

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación in vitro de hongos entomopatógenos como  
agentes potenciales para el control de *Dysdercus  
peruvianus* Guérin-Méneville 1831 (Hemíptera:  
Pirrhocoridae) plaga del cultivo del algodón**

**TESIS**

para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y  
Parasitología

**AUTOR**

Francesca Falconi Agapito

**Lima-Perú**

**2009**

*A mis padres, Jesús y Pilar, que a ellos les debo cuanto soy;  
a Papá que siempre me enseñó que nunca hay cosas  
inalcanzables y no existe la palabra imposible,  
a mamá por tu amor, sacrificio, entrega  
y determinación.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme fuerzas para salir adelante después de cada tropiezo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por el soporte institucional brindado para la realización del presente trabajo.

Al PhD Pedro Luis Castellanos Sánchez, por su incondicional guía a través de todo este proceso; sin su conocimiento, paciencia y apoyo el desarrollo de esta investigación no habría tenido éxito.

A la Bióloga Nicolaza Pariona por sus sugerencias realizadas y por facilitarme la cepa de *Beauveria sp.* empleada en el presente trabajo.

Al Biólogo Enrique Torres por su apoyo en el análisis estadístico y sugerencias en el presente trabajo.

Al Ing. Carlos Torres Limache por su apoyo en la búsqueda bibliográfica para la crianza de los insectos.

Al Biólogo Aldo Flores Pérez por su participación activa y brindarme su apoyo incondicional, alentándome en cada paso de la realización del presente trabajo.

A los MV. Juan Carlos Chunga y Sofía Bernedo Llerena, por su apoyo y comprensión en el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos Estela Memenza y José Bustamante que por medio de las discusiones, preguntas y sugerencias.

A mi familia que me apoyó anímica y moralmente durante la realización de mi carrera y del presente trabajo y me impulsaron a dar siempre lo mejor de mí.

A mis hermanas Fabiola, Sol – Sol y Ofelia, por su amor, compañía y apoyo. Porque se que siempre cuento con ellas.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la presente investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

## INDICE

### RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	6
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV.	RESULTADOS	34
V.	DISCUSIÓN	39
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIONES	45
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
IX.	ANEXOS	54

## RESUMEN

La especie *Dysdercus peruvianus* comúnmente conocido como “arreatado” constituye una de las plagas de mayor importancia en el cultivo del algodón debido a que ocasiona pérdidas estimadas en un 16% en el Perú. El objetivo del presente trabajo fue aislar y evaluar cepas de hongos entomopatógenos como agentes potenciales para el control del “arreatado” en condiciones de laboratorio. Se aislaron 7 cepas de mohos: 6 de *Acremonium sp.* y 1 de *Scopulariopsis sp.*, a partir de insectos adultos infectados naturalmente en el campo de *D. peruvianus* de la localidad de Mala Provincia de Cañete. Para determinar la patogenicidad y virulencia sobre *D. peruvianus* de las cepas aisladas se seleccionaron una del género *Acremonium* y una de *Scopulariopsis*. Además se evaluó una cepa de *Beauveria sp.* proveniente de *Schistocerca piceifrons peruviana* (Orthoptera). Los bioensayos se realizaron sobre ninfas del 4to estadio de *Dysdercus peruvianus* y las concentraciones de conidias empleadas fueron  $3.7 \times 10^8$ ,  $1.9 \times 10^8$ ,  $9.4 \times 10^7$  conidias/mL para *Beauveria sp.*, *Acremonium sp.* y *Scopulariopsis sp.* respectivamente. Con estas concentraciones se encontró que el porcentaje de mortalidad a los 20 días post tratamiento fue de 83.3%, 80% y 23.3% para *Beauveria sp.*, *Acremonium sp.* y *Scopulariopsis sp.*, respectivamente. La cepa *Beauveria sp.* fue la que presentó mayor virulencia sobre *D. peruvianus* al alcanzar el mayor porcentaje de mortalidad (83.3%), mientras que la cepa *Acremonium sp.* fue la mas agresiva sobre el insecto, ya que el tiempo de letalidad para el 50% ( $TL_{50}$ ) de la población tratada fue de solo 3.8 días. El hongo *Scopulariopsis sp.* a la concentración de conidias evaluada solo presentó una mortalidad de 23.3% sobre ninfas del cuarto estadio del “arreatado”.

## ABSTRACT

The specie *Dysdercus peruvianus* commonly know as “cotton stainer” constitute one of de plagues of great importance in the cultivation of cotton because it cause losses estimated in 16% in Peru. The objective of this study was to isolated and to evaluated strains of entomopathogenic fungi as potential agents to the control of the “cotton stainer” under laboratory conditions.

From the “cotton stainer” *D. peruvianus* (Hemiptera: Pirrhocoridae) naturally infected in the field, it were obtained 6 strains from *Acremonium sp* and 1 from *Scopulariopsis sp.* to determinate the pathogenicity and virulence on *D. peruvianus* one strain from genus *Acremonium* and another from *Scopulariopsis* were selected. Besides was tested an isolated from *Beauveria sp.* obtained from *Schistocerca piceifrons peruviana* (Orthoptera).

Bioassays were performed on fourth instar nymphs of *Dysdercus peruvianus* and the conidial concentrations used were  $3.7 \times 10^8$ ,  $1.9 \times 10^8$ ,  $9.4 \times 10^7$  conidia/mL to *Beauveria sp*, *Acremonium sp* and *Scopulariopsis sp* respectively. At these concentrations was found that the mortality percentage at twenty days after treatment was of 83.3%, 80% and 23.3% to *Beauveria sp*, *Acremonium sp* and *Scopulariopsis sp* respectively. The strain *Beauveria sp* showed more virulence against *D. peruvianus* since it reached the highest mortality (83.3%), whereas the strain *Acremonium sp* was the most aggressive on the insect, because when the lethality time was determined for the 50% (LT50) of the locust population, it needed only 3.8 days The fungus *Scopulariopsis sp.* to the concentration of conidia tested did not show an important mortality against the fourth instar nymphs of the “cotton stainer”.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1.- IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.

El algodón ha sido tradicionalmente la materia prima de mayor utilización en la industria textil. La producción mundial para el periodo 2004/2005 fue de 21 millones de toneladas, de las cuales el 24.1% correspondió a la producción de China y 19.3% a USA, le siguen en importancia las producciones de India (15.8%), Pakistán (9.3%), Brasil (4.9%) y Uzbekistán (4.3 %). (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2006).

La producción de algodón en el Perú fue de 213, 385 toneladas en el año 2006, con un área cultivada en el periodo 2005-2006 de 50, 460 Has durante los meses de agosto a diciembre. (Ministerio de Agricultura del Perú, Febrero 2007).

Se prevé un incremento de la demanda mundial de algodón, lo que dará lugar a un aumento de la producción para el próximo decenio. Según las proyecciones, la producción de algodón aumentará en 1,5 por ciento anual en el actual decenio, hasta llegar a 23,1 millones de toneladas para 2010. En ese contexto, América Latina crecería a una tasa del 2.1 % anual con Brasil como principal país productor (Posse, 2005).

El Perú produce 225, 282 toneladas (periodo 2007 – 2008) de algodón con cinco variedades de algodón: Tangüis, Pima, Supima, Del Cerro y Aspero, de las cuales las dos primeras representan en conjunto el 90% de la producción algodонера nacional. El algodón se cultiva en la costa y en la selva, desarrollando básicamente la especie *Gossypium barbadense*. La variedad Pima es la de mayor exportación con aproximadamente el 75% del total exportado, la variedad Tangüis se exporta menos, debido al elevado consumo interno de parte de la industria textil (Ministerio de Agricultura del Perú, 1999).

En la región costera se tiene dos zonas bien definidas: la costa central que comprende los valles del Río Santa hasta el valle de Nazca en que se cultiva la variedad TANGUIS, y la zona algodonera de la costa norte que comprende los valles del departamento de Piura que produce la variedad PIMA. En la Selva se cultiva el algodón de tipo ecológico o también llamado orgánico (variedad Tanguis o Pima), no se utiliza variedades transgénicas, ni fertilizantes químicos (Ministerio de Agricultura del Perú, 2001).

En nuestro país, el cultivo del algodón es atacado por numerosas plagas, siendo la de *Dysdercus peruvianus* “arreatado” una de las de mayor importancia; que ocasiona pérdidas estimadas en un 16% (Beingolea, 1973). En 1992, Sarmiento señala que el arreatado causa daños en el 60% del área y que en años de fuerte migración causa pérdidas mayores del 30% de las cosechas. El Instituto de Valle Grande de la Provincia de Cañete ha establecido una Matriz de Plagas donde se indica que un número de 0.24 individuos del arreatado por planta, produce un porcentaje de daño en las bellotas de hasta 4% (Rojas, 2005). En la región de Lambayeque en un monitoreo permanente de la plaga, se registraron en el año 2005 de 2% a 8 % de bellotas dañadas por arreatado; mientras que en el año 2006 el daño de las bellotas varió de 5% a 30% (Síntesis Agrario Lambayecano 2005, 2006).

Sin embargo, el “arreatado” en los valles algodoneros de la Costa central tiene una incidencia más limitada que en los valles de la Costa Norte, además, suele presentarse infestaciones económicamente importantes en las siembras atrasadas, donde la población de este insecto puede causar un cierto porcentaje de bellotas “acocopadas” (Herrera, 2004).

El control químico es el método más utilizado en el Perú para eliminar al arreatado en el Perú. Primero se empleó el hexacloruro de benceno que resultó ser bastante efectivo y además era de bajo costo; pero su uso continuado, trajo consigo el incremento de otras plagas que adquirieron carácter primario como *Heliothis* y otros perforadores (*Platinota*, *Argyrotaenia*, *Mescinia*, *Pococera*), *Bucculatrix*, “arañita roja” y finalmente *Pseudococcus*, de efectos desastrosos (Lamas, 1980). El *Dysdercus* llegó a adquirir resistencia al hexacloruro de

benceno, por lo que fue reemplazado por el insecticida Sevin (carbaryl), que sigue siendo utilizado parcialmente hasta la fecha; sin embargo en la actualidad, debido a la resistencia de los insectos a los productos químicos, se requiere aplicar en mayores dosis, para mantener la población en un nivel bajo (5 a 10 individuos por 100 plantas), lo que ocasiona el descontrol de las otras plagas del algodón; por muerte de sus enemigos bióticos (Aguilar y Lamas, 1980).

La necesidad de optar por alternativas de control de plagas, ha determinado la orientación de la investigación hacia el uso de bioinsecticidas, dentro de los que se encuentran los hongos entomopatógenos, siendo una las principales especies *Beauveria bassiana* (Cabrera-La Rosa y Pinedo, 1994).

## **1.2.- JUSTIFICACIÓN**

El arrebatiado *Dysdercus peruvianus* Guerin es actualmente una de las plagas más importantes que afecta el cultivo del algodón. Los daños directos e indirectos ocasionados por esta especie generan pérdidas a los agricultores, principalmente por la mancha de la fibra y la caída, y apertura prematura de las bellotas.

El manejo integrado es la forma más racional de luchar contra los insectos plaga, consiste en la combinación e integración de todas las técnicas disponibles (control cultural, la resistencia varietal, el control biológico y control químico) para aplicarlas en forma armoniosa y mantener estos insectos en niveles que no produzcan daño de importancia económica a los cultivos (Bellotti *et al.* 2002).

En el Perú, para el control biológico del arrebatiado se han ensayado predadores y parasitoides, que no han mostrado resultados satisfactorios, tal es el caso de las moscas *Acaulona peruviana* y *Paraphoranthia peruviana* que no registran mayor disminución de las poblaciones del insecto (Wille 1958); debido a que no todas las plagas poseen enemigos biológicos eficientes. Sin embargo el control biológico del arrebatiado usando hongos entomopatógenos puede proveer una alternativa de control a la plaga; reforzada por reportes que indican que los hongos entomopatógenos son capaces de infectar especies del Orden Hemíptera y causar una alta mortalidad (Lecuona *et al.*, 2001; Thara *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002) y

además por el hecho de que este insecto es susceptible a infecciones fúngicas bajo condiciones de laboratorio (Lupuche, 1997).

Con el aislamiento de hongos entomopatógenos se busca un mejor control de esta plaga limitando el uso indiscriminado de químicos que si bien han permitido un control eficaz de la plaga se conoce que estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas. Se ha comprobado el alto poder patógeno de los hongos eliminando altas densidades poblacionales y de poseer ciertas propiedades como: poder multiplicarse, conservarse de manera económica, mecanismo de acción por penetración de la cutícula del huésped haciendo más efectiva la forma de infección, ser más selectivos que los productos químicos y que su aplicación es similar al del equipo de rociamiento con insecticidas. Por estas razones se hace necesario su estudio, en primer lugar, a nivel de laboratorio llevando a cabo aislamientos de hongos entomopatógenos, evaluando su patogenicidad, con la finalidad de estandarizar las condiciones para el uso de estos bioinsecticidas en el campo, ya que se conoce que los hongos son influenciados por las condiciones climáticas y biológicas del lugar, como son principalmente humedad y temperatura. Por ello esperamos que en un futuro próximo puedan ser llevados a producción en gran escala y emplearlos como un bioinsecticida comercial en las zonas aldoneras del país disminuyendo así costos de producción y evitando la contaminación ambiental.

Considerando lo anteriormente mencionado se fijaron los siguientes objetivos para el desarrollo del presente trabajo:

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar tres cepas de hongos: el hongo *Beauveria sp* cepa PR-11 (Ayacucho) y dos cepas de hongos aislados de *Dysdercus peruvianus* de la localidad de Mala, como agentes potenciales para el control de *D. peruvianus* "arrebataado" plaga del cultivo del algodón.

### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar hongos nativos a partir de insectos muertos de *Dysdercus peruvianus* procedentes de la localidad de Mala, provincia de Cañete.
- Seleccionar hongos nativos entomopatógenos.
- Evaluar la capacidad biocida de dos hongos aislados de *Dysdercus peruvianus* de la localidad de Mala sobre las ninfas de 4<sup>to</sup> estadio de *Dysdercus peruvianus*.
- Evaluar la capacidad biocida de *Beauveria* sp cepa ABvPr-11 (Ayacucho) sobre ninfas de 4<sup>to</sup> estadio de *Dysdercus peruvianus*.
- Determinar el tiempo de letalidad (TL50 y TL80) de las cepas de hongos evaluados.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. *Dysdercus peruvianus*.

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica de *Dysdercus peruvianus*.

Reino	: ANIMALIA
Phylum	: ARTHROPODA
Clase	: HEXAPODA
Orden	: HEMIPTERA
Sub orden	: HETEROPTERA
Super familia	: LYGAEOIDEA
Familia	: PYRRHOCORIDAE
Género	: <i>Dysdercus</i>
Especie	: <i>Dysdercus peruvianus</i> (GUERIN- MÉNEVILLE 1831)

#### 2.1.2. Distribución:

En el Perú su hábitat permanente es la región comprendida a lo largo de los Andes Peruanos, desde Piura (4° LS) hasta el valle de Chaparra (16° LS) (Caraveli-Arequipa) a altitudes de 800 a 2 500 msnm. Desde éstas áreas migran a los valles algodoneros llegando hasta el nivel del mar. Las áreas de mayor incidencia son los valles del norte desde Huaura hasta Piura. En la costa central y

sur su incidencia es más limitada, aunque suelen presentarse infestaciones económicamente importantes (Sarmiento, 1992).

### **2.1.3. Ciclo de vida:**

*Dysdercus peruvianus* presenta una metamorfosis gradual, pasando por tres estados de desarrollo: huevo, ninfa y adulto (ver anexo).

**2.1.3.1. Huevo:** son ovals, blancos cuando son recién puestos, luego gradualmente se tornan amarillos hasta el momento de la eclosión que presentan color naranja. Miden 0.5 mm de diámetro (Sarmiento, 1992).

**2.1.3.2. Ninfas:** Presentan 5 estadios ninfales. Las ninfas recién nacidas son de color anaranjado pero a medida que crecen son de color rojo claro. Presentan sobre el abdomen líneas blancas transversales y las alas van desarrollándose paulatinamente hasta que alcanzan el estado adulto (Sarmiento, 1992).

**2.1.3.3. Adulto:** Son de color amarillo, anaranjado o rojizo con o sin la extremidad posterior de los hemiólitros que cuando existen son negros. El adulto llega a medir hasta 13 a 14 mm de largo por 3.5 a 4.5 mm de ancho. La hembra es de mayor tamaño que el macho (Sarmiento, 1992).

### **2.1.4. Hábitos (Sarmiento, 1992).-**

El arrebiatado, debido al amplio rango de plantas hospedadoras, se reproduce durante todo el año sea en los campos de algodónero o en la vegetación silvestre de las lomas y contrafuertes andinos.

Los adultos maduran sexualmente en 2 a 3 días y entran en cópula, quedando en una posición característica unidos por sus extremos abdominales; de allí el nombre de "arrebiatado", "raboatado", o "culi-culi". La cópula dura varias horas y pueden copular varias veces en un periodo de vida de 8 a 10 semanas. La hembra inicia la oviposición a los diez días, depositando un total de 300 a 500 huevos en

seis a ocho posturas durante un periodo de 30 a 45 días. Las posturas son colocadas en el suelo en grupos de 50 a 60 al pie de la planta, debajo de la hojarasca o de terrones. También dejan sus posturas sobre las bellotas abiertas.

Los primeros estadíos ninfales viven reunidos en enjambres sin alimentarse de bellotas ni semilla de algodón debido a que la trompa no es lo suficientemente larga ni fuerte. A partir del tercer estadío, empiezan a dispersarse sobre las bellotas y motas pudiendo recién perforar los carpelos de las bellotas, especialmente las chicas. Las ninfas más desarrolladas y los adultos pican bellotas grandes para succionar el contenido de la semilla o pueden hacerlo directamente sobre las motas que están en la planta o en el suelo.

Se considera que existen dos tipos de poblaciones de este insecto, en primer término, la denominada “población remanente” que corresponde a los individuos que pasan de una campaña a otra dentro de los mismos campos de cultivo, alimentándose sobre los residuos de algodón o semillas que quedan en el suelo y/o sobre las malezas que crecen en los campos o acequias. El segundo tipo es la llamada “población migratoria” constituida por individuos que se reproducen en las zonas altas de los valles, alimentándose sobre malváceas y bombacáceas silvestres que vegetan en los contrafuertes andinos de la costa norte, en las malváceas de las “lomas” de la costa central y en las quebradas de las cabeceras de valles.

