ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* (DEUTEROMYCETE) EN EL COMBATE DE *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae).

Tesis presentada como requisito parcial para optar al
título de Ingeniero Agrónomo en el grado
académico de Licenciatura

Por

Juan Diego Molina Lupiac.

Abril de 1997.

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

_____

Juan Diego Molina Lupiac

Honduras, Abril de 1997.

EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* (DEUTEROMYCETE) EN EL COMBATE DE *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae).

Por

Juan Diego Molina Lupiac

Aprobada:

_____	_____
Sally Gladstone, Ph. D. Asesor principal	Juan J. Alán, Ph. D. Coordinador PIA
_____	_____
Michael Zeiss, Ph.D. Consejero	Pablo E. Paz, Ph. D. Jefe de Departamento
_____	_____
Juan José Alán, Ph. D. Consejero	Antonio Flores, Ph. D. Decano Académico
_____	_____
	Keith L. Andrews,Ph.D. Director

DEDICATORIA.

En primer lugar a Dios por su ayuda y protección.

A mi esposa e hija Cinthia de Molina y Andrea Molina por su apoyo y amor, que son la razón y fin de este proyecto.

A mis padres Juan Diego e Isabel por su ayuda y apoyo, a mis hermanos Karina, Sofía, Gisel, Alex y Dennis por su ayuda incondicional.

A mis abuelos Humberto Lupiac (Q.D.D.G) y Digna de Lupiac por el cariño brindado.

A mi familia con quien siempre he podido contar.

A la familia Pineda Madrid por su aceptación y apoyo durante este año.

AGRADECIMIENTOS.

Al Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) por el finanaciamiento de mis estudios.

A la Dra. Sally Gladstone por su asesoría y tiempo en la revisión y supervisión de los trabajos realizados.

Al Dr. Raúl Espinal por su asesoría, amistad y confianza depositada en mi persona.

A los Drs. Valerie Wright y Richard Markham, por sus consejos para realización de este trabajo.

Al Dr. Michael Zeiss por su ayuda en los análisis estadísticos.

Al Dr. Juan José Alán por su ayuda en la revisión de mis trabajos.

A mis amigos: Rafael, Carolina, Jorge, José por la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A todo el personal del CITESGRAN por la ayuda y colaboración brindada en especial Suyapa, Marvin y Edgardo.

RESUMEN

Prostephanus truncatus es una plaga de maíz almacenado tradicionalmente, este fue introducido accidentalmente en África donde esta causando severas pérdidas en maíz y yuca almacenados tradicionalmente. Para el combate de *P. truncatus* se introdujó en África el depredador *Teretriosoma nigrescens*. Este estudio se hizo con la finalidad de evaluar una nueva táctica de combate biológico, mediante el uso del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, contra *P. truncatus*, que no dañe a *T. nigrescens* ni a la salud humana. En un bioensayo se evaluó la patogenicidad de los cinco aislamientos de *B. bassiana* a una concentración de $1x10^8$ conidios por ml, en contra de *P. truncatus* y *T. nigrescens* y se encontró que los aislamientos provenientes de las plagas *Anthonomus grandis* y *Cosmopolites sordidus* causaron una mortalidad de 86.7% y 84.4% respectivamente en *P. truncatus*, mientras que en *T. nigrescens* causaron una mortalidad de 62.2% y 66.7% respectivamente. Se seleccionó el aislamiento de *A. grandis* para ser probado en almacenes tradicionales de maíz. En un ensayo realizado en trojas experimentales en casas de los agricultores se aplicó una dosis de $1x10^{10}$ conidios por troja en mezcla con kaolinita aplicados en forma preventiva a maíz fumigado es decir, antes de la llegada de *P. truncatus*. En un segundo ensayo se aplicó el hongo en kaolinita en forma curativa, cuando *P. truncatus* se encontraba en el interior de las mazorcas. En ambos ensayos se liberaron cuatro adultos de *P. truncatus* por mazorca. Las trojas fueron arreglados en un Diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones por tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los ensayos para las variables analizadas, *P. truncatus* y *S. zeamais* por kilogramo de grano y pérdida de peso. Cuando se aplicó el hongo en forma preventiva se encontraron porcentajes de mortalidad por *B. bassiana* mayores en *P. truncatus* (1.38%) que cuando se aplicó en forma curativa (0.31%), lo cual nos indica que *P. truncatus* no se infecta con el hongo al estar dentro de las mazorcas con abundancia de comida por lo que debería aplicarse el hongo al momento de almacenarse las mazorcas. En cuanto a *S. zeamais* la mortalidad fue de 0.6% y de 0.37%, respectivamente, por lo que no se recomienda el uso del hongo en contra de *S. zeamais* ya que este se encuentra en el interior de las mazorcas antes de ser almacenadas.

CONTENIDO.

	Página
Portada	i
Derechos de Autor	ii
Hoja de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Contenido	vii
Indice de Figuras	viii
Indice de Cuadros	ix
Indice de Anexos	x
I. Introducción	1
II. Revisión de Literatura	3
2.1 Taxonomía y Morfología de *Prostephanus truncatus*	3
2.2 Biología de *Prostephanus truncatus*	3
2.3 Hospederos de *Prostephanus truncatus*	4
2.4 Distribución de *Prostephanus truncatus*	4
2.5 Daños y Pérdidas causadas por *Prostephanus truncatus*	5
2.6 Medios de Combate	5
2.6.1 Prácticas culturales	5
2.6.2 Combate biológico	6
2.7 Historia del combate biológico por entomopatógenos	6
2.8 Características de los hongos	7
2.9 Ventajas y desventajas del combate microbiológico	7
2.10 Toxinas producidas por *Beauveria bassiana*	8
2.11 Ciclo de vida y síntomas de infección del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*	8
2.12 Factores que afectan el desarrollo del hongo	9

III. Materiales y Métodos..... 12
3.1 Ensayo I. Evaluación de la patogenicidad de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Prostephanus truncatus* y *Teretriosoma nigrescens*..... 12
3.1.1 Establecimiento de los bioensayos..... 13
3.1.2 Revisión de los bioensayos..... 14
3.2 Ensayo II y III. Evaluación de *Beauveria bassiana* en kaolinita en el control de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* en almacenes tradicionales de maíz..... 14
3.2.1 Localización del Estudio..... 14
3.2.2 Diseño del Estudio..... 15
3.2.3 Recolección y análisis de muestras..... 16
3.2.4 Análisis Estadístico..... 17

IV. Resultados..... 18
4.1 Ensayo 1. Patogenicidad de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Prostephanus truncatus* y *Teretriosom nigrescens*..... 18
4.2 Ensayos II y III. Evaluación de *Beauveria bassiana* en Kaolinita en el control de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* en almacenes tradicionales de maíz..... 20
4.2.1 Ensayo II. Trojas infestadas con *Prostephanus truncatus* al momento de la aplicación del producto..... 20
4.2.2 Ensayo III. Trojas inoculadas con *Prostephanus truncatus* un mes antes de la aplicación del producto..... 23

V. Discusión..... 27

VI. Conclusiones..... 30

VII. Recomendaciones..... 31

VIII. Literatura citada..... 32

IX. Anexos..... 37

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura Página
1. Ciclo de vida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*..... 11
2. Porcentajes de mortalidad de *Prostephanus truncatus* provocados por los cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* en *Prostephanus truncatus*..... 18

3. Porcentajes de mortalidad de *Teretriosoma nigrescens* debido a los aislamientos de *Beauveria bassiana* y el testigo..... 19

4. Tiempo letal medio de los cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* en *Prostephanus truncatus*..... 20

5. Dinámica poblacional de *Prostephanus truncatus* en trojas aplicadas con *Beauveria bassiana* mas kaolinita y trojas testigo en maíz fumigado previa la inoculación con *Prostephanus truncatus*..... 21

6. Dinámica poblacional de *Sitophilus zeamais* en trojas aplicadas con *Beauveria bassiana* mas kaolinita y trojas testigo en maíz fumigado previa la inoculación con *Prostephanus truncatus*..... 21

7. Porcentaje de mortalidad de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* por *Beauveria bassiana* en trojas aplicadas con *Beauveria bassiana* más kaolinita en maíz fumigado previa la inoculacion con *Prostephanus truncatus*..... 22

8. Pérdida de peso en trojas aplicadas con *Beauveria bassiana* más kaolinita y trojas testigo con maíz fumigado previa la inoculación con *Prostephanus truncatus*..... 23

9. Dinámica poblacional de *Prostephanus truncatus* en trojas con *Beauveria bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz inoculado con *Prostephanus truncatus* previa la aplicación del producto..... 24

10. Dinámica poblacional de *Sitophilus zeamais* en trojas con *Beauveria bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz inoculado con *Prostephanus truncatus* previa la aplicación del producto..... 24

11. Porcentaje de mortalidad de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* en trojas con *Beauveria bassiana* más kaolinita en maíz inoculado con *Prostephanus truncatus* previa la aplicación del producto y muestra viva de *P. truncatus*..... 25
12. Pérdidas de peso en trojas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz inoculado con *Prostephanus truncatus* antes de la aplicación del producto..... 26

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro Página

1. Características de los cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*..... 12

2. Tiempo letal medio de los cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*..... 19

3. Valores F para las variables densidad de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* y pérdida de peso en el En sayo II..... 20

4. Valores F para las variables densidad de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* y Pérdida de peso en el Ensayo III..... 23

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo Página
1. Resumen de la Metodología de análisis de muestras en el laboratorio..... 38

2. Análisis de Varianza para las variables *P. truncatus* por Kilogramo, *S. zeamais* por kilogramo y pérdida de peso en el Ensayo II..... 39

3. Análisis de Varianza para las variables *P. truncatus* por Kilogramo, *S. zeamais* por kilogramo y pérdida de peso en el Ensayo III..... 40

I. INTRODUCCIÓN.

En América Latina y África , el maíz es uno de los principales cultivos utilizados para la alimentación humana. En estas regiones, se ha encontrado que en los sistemas tradicionales de almacenamiento de grano seco se pueden llegar a tener severas pérdidas debido al mal manejo de los granos. El mal secado y, sobre todo, el daño ocasionado por el ataque de insectos de almacén, son las principales causas de las pérdidas.