#### **2.1.5. Ecología (Sarmiento, 1992).-**

Según Wille el desarrollo del arrebiatado como plaga agrícola depende del clima y de otras condiciones bio-ecológicas del ambiente. En observaciones realizadas, se ha demostrado que las gradaciones del arrebiatado dependen del clima de los meses de primavera (Setiembre a Diciembre) en especial de la insolación y de la nubosidad. Así tenemos, que en primavera con baja insolación y alta nubosidad el arrebiatado desarrolla como una plaga agrícola en verano y otoño, mientras que las primaveras con fuerte insolación y baja nubosidad matan y eliminan el arrebiatado de los campos. El alimento constituye un factor decisivo en el desarrollo de poblaciones debido a que requiere de aceite para su reproducción, el

cual es obtenido en mayor grado, en la semilla de algodón. En ausencia de aceite, la reproducción se reduce fuertemente limitando el incremento de poblaciones remanentes en los valles. En las zonas de hábitat natural el arrebiado también se incrementa en función a la abundancia de plantas hospedadoras como *Bombax discolor* “payaso” y *Urocarpidium peruvianum* “urocarpidium”. Finalmente la presencia de *Gossypium barbadense* “algodón” y *Sidastrum paniculatum* “pichana” en las partes altas de los valles o en las quebradas constituye uno de los factores decisivos en la abundancia de poblaciones migratorias.

#### **2.1.6. Daño.-**

Este insecto pica y chupa brotes terminales y hojas de donde extrae jugos para alimentarse, siendo el órgano preferido para su alimentación las bellotas de cualquier edad, de donde extrae el aceite de las semillas. Como consecuencia se produce la caída y mal formación de las bellotas chicas, mientras que en bellotas medianas y grandes provoca endurecimiento y coloración anormal de las zonas picadas, mancha la fibra (“cocopa”) y provoca su apertura prematura (Herrera, 2004).

#### **2.1.7. Características de *Dysdercus peruvianus* que lo sitúan como especie plaga del algodón**

Las características que presenta este insecto son las siguientes (Lamas, 1980):

- Su amplia distribución geográfica ayudada por la presencia de especies vegetales que, además del algodón, en especial otras malváceas, bombacáceas, solanáceas, le sirven de alimento y permiten su reproducción de forma masiva.
- Amplitud de su radio de vuelo, dando lugar a desplazamientos o migraciones, desde las quebradas de la vertiente occidental a los cultivos de algodón en los valles.
- Rápido desplazamiento de un campo a otro o de una zona a otra dentro de un valle.

- Carencia de controladores biológicos (parásitos o predadores) que produzcan un porcentaje de mortalidad significativa.
- Gran resistencia a condiciones desfavorables del medio ambiente (clima, falta de alimento), pudiendo sobrevivir por tiempo prolongado en condiciones de ayuno extremo.
- Se requiere mantener la plaga a un nivel de infestación muy bajo (5 a 10 adultos por 100 plantas o matas) durante todo el periodo de fructificación, para que los daños que produzca a la cosecha (“cocopa” o pudrición de la bellota) sean lo menos posibles.
- Requiere de dosis letales altas de insecticidas, especialmente órgano-sintéticos, para su eliminación.
- Debido a su control químico, se debe de afrontar los problemas derivados del incremento de otras plagas que quedan biológicamente descontroladas.
- Capaz de desarrollar resistencia genética a la acción tóxica de insecticidas químicos.

### **2.1.8. Control de *Dysdercus peruvianus***

Tradicionalmente el control de las plagas consistía únicamente en aplicar insecticidas y matarlas, en la actualidad debe hablarse de “Manejo de Plagas”, que implica un conjunto de acciones para la toma de decisiones que considera todo el Ecosistema (Interacción entre todos los organismos de un “área” y su ambiente), con la finalidad de determinar los mejores métodos que deben emplearse para el control de las plagas agrícolas. Se han diseñado tácticas para un uso mínimo de plaguicidas químicos con el fin de mantener el equilibrio biológico natural, tales como buenas prácticas culturales, reglamentación de cultivos y fomento del control biológico.(Herrera , 2004).

#### **2.1.8.1. Control cultural (ver anexo).**

El control cultural incluye una serie de medidas tendientes a lograr un control temprano del “arreatado remanente” antes de que aparezcan los órganos fructíferos (Herrera, 2004). Comprende:

- a. Reglamentación del cultivo, de las fechas límites de matada, poda y quema de la broza, y fijación de un periodo de siembra lo mas estrecho posible, consiguientemente de la observancia de un periodo de campo limpio o por lo menos de no disponibilidad de órganos fruteros, y conseguir una fructificación y apertura de bellotas en un periodo lo mas corto y uniforme.
- b. Eliminación de motas que queden después de la cosecha (“peluseo”) así como los sobrantes de semilla que queden después de la siembra.
- c. Eliminación continua de hospederos alternantes durante el periodo de campo limpio.
- d. Frecuentes recojos a mano de ninfas, adultos y eliminación sistemática de los primeros.

#### **2.1.8.2. Control químico (ver anexo).**

En lo que respecta al control químico del arrebiatado, en la actualidad es realizado con insecticidas de corta residualidad y químicamente selectivos. Con el control dirigido se tratan los focos de infestación, a través de una fumigación eficiente, antes que se generalice la infestación (Conabio, México, 2004).

El carbaril es muy usado por los agricultores contra el arrebiatado en la preparación de trampas que consiste en semillas de algodón mezcladas con aceite crudo de pepas de algodón y el insecticida (Sánchez, 2004).

Juan M. Herrera (2004), recomienda para la eliminación del “arrebiatado remanente” la aplicación de cebos tóxicos a base de semilla de algodón y un insecticida. Para las poblaciones de migración no queda otra alternativa que la aplicación de insecticidas orgánicos sintéticos en aspersión o espolvoreos. El número de aplicaciones estará supeditado a la frecuencia de las migraciones y al estado vegetativo del cultivo (Sarmiento, 1992).

#### **2.1.8.3. Control biológico (ver anexo).**

El Control Biológico del arrebiatado en el Perú consiste en el empleo de parasitoides y predadores, sin embargo tienen una influencia muy limitada, por lo

cual su importancia como factor de regulación de la población es muy reducida (Herrera, 2004).

El parasitismo por moscas de la familia Tachinidae: *Acaulona peruviana* y *Paraphoranthra peruviana* es considerado ineficiente, sobre todo durante las épocas de migración, aunque durante el invierno las moscas pueden ejercer un buen control sobre la población del "arreatado"; sin embargo la acción de estos parásitos es muy lenta y su efectividad depende de muchos factores climáticos y ecológicos que son muy difíciles de controlar (Bagley 1958).

Por otro lado también se mencionan las aves predatoras como parte del control biológico del arreatado: *Crotophaga sulcirostris*, de la familia Cuculidae y *Athene cunicularia* de la familia Strigidae; sin embargo este control al igual que el de los parasitoides es muy limitado.

Stadler y Schang en 1992, analizaron los porcentajes de infestación en diferentes poblaciones de *Dysdercus albofasciatus* provenientes del bosque xeromórfico subclimático de Baradero, Argentina, entre 1985 y 1989, los resultados oscilaron entre 7,0% y 66,0%, con un valor medio de infestación del 27,6%. Las poblaciones de *Acaulona brasiliensis* muestran una acentuada distribución agregada ("patchiness") que es la principal responsable de la marcada variabilidad en los porcentajes de infestación observados en las poblaciones naturales.

Estrada y García en 1996, evaluaron la resistencia tipo antibiosis contra *Dysdercus peruvianus* de siete variedades de algodón: Deltapine, Coker, Torpe, Auburn, Sudan, Glandless y Tanguis; resultando favorables al insecto las variedades Sudan y Tanguis al reducir el periodo ninfal, causar baja mortalidad e incrementar la oviposición, las variedades Torpe y Auburn incrementaban el peso de las hembras, la oviposición y la fertilidad, mientras que la variedad Glandless causó baja mortalidad. Los efectos desfavorables al insecto fueron en mayor grado por la variedad Deltapine en la que se registró alta mortalidad, alargamiento del periodo ninfal, y reducción en el peso, oviposición y fertilidad.

#### **2.1.8.3.1. Control microbiológico (ver anexo).**

En el Perú uno de los trabajos más recientes en el control del “arreatado” mediante el aislamiento de microorganismos endógenos, logrando obtener 5 cepas bacterianas y 4 cepas fúngicas es el de Lupuche en el año 1997. Las bacterias ejercieron su actividad a partir del cuarto día después de la inoculación, obteniendo mayores porcentajes de mortalidad para el caso de los primeros estadios ninfales y el estadio adulto, con valores máximos de alrededor de 40% para el caso de adultos. La actividad entomopatógena de los hongos también se registró a partir del cuarto día después de la inoculación con valores máximos alrededor del 33% de mortalidad para el caso de adultos.

Dentro del orden Hemiptera, al cual pertenece *Dysdercus peruvianus*, se encuentran además numerosas plagas de gran importancia tanto en salud pública como en agricultura sobre las cuales se vienen realizando trabajos de investigación para su control empleando hongos entomopatógenos.

Thara *et al.* en el 2001 realizaron un screening de hongos entomopatógenos contra *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae), los resultados mostraron que las cepas de *Metarhizium sp.* fueron relativamente más virulentas que las de *Beauveria sp.* Los valores mínimos de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) fueron obtenidos de una cepa de *Metarhizium anisopliae* FRM515, siendo la concentración de  $6 \times 10^4$  conidias/ml. Cuando la suspensión usada fue de  $1 \times 10^7$  conidias/ml, el valor de tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) del aislamiento fue de 4.9 días.

Liu *et al.* en el 2002 evaluaron la patogenicidad de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y otros hongos entomopatógenos sobre ninfas del segundo estadio de *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), en el que registraron mortalidades en el rango de 35 a 98%, con valores de CL<sub>50</sub> para las cepas más patogénicas de  $0.8$  a  $5.0 \times 10^5$ , los valores de TL<sub>50</sub> registrados fueron de 6.0 a 6.9, 3.1 a 5.1, y 2.5 a 4.0 días para concentraciones de  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  conidias/ml, respectivamente.

Luz *et al.* en el 2004 evaluaron hongos de la especie *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre ninfas del tercer estadio de *Triatoma infestans*,

encontrando que las cepas de *Metharhizium anisopliae* evaluadas produjeron una mortalidad del 100% a los 15 días después del tratamiento, mientras para el hongo *Beauveria bassiana* se registró una mortalidad acumulada que varió de 10% a 60%, dependiendo de las cepas, a los 20 días después del tratamiento.

## **2.2. Generalidades de los hongos entomopatógenos**

Los hongos microscópicos fueron los primeros patógenos de insectos en ser empleados como control microbiano. Aproximadamente 80% de las enfermedades de insectos tienen como agentes etiológicos a los hongos, la ocurrencia de estos hongos en condiciones naturales, tanto enzoótica como epizóticamente es un factor importante en la reducción de las poblaciones de plagas (Alves, 1998). La mayoría de los hongos entomopatógenos presentan crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos, sin embargo algunas especies no producen crecimiento superficial o producen muy poco. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, en particular, alta humedad relativa (óptima para germinación, por encima de 95%) y temperatura (entre 20 y 30° C) adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada and Kaya 1993, citado por Aleán, 2003).

### **2.2.1. Modo de acción de los hongos entomopatógenos**

Los hongos son patógenos de amplio espectro, pueden infectar diferentes estadios de desenvolvimiento del hospedero, como huevos, larvas, pupas y adultos, siendo esta característica la más deseable y peculiar. La mayoría son altamente especializados en la penetración vía tegumento, que los coloca en ventaja cuando son comparados con otros grupos de patógenos que solo ingresan al insecto por vía oral, penetrando a través del mesenterio (Alves, 1998). Estudios realizados por Alves en 1998 indican que los hongos penetran la cutícula de los insectos originando dos procesos: uno físico debido a la presión de las hifas que rompen áreas membranosas y poco esclerotizadas; y otro químico, por la elaboración de enzimas que degradan la cutícula.

La muerte del insecto ocurre por acción de micotoxinas, el rompimiento de tejidos, bloqueo mecánico del aparato digestivo y otros daños físicos por desarrollo de micelio (Cabrera-La Rosa y Pinedo, 1994).

El proceso de desarrollo de la enfermedad puede ser dividido en 10 pasos (Roberts y Humber, 1984; Hajek y St Leger, 1994).

- 1. Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto.** Para penetrar el integumento externo del hospedero la conidia debe adherirse a la superficie cuticular. La interacción entre la conidia y la cutícula depende de las sustancias mucilaginosas que rodean la conidia, las enzimas; además de la conformación morfológica del integumento que favorece la germinación de la conidia. Las conidias pueden adherirse al azar de acuerdo a los pliegues intersegmentales o a la rugosidad de la superficie de la cutícula (Fargues, 1984).
- 2. Germinación de la conidia en la cutícula del insecto.** La germinación ocurre dentro de un mínimo de 12 horas siendo necesaria una humedad relativa alta (mayor al 90 %). Fisiológicamente, la germinación de la conidia es el retorno a la actividad o metabolismo vegetativo (Bartinicki-Garcia, 1984). Morfológicamente la germinación es la emergencia de la célula vegetativa de una conidia, en forma de un tubo germinativo que crece sobre la superficie cuticular formándose un apresorio o penetrando directamente a la cutícula (Fargues, 1984; Martinicki-Garcia, 1984). La célula apresoria le permite adherirse a la superficie cuticular.
- 3. Penetración de la cutícula.** La penetración se produce por un sistema enzimático de lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora (Roberts y Humber, 1984; Gonzáles et al., 2001). Las enzimas tiene un efecto específico sobre cada uno de los componentes de la cutícula, así la epicutícula o capa más externa, formada por lípidos (ácidos grasos y parafina) es desintegrada por las lipasas, la quitinasa desintegra la quitina, sustancia que confiere resistencia y dureza a la cutícula. Asimismo, las proteínas presentes en la cutícula son

desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo (Torres et al., 1993).

4. **Crecimiento del hongo en el hemocele.** El hongo crece en el hemocele formando cuerpos hifales levaduriformes o blastosporas, que se multiplican por gemación (Roberts y Humber, 1984; Hajek y St Leger, 1994).
5. **Producción de toxinas.** Las toxinas producidas por los hongos entomopatógenos son las responsables de la mortalidad del hospedero. Según Hajek y St Leger (1994), el rápido desarrollo del hongo indica que la muerte del insecto ocurre por el crecimiento vegetativo (ruptura de áreas membranosas o esclerotizadas) produciéndose altos niveles de micosis, mientras que la muerte rápida (48 horas o menos) es atribuida a la producción de toxinas (Roberts y Humber, 1984), permitiendo que otros organismos invadan el hemocele lo que produce un crecimiento reducido del hongo dentro del hospedero (Roberts y Humber, 1984; Kershaw et al., 1999).
6. **Muerte del insecto.** Esto puede ser antecedido por cambios en el comportamiento del insecto, como contracciones y pérdida de coordinación (Roberts y Humber, 1984).
7. **Desarrollo de la fase micelial.** En esta fase aparecen pequeñas manchas melanizadas en los sitios de infección, observándose en algunos casos una coloración rojiza en el insecto hospedero. Estos insectos sirven de reservorio para los hongos durante periodos de condiciones adversas.
8. **Emergencia del micelio hacia el exterior.** En condiciones de baja o moderada humedad relativa, el hongo continúa en el insecto sin embargo, con alta humedad el hongo crece a través de la cutícula.
9. **Producción de unidades infectivas.** El metabolismo del hongo se reduce, formándose las unidades infectivas o conidias.
10. **Dispersión de las unidades infectivas.** Esto sucede por medio del agua o del viento.

## **2.3. Características del género *Beauveria* (Bálsamo) Vuillemin**

### **2.3.1. Clasificación taxonómica**

Agostino Bassi fue el primer científico en demostrar en 1935 que *Beauveria bassiana* afectaba al gusano de seda *Bómbix mori*. A partir de este momento se han descrito varias especies de *Beauveria*, según sus características morfológicas y genéticas, tales como *B. bassiana*, *B. brogniartii*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* y *B. calendonica* (Glare e Inwood, 1998), sin embargo las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *B. brogniartii* (De Lacroix) Siemszko.

La clasificación taxonómica de *Beauveria sp.* es la siguiente:

Reino : FUNGI  
División : MYCOTA  
Subdivisión : EUMYCOTINA  
Clase : DEUTEROMYCETES  
Subclase : HYPHOMYCETES  
Orden : MONILIALES  
Familia : MONILIACEAE  
Genero : *Beauveria*

### **2.3.2. Descripción morfológica.**

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco, las fiálides están representadas por células con una región basal más voluminosa en el que se organizan los conidióforos, densamente agrupados en espirales o solitarios. Las conidias globosas, ovoides, cilíndricas, verrugosas curvadas o no, aparecen sobre las fiálides que pueden ser simples, con algunas ramificaciones en la parte superior o zigzageante. *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5  $\mu\text{m}$ ) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Alves, 1998).

### **2.3.3. Distribución en el Perú**

En el Perú, Torres et al. (1993), colectaron cepas de *Beauveria sp.* provenientes de diferentes zonas. En la costa (0 a 800 m.s.n.m.) colectaron adultos del “gorgojo

del camote” *Euscepes postfasciatus* (Coleoptera: Curculionidae), en la sierra alta (3000 a 4000 m.s.n.m.) colectaron adultos del “gorgojo de los Andes” *Premnotrypes spp* (Coleoptera: Curculionidae), en la Selva alta (0 a 800 m.s.n.m.) colectaron adultos de *Diabrotica sp* (Coleoptera: Chrysomelidae), todos infectados con *Beauveria spp*.

#### **2.3.4. Antecedentes de la actividad entomopatógena de *Beauveria sp***

Cabrera-La Rosa y Pinedo (1994) evaluaron una formulación comercial del hongo *B. bassiana* para el control del “gorgojo de la chupadera” *Eutinobothrus gossypii* (Coleoptera: Curculionidae) plaga del algodón, encontrando que el insecto es susceptible a una dosis de 0.35% del producto, en condiciones de laboratorio; mientras que en el campo la eficacia del producto solo se presentó en plantas de algodón provenientes de semillas en las que se obtuvieron buenos resultados a la semana de aplicación, sin embargo en plantas provenientes de soca (brote de la planta de algodón cortada luego de la primera cosecha), la población de larvas no fue afectada por el producto.

Luz *et al* (1998) evaluaron diferentes cepas de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) a una HR cercana a la saturación y a 25 °C, registrando una mortalidad en ninfas del tercer estadio cercana al 100% a los 15 días después del tratamiento, asimismo se pudo notar en dicho estudio que los aislamientos de *B. bassiana* causaron una mortalidad más alta en comparación a los aislamientos de *M. anisopliae*.

Willoughby *et al* (1998) realizaron aislamientos de *B. bassiana* mediante el empleo de medios selectivos y evaluaron su virulencia sobre el “gorgojo de la raíz del trébol” *Sitona lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). Aislaron 3 cepas de *B. bassiana* identificadas como F267, F268 y F269. Las cepas F267 y F268 fueron empleadas en los bioensayos, empleando una alta concentración:  $10^{13}$  conidias/ha de cada cepa. La cepa con mayor patogenicidad fue F267, que mostró 100% de mortalidad de adultos a los 29 días después de la aplicación. Con F268, la misma aplicación resultó en solo 80% de mortalidad a los 48 días, sin embargo para este tiempo la mortalidad de los controles había alcanzado el 40%.

Lecuona *et al.* (2001), evaluaron 4 cepas de *B. bassiana* aisladas de Argentina (Bb 1, 10, 25 y 65) sobre ninfas y adultos de *T. infestans*. El porcentaje de mortalidad y TL<sub>50</sub> promedio registrado para las ninfas fue de 100% y 6.6 días para la cepa Bb1, 100% y 7.1 días para la cepa Bb10, 100% y 7.3 días para la cepa Bb25 y de 100% y 6.5 días para la cepa Bb65; mientras que los insectos adultos presentaron 98.3% y 5.4 días para la cepa Bb1, 100% y 4.8 días para la cepa Bb10, 75% y 5.4 días para la cepa Bb25 y 97.5% y 7.5 días para la cepa Bb65; de porcentaje de mortalidad y TL<sub>50</sub> respectivamente.

De la Rosa *et al.* (2002), evaluaron el efecto de 8 cepas de *B. bassiana* sobre larvas, pupas y hembras adultas de la "mosca de la fruta mexicana", *Anastrepha ludens* (Díptera: Tephritidae). La mortalidad de los estados inmaduros fue baja, de 2-8 % en larvas y 0% en pupas. Sin embargo, niveles muy altos de mortalidad fueron obtenidos para moscas adultas, con valores de 100, 98 y 98% para las cepas Bb16, Bb24 y Bb26, respectivamente. Los valores de CL<sub>50</sub> para las tres cepas evaluadas fueron de  $3.12 \times 10^6$  a  $9.07 \times 10^6$  conidias/mL. El TL<sub>50</sub> fue de 2.8, 3.7 y 4.2 días para las cepas Bb16, Bb26 y Bb24, respectivamente, con un promedio de TL<sub>50</sub> de 4.4 días para todas las cepas. El porcentaje máximo de esporulación registrado fue de 66.4 a 74.7% para las cepas mas virulentas.

Luna y Lecuona (2002), realizaron aislamientos de cepas de hongos entomopatógenos nativos a partir de tucuras *Rhammatocerus pictus* (Orthoptera: Acrididae) y de *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae), que se encontraban infectadas naturalmente en el campo, obteniendo 34 cepas de *B. bassiana* y 35 de *M. anisopliae* var. *acridium*. Una parte de las cepas obtenidas fueron evaluadas sobre *R. pictus* para determinar su patogenicidad y virulencia: 18 cepas de *M. anisopliae* y 14 cepas de *B. bassiana* obtenidas de *R. pictus*, 15 cepas de *B. bassiana* aisladas de *D. elongatus* y 13 cepas de la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA-INTA-Castelar- Argentina, (12 de *B. bassiana* y 1 de *M. anisopliae*) que fueron obtenidas sobre hospederos no ortópteros. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las cepas aisladas de tucuras así como algunos aislamientos provenientes de *Deuterocampta quadrijuga* (Coleoptera: Chrysomelidae), fueron patógenos sobre

*R. pictus*. Se seleccionaron 4 cepas de *B. bassiana* y 2 cepas de *M. anisopliae* var. *acridum* que mostraron mortalidad superior a 90% y sobrevivencia media entre 7,2 y 9,2 días. En relación a los aislamientos provenientes de tucuras, el 90% de las cepas de *B. bassiana* evaluadas provocaron una mortalidad superior al 80% sobre *R. pictus* en tanto que las cuatro cepas obtenidas del crisomélido *D. quadrijuga*, causaron 100% de mortalidad. Al registrar la mortalidad diaria causada por *B. bassiana*, determinaron que los insectos murieron entre los días 7,4 y 14,4, con una sobrevivencia media de 10,4 días.

Gallegos-Morales *et al.* (2004), aislaron 21 cepas de *Beauveria bassiana* a partir de adultos de "picudos" *Amphidees* spp (Coleoptera: Curculionidae), esporulados de la Sierra de Arteaga (México) de los cuales seleccionaron 4 cepas acorde a sus características de desarrollo y adaptación a la manipulación en el laboratorio. Las cuatro cepas seleccionadas mostraron mortalidad sobre picudos de la yema del manzano del complejo de *Amphidees* spp. Las cepas más eficientes fueron SAA-1 y HCA-2, con una CL<sub>95</sub> a los 13 días de  $5.2 \times 10^{10}$  y  $6.2 \times 10^{11}$ , respectivamente. De las concentraciones (dosis) evaluadas, la que arrojó mejores resultados fue la de  $1 \times 10^{11}$  conidias/ml, para las cepas SAA-1 y HCA-2.

Batta (2007) comparó el efecto de 2 cepas de *Beauveria bassiana* formulada y no formulada y su efecto biocida sobre *Scolytus amygdali* (Coleoptera: Curculionidae), los resultados obtenidos de ambas exposiciones indican que el tratamiento de adultos de *S. amygdali* con el hongo formulado presentó un porcentaje de mortalidad media mas alta cuando se comparó con el tratamiento del hongo no formulado. La mortalidad registrada fue de 81.2 a 100% a los 10 días después del tratamiento con el hongo formulado y de 66.7% de mortalidad a los 10 días después del tratamiento con el hongo no formulado.

## **2.4. Características de *Acremonium* sp.**

### **2.4.1. Clasificación Taxonómica**

Descrito por Link ex Fries en 1809

Reino : FUNGI

Phylum : ASCOMYCOTA

Subphylum : ASCOMYCOTINA  
Orden : HYPOCREALES  
Familia : HYPOCREACEAE  
Genero : *Acremonium*

#### **2.4.2. Descripción morfológica.**

El aspecto del hongo se caracteriza por presentar colonias con colores que varían desde blancas, rosadas o grises. Microscópicamente, los conidióforos son largos, delicados y casi de apariencia a un cabello. Conidias hialinas elípticas unicelulares que están dispuestas en racimos irregulares que nacen del extremo de los conidióforos, dando la apariencia a la superficie de la corteza cerebral. Comúnmente los racimos de conidias están separados cuando se realizan los montajes microscópicos. (Koneman *et al*, 1978; Barnett y Hunter, 1998).

#### **2.4.3. Antecedentes de la actividad entomopatógena de *Acremonium sp.***

Samson *et al* en 1988 incluyen a *Cephalosporium (Acremonium, Gams;1971)* como una especie entomopatógena junto con *Aspergillus, Beauveria, Fusarium, Metarhizium, Verticillium*.

Steenberg y Humber (1999), evaluaron el potencial entomopatógeno de especies de *Verticillium* y *Acremonium* contra *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Los hongos fueron aislados a partir de un rango de insectos hospederos y el aislamiento se realizó sobre medio artificial y luego del examen microscópico los hongos aislados fueron identificados como *Verticillium fisisporum, Verticillium psalliotae, Verticillium lamellicola* y especies de *Acremonium*.

Tippannavar *et al* (2006), reportaron la ocurrencia natural de un nuevo hongo entomopatógeno sobre el áfido de la caña de azúcar lo cual abre un nuevo camino para su control. Sorprendentemente el hongo pudo esparcirse sobre un área de 100 acres causando más del 90% del control de la plaga induciendo una espectacular epizootia. El hongo fue colectado de campos infectados y una vez puro el hongo fue identificado como *Acremonium zeylanicum* (Pech) Gams *et*

Evans. El hongo produce conidias en gran numero durante condiciones favorables, tales como alta humedad relativa (>90%) y temperatura optima (27° C). Las unidades infectivas del hongo penetran el cuerpo del hospedero a través de la cutícula y causa la muerte dentro de una semana. Estudios preliminares realizados por Sankeshwar y Dharwad sobre el comportamiento en campo de la utilización del hongo en el manejo del áfido de la caña de azúcar han indicado fuertes resultados positivos. Sin embargo, estudios detallados sobre diferentes aspectos del hongo tal como patogenicidad, comportamiento en campo, producción en masa, etc. aun están en progreso.

## **2.5. Características de *Scopulariopsis* spp.**

Descrito por Bainier, 1907

### **2.5.1. Clasificación Taxonómica**

Reino : FUNGI  
Phylum : ASCOMYCOTA  
Clase : EUASCOMYCETES  
Orden : MICROASCALES  
Familia : MICROASCACEAE  
Genero : *Scopulariopsis*

### **2.5.2. Descripción morfológica.**

El aspecto de las colonias es de una superficie polvorienta interrumpida por rugosidades radiales irregulares y son de un color marrón claro. Microscópicamente, el esterigma forma un penicilio ramificado (del Griego *scopula* = “escoba”) que sostienen largas cadenas de conidias en forma de limón. Conforme las colonias envejecen, las conidias son propensas a formar superficies rugosas (espinosa) (Koneman *et al*, 1978).

### **2.5.3. Antecedentes de la actividad entomopatógica de *Scopulariopsis* spp.**

Brooks y Raun (1965), aislaron más de 9 especies de hongos a partir de más de 200 insectos representantes de plagas del maíz. Los hongos fueron: *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*,

*Scopulariopsis* y *Mycoderma*. Ellos emplearon el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae), para evaluar la patogenicidad de los organismos fúngicos. *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* fueron las cepas recobradas mas patógenas. Para la fecha en que los autores realizaron este trabajo el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* no había sido reportado previamente a partir de insectos.

Li y Wu (1993) reportaron a *Aspergillus sp.*, *B. bassiana*, *Cephalosporium sp.*, *Crinula sp.*, *Chaetomium funicolum*, *Fusarium spp.*, *M. anisopliae*, *Penicillium sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Syngliocladium sp.*, y *Verticillium sp.* como hongos patógenos de Anoplophora sp (Coleoptera : Cerambycidae) (citado por Shimazu et al, 2002).

Narayanasamy y Yasodha (2004), reportaron el aislamiento de hongos entomopatógenos sobre adultos de lepidopteros plaga del arroz en la India. Ellos aislaron 3 cepas de hongos entomopatógenos: *Mucor hiemalis*, *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*) y *Scopulariopsis sp.*, a partir de *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae), *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Cretonotus gangis* (Lepidoptera :Arctiidae). Ellos aplicaron una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias/mL de los hongos aislados, resultando en una mortalidad de 60, 61.6 y 52.6 % para *S. incertulas*, *C. medinalis* y *C. gangis*, respectivamente.

Quesada-Moraga *et al* (2006), evaluaron la toxicidad de extractos de proteína soluble cruda en medio líquido de Adamek de 25 aislados fúngicos pertenecientes a las especies *Metarrhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y *Scopulariopsis brevicaulis* sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). De los extractos evaluados, dos correspondieron a *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana* mostraron mortalidades significativas cuando fueron aplicados sobre discos de hojas de alfalfa o incorporados artificialmente en la dieta. El extracto de la cepa de *M. anisopliae* 01/58-Su fue el más tóxico en las larvas de *S. littoralis*. En el ensayo sobre discos de hojas este extracto exhibió una fuerte toxicidad relacionada a la dosis y una fuerte actividad antialimentaria contra la larva. A concentraciones de 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  proteína/insecto, el extracto mostró

61.3, 96.6 y 100% de mortalidad, respectivamente. No solo el índice antialimentario estuvo relacionado a la dosis, sino que la mortalidad se incrementó significativamente con el tiempo de exposición. Los tiempos de exposición para la mortalidad al 50% fueron de 91.3 h y 62.1 h para 20 y 40  $\mu\text{g}$  proteína /insecto respectivamente.

Benoit *et al.* (2003), reportaron una nueva técnica para la recuperación *in vitro* de hongos entomopatógenos a partir de garrapatas. Este protocolo de aislamiento es un método modificado de patología de plantas, que involucra la esterilización de la superficie, disección, embebimiento de las secciones del cuerpo en agar y removimiento de los extremos de las hifas por subcultivos. Mediante este procedimiento ellos aislaron el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* a partir del contenido interno de la "garrapata de perro" *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), vector de la fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. La aplicación de este hongo sobre la garrapata produjo una marcada mortalidad confirmando la patogenicidad natural del hongo. Los autores estudiaron el balance de agua sugiriendo que el parasitismo fúngico promueve la muerte de la garrapata a través de la deshidratación por medio de una elevada aceleración de la velocidad de pérdida de agua e inhibiendo la salida de vapor de agua. También encontraron que variando los niveles de infección de *S. brevicaulis*, se puede restringir la distribución de la garrapata a hábitats específicos para mantener el balance de agua, esto tiene significancia epidemiológica. Derivando las curvas de velocidad y crecimiento de *S. brevicaulis*, *in vitro*, el hongo mostró preferencia por condiciones mesofílicas (24-26°C), un máximo crecimiento sobre medios (agar papa dextrosa, agar nutritivo y agar sangre) que contienen 0.1-1.0M NaCl. Concluyeron que la sangre rica en sales del hospedero, puede jugar un rol en la atracción del hongo para entrar y persistir dentro de la garrapata.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en el Bioterio y el Laboratorio de Parasitología Humana y Animal del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### 3.2. Material biológico:

- Se evaluaron tres cepas: *Beauveria sp* cepa ABvPr-11 aislada de adultos de *Schistocerca piceifrons peruviana* (Orthoptera) en Ayacucho y dos hongos: *Acremonium sp.* DperMa 052B y *Scopulariopsis sp.* DperMa053M, aislados de *Dysdercus peruvianus* de la localidad de Mala (Tabla 1).
- Ninfas del 4<sup>to</sup> estadio de *D. peruvianus* “arrebiatado”.
- Semillas de algodón.
- Hojas de mandarina.

#### 3.3. Cepa de *Beauveria sp.* ABvPr11.

Se empleó una cepa de *Beauveria sp.* ABvPr11 aislada del adulto de *Schistocerca piceifrons peruviana* (Orthoptera: Acrididae). La reactivación de la cepa no fue necesaria debido a que la cepa no había sido liofilizada y había sido empleada en recientes estudios de patogenicidad.

#### 3.4. Recolección de *Dysdercus peruvianus*.

Se recolectaron aproximadamente 150 especímenes adultos de *Dysdercus peruvianus* de los cultivos de algodón de la localidad de Mala, Provincia de Cañete. La recolección se llevó a cabo manualmente, fueron colocados en latas debidamente rotuladas con fecha y lugar de muestreo y fueron trasladados inmediatamente al laboratorio (Figura 1).

#### 3.5.- Crianza de *D. peruvianus* en laboratorio.

En el laboratorio, la crianza se inició a partir de los adultos de *Dysdercus peruvianus* recolectados en campo, los cuales fueron colocados en un ambiente

que consistió en una jaula de madera cubierta de malla plástica. La jaula de madera de 0.30 metros de alto con una base de 0.30 x 0.60 metros, con dos puertas frontales, para llevar a cabo las operaciones de alimentación, limpieza y manipulación en general (Figura 2).

En estas jaulas los arrebatiados fueron alimentados con semillas de algodón colocadas en tapas de placas petri de 100 mm de diámetro. El alimento líquido consistió en hojas de mandarina, colocadas en frascos de vidrio pequeños de boca angosta conteniendo agua y taponados con algodón absorbente. Tanto la semilla como el alimento líquido fueron renovados cada 3 días. Bajo estas condiciones de crianza se registró la oviposición en grupos principalmente entre las semillas de algodón en las placas petri, de donde eran recolectados cada dos días para de esta manera separar las poblaciones siguientes en edades uniformes (Figura 3).

La recolección de los huevos se llevó a cabo cuidadosamente empleando un pincel fino, separando las semillas de algodón y colocándose los huevos en placas petri, marcando la fecha de recolección.

Cuando los huevos se tornaban anaranjados, se colocaron en una placa petri con una hoja limpia de mandarina (Figura 3).

Las ninfas recién eclosionadas tienden a reunirse en enjambres sobre o debajo de las hojas de mandarina, y no se alimentan durante el primer estadio y son generalmente de escasa movilidad. Las ninfas 1 fueron mantenidas en las placas petri hasta que mudaron al segundo estadio ninfal, en que aumentaban su movilidad y en este estadio requieren de alimento para su sustento (Figura 3).

Las ninfas 2 fueron transferidas a frascos de vidrio de una capacidad de 1 litro, donde fueron alimentadas a base de semillas de algodón que colocadas en el fondo del frasco formaban una capa, mientras que el alimento líquido consistió en hojas de mandarina colocadas en frascos de vidrio pequeños de boca angosta conteniendo agua y taponados con algodón absorbente. Los frascos de vidrio grandes se taparon con tul fino el que se ajustaba a la boca del frasco por medio de una liga. Las semillas y hojas fueron renovadas cada 3 días.

Las ninfas de tercer, cuarto y quinto estadio también fueron criadas en frascos de vidrio de la misma manera que las ninfas 2, reduciendo el número de individuos por frasco según con el incremento de tamaño de los insectos. Cuando los insectos alcanzaban el estadio adulto eran transferidas a las jaulas de crianza.

### **3.6. Aislamiento e identificación de los hongos.**

Una parte de los insectos recolectados en campo fueron mantenidos en cautiverio en condiciones de alta densidad en el laboratorio para estimular la expresión de las infecciones latentes que pudieran traer del campo (Luna Rodríguez y Lecuona; 2002). Una vez muertos los insectos, fueron procesados con la finalidad de aislar hongos entomopatógenos, para lo cual fueron sumergidos en una solución de hipoclorito al 5% por 1 minuto, para eliminar microorganismos acompañantes en la superficie externa, luego se lavaron tres veces en agua destilada para finalmente ser colocadas en cámaras húmedas (placas petri con algodón humedecido) (Figura 4). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente observando diariamente el crecimiento de micelio en el insecto. Los hongos que crecieron sobre el insecto fueron aislados en placas petri con agar papa dextrosa (APD), y se realizaron repiques sucesivos hasta la obtención de cultivos puros. Una vez aislados los hongos se les asignó un código, donde el criterio empleado fue Dper por *D. peruvianus*, Ma por la localidad de Mala y luego un número que fue asignado en orden ascendente de acuerdo al número de insectos muertos tratados, adicionalmente se asignó una letra en base al color de la colonia del hongo aislado (B: blanco, M: marrón, V: verde), así tenemos por ejemplo: DperMa 052B.