Actualmente, se estima que el promedio de las pérdidas de granos a nivel mundial durante el período poscosecha es de un 10 porciento anual (FAO,1992). Las pérdidas encontradas durante este período se deben sobre todo por agentes bióticos: insectos, roedores, aves y el hombre mismo. FAO (1992) estima que los insectos son responsables de un 70 por ciento de las pérdidas poscosecha en la producción de agricultores de subsistencia. Además del daño directo, los insectos provocan, con su actividad, un aumento de la temperatura y humedad del lugar de almacenamiento, lo cual favorece el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos.

Las pérdidas en Latinoamérica son causadas por insectos primarios como *Sitophilus zeamais* Motsh (Coleoptera: Curculionidae) que es la plaga principal asociada con las pérdidas de almacenamiento de maíz en las regiones tropicales del continente (Ríos Ibarra, 1991). Sin embargo, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), el mayor barrenador de los granos, puede causar pérdidas mayores en caso de no tener huéspedes alternos como árboles de los géneros *Spondia* y *Bursera* (Novillo 1991).

Prostephanus truncatus es una plaga ocasional de maíz almacenado tradicionalmente en Mesoamérica, su lugar de origen. Sin embargo, este insecto fue introducido accidentalmente en África a principios de la década de los ochenta. Actualmente, se encuentra distribuida en África del este y del oeste, convirtiéndose en un problema muy importante en maíz y yuca almacenados tradicionalmente (Markham *et al.*, 1991). Investigaciones en Tanzania informan que *P. truncatus* provoca pérdidas máximas de 17.4 por ciento en el peso seco después de seis meses de almacenamiento y de 41.2 por ciento después de ocho meses (Keil, 1988).

Debido a los graves daños que esta causando *P. truncatus* en África se establecieron varios proyectos internacionales para desarrollar un sistema de manejo integrado de plagas. Uno de los componentes de este manejo integrado incluye el control biológico realizado por entomopatógenos como el hongo *Beauveria bassiana* (Deuteromycete).

Además, *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera:Histeridae), un depredador de *P. truncatus,* ha sido introducido intencionalmente en África, pero no ha tenido el impacto que se esperaba ya que es la principal táctica de control biológico utilizada en estos momentos.

El objetivo general de este estudio fue el de evaluar una táctica de control biológico para *P. truncatus* y *S. zeamais* que no dañe a *T. nigrescens* y de bajo riesgo a la salud humana a través de los siguientes objetivos específicos: la evaluación de aislamientos de *B. bassiana* a nivel de laboratorio para escoger el aislamiento que realize el mejor control sobre *P. truncatus* y el menor daño a *T. nigrescens*; y su aplicación en almacenes tradicionales de maíz infestados con *Prostephanus truncatus* antes y después de la aplicación del hongo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Taxonomía y morfología de *P. truncatus*.

La larva de *P. truncatus* tiene forma recurvada, su cuerpo y sus extremidades en todos los instares son de color blanco cremoso (Gardner, 1945., citado por Mateo, 1996). La pupa también es de color blanco cremoso aunque se vuelve café con la edad (Spilman, 1984., citado por Mateo, 1996). Los adultos tienen forma cilíndrica, de color café obscuro, de 1.5 mm de ancho y de 3 a 5 mm de largo (Hodges, 1983., citado por García, 1996), típica de los bostrichidos.

2.2 Biología de *P. truncatus*.

Los estadios de huevo, larva y pupa duran en promedio 4.9, 25.4 y 5.2 días respectivamente, resultando un total de 35 días desde huevo hasta adulto a 30 °C y 70% de humedad relativa (HR) (Shires, 1980). Li (1988) encontró que *P. truncatus* puede completar su ciclo de vida en 34.5 días a 30 °C y 70 % HR, con un rango de 31 a 38 días mientras que Hodges y Meik (1984) encontraron un ciclo de vida de 32 a 39 días a 30 °C y 70% de HR.

Según sondeos realizados en 1995 los almacenes tradicionales de maíz generalmente son infestados por *P. truncatus* al momento de iniciarse las lluvias entre los meses de mayo y junio que es el período cuando presentan una mayor actividad de vuelo (Espinal, 1996)[1] . En Kenya encontraron la mayor actividad de vuelo de *P. truncatus* durante el período de las lluvias cortas entre septiembre y diciembre (Nángayo, 1993).

[1] ESPINAL, R. 1996. Prácticas culturales para el control de *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Grupo ALCON, San Pedro Sula, Honduras. (Comunicación personal).

2.3 Hospederos de *P. truncatus*.

P. truncatus como plaga de maíz probablemente se originó de un barrenador de la madera o de otras partes de plantas (Chittenden, 1911). También pueden ser substrato para el desarrollo de *P. truncatus* la yuca seca (Nyakunga, 1982), así como el camote seco (Li, 1988).

Se han usado trampas con feromonas que han mostrado que *P. truncatus* puede actuar fuera de sistemas de producción y almacenamiento de maíz (Herrera *et al*., 1989 y 1991; citado por García 1995). Por tanto, existen posibles hospederos alternos en forma natural. Infestaciones naturales en árboles de *Spondias purpurea* y *Bursera fagaroides*, incluyendo estados inmaduros del insecto, han sido observados en bosques deciduos secos en México (Ramírez, 1991).

2.4 Distribución de *P. truncatus*.

La plaga es originaria de Mesoamérica desde el sur de Texas hasta Panamá y Colombia (Wright, 1984). En México esta distribuida en Yucatán y Quintana Roo (Herrera *et al.* , 1989; Rees *et al*., 1990) y en el sur del país (Ríos Ibarra, 1991). En Honduras se encuentra en la costa norte y en el sur (Novillo, 1991) y en las zonas productoras de maíz del interior del país (Hoppe, 1986).

Fue introducido en África accidentalmente a principios de la década de los ochenta, donde se ha establecido como una plaga destructiva. En África se detectó por primera vez en dos lugares, Tanzania (Golob y Hodges, 1982) y Togo (Harnish y Krall, 1984). De Tanzania se ha difundido a África oriental en el sur de Kenya y Burundi (Golob, 1988) y de Togo a África occidental en Benin y Ghana (Dick y Rees, 1989). El transporte de productos en regiones del continente africano y el intercambio de víveres en mercados locales y regionales ha promovido la rápida propagación de la plaga, ya que esta tiene una alta capacidad de vuelo (Ritcher y Biliwa, 1991).

En el sur de California y Arizona se encontraron especímenes en productos alimenticios importados de China y mas recientemente en flores de azucena que provenían de Hong Kong (Zimmerman, 1990).

2.5 Daños y pérdidas causadas por *P. truncatus*.

P. truncatus es una plaga con un alto potencial de daño a lo largo del período de almacenamiento. En almacenes de maíz infestados con *P. truncatus* en el valle de Zamorano en Honduras, se encontraron pérdidas de 21.1% a los 10.5 meses después de iniciado el almacenamiento durante el primer año de evaluación, mientras que en el siguiente año de almacenamiento se encontraron pérdidas de 15.6% a los 4.5 meses (Novillo, 1991). En Nicaragua se han encontrado pérdidas de hasta 40% en almacenes tradicionales con maíz en mazorca, durante un período de seis meses (Giles y León, 1974). Por esto es que las pérdidas en los neotrópicos es objeto de debate. Sin embargo, existe la impresión de que las pérdidas son más bajas que en África (Boeye *et al*, 1988; Laborius, 1990b).

Hodges y Meik (1984) observaron en Tanzania que al inicio del almacenamiento el 20% de los almacenes estaban infestados con *P. truncatus* y al final del período (5 a 6 meses después) el 80% de los almacenes presentaban infestaciones por *P. truncatus*. Después de 3 a 6 meses de almacenamiento las mazorcas presentaron pérdidas de peso mayores del 34%, donde el promedio de pérdidas de peso antes de la aparición de *P. truncatus* era de 9%. También en Togo se observó que en varios almacenes hubo perforaciones de las mazorcas por *P. truncatus* en 100% de ellas después de nueve meses de almacenamiento, dándose una pérdida de peso de 30.2% en seis meses de almacenamiento donde el promedio anterior de la zona era de 7% (Pantenius, 1988).

Hodges *et al*. (1985) observaron que *P. truncatus* también causa daños en yuca. Se han encontrado pérdidas mayores de 70% en yuca fermentada y 50% en yuca no fermentada después de cuatro meses de almacenamiento en Tanzania.

2.6 Medios de combate

2.6.1 Prácticas culturales.

Se han evaluado varias prácticas culturales sobre todo en lo que se refiere al tiempo de cosecha en relación con el patrón de la actividad de vuelo de *P. truncatus*, y modificaciones en el proceso de selección y almacenamiento de las mazorcas de maíz. Cuando existen infestaciones altas de *P. truncatus* la selección de mazorcas limpias y con buena cobertura por tuza, pueden reducir la infestación y por consiguiente la pérdida de peso (Dick, 1990). También es recomendable realizar el desgranado de las mazorcas a los cinco meses de almacenamiento y aplicarles un protector de grano y, preferiblemente, fumigarlo en recipientes herméticos para disminuir las pérdidas de peso (Espinal, 1996)[2] .