Finalmente se realizaron microcultivos de los hongos aislados con la finalidad de identificar el género al cual pertenecen, una vez identificados fueron conservados en viales con APD entre 2 – 4° C hasta su evaluación entomocida (Figura 4).

#### **3.6.1.- Caracterización morfológica de las cepas.**

El primer paso fue establecer la identidad del hongo mediante la utilización de la clave taxonómica propuesta por Egorova (1980), Barnett y Hunter (1998).

### **3.6.1.1.- Morfología macroscópica.**

Se realizaron observaciones en el aspecto, color, crecimiento y superficie del hongo cultivado en medio APD. Con una aguja de siembra en ángulo recto las cepas fueron sembradas por punción en el centro de la placa petri conteniendo medio APD, incubándose a temperatura ambiente durante 10 días. Se realizaron observaciones en el color de las colonias, aspecto, superficie y crecimiento. Además también se observó si el hongo produce pigmentación en el medio.

### **3.6.1.2.- Morfología microscópica.**

La morfología microscópica consistió en describir la forma de las células conidióforas. Para ello se realizó un microcultivo en placa petri cortando pequeños cubos de medio APD, cada cubo fue colocado en láminas portaobjetos estériles ubicadas en placas petri. Con una aguja de siembra en ángulo recto se sembró una pequeña porción de micelio en cada lado del cubo de agar. Posteriormente se colocó un cubreobjetos sobre el cubo de agar y para dar las condiciones de humedad se colocó algodón húmedo en el interior de la placa petri. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente. Al quinto día, el cubreobjetos fue colocado con una gota de azul de lactofenol sobre un nuevo portaobjetos. Se eliminó el cubo de agar y se colocó una gota de azul de lactofenol en la lámina portaobjetos cubriéndola con un nuevo cubreobjetos. Finalmente, se eliminó el exceso de colorante con un papel absorbente, sellándose cada cubreobjetos con esmalte de uñas. Cada montaje fue observado con un microscopio a 40X.

### **3.6.2.- Caracterización fisiológica de las cepas**

La caracterización fisiológica se realizó mediante la evaluación de los parámetros utilizados en el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos: porcentaje de germinación y producción de conidias.

### 3.6.2.1.- Porcentaje de germinación (viabilidad)

En placas petri conteniendo APD se marcaron 6 puntos en la superficie externa inferior de la placa. De la dilución  $10^{-4}$  de cada cepa de hongo preparada para la prueba de conteo de conidias (con previa agitación), se tomaron 5 ul para depositarlas en los puntos marcados en las placas petri, a razón de 6 alícuotas por placa (cada alícuota representa una repetición para cada cepa de hongo evaluado). Las placas fueron mantenidas a 22°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó azul de lactofenol para detener la germinación y dar contraste a las conidias. Cada sector de agar que contenía una alícuota fue cortado y colocado en un portaobjeto y posteriormente cubiertas con un cubreobjeto. El porcentaje de germinación se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{No de conidias germinadas}}{\text{No total de conidias}} \times 100$$

El conteo se realizó en 5 campos para cada repetición. Se consideró como conidia germinada aquella cuyo tubo germinativo presente el doble del diámetro mayor de la conidia. Asimismo con la finalidad de determinar si existía diferencia entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA). En el caso de existir diferencia entre los tratamientos se realizó una prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). Para el cálculo de estadística se usó el paquete estadístico SPSS versión 13 (2006).

### 3.6.2.2.- Producción de conidias (esporulación)

Se inoculó 10 ul de la solución conidial con una concentración de  $10^7$  conidias/mL en placas petri con APD diseminándose en toda la superficie del medio con la ayuda de una espátula de Drigalsky esterilizada. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 21 días. Para el recuento de conidias se preparó una solución conidial de 10 mL de agua destilada y Tween 80 al 0.1%, y a partir de esta se realizaron diluciones sucesivas en un factor de 0.1. Con una cámara de Neubauer se realizaron

los conteos de conidias por mililitro, se utilizaron cuatro repeticiones para cada cepa. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos comparándose los promedios mediante el análisis de Duncan (diferencia de significación) ( $p < 0.05$ ). Para el cálculo de estadística se usó el paquete estadístico SPSS versión 13 (2006).

### **3.7. Multiplicación del hongo.**

La siembra de los hongos se llevó a cabo en una cámara de siembra. Los hongos a evaluar se encontraban sembrados en pequeños viales con APD sobre los que se agregó 4 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1%, y se realizó un raspado de las conidias para resuspenderlas, luego se tomó 0.5 mL de esta suspensión de conidias y se sembró en un frasco con 50 mL de APD en pico de flauta, posteriormente con la ayuda de una espátula de Drigalsky se homogenizó el inóculo en toda la superficie del medio. Se empleó como mínimo 3 frascos con 50 mL de APD para cada hongo, para así alcanzar la concentración de conidias deseada. Los frascos fueron mantenidos a temperatura ambiente durante 21 días.

### **3.8.- BIOENSAYOS REALIZADOS CON LOS AISLAMIENTOS NATIVOS**

#### **3.8.1.- Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas sobre *Dysdercus peruvianus***

Una vez establecida la identidad del hongo se evaluó la patogenicidad de las cepas para seleccionar la más eficiente, mediante el porcentaje de mortalidad y la virulencia hallando el tiempo letal medio (TL50).

#### **3.8.2.- Efecto de las cepas en ninfas del 4<sup>to</sup> estadio de *Dysdercus peruvianus*.**

Para este ensayo se seleccionaron aquellos hongos que mostraron una mayor invasión en la superficie externa de los insectos a partir de los cuales fueron aislados. Estas cepas fueron: *Acremonium* sp. cepa DperMa 052B y *Scopulariopsis* sp. cepa DperMa 053M. Además se empleó la cepa de *Beauveria* sp. ABvPr11 aislada del adulto de *Schistocerca piceifrons peruviana* (Orthoptera). Los 3 hongos fueron evaluados en ninfas del 4<sup>to</sup> estadio de *D. peruvianus*.

### **3.8.3.- Obtención del inóculo**

Una vez esporuladas las cepas de los hongos en los frascos con APD durante 21 días (tiempo necesario para una buena esporulación), se cosecharon las conidias agregando a cada frasco 20 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1%, y cosechando las conidias del hongo con la ayuda de una espátula. Se agitó vigorosamente y se procedió a realizar diluciones sucesivas en un factor de 0.1 mL. Luego de la dilución  $10^{-2}$  se tomó una alícuota de la suspensión conidial y se colocó en la cámara de Neubauer. Con el microscopio compuesto con un objetivo de 40X se realizó el recuento para calcular la concentración de conidias por mililitro.

### **3.8.4.- Prueba de patogenicidad**

Este ensayo tuvo como finalidad seleccionar la cepa que ocasione el mayor porcentaje de mortalidad. El ensayo consistió de 4 tratamientos:

T1: *Beauveria* sp cepa ABvPr11 (Ayacucho)

T2: Aislamiento de *Acremonium* sp. DperMa 052B

T3: Aislamiento de *Scopulariopsis* sp. DperMa 053M

T4: Testigo, sin aplicación del hongo.

Para cada hongo, se realizaron 3 repeticiones de 10 ninfas cada uno, para un total de 30 ninfas por tratamiento. En una placa de vidrio estéril se colocó 10 mL de la suspensión conidial y se sumergió a las ninfas por espacio de 4 segundos bajo agitación suave. El tratamiento del testigo consistió de 10 insectos, los que fueron sumergidos en una solución de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1% (Figura 5).

Luego del tratamiento las ninfas fueron transferidas individualmente en un contenedor plástico (20 mL) usando un pincel fino. Cada envase fue tapado, y para proveer ventilación a las ninfas se realizaron pequeños agujeros en las tapas de los envases. Se alimentó a las ninfas en base a hojas de mandarina y semillas

de algodón. El alimento fue renovado cada 2 días. La mortalidad de las ninfas fue registrada diariamente durante 20 días. La individualización de las ninfas permitió realizar la evaluación de la patogenicidad ocasionada por la acción directa del hongo sobre cada una de ellas y no como consecuencia de la oportunidad de enfermarse por la presencia permanente del inóculo, lo cual ocurre cuando se evalúa la patogenicidad sobre poblaciones en las que un insecto enfermo puede estar afectando la población y servir de vehículo para la infección del grupo (Gonzales *et al.*, 1993) (Figura 5). Las ninfas muertas fueron colocadas en cámaras húmedas para facilitar el crecimiento de micelio, comprobándose así que el insecto estaba infectado. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, los datos obtenidos de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para lo cual se transformaron los datos mediante la expresión  $\arcsen \sqrt{m}$ , donde m es el valor de la variable porcentaje de individuos muertos. Posterior al análisis de ANOVA se aplicó el test de Duncan ( $p < 0,05$ ) para comparar los promedios. Para el cálculo de estadística se usó el paquete estadístico SPSS versión 13 (2006).

### **3.8.5.- Agresividad y determinación del LT50 y LT80 de las cepas evaluadas.**

El objetivo de este ensayo fue determinar el tiempo necesario para matar el 50% y el 80% de cada población ninfal experimental por medio de una tabla de mortalidad acumulada diaria durante 20 días (Pariona, 2006). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos comparándose los promedios mediante el análisis de Tukey (diferencia de significación) ( $p < 0.05$ ). Para el cálculo de estadística se usó el paquete estadístico SPSS versión 13 (2006).

### **3.8.6.- Tasa de infección**

La tasa de infección determinó el porcentaje de ninfas con confirmación de esporulación (micosis) al final del experimento. Para ello se seleccionaron las ninfas muertas a lo largo del experimento y se separaron en cámara húmeda para realizar un conteo de ninfas infectadas por el hongo y así hallar el porcentaje dentro de cada unidad experimental y tratamiento. Se realizó un análisis de

varianza (ANOVA) a los datos obtenidos comparándose los promedios mediante el análisis de Tukey (diferencia de significación) ( $p < 0.05$ ). Para el cálculo de estadística se usó el paquete estadístico SPSS versión 13 (2006).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento e identificación de cepas.

A partir de los 71 insectos procesados se aislaron 50 cepas de hongos, de las cuales se seleccionaron las mejores cepas (7), considerando para ello el mayor desarrollo micelial del hongo en la superficie del insecto, y se identificaron los géneros *Acremonium sp.* (6 cepas) y *Scopulariopsis sp.* (1 cepa). Para la evaluación de la capacidad entomopatógena sobre *D. peruvianus* se seleccionaron al azar las cepas identificadas como *Acremonium sp.* DperMa 052B y *Scopulariopsis sp.* DperMa053M (Figura 6).

### 4.2. Caracterización morfológica.

#### 4.2.1. *Beauveria sp* cepa ABvPr11

##### a) **Caracterización morfológica macroscópica.**

La cepa de *Beauveria sp* presentó una colonia con micelios blancos de aspecto algodonoso, superficie semielevada con formación de sinemas (estructuras alargadas ramificadas). Al envejecer la colonia se torna de color crema con aspecto pulverulento. La cepa produjo pigmentos de color amarillo difundándose en el medio; características que correspondieron al género *Beauveria sp* (Tabla 2) (Figura 7).

##### b) **Caracterización morfológica microscópica.**

Las observaciones realizadas al microscopio permitieron identificar con seguridad al género del hongo. Con aumentos de 100 y 400 observamos células conidióforas formando racimos, irregularmente densos. Con aumento de 1,000 observamos como en uno de los racimos se forma la célula conidiófora desde una base hinchada hacia los filamentos estrechos en forma de zig – zag en el ápice, las conidias se forman en cada punto de flexión. Las conidias son hialinas, ovoides, globosas, unicelulares y pequeñas; características que correspondieron al género *Beauveria sp* (Figura 7).

#### **4.2.1. *Acremonium* sp. Cepa DperMa 052B**

##### **a) Caracterización morfológica macroscópica.**

La cepa DperMa 052B presentó una colonia con micelios blancos de aspecto algodonoso, superficie elevada. En cuanto a la pigmentación la cepa produjo pigmentos de color liliáceo que se difundió en el medio; características que correspondieron al género *Acremonium* sp (Tabla 2) (Figura 8).

##### **b) Caracterización morfológica microscópica.**

Las observaciones realizadas al microscopio permitieron identificar con seguridad al género del hongo. Con aumentos de 400 y 1,000 observamos hifas septadas, delicadas y hialinas, con conidióforos largos y delgados, que dan origen a microconidias hialinas, unicelulares y elipsoidales, reunidas en una cabezuela en el extremo distal del conidióforo; características que correspondieron al género *Acremonium* sp (Figura 8).

#### **4.2.2. *Scopulariopsis* sp. cepa DperMa 053M**

##### **a) Caracterización morfológica macroscópica.**

La cepa DperMa 052B presentó una colonia con micelio marrón, superficie plana y crecimiento moderado. En cuanto a la pigmentación la cepa produjo un pigmento de color mostaza que se difundió en el medio; características que correspondieron al género *Scopulariopsis* sp (Tabla 2) (Figura 9).

##### **b) Caracterización morfológica microscópica.**

Las observaciones realizadas al microscopio permitieron identificar con seguridad al género del hongo. Con aumentos de 400 y 1,000 observamos conidióforos mayormente ramificados o produciendo en el ápice racimos de conidias, dejando anelaciones en el extremo. Las conidias, llamadas en este caso anelosporas, son hialinas, unicelulares, globosas con la base truncada, producidas en cadenas basipetales; características que correspondieron al género *Scopulariopsis* sp (Figura 9).

### **4.3. Selección de los hongos con propiedades entomopatógenas**

#### **4.3.1. Multiplicación del hongo**

La evaluación de las propiedades entomopatógenas de los hongos se realizaron luego que la superficie de los frascos con APD en pico de flauta se encontraba totalmente cubierta por las conidias del hongo (Figura 10).

#### **4.3.2. Caracterización fisiológica del hongo**

##### **4.3.2.1. Recuento de conidias**

Las tres cepas evaluadas presentaron una alta producción de conidias después de 21 días de sembrado. Según el análisis de varianza (ANOVA) se determinó diferencias altamente significativas entre la producción de conidias de los tres hongos evaluados, las cuales presentan valores mayores a  $10^7$  conidias/mL. La cepa de *Beauveria sp* ABvPr11 (Ayacucho) presentó el valor más alto con  $4.6 \times 10^8$  conidias/mL, seguido de la cepa de *Acremonium sp*. DperMa 052B con  $2.9 \times 10^8$  conidias/mL. El valor más bajo lo presentó la cepa *Scopulariopsis sp*. DperMa 053M con  $2.2 \times 10^7$  conidias/mL (Tabla 3) (Figura 11 y 12).

##### **4.3.2.2. Porcentaje de germinación**

Los hongos evaluados presentaron valores altos esporulación con un porcentaje de 92.24% para *Beauveria sp*. ABvPR-11, 95.12% para *Acremonium sp* DperMa 052B y 94.90% para *Scopulariopsis sp*. DperMa 053M. Según el análisis de varianza (ANOVA) los valores no son significativamente diferentes (Tabla 4) (Figura 13, 14 y 15).

#### **4.4. Evaluación de la capacidad biocida de las cepas: *Beauveria sp* cepa PR-11, DperMa 053M y DperMa 052B sobre ninfas del 4to estadio de *Dysdercus peruvianus*.**

#### **4.4.1. Prueba de patogenicidad**

De los tres hongos evaluados solo dos presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 50% sobre las ninfas del cuarto estadio *D. peruvianus*, con mortalidades promedio al finalizar el estudio de 83.3% y 80.0%, que correspondieron a las cepas de *Beauveria sp.* ABvPr11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B, respectivamente. El tercer hongo evaluado *Scopulariopsis sp.* DperMa 053M presentó una mortalidad baja sobre el insecto que alcanzó sólo al 23.3% de insectos tratados. No se obtuvo mortalidad en los testigos a lo largo del ensayo (Figura 16).

El análisis de varianza (ANOVA) nos demuestra que existen diferencias significativas entre las cepas. Dos cepas fueron altamente patogénicas: *Beauveria sp.* ABvPr11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B; al décimo día no se observaron diferencias significativas de mortalidad entre las tres cepas evaluadas. Al quinceavo día las cepas *Beauveria sp.* ABvPr11 con 56.67% de mortalidad y *Acremonium sp.* DperMa052B con 80% de mortalidad fueron significativamente diferentes al hongo *Scopulariopsis sp.* DperMa 053M con solo 16.67 % de mortalidad. Al finalizar el estudio los tres hongos presentaron valores significativamente diferentes al testigo (Duncan,  $P < 0.05$ ). No fue necesario aplicar la fórmula de Abbot para corregir los datos de mortalidad acumulada debido a que no se registró mortalidad en los testigos (Tabla 5) (Figura 17).

#### **4.4.2. Tiempo de letalidad al 50% y 80% (TL<sub>50</sub> y TL<sub>80</sub>) de la población expuesta.**

##### **4.4.2.1. Tiempo de letalidad al 50% de la población (TL<sub>50</sub>)**

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) a los hongos que alcanzaron mortalidad mayor al 50% que fueron *Beauveria sp.* ABvPr11 y *Acremonium sp.* DperMa052B. Según el análisis de varianza (ANOVA) el tiempo necesario para eliminar al 50% de la población es altamente significativo ( $P < 0.01$ ). Siendo el TL50 de 5.6 días para *Beauveria sp.* ABvPr11 y de 3.8 días para *Acremonium sp.* DperMa052B. Según el análisis de Tukey la diferencia entre las dos cepas es

significativamente diferente, donde la cepa *Acremonium sp.* DperMa052B, mostró ser más efectiva actuando en menor tiempo (3.8 días) en promedio (Tabla 6).

#### **4.4.2.2. Tiempo de letalidad al 80% de la población (TL<sub>80</sub>)**

No se pudo realizar un análisis de varianza (ANOVA) debido a la falta de datos para el hongo *Acremonium sp.* DperMa052B en el que solo en una repetición se supero el 80%. Sin embargo en promedio de las tres repeticiones se observa que los registros del TL80 para las cepas son de 19.2 días para *Beauveria sp.* ABvPr11 y de 10 días para *Acremonium sp.* DperMa052B (Tabla 7).

#### **4.4.3. Tasa de infección**

La aparición de micelio ocurrió a partir de las 48 horas de muerte del insecto al ser colocado en cámara húmeda. Cuando el hongo esporuló en los cadáveres de las ninfas del arrebiatado, adquirieron un aspecto pulverulento. Según el análisis de varianza (ANOVA), la variable ninfas infectadas presentó valores altamente significativos ( $p < 0.01$ ) para el hongo *Beauveria sp.* ABvPr11, mientras que para los hongos *Acremonium sp.* DperMa052B y *Scopulariopsis sp.* DperMa 053M el valor de esta variable fue significativo ( $P < 0.05$ ). Para la variable ninfas infectadas el tratamiento *Beauveria sp.* ABvPr11 fue la que causo el mayor porcentaje de ninfas infectadas (96.3%), siendo significativamente diferente a los tratamientos *Acremonium sp.* DperMa052B y *Scopulariopsis sp.* DperMa 053M, en los que los porcentajes de infección fueron de 37.14% y 33.3% respectivamente (Tabla 8) (Figura 18).

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos.

La infección fúngica natural en los insectos recolectados de la localidad de Mala fue baja 0.10%; (solo 7 insectos estaban infectados con posibles hongos entomopatógenos). La baja frecuencia de infección encontrada también se ha presentado en otros países. Así, Shah et al. (1997) señalan que en la República de Benin (África) entre 1990 y 1992, se mantuvieron bajo cría masiva más de 23000 insectos, y obtuvieron 79 aislamientos siendo 8 de ellos de *B. bassiana* (0.03%) y 67 de *Metharizium flavoride* (0.29 %); sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo en relación con el aislamiento de cepas provenientes de insectos de campo, permiten remarcar la presencia natural de hongos entomopatógenos y la factibilidad de obtener cepas fúngicas, a partir de insectos aparentemente sanos.

Es importante destacar que los géneros *Acremonium sp.* y *Scopulariosis sp* no han sido reportados anteriormente en el Perú como entomopatógenos y no se conoce mucho sobre su distribución. Desafortunadamente no se pudo aislar el hongo *Beauveria sp.* o algún otro hongo entomopatógeno conocido como se esperaba lo cual pudo deberse a que de acuerdo con los agricultores de la zona en el lugar del cual proceden los insectos no se ha utilizado anteriormente ningún producto con este hongo entomopatógeno.

En la caracterización fisiológica de las cepas respecto a los factores que influyen directamente en el poder entomopatógeno de los hongos, se observó que en cuanto al porcentaje de germinación las tres cepas evaluadas: *Beauveria sp.* ABvPr11, *Acremonium sp.* DperMa052B y *Scopulariosis sp.* DperMa053M presentaron valores similares, no permitiendo establecer diferencias significativas entre ellas. Asimismo los porcentajes de germinación obtenidos a las 24 horas coinciden con los requisitos descritos para el control de calidad de hongos entomopatógenos señalado por Gómez (1998), quien señala que es necesario un

porcentaje de germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas, ya que al aspersar en el campo el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales (Velez et al. 1997, citado por Alean 2003).

Las tres cepas estudiadas mostraron diferencias altamente significativas entre sí respecto a la producción de conidias. Considerando este parámetro fisiológico se podría considerar como la cepa más promisoría a *Beauveria sp.* ABvPr11 por tanto que bajo las mismas condiciones ambientales y el mismo tiempo de incubación produjo mayor cantidad de conidias que las otras dos cepas evaluadas.

## **5.2. Evaluación de patogenicidad y virulencia sobre *D. peruvianus* de los hongos evaluados.**

**5.2.1. *Beauveria sp.* ABvPr11.** - Esta fue la cepa más virulenta sobre ninfas de cuarto estadio de *D. peruvianus* ya que obtuvo mayor el porcentaje de mortalidad. Este resultado muestra una patogenicidad inespecífica, es decir sin relación con el hospedero de origen de la cepa. Respecto a este hecho, Feng *et al.* (1994) señalan que en general cepas de *B. bassiana*, tienden a mostrar gran virulencia sobre su hospedante original o sobre especies cercanamente relacionadas, tal como lo reportado por Romaña y Fargues (1987), quienes observaron que solo las cepas aisladas a partir de Hemiptera fueron altamente patógenas a *Rhodnius prolixus*. Sin embargo existen excepciones; Moorhouse *et al.* (1993) sugiere que la especificidad hospedero patógeno no es tan estricto, esto explicaría la virulencia presentada en este estudio por la cepa heteróloga *Beauveria sp.* ABvPr11 aislada del ortóptero *Schistocerca peruviana* sobre ninfas del cuarto estadio de *D. peruvianus*, tal como fue el caso de una cepa de *Beauveria bassiana* aislada del lepidóptero *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae), que causó 97% de mortalidad sobre *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) (Lecuona *et al.* 2001).

La cepa de *Beauveria sp.* mostró una mayor capacidad de esporulación en comparación a los otros dos hongos evaluados sobre los cadáveres de *D.*

*peuvianus*, este comportamiento observado tiene una importancia práctica para la aplicación del hongo como bioinsecticida ya que si las condiciones son apropiadas, podría incrementar la densidad del propágulo infeccioso en el campo, transmitiendo el inóculo horizontalmente y prolongar el tiempo de infección (Ayasse y Paxton, 2002).

### **5.2.2. *Acremonium sp.* DperMa 052B.-**

Se observó en las ninfas tratadas con este hongo una coloración oscura causada posiblemente por sustancias similares a la oosporeína producida en el caso de infecciones con *Beauveria* (Lecuona, 1990; Khachatourians, 1996). Al realizar la cámara húmeda para determinar la tasa de infección por el hongo no se observó la esporulación del hongo sobre todos los cadáveres. Por esta razón, no hubo una relación proporcional entre los porcentajes de mortalidad y esporulación, lo que coincide con lo observado en otras especies de insectos (Rodríguez *et al.*, 2006), resultando que la mortalidad por micosis (con confirmación de esporulación) es menor a la mortalidad real (coloración oscura). Esta menor capacidad de esporulación de *Acremonium sp.* DperMa 052B podría indicar que la mortalidad fue causada por la actividad de alguna sustancia fúngica segregada durante la fase de ligero crecimiento vegetativo (Jaronski, 1997; Inglis *et al.*, 2001; Shah y Pell, 2003) y que luego el hongo presenta dificultades para atravesar el tegumento y emerger a la superficie como pone de manifiesto el bajo porcentaje de insectos que mostraron micosis. Esta característica de una posible producción de toxinas es interesante para su posterior investigación en el desarrollo de formulaciones de productos insecticidas. Es importante señalar que el hecho de no esporular no invalida a las cepas para ser empleadas como bioinsecticidas (Luna Rodríguez y Lecuona, 2002).

Además, se observaron diferencias respecto a la agresividad de las cepas evaluadas, ya que cuando se determinó el tiempo letal para el 50% (TL<sub>50</sub>) de la población tratada, *Acremonium sp.* necesitó solo 3.8 días, mientras que *Beauveria sp.* necesitó de 5.6 días. Asimismo, el pico de mortalidad alcanzada por la cepa de

*Acremonium sp.* (80%) fue sólo al décimo día post tratamiento, mientras que *Beauveria sp.* obtuvo la mayor mortalidad (83.3%) recién al vigésimo día post tratamiento. Esto demuestra que la cepa evaluada de *Acremonium sp* es más agresiva que la de *Beauveria sp.*; sin embargo, la cepa que presentó mayor virulencia fue el hongo *Beauveria sp.* si consideramos el porcentaje de mortalidad alcanzado sobre *D. peruvianus*.

### **5.2.3. *Scopulariopsis sp.* DperMa053M.-**

El hongo *Scopulariopsis sp.* evaluado no presentó importante mortalidad sobre el “arreatado”. Este resultado plantea la necesidad de utilizar concentraciones de conidias más elevadas de este hongo a fin de obtener una mayor virulencia, debido a que mayormente los trabajos realizan evaluaciones de patogenicidad con concentraciones por encima de  $10^8$  conidias / mL, sin embargo debido a la baja producción de conidias de este hongo en el medio APD no se pudo alcanzar dicha concentración.

El ensayo realizado en el presente estudio fue en condiciones de laboratorio con una temperatura promedio de 25° C y humedad relativa promedio de 80%, sin embargo los resultados obtenidos fueron satisfactorios; donde las cepas *Beauveria sp.* ABvPr11 y *Acremonium sp.* DperMa052B eliminaron entre 63 y 80 % de la población de ninfas tratadas al doceavo día con concentraciones de  $10^8$  conidias/mL.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con los hongos evaluados permitieron seleccionar dos cepas como promisorias para el control del arreatado: *Beauveria sp.* ABvPr11 y *Acremonium sp.* DperMa052B. Los aspectos considerados para esta selección fueron la virulencia y la agresividad, es decir, el alto porcentaje de mortalidad y el menor TL50 de los insectos frente a la infección provocada por estas cepas.

Trabajos posteriores en campo permitirán evaluar si los resultados obtenidos en este trabajo (porcentaje de mortalidad obtenida) pueden generalizarse a otras poblaciones de *D. peruvianus* en las diferentes áreas de distribución en el Perú. Por otro lado, la selección de aislados fúngicos para su empleo práctico, no solo debe fundarse en los niveles de mortalidad sino también en la capacidad de producir abundante cantidad de conidias sobre un elevado porcentaje de los cadáveres del hospedante, característica ventajosa de la cepa *Beauveria* sp. ABvPr11 respecto a la cepa *Acremonium* sp. DperMa052B.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los hongos *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B son las cepas más prometedoras de las tres estudiadas.
2. Se pudo obtener elevados valores de virulencia sobre ninfas del 4to estadio de *D. peruvianus* a partir de la cepa de *Beauveria sp.* ABvPR-11 aislada de un hospedante heterólogo.
3. La cepa *Beauveria sp.* ABvPR-11 tiene una mayor capacidad de esporulación sobre los cadáveres de ninfas del 4to estadio de arrebiatado que la cepa *Acremonium sp.* DperMa 052B.
4. Las cepas *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B a concentraciones de  $4.6 \times 10^8$  conidias/mL y  $2.9 \times 10^8$  conidias/mL respectivamente fueron altamente virulentas sobre ninfas del 4to estadio de *D. peruvianus*, siendo *Acremonium sp.* DperMa 052B más agresiva que *Beauveria sp.* ABvPR-11.
5. El hongo *Scopulariopsis sp.* DperMa 053M a la concentración de  $2.2 \times 10^7$  conidias/mL no presentó mortalidad significativa sobre ninfas del 4to estadio de *D. peruvianus*.
6. No se pudo aislar *Beauveria sp.* a partir de insectos adultos de *D. peruvianus* procedentes de la Localidad de Mala, Provincia de Cañete.
7. Por primera vez en el Perú se reporta la presencia de los hongos *Acremonium sp.* y *Scopulariopsis sp.* aislados de adultos de *D. peruvianus*.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar bioensayos para determinar la CL<sub>50</sub> y CL<sub>80</sub> de *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B.
2. Evaluar la actividad entomopatógena de *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B sobre los diferentes estadios de *D. peruvianus* para determinar el estadio mas susceptible.
3. Con la finalidad de confirmar su utilidad se requieren estudios in vitro del efecto de diferentes factores como temperatura, humedad relativa, posibilidad de transmisión horizontal; sobre los hongos *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B para determinar si las condiciones climáticas en el hábitat natural del insecto serian favorables para la infección del hongo in vivo.
4. Realizar ensayos experimentales para determinar la efectividad en campo de las cepas *Beauveria sp.* ABvPR-11 y *Acremonium sp.* DperMa 052B, con la finalidad de desarrollar un bioinsectida, que seria destinado al control del arrebiatado en cultivos de algodón.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR, P., LAMAS, J. 1980. El cultivo del Algodonero. Revista Peruana de Entomología. 23(1) 91-97.
2. ALEAN, I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatogenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria.
3. ALVES, S. B. 1998. Controle Microbiano de Insetos. Segunda Edición. Fundación de Estudios Agrarios Luiz de Queiroz – FEALQ. Piracicaba, SP, Brasil. 1163 pp.
4. AYASSE, M., y R. PAXTON. 2002. Brood protection in social insects. Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell, Berlin, Germany. pp. 117-148.
5. BAGLEY, R. 1958. Algunos recientes ensayos para el control de "Arrebiatado" (*Dysdercus peruvianus* Guerin). Revista Peruana de Entomología. 1(1): 37-38.
6. BARNETT, H. L y HUNTER, B. 1998. *Illustrate Genera of Imperfec Fungi*. 4ta Edicion. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota (USA). 217pp.
7. BARTINICKI-GARCIA, S. 1984. Spore Germination in fungi: Basic concepts. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Proceses of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 111-117.
8. BATTA, Y. (2007). Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

9. BEINGOLEA, O. (1973). Pérdidas ocasionadas por las plagas de insectos, enfermedades, nematodos y plantas nocivas a la agriculturaa en el Perú. Boletín de la Sociedad entomológica del Perú. 7 (1): 3-8.
10. BELLOTTI, A. (2002). Arthropod Pests. In: Cassava Biology, production and utilization. Hillocks, R.; Thresh, J.; Bellotti, A. CABI Publishing. London. United Kingdom. 209-235.
11. BENOIT, J; YODER, J. AND ZETTLER, W. (2003). A novel technique for recovery and *in vitro* culturing of entomopathogenic fungi in ticks (Acari: Ixodidae), and its implications for biological control. The Annual Meeting and Exhibition of the Entomological Society of America (ESA). Student Competition Ten-Minute Papers, Ca2, Biological Control, Ce, Insect Pathology and Microbial Control, and Cf1, Quantitative Ecology.
12. BROOKS, D. AND RAUN, E. (1965). Entomogenous fungi from corn insects in Iowa. Journal of Invertebrate Pathology. 7 (1): 79-81.
13. CABRERA-LA ROSA, J; PINEDO, E. 1994. El hongo *Beauveria bassiana* en el control de algunas plagas agrícolas. Revista Peruana de Entomología. 37: 107-110.
14. CONABIO. MÉXICO. 2004. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados. 16 pp. www.conabio.gob.mx.
15. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS. 2006. Cotton circular. Agosto. 7 p.
16. DE LA ROSA, W; LOPEZ, F. AND LIEDO, P. (2002). *Beauveria bassiana* as a Pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory Conditions. Journal of Economic Entomology. 95(1): 36-43.
17. EGOROVA, L. N. 1980. Hongos del suelo del Este. Hyphomycetes. Instituto de Biología del Suelo. Centro Científico del Lejano Este. Academia de Ciencias. URSS. p: 49-76.
18. ESTRADA, H., GARCÍA, U. 1996. Resistencia tipo antibiosis de siete variedades de algodónero sobre *Dysdercus peruvianus*. Revista Peruana de Entomología. 39: 75-77.

19. FARGUES, J. 1984 Adhesión of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Processes of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 90-110.
20. FENG, M. G.; POPRAWISKY, T. J. Y KHACHATOURIANS, G. C. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*. 4: 3-34.
21. GALLEGOS-MORALES, G; OLAYO-PAREDES, R. P; GUERRERO-RODRIGUEZ, E; SÁNCHEZ VALDEZ V. M., CEPEDA-SILLER , M., GRANT-HUERTA Y. y H. QUIROZ-MARTINEZ. 2004. Evaluación de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (vuill.) sobre *Amphidees* spp. de Arteaga, Coahuila *Entomología Mexicana*. 1: 360-367.
22. GLARE, T. AND INWOOD, A. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research*. 102 (2): 250-256.
23. GÓMEZ, H. 1998. Importancia de los hongos entomopatógenos. En: *Nuevos Aportes del Control Biológico en la agricultura Sostenible*. p: 79 – 112.
24. GONZALES, M; POSADA, F. y BUSTILLO, A. 1993. Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre la broca de café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología*. 19(4): 123-130.
25. HAJEK, H. A. Y ST. LEGER, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-332.
26. HERRERA, J. 2004. Manejo de las principales plagas del algodonero. <http://www.huaral.org/isa>.
27. INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential* (Butt, T.M., Jackson, C. y N. Magan Eds.). CABI Publishing. pp. 23-69.

28. JARONSKIS, T. 1997. New paradigms in formulations mycoinsecticides. Pesticide Formulations and Applications Systems. 17th Volume. ASTM STP. 1328. pp. 93-112.
29. KACHATOURIANS, G.G. 1996. Biochemistry and Molecular biology of entomopathogenic fungi. En LUNA RODRIGUEZ, J. A. Y LECUONA, R. E. 2002. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). RIA, INTA, Argentina. 31 (1):67 – 84.
30. KERSHAW, M. J; MOORHOUSE, . R; BATEMAN, R; REYNOLDS, S. E. AND CHARNLEY, A. K. 1999. The role of destruxin in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. Journal of Invertebrate Pathology. 74: 213-223.
31. KONEMAN, E; ROBERTS, G; WRIGHT, S. 1978. Practical Laboratory Mycology. Segunda Edición. Compañía Williams & Wilkins. Baltimore 153 pp.
32. LAMAS, J. 1980. Control de los insectos-plaga del algodón en el Perú, Esquema de la planificación de una Campaña de control integrado y su problemática. Revista Peruana de Entomología. 23(1) 1-6.
33. LECUONA, R. 1990. El control microbiano como regulador de insectos plaga. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Agricultura Sostenible. Publicación N<sup>o</sup>. 4.
34. LECUONA, R; EDELSTEIN, J; BERRETTA, M; LA ROSA, F. AND ARCAS, A. 2001. Evaluation of *B. bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae). Journal of Medical Entomology. 38(2): 172-179.
35. LIU, H., SKINNER, M., PARKER, L., BROWNBRIDGE, M. 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other Entomopathogenic Fungi Against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) Journal of Economic Entomology. 95(4): 675-681.
36. LUNA RODRIGUEZ, J. A. Y LECUONA, R. E. 2002. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura

- Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). RIA, INTA, Argentina. 31 (1):67 - 84
37. LUPUCHE, J. 1997. Control biológico del arrebiatado (*Dysdercus peruvianus*) mediante el uso de microorganismos endógenos del insecto. Boletín de resúmenes de investigaciones de la Red de Acción en Agricultura Alternativa.
38. LUZ, C., ROCHA, L., NERY, G. 2004. Detection of Entomopathogenic Fungi in Peridomestic Triatomine-Infested Areas in Central Brazil and Fungal Activity Against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) Neotropical Entomology .33(6): 783-790.
39. LUZ, C; TIGANO, M; SILVA, I; CORDEIRO, C. AND ALJANABI, S. 1998. Selection of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 93(6): 839-846.
40. MINISTERIO DE AGRICULTURA. REPÚBLICA DEL PERÚ. 2007. Estadística Agraria Mensual. Dirección General de Información Agraria. Febrero.
41. MINISTERIO DE AGRICULTURA. REPÚBLICA DEL PERÚ. 1999. Producción de Algodón. Oficina de Información Agraria. 190 p.
42. MINISTERIO DE AGRICULTURA. REPÚBLICA DEL PERÚ. 2001. Cultivos de importancia nacional. El Algodón. Ficha Técnica. [www.minag.gob.pe/algodon.shtml](http://www.minag.gob.pe/algodon.shtml).
43. MOORHOUSE, S. R., GILLESPIE, A. T. Y CHARNLEY, A. K. 1993. Laboratory selection of *Metarhizium spp.* Isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). Journal Invertebrate Pathology. 62: 15 –21.
44. NARAYANASAMY, P., YASODHA, P. 2004. Report of entomopathogenic fungi on adults of lepidopteran pests in rice. Journal of Biological Control. 18(1): 87-90.
45. PARIONA, M. 2006. Evaluación de la capacidad entomocida de *Beauveria sp.* sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903) nativos del departamento de Ayacucho. Tesis título de Biólogo. Facultad de

- Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 51 pp.
46. POSSE, J. 2005. Perfil Descriptivo de la Cadena de Algodón. Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos. Dirección Nacional de Mercados. Dirección de Mercados Agroalimentarios. Buenos Aires, Argentina. 16 p.
  47. QUESADA-MORAGA, E; CARRASCO-DÍAZ, J. Y SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. (2006). Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*. 130 (8): 442 - 452.
  48. ROBERTS, D. Y HUMBER, R. 1984. Entomopathogenic Fungi. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Processes of Fungi*. A Bellagio Conference. March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. Pp. 1-12.
  49. RODRÍGUEZ, M., M.E. GERDING, Y A. FRANCE. 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultura Técnica*. (Chile). 66:159 -165.
  50. ROJAS, R. 2005. Modelo Organizacional de la Asistencia Técnica (Valle de Cañete). Instituto Valle Grande.
  51. ROMAÑA, C., Y FARGUES, J. 1987. Sensibilité des larves del hémiptère hématophage, *Rhodnius prolixus* (Triatominae) aux hyphomycète entomopathogènes. *Entomophaga*. 32: 167 –179.
  52. SAMSON, R.; EVANS, H.; Latgé, J. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Springer-Verlag, Berlin. 300 p.
  53. SÁNCHEZ, G. 2004. Curso Modular de Actualización en Sanidad Vegetal. UNALM. Lima-Perú.
  54. SARMIENTO, J. 1992. Plagas del cultivo del algodónero. Universidad nacional Agraria La Molina. Departamento de Entomología. Lima- Perú.
  55. SHAH, P. A.; KOOYMAN, C. Y PARAISO, A. (1997). Surveys for fungal pathogens of locust and grasshoppers in Africa and Near East. *En* Goettel, M. and Johnson D. (Eds). *Microbial Control of Grasshoppers and Locusts*. Mem. Entom. Soc. Can. 171: 27-35.