2.6.2 Combate biológico.

Microorganismos patogénicos a *P. truncatus* han sido encontrados en Tanzania y en Centroamérica, como hongos del género *Aspergillus* spp., *Fusarim* spp. y otros hongos de almacén, los cuales no puede ser usados para el combate de la plaga en maíz almacenado porque podría ser un riesgo para la salud humana por los metabolitos tóxicos que producen (Boeye *et al*., 1988, Laborius, 1990a). Además se encontraron en Centroamérica hongos entomopatogénicos como son *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* que fueron obtenidos de insectos que no son plagas de almacén (Burde, 1988). En México se evaluaron dos incubaciones de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en contra de *P. truncatus* los cuales no produjeron buenos resultados (Ibarra y León, 1989).
Se encontró el histérido *Teretriosoma nigrescens* en asocio con la plaga en muestras de maíz (Haines, 1981), el cual ha sido utilizado en el combate biológico clásico. También se han encontrado algunos parasitoides de la familia Pteromalidae como son *Aniopteromalus calandrae* y *Choetospila elegans* en Costa Rica. Además, se ha encontrado *Calliodis sp*. (Hemiptera: Anthocoridae) y *T. nigrecens* (Col.: Histeridae) (Laborius, 1990a), los cuales no realizaron un buen control sobre la plaga.

Con la unión del control biológico con otros métodos de combate compatibles se espera encontrar una solución ambientalista y completa al problema.

---

[2] ESPINAL, R. 1996. Prácticas culturales para el control de prostephanus truncatus (Coleoptera: Bostrichidae). Grupo ALCON, San Pedro Sula, Honduras. (Comunicación personal)

2.7 Historia del control biológico por entomopatógenos.

Jackson *et al*., 1994 dicen que los hongos fueron los primeros microorganismos en ser asociados con los insectos. Hay reportes de que chinos y japoneses hace 1000 años usaron medicinas producidas de insectos infectados con hongos. Pero el primer escrito de un hongo infectando a un insecto fue en Europa en 1726, un hongo del género *Cordyceps*.

Los estudios modernos con enfermedades infecciosas realmente comenzaron con Agostino Bassi quien demostró en 1834 que el hongo *Beauveria bassiana* causaba enfermedades en el gusano de seda. Pero el primer intento práctico de usar hongos para el combate de insectos fue hecho por el ruso Elie Metschikoff que intento usar *Metarhizium anisopliae* en contra del escarabajo *Anisoplia austriaca* en 1879 (Jacckson *et al*, 1994).

Desde que los hongos fueron descubiertos como causantes de enfermedades en insectos se han descrito 700 especies de hongos entomopatogénicos. Actualmente se conocen 51 géneros de hongos que contienen especies entomopatogénicas (Sanson *et al*. 1988, Citado por Jackson *et al*, 1994).

2.8 Características de los hongos.

Los hongos son organismos eucarióticos. Con algunas excepciones, se reproducen naturalmente por medio de esporas y no tienen clorofila. La mayoría de las partes de un hongo pueden tener crecimiento individual aún cuando sean separadas del resto. Los cuerpos son generalmente como fibras o filamentos y comúnmente ramificados. No son mótiles, y las esporas pueden ser producidas sexual o asexualmente (Jackson *et al*., 1994).

Según Jackson *et al* 1994, los hongos se dividen en dos grupos:
1.Hongos inferiores de los ordenes: Mastigomycota, Zygomycota y Ascomycota.
2.Hongos superiores de los ordenes: Basidiomycota y Deuteromycota, (hongos imperfectos), que solo se reproducen asexualmente.
Los Deuteromycetes y los Ascomycetes son los grupos en los cuales se encuentran los hongos entomopatógenos mas conocidos.

2.9 Ventajas y desventajas del combate microbiológico.

Según Burges (1981) las ventajas y desventajas de este tipo de combate son:
Las ventajas de usar patógenos para combatir una plaga son:

a. Especificidad hacia el organismo que queremos combatir o un número limitado de especies hospederas.
b. No dañan a los vertebrados y las plantas.
c. No dejan residuos tóxicos.
d. Producen poca o ninguna contaminación ambiental.
e. Producen poca o ninguna resistencia por el organismo que combatimos.
f. Son compatibles con muchos pesticidas químicos, parasitoides, depredadores y otros patógenos.
g. Posibilidad de un combate a largo plazo.
h. De fácil aplicación con equipo convecional para pesticidas .
y. De fácil producción masiva para patógenos facultativos.
j. Son adaptables a modificaciones genéticas a través de la biotecnología .

Las ventajas del combate microbiológico son muchas pero se pueden convertir en desventajas dependiendo del patógeno que se utilice. Estas desventajas son:

a. Especificidad solo para el organismo que queremos combatir.
b. Los patógenos o sus productos son dañinos a otros organismos
c. Hora de aplicación es determinante para obtener máximos efectos.
d. Una buena cobertura es esencial para la ingestión del patógeno o contacto con organismos a controlar .
e. El tiempo de infección hasta la muerte no es inmediato.
f. Susceptible a inactivación por condiciones ambientales.
g. Pérdida de virulencia y patogenicidad por cultivos frecuentes.
h. Patógenos obligados son difíciles y caros en la producción masiva.
i. Solo se recomienda su uso para cultivos de alto valor económico .
j. Miedo de las personas a los patógenos.
k. Riesgos asociados con la ingeniería genética del patógeno.

2.10 Toxinas producidas por *Beauveria bassiana*.

Los compuestos que han sido aislados de varias especies del género *Beauveria* son:
a. Beauvericina: ha sido probada contra larvas de mosquitos, algunas bacterias y adultos de moscas caseras con los cuales ha dado buenos resultados , pero la DL50 no ha sido publicada. Este ha sido el compuesto con el cual se han realizado la mayoría de las investigaciones .
b. Beauviriloides: Se han aislado dos beauveriloides, el H y el I, de los micelios de *B. bassiana.* Se han hecho estudios y se ha encontrado que no han hecho daño a mosquitos y larvas de moscas.
c. Basianolida : Este compuesto ha sido aislado del quinto instar de larvas del gusano de seda en las que causa un alto grado de mortalidad .
d. Isarolidas y pigmentos: Con estos dos compuestos no se han realizado pruebas de toxicidad.
e. Ácido oxálico: Este ácido ha sido encontrado en la superficie de insectos muertos por *B. bassiana*. El ácido oxálico es generalmente venenoso, y su participación en el modo de acción de algunos hongos patógenos a plantas es bien conocido. Hasta el momento no se han encontrado evidencias de su rol en el modo de acción de *B. bassiana* (Burges,1981).

2.11 Ciclo de vida y síntomas de infección del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana.*

Desarrollo de *B. bassiana* en un hospedero susceptible (Figura 1):
a) El hongo entomopatógeno pueden causar infección en cualquier etapa del desarrollo del insecto.
b) Los conidios inician la germinación al entrar en contacto con la cutícula del insecto, y requieren de condiciones específicas de temperatura (15 a 35 °C) y una humedad relativa de 70% o mayor. A diferencia de los virus, bacterias y protozoarios, el hongo no necesita ser ingerido para causar infección.
c) Durante la germinación, en las primeras 24 horas, el tubo germinal produce enzimas que destruyen la cutícula y la pared celular que permite que el hongo penetre.
d) El tubo germinal llega a la cavidad hemocélica, produce micelios vegetativamente que invaden los tejidos y fluidos corporales, hasta llenar el interior del hospedero y matarlo por el daño mecánico o por la liberación de toxinas resultantes del metabolismo (la muerte del hospedero ocurre generalmente cinco a seis días después de la penetración del

tubo germinal). El lapso entre la infección y la muerte es función de la temperatura, el nivel de inoculación y la susceptibilidad del hospedero.
e) Cuando las condiciones ambientales son favorables, ocurre la esporulación, manifestándose por los brotes de cuerpos fructíferos, llamados conidióforos, sobre el integumento del insecto; estos producen conidios (conidiogénesis) bajo condiciones de alta humedad.
f) El viento, con condiciones de baja humedad dispersa los conidios a la cutícula de nuevos hospederos. También, pueden ser dispersados por adultos infectados, por la lluvia, el movimiento de insectos no hospederos, y a través de las heces de los hospederos infectados. El número de conidios producidos sobre los cadáveres es un factor importante para determinar el potencial epizóotico de las razas. Las razas virulentas no necesariamente producen conidios en abundancia (Cave, 1995).

Síntomas de Infección.
Los hospederos infectados son débiles e inactivos, se cubren de un hollín blanco (micelios) y mueren lentamente, quedando momificados como moho algodonoso (esporulación) de color blanco. Si no hay esporulación los cadáveres están duros debido a que están llenos de hifas (Cave, 1995).

2.12 Factores que afectan el desarrollo del hongo.

Estos microorganismos requieren ciertas condiciones para completar su ciclo de vida. Las condiciones ambientales adversas pueden restringir la infección en cualquier estado del ciclo del patógeno. También, existe una interrelación entre todos los factores ambientales bióticos y abióticos. Los factores abióticos incluyen: la temperatuta, la humedad, la luz, la materia inorgánica, el pH, la aireación, y la presencia de pesticidas; los factores bióticos incluyen las poblaciones de la plaga, las plantas hospederas y otros entomopatógenos. Otros factores que limitan la susceptibilidad del insecto son: la densidad poblacional, el hábitat, sus hábitos y su resistencia.