56. SHAH, P. A, PELL, J.K. 2003. Entomopatogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413-423.
57. SHIMAZU, M., ZHANG, B. AND LIU, Y. 2002. Fungal pathogens of *Anoplophora glabripennis* (Cloeoptera: Cerambycidae) and their virulences. *Bulletin of Forestry and Forest Products Research Institute*, 1 (1): 123-130
58. SÍNTESIS AGRARIO LAMBAYECANO. 2005. Dirección de Información Agraria. Gobierno Regional Lambayeque. Boletín mensual. Año VI, N° 3 - 4.
59. SÍNTESIS AGRARIO LAMBAYECANO. 2006. Dirección de Información Agraria. Gobierno Regional Lambayeque. Boletín mensual. Año VI, N° 1 - 6.
60. STADLER, T., SCHANG, M. 1992. El ciclo de vida de *Acaulona brasiliiana* townsend, 1937 (Diptera: Tachinidae) parasitoide de la "chinche tintorea" del algodónero, *Dysdercus albofasciatus* berg, 1878 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Bol. Entomol. Venez. N.S.* 9(2):193-198.
61. STEENBERG, T. AND HUMBER, R. (1999). Entomopathogenic Potential of *Verticillium* and *Acremonium* Species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*. 73(3): 309-314.
62. THARA, F., YAGINUMA, K., KOBAYASHI, N., MISHIRO, K., SATO, T. 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae) *Appl. Entomol. Zool.* 36(4): 495-500.
63. TIPPANNAVAR, P. S., MALLAPUR, C. P., KULKARNI, K. A., PATIL, S. B. 2006. Record of a new entomopathogenic fungus on sugarcane woolly aphid. *Current Science*. 91(7): 858.
64. TORRES, H; ORTEGA, A; ALCÁZAR, J; AMES, T. PALOMINO, L. 1993. Control Biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) con *Beauveria brogniartii*. *Guia de Investigación CIP 8*. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 43pp.
65. WILLE, J. 1958. Observaciones bioecológicas sobre el "Arrebiatado" (*Dysdercus peruvianus* Guerin) con Conclusiones Prácticas Agrícolas. *Revista Peruana de Entomología*. 1(1): 37-38.

66. WILLOUGHBY, B; GLARE, T; KETTLEWELL, F. AND NELSON, T. 1998.  
*Beauveria bassiana* as a Potential Biocontrol Agent against The Clover Root Weevil, *Sitona lepidus*. The New Zealand Plant Protection Society Incorporated. 1: 9-15.

## IX. ANEXOS

### Medios de cultivo

#### Agar Papa Dextrosa (APD).

Este medio de cultivo fue empleado para la propagación del hongo y la obtención de conidias que fueron utilizadas en los bioensayos. Se pelan las papas para luego cortarlas en trozos colocándolas en una olla con agua y se deja cocinar. Luego se colecta el líquido filtrándolo a través de algodón con gasa. El líquido filtrado se coloca en un matraz. Por cada litro se agregan 20 gr. de agar y 20 gr. de dextrosa. Se coloca un tapón de algodón y se lleva a la autoclave a 121 ° C por 20 minutos a 15 libras de presión. Finalmente el medio es repartido en las placas de petri en una cámara de siembra.

### Preparación de reactivos

#### Azul de lactofenol.

Para preparaciones microscópicas en fresco de mohos.

- Lactofenol de Amann .....100 mL
- Azul de algodón.....0.05 gr.

Agregar al Lactofenol de Amann, el azul de algodón.

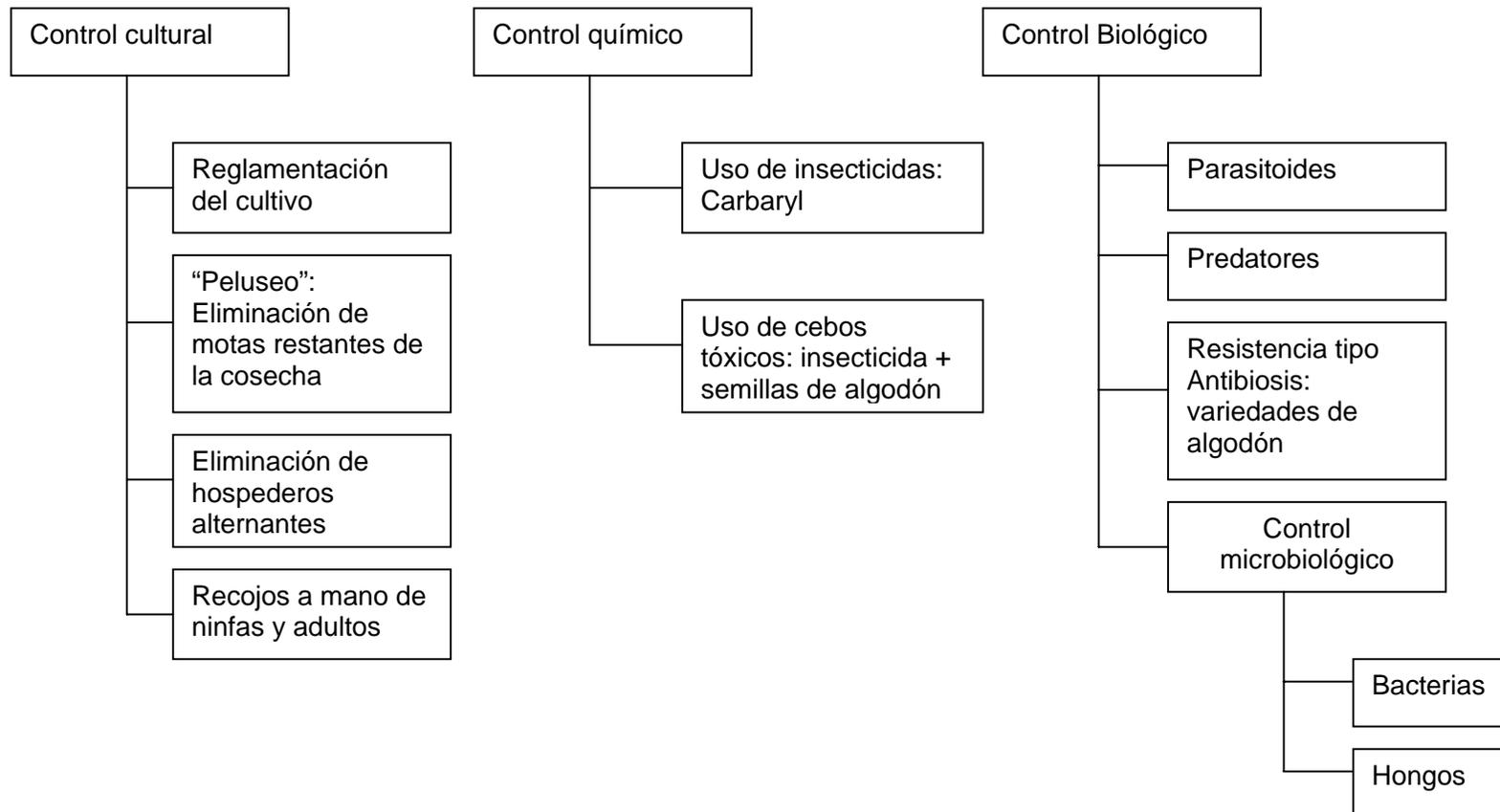
#### Lactofenol de Amann.

- Ácido fénico cristalizado..... 10 gr.
- Ácido láctico..... 10 mL
- Glicerina..... 20 mL
- Agua destilada..... 10 mL

Disolver el ácido fénico con agua destilada, con ayuda de calor suave, añadir luego el ácido láctico y la glicerina.



## CONTROL DE *Dysdercus peruvianus* (GUERIN- MÉNEVILLE 1831)



**Tabla 1.-  
Origen de la cepas de hongos empleadas en los bioensayos.**

<b>Código</b>	<b>Cepa</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Hospedero</b>
ABvPR11	<i>Beauveria sp</i>	Ayacucho, Perú	<i>Schistocerca piceifrons peruviana</i> (Orthoptera), adulto 2006
DperMa052B	<i>Acremonium sp</i>	Mala, Cañete, Perú	<i>Dysdercus peruvianus</i> (Hemiptera), adulto 2006
DperMa053M	<i>Scopulariopsis sp</i>	Mala, Cañete, Perú	<i>Dysdercus peruvianus</i> (Hemiptera), adulto 2006

**Tabla 2.-  
Morfología macroscópica de los hongos evaluados sembrados en APD a 22° C**

<b>Cepa</b>	<b>Color</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Superficie</b>	<b>Pigmento producido en el medio</b>	<b>Producción de sinemas</b>
ABvPR11	Blanco	Algodonoso	Semi elevada	Amarillo	Si
DperMa052B	Blanco	Algodonoso	Elevada	Púrpura	No
DperMa053M	Marrón	Pulverulento	Plana	Mostaza	No

**Tabla 3.-  
Producción de conidias de la cepas de hongos sembradas en APD y mantenidas a 22° C por 21 días.**

<b>Cepas</b>	<b>X (10<sup>7</sup> con/mL)</b>	<b>Sig.</b>	<b>DE (10<sup>7</sup> con/mL)</b>	<b>Rango (10<sup>7</sup> con/mL)</b>
ABvPR11	46.0	C	1.5	44.4 – 48.0
DperMa052B	29.3	B	9.3	23.6 – 43.2
DperMa053M	2.21	A	0.33	1.73 – 2.48
<b>F</b>	<b>65.9</b>			

Según Duncan ( $P < 0.05$ ) valores con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí.

X= Promedio. DE= Desviación estándar

F= estadístico de Fisher. Sig= Significancia

**Tabla 4.-****Porcentaje de germinación de las cepas de hongos sembradas en medio APD y evaluadas a las 24 horas de incubación.**

Cepa	% de germinación	Sig.	DE	Rango
ABvPR11	92,547	A	1.6062	90.00-94.27
DperMa052B	95,402	A	3.1072	92.14-100.00
DperMa053M	94,898	A	3.1873	91.92-100.00
F	1.867			

Según Duncan ( $P < 0.05$ ) valores con la misma letra no difieren estadísticamente entre si.

DE= Desviación estándar

F= estadístico de Fisher. Sig= Significancia

**Tabla 5.- Tasa de mortalidad total causadas por las cepas de *Beauveria sp.*, *Acremonium sp.* y *Scopulariopsis sp.***

Tratamiento	Día 5		Día 10		Día 15		Día 20	
	%	arcsen	%	arcsen	%	arcsen	%	arcsen
ABvPR11	43.33	0.72B	56.67	0.85B	66.67	0.95B	83.33	1.15C
DperMa052B	56.67	0.85B	80.00	1.11B	80.00	1.11B	80.00	1.11C
DperMa053M	6.67	0.26A	13.33	0.37AB	16.67	0.42A	23.33	0.50B
Testigo	0.00	0.00A	0.00	0.00A	0.00	0.00A	0.00	0.00A

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según el análisis de Duncan ( $P < 0.05$ ).ANOVA ( $P < 0.05$ ).**Tabla 6.- Tiempo letal al 50% de la población de las cepas evaluadas (TL50)**

Tratamiento	Tiempo letal al 50%
ABvPR11	5.6A
DperMa052B	3.8B

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ).ANOVA ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 7.- Tiempo letal al 80% de la población de las cepas evaluadas (TL80)**

Tratamiento	Tiempo letal al 80%
ABvPR11	19.2
DperMa052B	10

**Tabla 8.- Tasa de infección de los hongos evaluados**

Cepa	Tasa de infección %	ANOVA ( $P < 0.05$ )	Sig.	DE	Rango
ABvPR11	96.297	s	A	6.414	88.89 - 100.00
DperMa052B	37.143	s	B	7.561	28.57 - 42.86
DperMa053M	33.333	s	B	34.171	0.00 - 50.00

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ).

ANOVA ( $P < 0.05$ ).

Sig. = Significancia

s = significativo





a)



b)



c)

**Figura 1.-** a) Recolección del arrebiatado en campos de cultivo de algodón localidad de Mala. b) y c) Arrebiatados adultos sobre copos de algodón.



a)



b)

**Figura 2.-** Jaula de crianza de *Dysdercus peruvianus* “arrebiatado” a) Se observa la fuente de alimentación líquida que consistió en hojas de mandarina colocadas en frascos pequeños de vidrio y el alimento sólido basado en semillas de algodón colocadas en placas. b) Se observan dos arrebiatados adultos apareándose.



a)



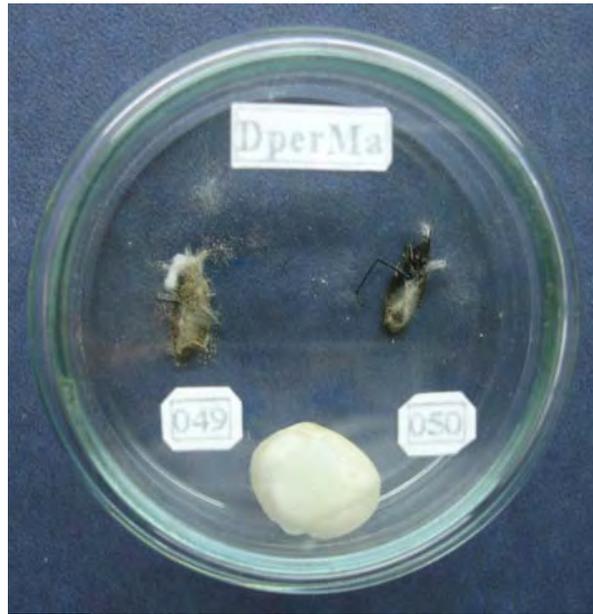
b)



c)

**Figura 3.-** a) Huevos ovopositados en las placas con pepas de algodón. b) Huevos maduros color naranja y eclosionando. c) Ninfas 1 del arrebiatado de escasa movilidad.

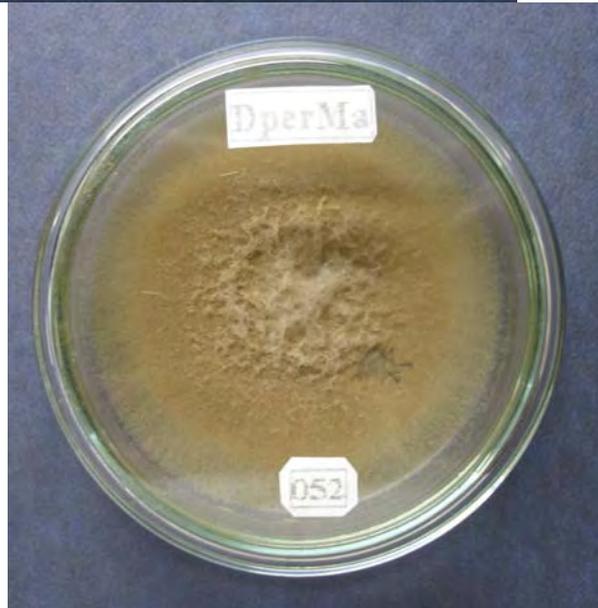
a)



b)



c)



d)

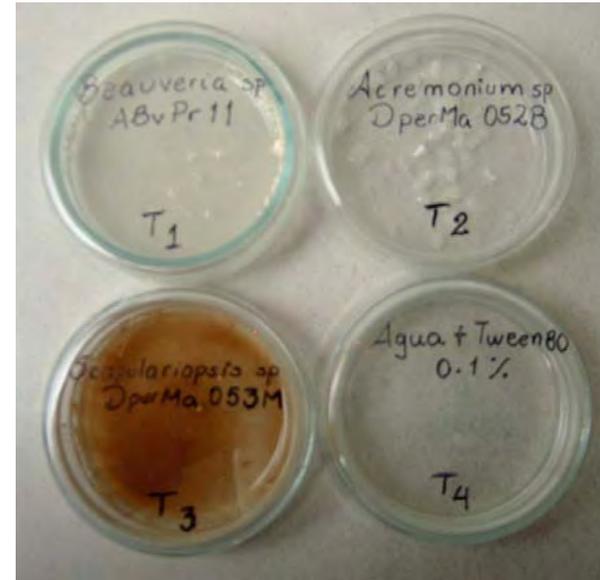


**Figura 4.** a) Cámara húmeda a insectos adultos muertos. b) Hongo cubriendo completamente al insecto. c) Aislamiento del hongo. d) Microcultivo del hongo aislado para su identificación.

a)



b)



c)

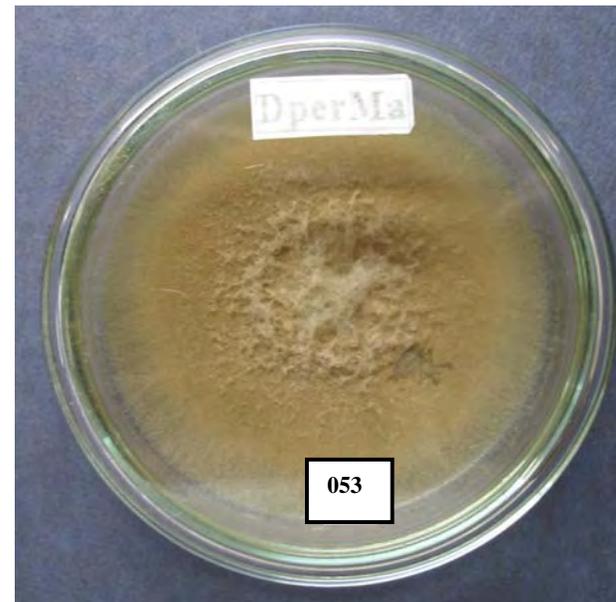
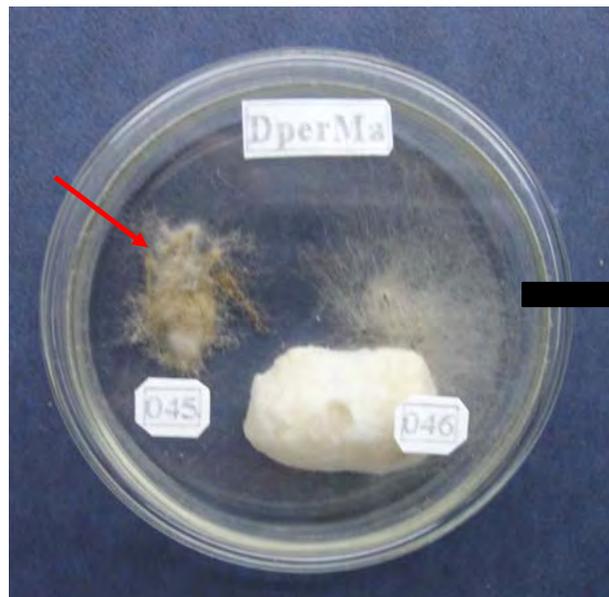


**Figura 5:** Evaluación de la patogenicidad. a) Ninfas del 4to estadio de *D. peruvianus* empleadas en el bioensayo. b) Tratamientos empleados: 3 hongos evaluados y el testigo. c) Individualización de las ninfas luego del tratamiento.

a)



b)



**Figura 6.** a) *Acremonium sp.* invadiendo al insecto y su posterior aislamiento en APD  
b) *Scopulariopsis sp.* invadiendo al insecto y su posterior aislamiento en APD

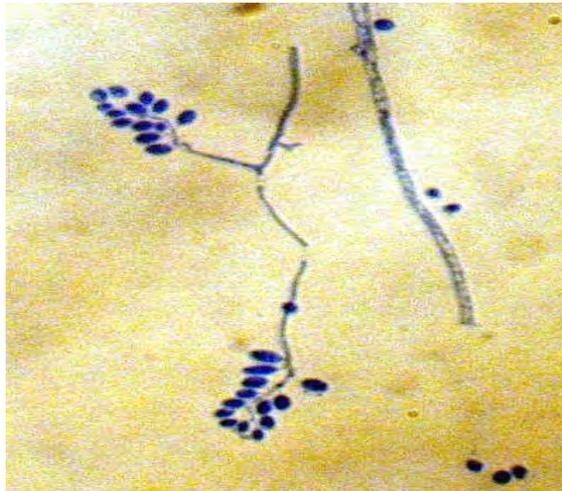
a)



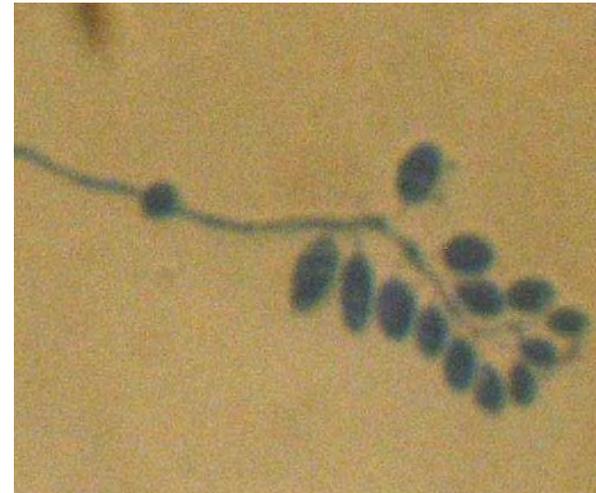
b)



c) 100X



d) 100X

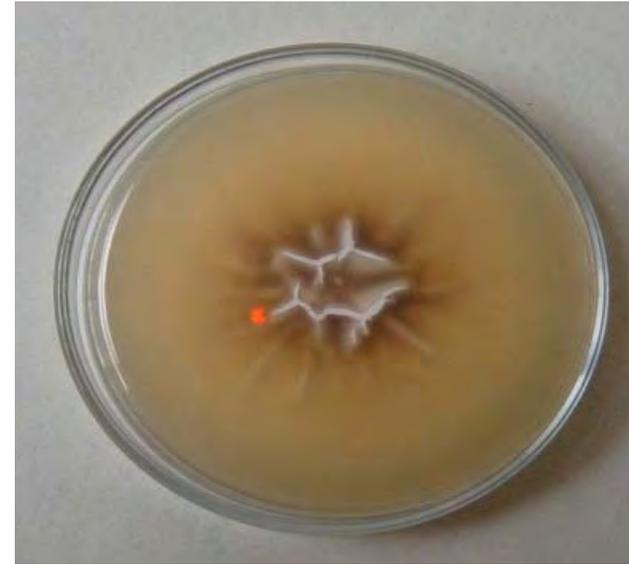


**FIGURA 7:** Caracterización morfológica de *Beauveria sp.* ABvPr11. a) aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento difundido en el medio. c) Vista de 2 fiálides con sus conidióforos. d) Vista de un conidióforo con conidias globosas dispuestas sobre la fiálide en forma zigzagueante.

a)



b)



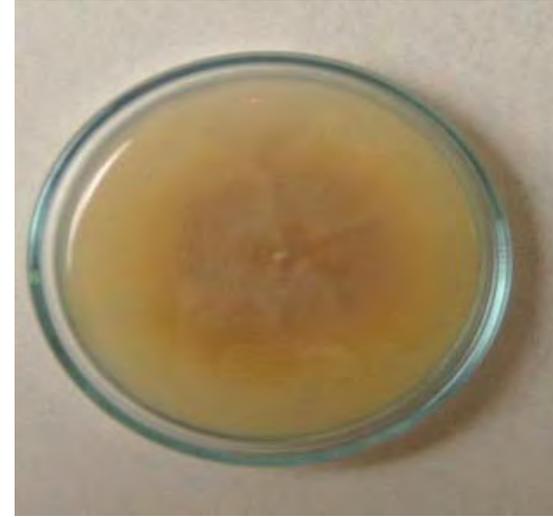
c) 100X

**FIGURA 8:** Caracterización morfológica de *Acremonium* sp. DperMa052B: a) aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento difundido en el medio. c) Vista de un conidióforo delgado en cuyo extremo distal se encuentran las conidias elipsoidales reunidas en una cabezuela.

a)



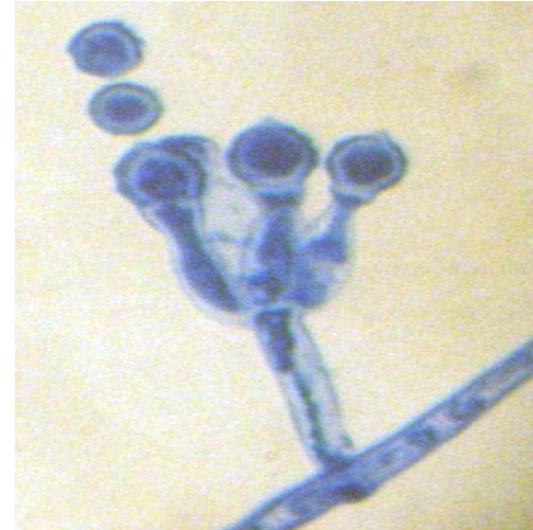
b)



c) 40X



d) 100X



**FIGURA 9:** Caracterización morfológica de *Scopulariopsis sp.* DperMa053M: a) Aspecto de la colonia. b) Producción de pigmento difundido en el medio. c) Vista del conidióforo ramificado, con conidias en su ápice. d) Conidióforo con anelosporas (conidias) unicelulares producidas en cadenas basipetales.



*Beauveria sp. ABvPr11*



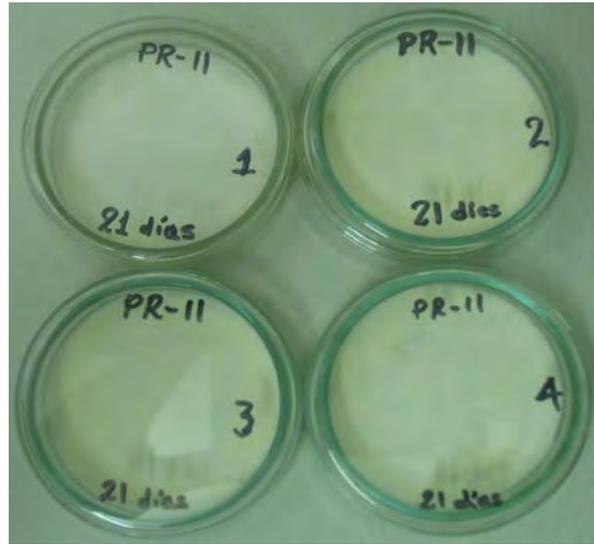
*Acremonium sp. DperMa 052B*



*Scopulariopsis sp. DperMa 053M*

**FIGURA 10.-** Esporulaci3n de los hongos en frascos con APD en pico de flauta.

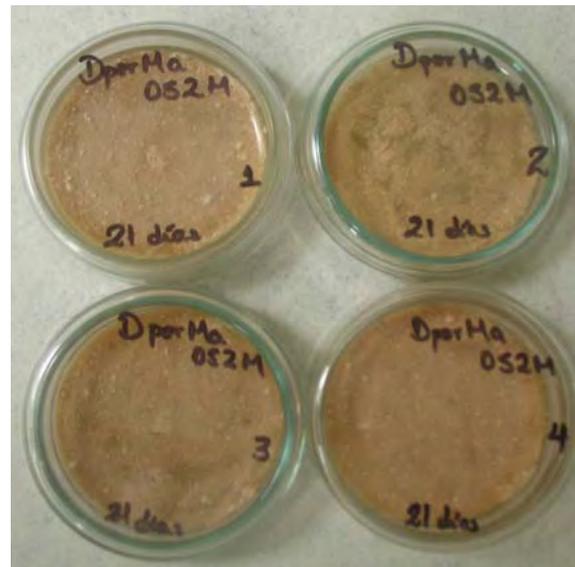
(1)



(2)



(3)



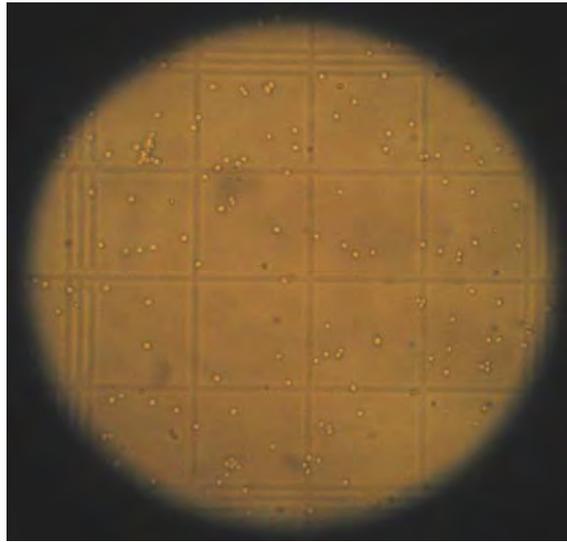
(1) *Beauveria* sp. cepa ABvPr11

(2) *Acremonium* sp. cepa DperMa052B

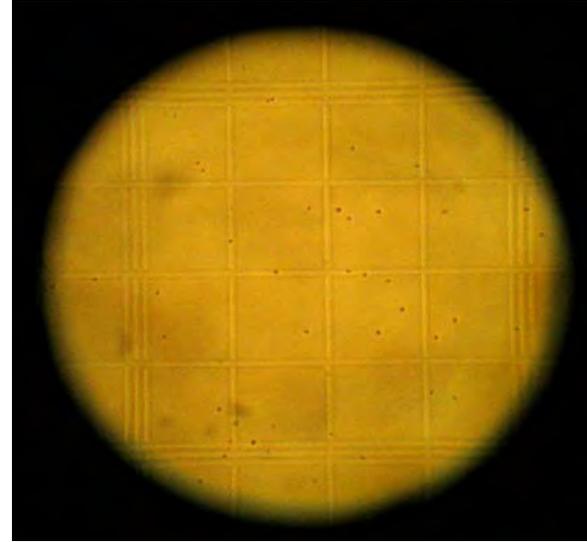
(3) *Scopulariopsis* sp. cepa DperMa053M

**FIGURA 11.-** Producción de conidias. Los hongos evaluados se sembraron en placas con APD y fueron incubados por 21 días. Se realizaron 4 repeticiones para cada cepa.

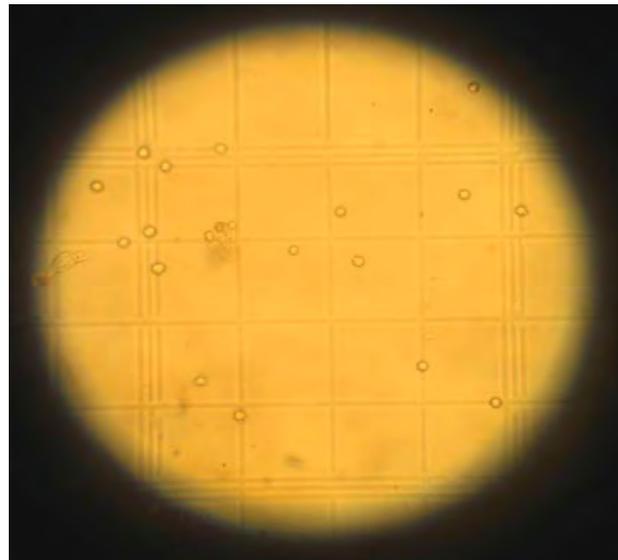
**(1)**



**(2)**



**(3)**

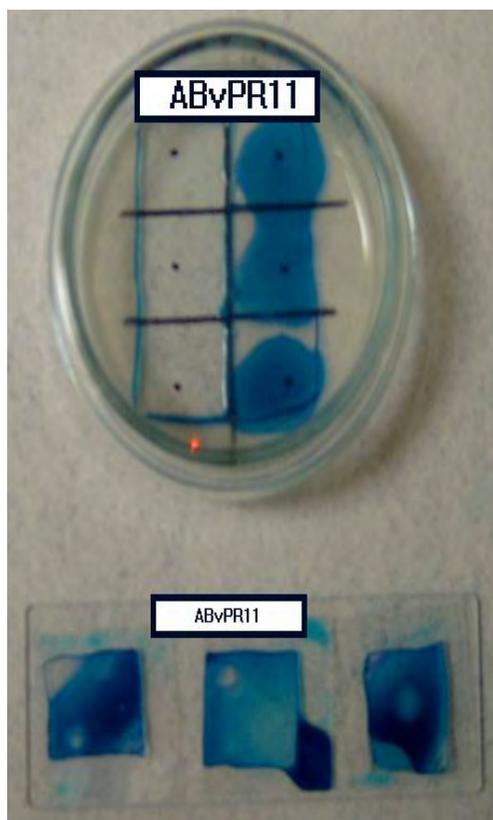


**(1)** *Beauveria* sp. cepa ABvPr11

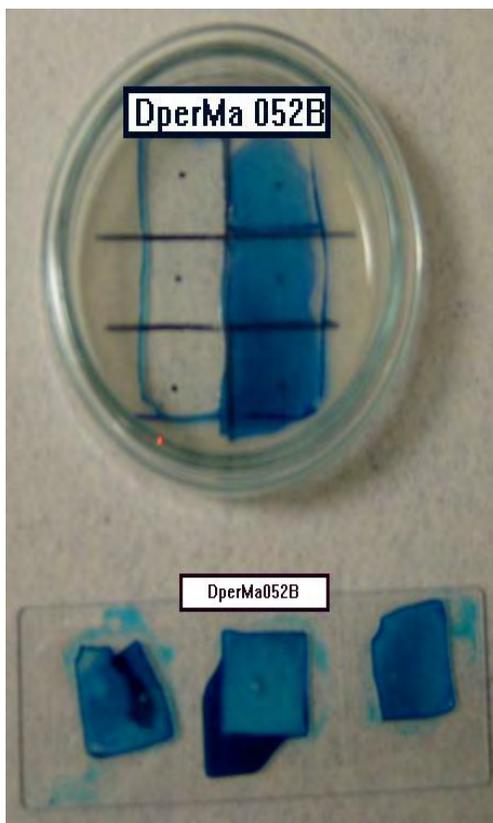
**(2)** *Acremonium* sp. cepa DperMa052B

**(3)** *Scopulariopsis* sp. cepa DperMa053M

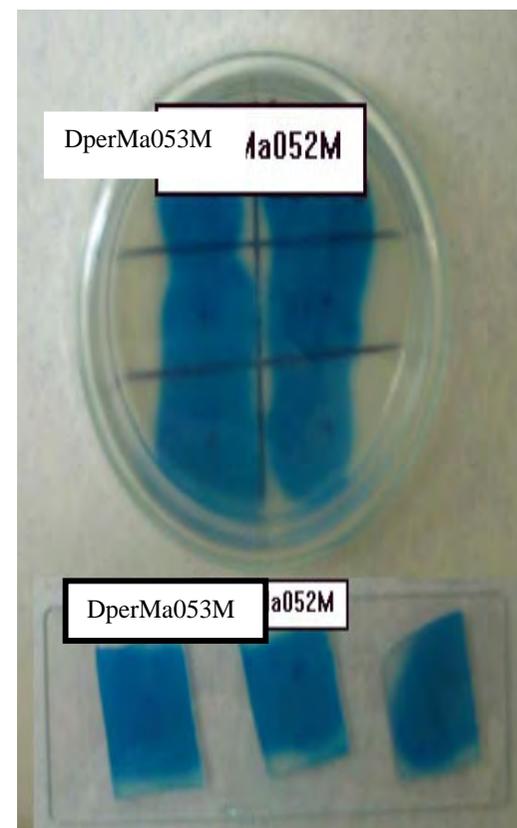
**FIGURA 12:** Producción de conidias de los 3 hongos evaluados, conteo de conidias al microscopio con cámara de Neubauer 40X



***Beauveria* sp. ABvPr11**



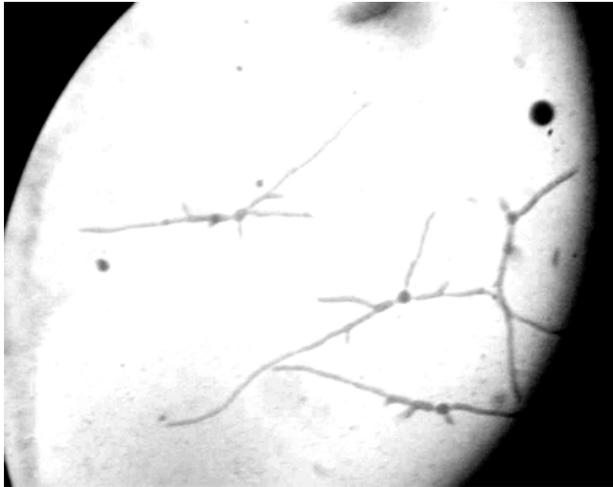
***Acremonium* sp. DperMa 052B**



***Scopulariopsis* sp. DperMa 053M**

**FIGURA 13.-** Porcentaje de germinación. Se sembraron 6 alícuotas de una solución conidial de cada hongo evaluado en placas con APD. Transcurridas 24 horas se agregó azul de lactofenol para detener la germinación. Cada sector de agar fue cortado y colocado en un portaobjeto y posteriormente cubiertas con un cubreobjeto.