Cuando una condición de enfermedad ocurre en un insecto, no somos capaces de determinar que factor causó el estrés, que actuó para disminuir la resistencia del insecto, o si el factor fue un estimulador o activador del patógeno. Los factores que pueden actuar como estresadores o estimuladores según sea el caso, son: la temperatura, la humedad, la superpoblación, las hambrunas, la nutrición, el oxígeno, el desbalance hormonal, las sustancias químicas y drogas, intoxicación por proteínas, la luz ultravioleta, los rayos X, las heridas o la hiperactividad. Hay una gran variación con cada factor de estrés que diferirán en intensidad y tiempo, y cualquiera de ellos puede convertirse en el más importante bajo ciertas condiciones (Tanada,1993).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Ensayo I. Evaluación de la patogenicidad de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Prostephanus truncatus* y *Teretriosoma nigrescens.*

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal (DPV), de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, Honduras.

Se realizaron bioensayos con cinco aislamientos del hongo entomopatógeno *B. bassiana,* en dos formulaciones: conidios secos y conidios en emulsión de aceite. Estos aislamientos provienen de plagas de los ordenes Coleoptera y Lepidoptera (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de los cinco aislamientos de *B. bassiana*.

Aislamiento	Formulación	País de origen	Huésped original
1	emulsión de aceite	EE.UU.	desconocido
2	conidios secas	Nicaragua	*Hypothenemus hampeii* (Coleoptera: Scolytidae)
3	conidios secas	Nicaragua	*Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae)
4	conidios secas	Nicaragua	*Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae)
5	conidios secas	Nicaragua	*Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

Los aislamientos provenientes de Nicaragua fueron enviados por el Proyecto MIP, CATIE, Managua, Nicaragua.

El aislado 1, comercializado bajo el nombre de Mycotrol, provenía de la Cía. MYCOTECH, Butte, Montana EEUU.

3.1.1 Establecimiento de los bioensayos.

Los adultos de *P. truncatus* utilizados en los bioensayos tenían una edad aproximada de 25 a 35 días de emergidos. Para asegurarnos de esto, se colocaron 50 adultos a ovopositar en 100 g de grano de maíz durante 21 días. Luego, se removieron los 50 adultos. Se esperó entre 30 y 35 días para que los adultos de la siguiente generación emergieran del maíz. Los nuevos adultos fueron mantenidos en la cámara de cría del Laboratorio de Entomología del CITESGRAN durante un día bajo las siguientes condiciones controladas: humedad relativa 70 ± 7%; 27 ± 2 °C. Estas condiciones se verificaron semanalmente por medio de un higrotermógrafo. Se les proporcionó 12 hr de oscuridad y 12 hr de luz por día (Cálix 1995). Los *T. nigrescens* provenían de crías mantenidas en granos de maíz infestados con *P. truncatus*, en el laboratorio con las mismas condiciones que *P. truncatus*.

Las pruebas se montaron en una cámara de flujo laminar en un cuarto aséptico, debido a que nos proporcionan las condiciones para evitar que los insectos fueran infestados por otros microorganismos. En *P. truncatus* se probaron todos los aislamientos, mientras en *T. nigrescens* solo se probaron los aislamientos 3 y 4 (Cuadro 1), por que estos causaron una mayor mortalidad en *P. truncatus* y un testigo para ambos en el cual los *P. truncatus* y *T. nigrescens* fueron sumergidos solo en agua destilada.

Para cada aislamiento se preparó una solución con $1x10^8$ conidios/ml de *B. bassiana* dispersadas en agua destilada. Luego, los adultos de *P. truncatus* y *T. nigrescens* (45 por especie para cada aislamiento), fueron sumergidos durante 30 segundos en la solución. Estos adultos fueron colocados inmediatamente e individualmente en cajas de plástico con compartimientos individuales. Las cajas de plástico tenían las siguientes dimensiones 14 cm de largo, 7 cm de ancho y 2 cm de alto. Se les colocó un tubo de aluminio de 1 cm de diámetro por 2.2 cm de alto, para evitar que los insectos pudieran subir por las paredes de los compartimientos. Se colocó 0.2 g de maíz quebrado por compartimiento para la alimentación de los adultos de *P. truncatus* y una larva de *P. truncatus* en el maíz quebrado para la alimentación del depredador *T. nigrescens.*

A cada caja se le colocó un pedazo húmedo de toalla de papel por dos días para que el hongo tuviera entre 90% y 100% de humedad relativa, condiciones adecuadas para su desarrollo. Luego, cada caja fue colocada en la cámara incubadora con condiciones controladas por un higrotermógrafo con una temperatura de 28 ± 2°C y una humedad relativa de 70 ± 7% durante una semana.

3.1.2 Revisión de los bioensayos.

Los insectos fueron revisados diariamente por un período de una semana, sacando los adultos muertos de las cajas. Los adultos muertos fueron sumergidos por un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, para la eliminación de cualquier microorganismo presente en la superficie del insecto. Posteriormente se colocaron en agua destilada durante un minuto para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Ya desinfectados, los adultos de *P. truncatus* y *T. nigrescens* se colocaron en platos Petri con un pedazo húmedo de toalla de papel por una semana, en la cámara de incubación con condiciones controladas de 70 ± 7 % humedad relativa y 28 ± 2 °C. Para observar si había crecimiento de algún hongo entomopatógeno. En caso de observarse el crecimiento el hongo era aislado en un medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con el antibiótico estreptomicina (0.05 g/l de medio) a razón de 10 ml por plato Petri, para permitir la observación e identificación del hongo *B. bassiana.* La identificación se hizó por medio de observaciones visuales del hongo (Loreck, 1995)[3] .
En cada prueba se contaron diariamente los insectos muertos se calcularon los porcentajes de mortalidad diario y acumulado.

Para *P. truncatus* se determinó el tiempo en el cual mueren el 50% de los adultos (TL 50) a una concentración del hongo de $1x10^8$ conidias por mililitro. La TL 50 se calculó por medio del programa "Probit Analysis Program".

3.2 Ensayo II y III. Evaluación de *Beauveria bassiana* en kaolinita en el control de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* en almacenes tradicionales de maíz.

[3] LORECK, C. 1995. Técnicas de evaluación de hongos entomopatógenos en *Prostephanus truncatus* por medio de bioensayos. Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), Benin. (Comunicación personal).

3.2.1 Localización del estudio.

Este estudio se realizó en tres comunidades en el valle del río Yeguare, Departamento de Francisco Morazán, Honduras a una altitud promedio de 800 m, temperatura máxima promedio de 29.4 °C, temperatura mínima promedio de 19 °C y una precipitación anual de 1100 mm, distribuida entre mayo y noviembre. Las comunidades fueron El Suyatillo, San Francisco y Galeras. Se escogieron por tres razones. Primero, por estar a una distancia promedio de no más de 8 km de la EAP; lo cual era necesario porque los muestreos se realizaron semanalmente. Segundo, el maíz es producido tradicionalmente por pequeños agricultores que utilizan este grano básico para su dieta alimenticia diaria. Tercero, estos agricultores habían colaborado con el Proyecto Prostephanus y presentan las mismas condiciones en sus hogares que los campesinos que utilizan sistemas tradicionales de almacenamiento.

3.2.2 Diseño del Estudio.

Se escogió el aislamiento de *B. bassiana* proveniente de *Anthonomus grandis* porque fue el que causó la mayor mortalidad sobre *P. truncatus* y la menor mortalidad en *T. nigrescens.*

Para montar cada ensayo, se fabricaron trojas de madera de orilla de pino para simular el almacenamiento tradicional. Las dimensiones de las trojas fueron de 94 cm de largo, 56 cm de ancho y 57 cm de alto. El maíz que se utilizó fue de la variedad Honduras Planta Baja (HPB), el cual es cultivado por los agricultores de la zona Sur-Oriental de Honduras. En cada troja se colocaron 450 mazorcas en capas de 50 mazorcas cada una arregladas horizontalmente, para ser muestreada la capa superior semanalmente por un período de siete semanas. Conidios secos del hongo *B. bassiana* se mezclaron con kaolinita (arcilla inerte) y se aplicaron a una dosis de 0.125 kg de la mezcla por capa a una concentración de $1x\ 10^{10}$ conidios por troja.

Se establecieron dos ensayos en Octubre de 1996 los cuales consistían en:
a) Ensayo II. Trojas infestadas con *P. truncatus* al momento de la aplicación del producto.
El objetivo fue probar si aplicaciones preventivas del hongo (al momento de almacenar el maíz) podrían proteger las mazorcas del ataque de *P. truncatus* al llegar ellos a las trojas. Las trojas se montaron con mazorcas de maíz fumigado por diez días con Phostoxin (fosfuro de aluminio) a una dosis de 1pastilla por m^3 (57% de ingrediente activo). Se aplicó la kaolinita con conidios de *B. bassiana* por capa, realizándose la inoculación con *P. truncatus* al momento de montarse las trojas (200 adultos por capa). Los insectos tenían una edad comprendida entre los 25 y 35 días de emergidos.

Se utilizaron cinco trojas a las cuales se les aplicó la kaolinita con conidios del hongo y tres trojas como testigos, teniendo una troja por agricultor (ocho agricultores), arregladas en un Diseño Completamente al Azar (DCA), para evitar el movimiento de insectos entre los tratamientos.

b) Ensayo III: Trojas inoculadas con *P. truncatus* un mes antes de la aplicación de la kaolinita con conidios del hongo.
El objetivo fue probar si aplicaciones curativas del hongo (después de almacenado el maíz) podrían proteger las mazorcas de maíz al encontrarse *P. truncatus* en el interior de las mazorcas. Las trojas se montaron con mazorcas de maíz sin fumigar, las cuales fueron inoculadas con cuatro adultos de *P. truncatus* por mazorca un mes antes de montarse las trojas.
Se usaron cuatro trojas a las cuales se les aplicó la kaolinita con conidios del hongo y cuatro como testigo, teniendo una troja por agricultor (ocho agricultores), en un Diseño Completamente al Azar (DCA).

3.2.3 Recolección y análisis de muestras.

Al momento de montar los ensayos se tomó una muestra de 20 mazorcas en total para el maíz a utilizar en los dos ensayos. Se determinó la pérdida de peso, el número de insectos de *Prostephanus truncatus*, *Sitophilus zeamais* y *Teretriosoma nigrescens* y el contenido de humedad. Una vez por semana, se muestreó la capa superior de mazorcas de cada troja. De las 50 mazorcas se dejaron para el análisis de laboratorio solamente 20 escogidas al azar, las cuales fueron colocadas en bolsas de plástico previamente etiquetadas.

A cada muestra se le realizó un conteo inicial de insectos, que se encontraban fuera de las mazorcas al momento de llegar la muestra al laboratorio para su análisis. Luego, las mazorcas se destuzaron, se desgranaron y se pesó el grano. Los granos se tamizaron para separar los insectos adultos de *P. truncatus* y *S. zeamais* y contarlos, calculando el número de insectos por kilogramo de muestra desgranada.

En cada muestra de las trojas a las cuales se les aplicó la kaolinita con conidios del hongo, todos los adultos muertos encontrados fueron aislados en una cámara húmeda para el cálculo del porcentaje de mortalidad debido al hongo *B. bassiana* del total de la población de *P. truncatus* y *S. zeamais*. Esto no se hizo con los testigos debido a que en estudios previos realizados por el proyecto no se habían encontrado evidencias de la existencia de algún hongo entomopatógeno en insectos recolectados en el campo o criados en el laboratorio.

En la última semana de muestreo se tomaron 50 insectos vivos de *P. truncatus* en ambos ensayos para tener una idea mas clara del porcentaje de mortalidad por *B. bassiana.* Se determinó si el porcentaje de mortalidad era diferente al obtenido por el muestreo de soló los insectos muertos. Se pusieron los insectos en frascos individuales con maíz quebrado (0.2 g) y se revisaron a las dos semanas de colectadas para el conteo de los insectos muertos. Estos se colocaron en platos Petri por una semana con un pedazo húmedo de toalla de papel en la cámara de cría para observar si había esporulación del hongo *B. bassiana*.

De cada muestra de maíz desgranado se obtenían tres submuestras de 250 g cada una para medir el contenido de humedad para lo cual se utilizo el Motomco Meter Aerglide N 919. El resto de la muestra se utilizó para obtener el porcentaje de pérdida usando el método de conteo y pesado de 1000 granos (Anexo 1) por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = \frac{(PGS \times NGD) - (NGS \times PGD)}{PGS \times 1000} \times 100$$

PGS= Peso de granos sanos.
NGD= Número de granos dañados.
NGS= Número de granos sanos.
PGD= Peso de grano dañado.

3.2.4 Análisis estadístico.

Las variables que se analizaron fueron el número de *P. truncatus* y *S. zeamais* por kilogramo y pérdida de peso. En el Ensayo II se normalizaron las variables de pérdida y densidad de *P. truncatus* por medio del logaritmo natural, y en el Ensayo III las variables pérdida y densidad de *S. zeamais* por logaritmo natural y densidad de *P. truncatus* por raíz cuadrada.

Se analizó cada variable usando un modelo de medidas repetidas en el tiempo por medio de un análisisis de varianza (ANDEVA) (alfa= 0.05) con el programa ¨Statistical Analysis System¨ (SAS).

Para evaluar si había algún efecto de los tratamientos en la población de las plagas a través del tiempo se calculó el número de insectos días usando el programa “ENSTAT” (Pedigo y Zeiss, 1996) para calcular el área debajo de la curva del número de insectos contra la fecha. Posteriormente esta nueva variable se analizó usando un ANDEVA en el programa “ Statistical Analysis System” .

IV. RESULTADOS.

4.1 Ensayo I. Patogenicidad de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* contra *Prostephanus truncatus* y *Teretriosoma nigrescens.*

Al analizar la patogenicidad de los cinco aislamientos de *B. bassiana* contra *P. truncatus* todos causaron un porcentaje de mortalidad similar. El aislamiento de *Anthonomus grandis* (picudo del algodón) fue el que causó la mayor mortalidad con 86.7 % y en segundo lugar el de *Cosmopolites sordidus* (picudo del banano) con 84.4%, mientras que en el testigo no hubo mortalidad (Figura 2). Por lo tanto los aislamientos provenientes de *A. grandis* y *C. sordidus* fueron los escogidos para ser probados contra *T. nigrescens* enemigo natural de *P. truncatus*.

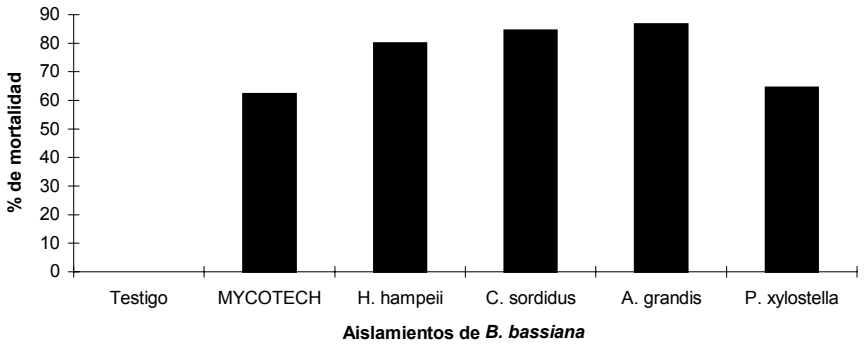

Figura 2. Porcentajes de mortalidad de *P. truncatus* provocados por lo aislamientos de *B. bassiana* y el testigo.

También en esta prueba con *T. nigrescens,* se obtuvieron similares porcentajes de mortalidad con los dos aislamientos. El que causó el menor porcentaje de mortalidad al depredador *T. nigrescens* fue el aislamiento de *Anthonomus grandis*

(62.2%). Con el aislamiento de *Cosmopolites sordidus* se obtuvo una mortalidad de 66.7%, mientras que en el testigo no hubo mortalidad (Figura 3).

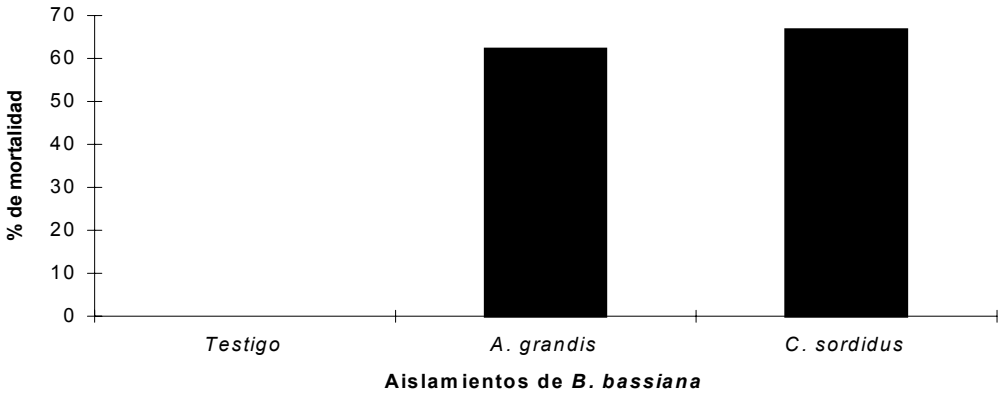

Figura 3. Porcentaje de mortalidad de *T. nigrescens* debido a los aislamientos de *B. bassiana* y el testigo.

Con los resultados obtenidos, se escogió el aislamiento de *Anthonomus grandis* para ser probado en el campo.

Los aislamientos de *H. hampeii* y *A. grandis* tuvieron las menores TL 50 para *P. truncatus* con 92.3 y 98.8 horas respectivamente, mientras que los aislamientos de *C. sordidus*, *P. xylostella* y la formulación en aceite (MYCOTECH) tardaron más de 100 horas en matar a la mitad de la población (Cuadro 2 y Figura 4).

Cuadro 2. Tiempo letal medio de los cinco aislamientos de *B. bassiana*.

	H. hampeii	*A. grandis*	*C. sordidus*	*Mycotech*	*P. xylostella*
TL 50 (hr)	92.3	98.8	110.5	117	124.1

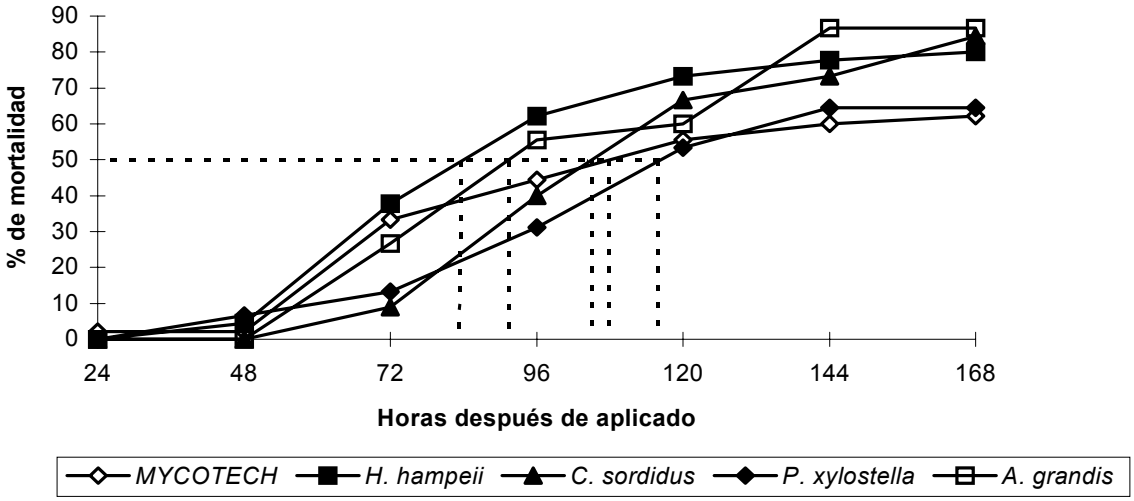

Figura 4. Tiempo letal medio de los cinco aislamientos de *B. bassiana* en *P. truncatus*.