*Beauveria sp. cepa ABvPr11*



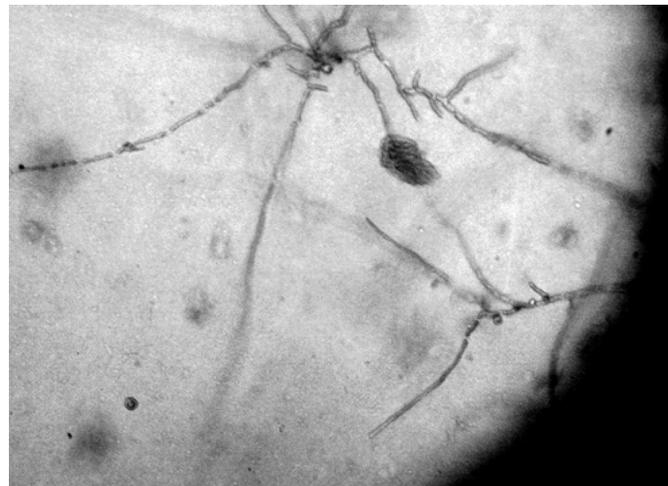
100X

*Acremonium sp. DperMa 052B*



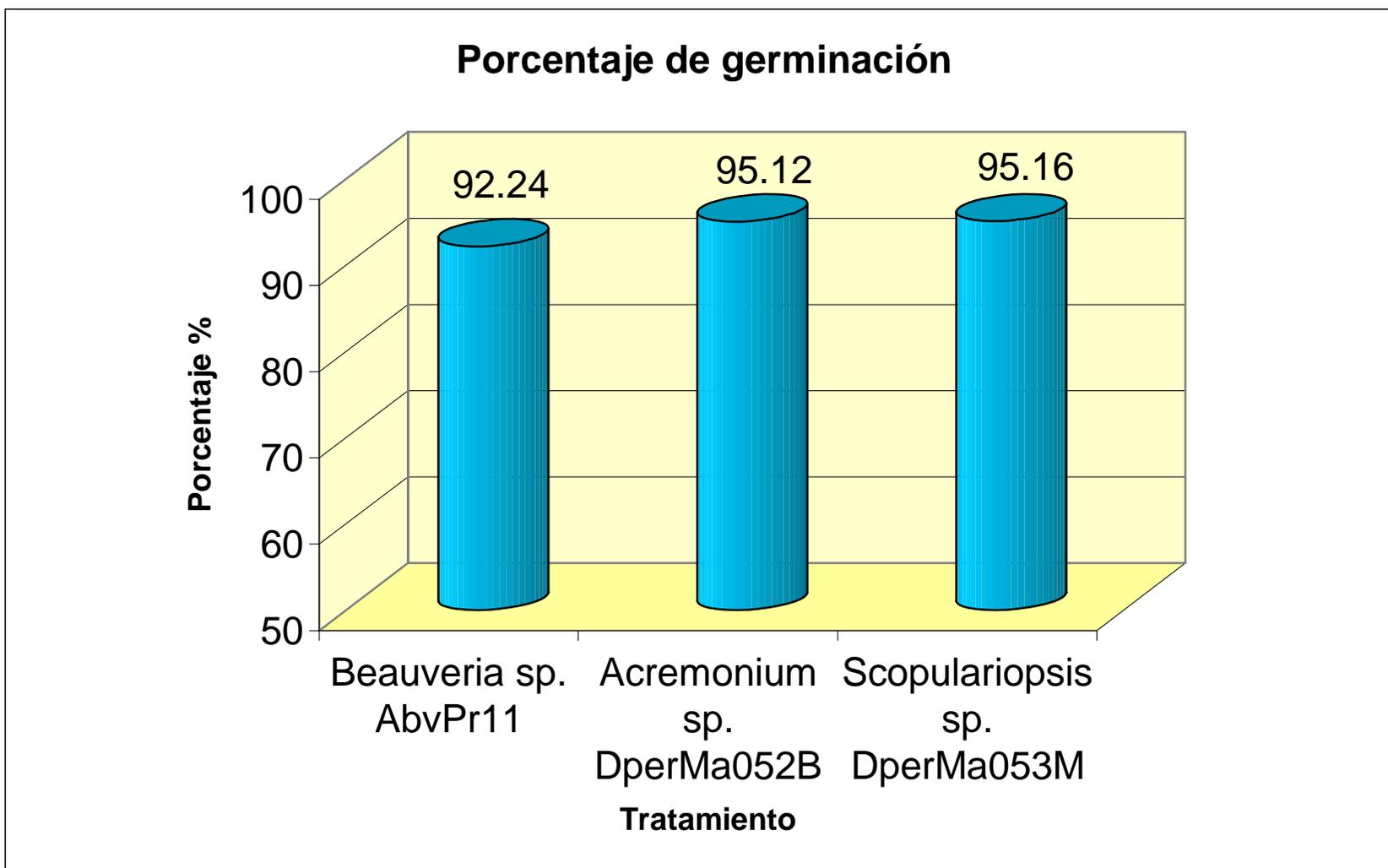
100X

*Scopulariopsis sp. DperMa 053M*

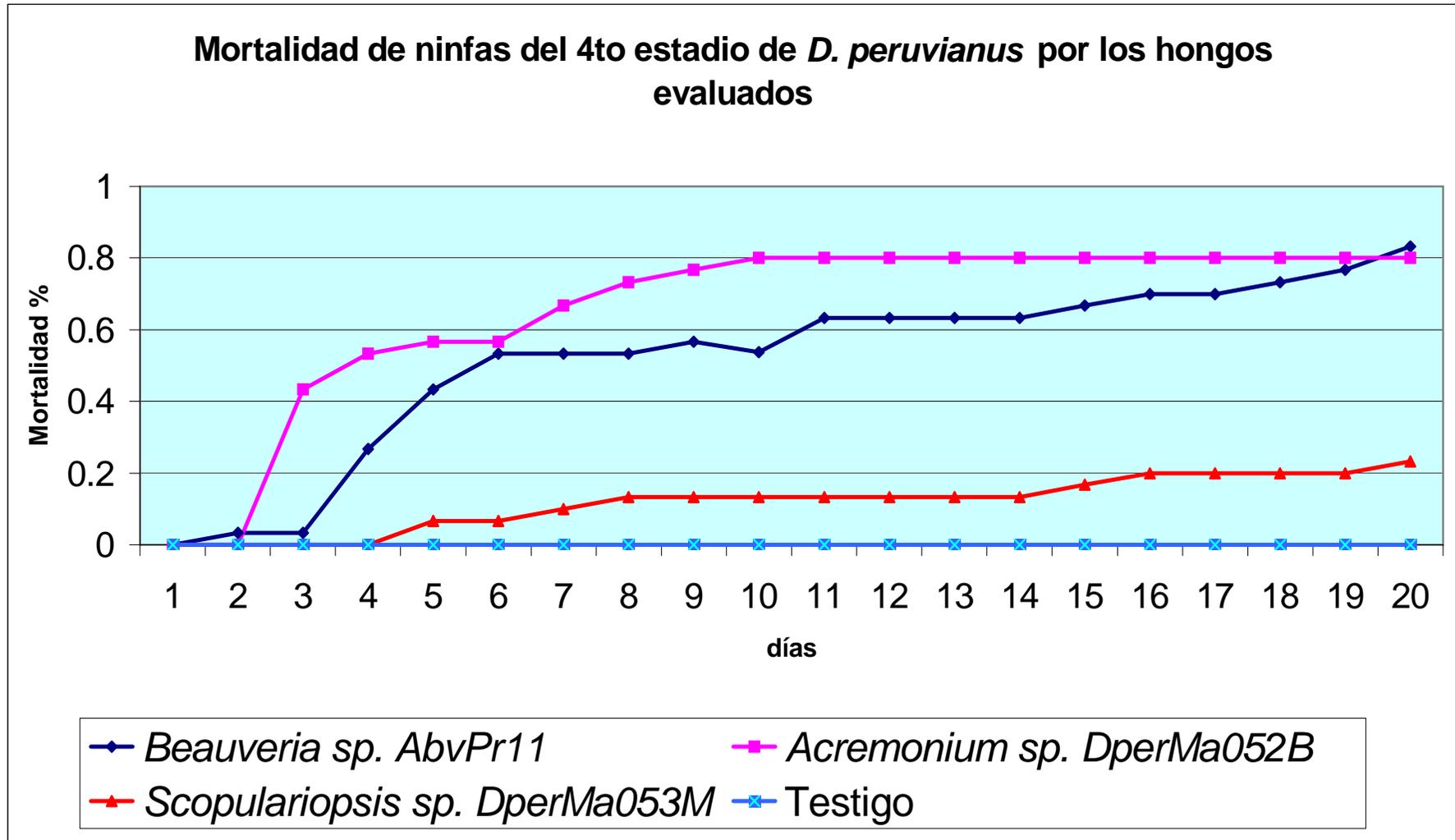


100X

**FIGURA 14.-** Conidias germinadas de los 3 hongos evaluados. Se consideró como conidia germinada aquella cuyo tubo germinativo presentaba el doble del diámetro mayor de la conidia.

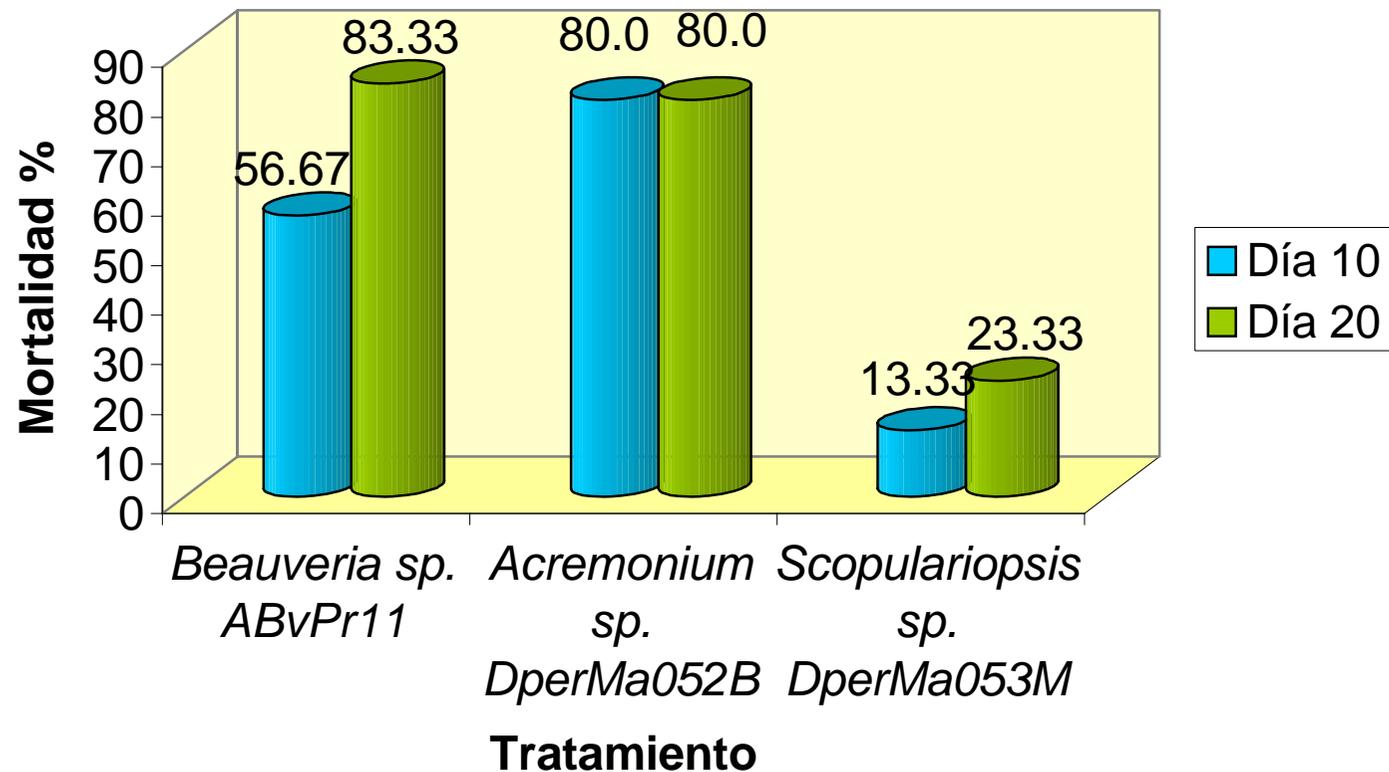


**FIGURA 15.-** Porcentaje de germinación de las 3 cepas de hongos evaluados

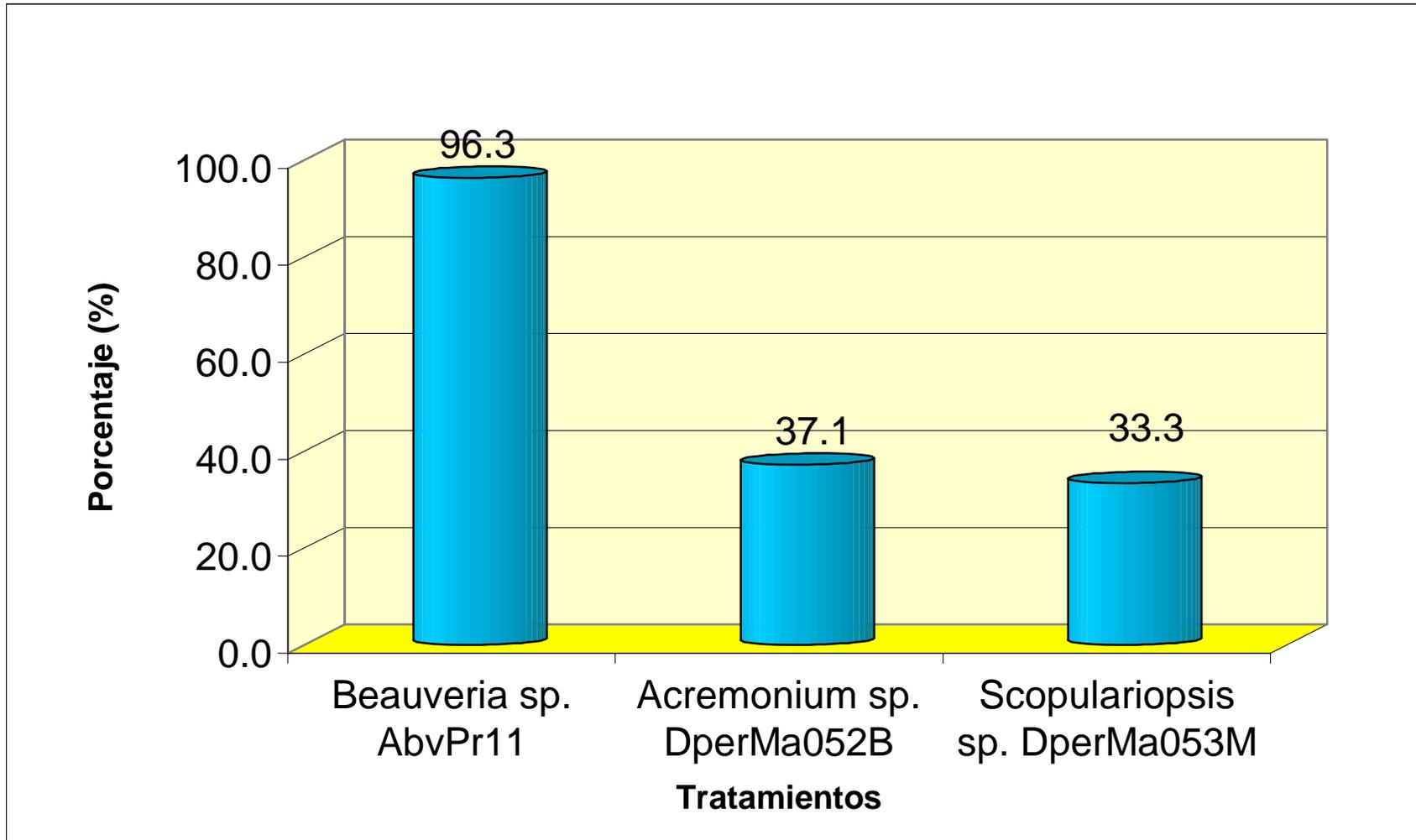


**FIGURA 16.-** Mortalidad diaria causada por las cepas de los hongos evaluados sobre ninfas del 4to estadio de *Dysdercus peruvianus*

## Mortalidad de ninfas del 4to estadio de *Dysdecus peruvianus* por los hongos evaluados



**FIGURA 17.-** Mortalidad causada por los hongos evaluados en Ninfas del 4to estadio de *Dysdecus peruvianus*



**FIGURA 18.-** Tasa de infección: porcentaje de recuperación de los hongos en ninfas muertas a lo largo del experimento.