4.2 Ensayos II y III. Evaluación de *Beauveria bassiana* en kaolinita en el control de *Prostephanus truncatus* y *Sitophilus zeamais* en almacenes tradicionales de maíz.

4.2.1 Ensayo II. Trojas infestadas con *Prostephanus truncatus* al momento de la aplicación del producto.

Las diferencias entre tratamientos y semanas de muestreo no fueron significativamente diferentes a través del tiempo para las variables *P. truncatus* y *S. zeamais* por kilogramo de grano y pérdidas de peso (alfa=0.05) (Cuadro 3).

No hubo una interacción significativa entre fecha de muestreo y los tratamientos para ninguna de las variables analizadas (Anexo2).

Cuadro 3. Valores F para las variables densidad de *P. truncatus* y *S. zeamais* y pérdida de peso.

		G L	Valor F	Pr > F
	Trat	Error		
P. truncatus	1	31	0.02	0.2106
S. zeamais	1	35	0.02	0.8826
Pérdida de Peso	1	31	1.66	0.2447

Las poblaciones de *P. truncatus* no difirieron significativamente entre tratamientos y semanas de muestreo a través del tiempo (Figura 5).

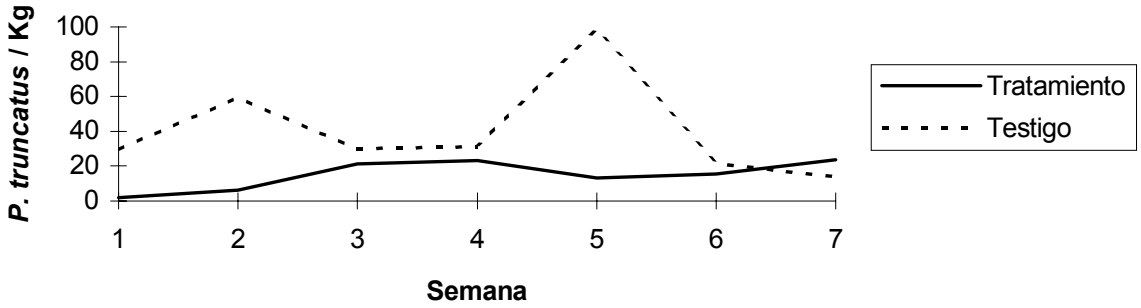

Figura 5. Dinámica poblacional de *P. truncatus* en trojas aplicadas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz fumigado previa la inoculación con *P. truncatus*.

Las poblaciones de *S. zeamais* no difirieron significativamente entre tratamientos y semanas de muestreo a través del tiempo (Figura 6).

Error! Not a valid link.Figura 6. Dinámica poblacional de *S. zeamais* en trojas aplicadas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz fumigado previa la inoculación con *P. truncatus*.

En las variables días insecto *P. truncatus*, días insecto *S. zeamais* y pérdida de peso acumuladas no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (alfa= 0.05).

Aunque la aplicación del producto no afectó significativamente las poblaciones de *P. truncatus* y de *S. zeamais.* Sin embargo si hubo una infección de individuos de ambas plagas por *B. bassiana.* Las muestras de insectos muertos indicaron que *B. bassiana* causó una mortalidad promedio de 1.38% en *P. truncatus* y de 0.6% en *S. zeamais* en las siete semanas de muestreo. En la muestra viva de *P. truncatus* en el último muestreo, se encontraron similares porcentajes de mortalidad (1.98%) (Figura 7).

Error! Not a valid link.Error! Not a valid link.

Las pérdidas de peso no difirieron significativamente entre tratamientos y semanas de muestreo a través del tiempo (Figura 8).

Error! Not a valid link.Figura 8. Pérdida de peso en trojas aplicadas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo con maíz fumigado previa la inoculación con *P. truncatus*.

4.2.2 Ensayo III. Trojas inoculadas con *Prostephanus truncatus* un mes antes de la aplicación del producto.

Las diferencias entre tratamientos y semanas de muestreo no fueron significativamente diferentes a través del tiempo para las variables densidad de *P. truncatus* y *S. zeamais* y pérdidad de peso (alfa=0.05) (Cuadro 4).

No se encontró una interacción significativa entre tratamientos y fecha de muestreo para todas las variables analizadas (Anexo 3) .

Cuadro 4. Valores F para las variables densidad de *P. truncatus* y *S. zeamais* y pérdida de peso.

	G Trat	**L Error**	**Valor F**	**Pr > F**
P. truncatus	1	29	1.16	0.3228
S. zeamais	1	30	0.01	0.942
Pérdida de Peso	1	25	2.04	0.2034

Las poblaciones de *P. truncatus* no difirieron significativamente entre tratamientos y semanas de muestreo a través del tiempo (Figura 9).

Error! Not a valid link.Figura 9. Dinámica poblacional de *P. truncatus* en trojas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz inoculado con *P. truncatus* previa la aplicación del producto.

Las poblaciones de *S. zeamais* no difirieron significativamente entre los tratamientos y semanas de muestreo a través del tiempo (Figura 10).

Error! Not a valid link.Figura 10. Dinámica poblacional de *S. zeamais* en trojas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en maíz inoculado con *P. truncatus* previa la aplicación del producto.

En las variables pérdida de peso, *P. truncatus* y *S. zeamais* por kilogramo de grano (insectos día) a través del tiempo no se encontró diferencia estadística significativa entre las trojas con el producto y las trojas testigo (alfa=0.05).

A través de todas las semanas de muestreo en trojas tratadas con el producto la taza de mortalidad por *B. bassiana* fue menor que en el ensayo anterior, con un promedio de 0.31% para *P. truncatus* y de 0.37% para *S. seamais*. Con una muestra viva de *P. truncatus* en la última semana de muestreo, se encontró un porcentaje de mortalidad de 3.1% en contraste con el porcentaje de mortalidad encontrado en la muestra de insectos muertos (Figura11).

Error! Not a valid link.Figura 11. Porcentaje de mortalidad de *P. truncatus* y *S. zeamais* en trojas con
B. bassiana mas kaolinita en maíz inoculado con *P. truncatus* previa la aplicación del producto. (*P. truncatus* v= muestra viva de insectos).

La pérdida de peso entre los tratamientos y semanas de muestreo no difirieron significativamente a través del tiempo (Figura 12).

Error! Not a valid link.Figura 12. Pérdidas de peso en trojas con *B. bassiana* más kaolinita y trojas testigo en
maíz inoculado con *P. truncatus* antes de la aplicación del producto.

V. DISCUSIÓN.

En los bioensayos los aislamientos de *Beauveria bassiana* provenientes de plagas del orden Coleoptera (*Anthonomus grandis*, *Cosmopolites sordidus* e *Hypothenemus hampeii*) obtuvieron porcentajes de control sobre *P. truncatus* (84% en promedio) mayores que el aislamiento proveniente de la plaga del orden Lepidoptera (*Plutella xylostella*) con 64%. Esto puede deberse a que los primeros aislamientos provienen del mismo orden (Coleoptera) que *P. truncatus* y los aislamientos provenientes del orden Coleoptera atacan los estados maduros de los insectos mientras que el aislamiento del orden Lepidoptera ataca el estado larval de la plaga. Produciendo por tanto, un mejor control los aislamientos del orden Coleoptera (Figura 2).

Los niveles de mortalidad obtenidos en *P. truncatus* son buenos y prometedores ya que similares resultados se han encontrado con plagas como *Anthonomus eugenii* (picudo del chile) teniendo mortalidades por *B. bassiana* de 82% (Gómez *et al.,* 1994), con la misma dosis en los bioensayos.

En las pruebas realizadas en contra de *T. nigrescens* los aislamientos de *A. grandis* y *C. sordidus* causaron una mortalidad de 62 y 67%, respectivamente (Figura 3), esto debido a que ambos aislamientos pertenecen al mismo orden como es Coleoptera. Como podemos observar el hongo entomopatógeno también causa un alto porcentaje de mortalidad en este enemigo natural de *P. truncatus* que debería ser considerado para la aplicación práctica de este tipo de control. Podría hacerse uso de este hongo en situaciones en las que el depredador *T. nigrescens* no pueda ser utilizado como en zonas en que las condiciones ambientales óptimas (26°C y 70% de humedad relativa) no permitan su establecimiento (Rees, 1985), o cuando halla una falta de hospederos alternos. *T. nigrescens* se puede reproducir en otras plagas de granos almacenados como son *Dinoderus sp*., *Sitophilus sp., Ryzopertha dominica* y *Tribolium castaneum* (Rees, 1987, 1991; Leliveldt, 1990, citado por García 1995).

La determinación del tiempo letal medio es importante debido a que con un tiempo menor para el comienzo del control de la plaga se podrían evitar pérdidas que habrían sido causadas por los insectos. Se encontró que el tiempo en que el hongo mató la mitad de la población de adultos de *P. truncatus* (100 hr) con cada uno de los diferentes aislamientos fue similar al encontrado en *H. hampeii* (Jiménez, 1996) (Figura 4).

La mortalidad de *P. truncatus* fue cuatro veces mayor en el ensayo en el que se aplicó el producto en forma preventiva que cuando se aplicó en forma curativa (Figuras 7 y 11). Esto sugiere que al encontrarse *P. truncatus* dentro de las mazorcas con abundancia de alimento no saldrá para alimentarse y no se pondrá en contacto con los conidios del hongo entomopatógeno.

Las poblaciones de *P. truncatus* en el ensayo en el cual se aplicó el producto antes de la inoculación de *P. truncatus* fueron menores debido a que no todos los insectos con que se inoculó el maíz penetraron las mazorcas ya que la penetración fue de solo el 2.6% y 7.9% en el primero y segundo muestreos respectivamente, lo cual puede haberse debido a la kaolinita que actúa como una barrera física, mientras que en el testigo la penetración fue de 35% y 70% para el primer y segundo muestreo respectivamente.

En las poblaciones de *P. truncatus* no se encontraron diferencias estadísticas significativas a través del tiempo posiblemente debido a la gran variabilidad entre repeticiones en el Ensayo II, por la metodología que se utilizó para la inoculación de *P. truncatus,* ya que *P. truncatus* muestra una preferencia de moverse hacia el interior de las trojas (Figura 5).

Las poblaciones de *S. zeamais* fueron similares tanto en el tratamiento con el producto como en el testigo en ambos ensayos (Figuras 6 y 10), esto es debido a que esta plaga ya se encontraba en las mazorcas antes de la aplicación del producto lo cual dificulta el contacto de la plaga con los conidios del hongo entomopatógeno.

La mortalidad de *S. zeamais* fue el doble en el tratamiento en el cual se aplicó el producto al momento de inocularlo con *P. truncatus* que en el tratamiento en el cual se aplicó el producto cuando ya se encontraba inoculado con *P. truncatus*. Esto indica que hubo una transmisión por medio de los cadáveres de *P. truncatus* que contenían el hongo por conidios transportados en la cutícula de *P. truncatus* hasta *S. zeamais* dentro de las mazorcas de maíz.

En general, los niveles de mortalidad por *B. bassiana* son mayores en *P. truncatus* que en *S. zeamais,* pero *S. zeamais* muestra aproximadamente un 20 % más de infección por el hongo en el caso que *P. truncatus* ya se encuentre en el interior de las mazorcas. Esto nos indica que *S. zeamais* tiene mayor tendencia a salir de las mazorcas para movilizarse desplazado por la alta densidad de *P. truncatus*. Novillo (1991) encontró que altas densidades de *P. truncatus* provocaban la disminución o inmigración de las poblaciones de *S. zeamais*.

Los porcentajes de mortalidad encontrado son similares a los que se obtuvieron en pruebas de campo en almacenes a una dosis similar de *B. bassiana* realizadas en África siendo estos de 1.2 a 4.0% (Loreck, 1996)[4] .
Los bajos porcentajes de mortalidad que se encontraron en todos los muestreos se pueden aumentar con una dosis mayor de conidios para lograr mayor contacto con las plagas.

Las pérdidas en el peso de maíz fueron altas en el período de estudio de siete semanas ya que similares pérdidas se han encontrado en almacenes pero en un período de almacenamiento de seis meses. Esto se debió a que en el maíz se liberaron una gran cantidad de *P. truncatus* por mazorca (Figuras 8 y 12).

Con los resultados obtenidos en ambos ensayos podemos concluir que *B. bassiana* no se transmite mucho dentro de las mazorcas de maíz. La mejor opción es aumentar la dosis de conidios para controlar la población de *P. truncatus* que penetre en la troja una vez montada. Esto no sucedería en el caso de *S. zeamais* porque este infecta las mazorcas en el campo, lo cual no permitiría que la plaga entre en contacto con las conidios de *B. bassiana*.

[4] LORECK, 1996. Evaluación de *B. bassiana* en *P. truncatus*. Instituto Internacional de Agricultura Tropical. Benín. (Comunicación personal)

VI. CONCLUSIONES.

1. Los aislamientos provenientes del orden Coleoptera fueron los que causaron la mayor mortalidad de *Prostephanus truncatus* que el aislamiento del orden Lepidoptera.

2. El mejor aislamiento fue el de *A. grandis* con una alta mortalidad sobre *P. truncatus.*

3. En *T. nigrecens* también se obtuvo una alta mortalidad por el hongo *B. bassiana*.

4. Todos los aislamientos actuán rápidamente sobre *P. truncatus*.

5. *P. truncatus* tuvo una mayor mortalidad que *S. zeamais* por el hongo entomopatógeno *B. bassiana*.

6. No hubo un impacto significativo del hongo aplicado en kaolinita entre capas de maíz en trojas sobre las poblaciones de *P. truncatus* y *S. zeamais,* y pérdida de peso.

7. *S. zeamais* es más propenso a infectarse con el hongo que *P. truncatus* al estar ambos dentro de las mazorcas de maíz.

8. El hongo puede dispersarse dentro de las mazorcas de maíz por el contacto entre insectos sanos y enfermos, pero esto no produce un impacto significativo en la población.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar en el campo los aislamientos de *B. bassiana* provenientes de *Hypothenemus hampeii* y *Cosmopolites sordidus* que causaron una mortalidad similar que el aislamiento de *Anthonomus grandis.*

2. Utilizar este hongo en situaciones en que no pueda actuar el depredador *Teretriosoma nigrescens*.

3. Probar mayores dosis de este hongo aplicados al maíz en mazorca al momento de ser almacenadas.

4. Evaluar aplicaciones a las estructuras de almacenamiento para lograr un mayor contacto de los insectos con los conidios del hongo.

5. Realizar las aplicaciones al momento de la colocación de las mazorcas en los almacenes.

6. Evaluar el efecto que tendría este hongo en los diferentes tipos de troja usadas por los agricultores para el almacenamiento de maíz.

7. Evaluar un testigo con kaolinita para aislar el efecto de esta sobre la penetración de los insectos en las mazorcas.

VIII. LITERATURA CITADA.

BOEYE, J.; BURDE, S.; KEIL, H.; LABORIUS, G..A.; SHULZ, F.A. 1988. The possibilities for biologically integrated control of the larger grain borer (*Prostephanus truncatus* [Horn]) in Africa. Ed. por G.G.M. Shulten y A.J. Toet. p.110-139. Workshop on the containment and control of the larger grain borer, Arusha, Tanzania, (16-21 May 1988). Ministry of Agriculture and Livestock Development (Tanzania) with assistance from Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome, Italy). Report II Technical papers distribuited at the workshop (Unpublished). ii + 209 p.

BURDE, S. 1988. Microbial antagonist of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Botrichidae) - basis for a biological treatment in tropical store protection. GTZ, Hamburg (Unpublished final report). 97p.

BURGES, H. 1981. Microbial control of pest and plant disease (1970-1980). Academic Press Inc., p 444 - 447.

CALIX, L.C. 1995. Variación en el potencial biótico de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) en Honduras. Tesis de Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 59p.

CAVE, R. 1995. Control por Microorganismos. In: Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. p. 63-65.

DICK, K.M. 1990. Biological control of the larger grain borer in Africa: a component of an integrated pest management strategy. Ed. by R.H. Markham y H.R. Herren. pp. 5-15. Biological control of the larger grain borer: proceedings of an IITA/FAO coordination meeting, Cotonou, Republic of Benin, 2-3 June 1989. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan Nigeria. viii + 209pp.

DICK, K.M.; REES, K.K. 1989. Occurrence of the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn), in Ghana. FAO Plant Protection Bulletin 37 (3): 132.

FAO., 1992. Anuario FAO de producción 1989. Colección FAO. Estadística N° 43. Roma, Italia.

GARCIA, A.R. 1996. Impacto de prácticas de almacenamiento en la dinámica poblacional y daño ocasionado por *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) y en *Teretriosoma nigrescens* (Lewis) (Coleoptera: Histeridae). Tesis de Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. p. 3-9.

GILES, P.H.; LEON, V. 1974. Infestation problems in farmstored maize in Nicaragua, pp. 68-76. In proceedings of the First International Working Conference On Stored Products entomology, Savannah, Georgia, USA, October 7-11, 1974. 705 pp.

GOLOB, P. 1988. Current status of the larger grain borer *Prostephanus truncaus* (Horn) in Africa. Insect Science and its application 9 (6): 737-745.

GOLOB, P.; HODGES, R. 1982. Study of an outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn), in Tanzania. Report of the Tropical Products Institute, G164. 23p.

HAINES, C.P. 1981. Insects and arachnids fron stored products: A report on specimens received by the Tropical Products Institute Centre 1972-1973. Report of the Tropical Products Institute., L54. 73p.

HARNISH, R.; KRALL S. 1984. Togo: Further distribution of the larger grain borer in Africa. FAO Plant Protection Bulletin 32: 113-114.

HERRERA, R., RODRIGUEZ RIVERA, R.; REES, D.P. 1989. Distribution of the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) and the predator *Teretriosoma nigrescens* (Lewis) (Coleoptera: Histeridae) in Yucatan State México. pp. 43-55. En Primer Simposio Problemas Entomológicos de Granos Almacenados, XXIV Congreso Nacional de Entomología, Oaxtepec, Morelos, 24 de mayo 1989. Sociedad Mexicana de Entomología. 172 pp.

HODGES, R.J.; MEIK, J. 1984. Infestation of maize cobs by *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae): aspects of biology and control. Journal of Stored Products Research 20 (4): 205-213.

HODGES, R.J.; MEIK, J,; DENTON, H. 1985. Infestation of dried cassava (Manihot esculenta Crantz) by *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Stored Products Research 21: 73-77.

HOPPE, T. 1986. Storage insects of basic food grains in Honduras. Tropical Science 26 (1): 25-38.

IBARRA, J.; LEON, T. DE. 1989. Efecto de *Bacillus thuringiensis tenebrionis* y *B. thuringiensis sandiego* sobre algunos coleopteros de productos almacenados. En Congreso Nacional de Entomologia, Oaxtepec, Morelos, 21-24 mayo 1989. 454 pp.

JACKSON, F.; GLARE, T.; MILNER, R. 1994. Manual of training course insect pathology and microbial control of soil dwelling insect pests. Colony, Germany. s.p.

JIMENEZ, C.M. 1996. Evaluación de beauveria bassiana en el control de plgas de Cultivos tropicales. Proyecto, MIP, CATIE, Managua, Nicaragua. 1996.

KEIL, H. 1988. Losses caused by the larger grain borer in farm stored maize. In Markham, R., Wright, V. and Rios Ibarra, R. (eds.). A selective review of research on *P. truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) with annotated updated bibliography. CEIBA 32(1):5.

LABORIUS, G.A. 1990a. Biologically integrated control of the larger grain borer: GTZ proyect research programme, pp. 16-24. Ed. by R.H. Markham y Herren H.R. Biological control of tha larger grain borer. Proceedings of an IITA/FAO coordination meeting, Cotonou, Republic of Benin, 2-3 June 1989. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan Nigeria. viii + 177pp.

LABORIUS, G.A. 1990b. Studies of the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) conducted by GTZ and its collaborators, pp. 55- 72. Ed. by R.H. Markham y H.R. Herren Biological control of the larger grain borer. Proceedings of an IITA/FAO coordination meeting, Cotonou, Republic of Benin, 2-3 June 1989. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. viii + 177pp.

LI, L. 1988. Behavioural ecology and life history evolution in the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn). Doctoral Thesis, University of Reading. United Kingdom. viii + 299pp.

MATEO, R. 1996. Incidencia y daño ocasionado por *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) a germoplasma de maíz proveniente de diferentes regiones de Honduras. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. p 8-10.

MARKHAM, R.H.; WRIGHT, V.F.; RIOS IBARRA, R.N. 1991. A selective review of research on *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae) with an annotated and updated bibliography. CEIBA (Hon) 32 (1): 1-26.

NANGÁYO, F.L.; HILL, M.; CHANDI, E.; CHIRO, C.T.; OBIERO, J. 1993. The natural enviroment as a reservoir for the larger grain borer Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) in Kenya. Journal of African Crop Science 1(1): 39-47.

NOVILLO, P. 1991. *Prostephanus trucatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) en el ambiente de almacenamiento tradicional de maíz en el Valle del Zamorano, Honduras, C.A. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 129p.

PEDIGO, L.P.; ZEISS, M.R. 1996. Analyses in Insect Ecology and Management. Iowa State University Press, Ames, Iowa, EEUU.

PANTENIUS, C.U.; 1988. Storage losses in traditional maize granaries in Togo. Insect Science and its Application 9 (6): 727-735.

REES, D.P. 1985. *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) a predator of the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae): Current status of Knowledge, pp. 103-111. Ed. by R.H. Markham y H.R. Herren. Biological control of tha larger grain borer. Proceedings of an IITA/FAO coordination meeting, Cotonou, Republic of Benin, 2-3 June 1989. Instituto Internacional de Agricultura Tropical, Ibadan, Nigeria. viii + 177pp.

REES, D.P. 1990. *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) a predator of the larger grain borer P. truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae): Current status of knowledge, pp. 103-111. De. by R.H. Markham y H.R. Herren. Biological control of the larger grain borer. Proceedings of an IITA/FAO coordination meeting, Cotonou, Republic of Benin, 2/3 June 1989. Instituto Internacional de Agricultura Tropical, Ibada, Nigeria. viii + 177 pp.

REES, D.P. 1985. Life history of *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) and its ability to suppress populations of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of STORED products Research 21: 115-188.

RITCHER, J.; BILIWA, A. 1991. A countrywide survey with pheromone traps for their presence of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleotera: Bostrichidae) in Togo. Anzeiger fur Schadlingskunde, Pflanzencchutz, Umwwelshutz 64 (5): 89-92.

RIOS IBARRA, R.M. 1991. Ecología de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) en el altiplano de México. Tesis de Maestro en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. v + 85pp.

SHIRES, S. W. 1980. Life history of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) at optium conditions of temperature and humidity. Journal of Stored Products Research 16: 147-150.

TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. Toxins of entomopathogenic fungi. Academic Press Inc. pp. 557 - 571.

WRIGHT, V. F. 1984. Word Distribution of *Prostephanus truncatus*, pp. 11-16. In the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn). GASGA Workshop, Tropical Products Institute Storage Department, Slough, 24 - 25 Febreaury 1983. Deutshe Gesellshaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, Federal Republic of Germany. 139pp.

ZIMMERMAN, M.L. 1990. Coleoptera found in imported storedfood products entering southern California and Arizona betwen December 1984 through December 1987. The Coleopterists Bulletin 44 (2): 235-240.

IX. ANEXOS.

Anexo 1 . Resumen de la metodología de análisis de muestras en el laboratorio.

Muestras de mazorcas tomadas de las unidades experimentales
|
Destuzar las mazorcas individualmente de las muestras
|
Desgranar las mazorcas
|
Pesar el grano
|
Tamizar los insectos adultos y contarlos
|
Al día siguiente volver a tamizar la muestra para contar
insectos remanentes en los granos
|
Aislamiento en cámaras húmedas de insectos muertos
|
Obtener tres submuestras de 250 g. para evaluar humedad
|
Analizar la muestra sobrante
|
Obtener de esta muestra restante el porcentaje de pérdida de
peso (Método de los 1000 granos)

Anexo 2. Análisis de Varianza para las variables *P. truncatus* por kilogramo, *S. zeamais* por kilogramo y Pérdida de peso en el Ensayo II.

a) Variable Pérdida de Peso.

Dependent Variable: PERDLO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	1.78561344	0.09397965	0.94	0.5460
Error	31	3.09977316	0.09999268		
Corrected Total	50	4.88538659			

R-Square	C.V.	Root MSE	PERDLO Mean
0.365501	56.70782	0.316216	0.55762364

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	0.24555669	0.24555669	2.46	0.1272
REP(TRAT)	6	0.88602819	0.14767136	1.48	0.2186
MUESTREO	6	0.49009584	0.08168264	0.82	0.5652
TRAT*MUESTREO	6	0.15362548	0.02560425	0.26	0.9530

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	0.24555669	0.24555669	1.66	0.2447

b) Variable *P. truncatus* por kilogramo.

Dependent Variable: PTLO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	12.18327300	0.64122489	2.54	0.0092
Error	33	8.33682943	0.25263119		
Corrected Total	52	20.52010243			

R-Square	C.V.	Root MSE	PTLO Mean
0.593724	49.64029	0.502624	1.01253301

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	1.71774793	1.71774793	6.80	0.0136
REP(TRAT)	6	5.24725585	0.87454264	3.46	0.0092
MUESTREO	6	3.17817495	0.52969582	2.10	0.0803
TRAT*MUESTREO	6	1.96971390	0.32828565	1.30	0.2848

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	1.71774793	1.71774793	1.96	0.2106

c) Variable *S. zeamais* por kilogramo.

Dependent Variable: SITO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	76524.55491	4027.60815	0.96	0.5262
Error	35	147176.66654	4205.04762		
Corrected Total	54	223701.22145			

R-Square	C.V.	Root MSE	SITO Mean
0.342084	54.84340	64.84634	118.239091

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	171.35554	171.35554	0.04	0.8412
REP(TRAT)	6	43277.84799	7212.97466	1.72	0.1465
MUESTREO	6	21977.33861	3662.88977	0.87	0.5258
TRAT*MUESTREO	6	14430.32302	2405.05384	0.57	0.7498

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	171.3555446	171.3555446	0.02	0.8826

Anexo 3. Análisis de Varianza para las variables *P. truncatus* por kilogramo, *S. zeamais* por kilogramo y pérdida de peso en el Ensayo III.

a) Variable Pérdida de peso.

Dependent Variable: PERDLO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	16.62390363	0.87494230	2.93	0.006
Error	25	7.46209331	0.29848373		
Corrected Total	44	24.08599695			

R-Square	C.V.	Root MSE	PERDLO Mean
0.690190	19.87534	0.546337	2.74881639

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	1.27424302	1.27424302	4.27	0.0493
REP(TRAT)	6	3.75365764	0.62560961	2.10	0.0898
MUESTREO	6	10.11142943	1.68523824	5.65	0.0008
TRAT*MUESTREO	6	3.97086062	0.66181010	2.22	0.0749

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	1.27424302	1.27424302	2.04	0.2034

b) Variable *P. truncatus* por kilogramo.

Dependent Variable: PTSQ

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	2500.833702	131.622826	4.78	0.0001
Error	29	798.110251	27.521043		
Corrected Total	48	3298.943953			

R-Square	C.V.	Root MSE	PTSQ Mean
0.758071	25.94259	5.246050	20.2217685

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	222.5394180	222.5394180	1.16	0.3228

c) Variable *S. zeamais* por kilogramo

Dependent Variable: SZLO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	25.03166935	1.31745628	5.10	0.0001
Error	30	7.74476615	0.25815887		
Corrected Total	49	32.77643550			

R-Square	C.V.	Root MSE	SZLO Mean
0.763709	10.26400	0.508093	4.95024684

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	0.00143168	0.00143168	0.01	0.9411
REP(TRAT)	6	1.49075986	0.24845998	0.96	0.4670
MUESTREO	6	21.28764240	3.54794040	13.74	0.0001
TRAT*MUESTREO	6	0.77497285	0.12916214	0.50	0.8030

Tests of Hypotheses using the Type III MS for REP(TRAT) as an error term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	1	0.00143168	0.00143168	0.01	0.9420