

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA**  
**PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION**  
**ESCUELA DE POSGRADO**

23 JUN 1997  
RECIBIDO

**MORTALIDAD DE LARVAS DE *Phyllophaga menetriesi* (BLANCHARD)  
(COLEOPTERA: Scarabaeidae) DEBIDA A LA APLICACION COMBINADA  
DE *Beauveria* sp. (BALS.) VUILL, *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.  
Y *Bacillus popilliae* (DUTKY)**

**POR**

**CARLA CAMILA CARVAJAL PINTO**



Turrialba, Costa Rica  
1996

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
CATIE  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA

Directora: Conmemorativa  
GRION - IICA - CATIE

23 JUL 1997

RECIBIDO

Turrialba, Costa Rica

AREA DE POSTGRADO



MORTALIDAD DE LARVAS DE *Phyllophaga menetriesi* (BLANCHARD)  
(COLEOPTERA: Scarabaeidae) DEBIDA A LA APLICACIÓN COMBINADA  
DE *Beauveria* sp. (BALS.) VUILL, *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK.  
Y *Bacillus popilliae* (DUTKY)

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Postgrado y  
Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos  
Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para  
optar al grado de

Magister Scientiae

por

✓  
Carla Camila Carvajal Pinto

Turrialba, Costa Rica

1996

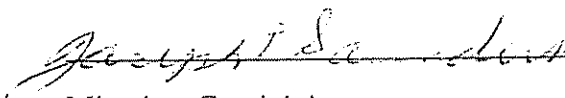
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

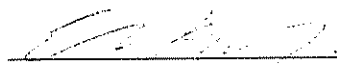
FIRMANTES:




Profesor Consejero



Miembro Comité Asesor



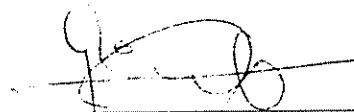
Miembro Comité Asesor



Jefe, Area de Postgrado



Director, Programa de Enseñanza



Candidato

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Organización FUNDATROPICOS por financiar mis estudios de Maestría.

Un especial agradecimiento a Philip Shannon Ph. D., mi profesor consejero, por fomentar en mi persona el interés en la investigación y por su apoyo incondicional para alcanzar el presente logro. A los componentes del Comité Asesor : Joseph Saunders Ph. D., Elkin Bustamante Ph. D., Eduardo Hidalgo M. Sc y Pedro Ferreira Ph. D. por sus acertadas observaciones y sugerencias.

Al personal del Laboratorio de Control Microbial : Lorena Flores, Adolfo Martínez, Claudio Arroyo, Giovanni Solíz, y Armando Portugués por compartir sus experiencias y su amistad.

A mis compañeros Toribio Contreras, Mario Talavera, Francisco Gutiérrez y Sergio García por demostrar que el trabajo en grupo es analítico, enriquecedor y positivo, gracias amigos.

A todas las personas que directa e indirectamente intervinieron en el proceso de investigación

## DEDICATORIA

*A las mujeres profesionales que siguen la senda  
del conocimiento y hacen posibles sus aspiraciones  
rebasando los obstáculos del camino*

Carvajal Pinto, C. 1996. Mortalidad de larvas de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) debida a la aplicación combinada de *Beauveria* sp. (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. y *Bacillus popilliae* (Dutky). Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica

Palabras claves: Control microbial, hongos entomopatógenos, enfermedad lechosa, interacción, antagonismo.

## RESUMEN

El propósito de estos ensayos fueron evaluar las combinaciones entre *M. anisopliae* y *B. bassiana*; *B. popilliae* y *M. anisopliae*; *B. popilliae* y *B. bassiana*, para determinar la existencia de un efecto de estímulo en la tasa de desarrollo de las enfermedades, mortalidad total y mortalidad asociada a la sintomatología de cada patógeno.

El estudio se realizó con larvas de *P. menetriesi* en el laboratorio de control microbial de la Unidad de Fitoprotección de CATIE, en dos fases; la primera evaluó la combinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo (L2) y tercer estadio(L3); y la segunda, la combinación pareada de *B. popilliae* con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en L3.

En las combinaciones de hongos, se pudo observar que en L2 y L3, la aplicación previa de un hongo no incrementa la susceptibilidad las larvas y no favorece la manifestación de síntomas asociados al segundo hongo. La aplicación simultánea de ambos hongos mostró en L2 una reducción numérica de la mortalidad de *B. bassiana* y un aumento de mortalidades asintomáticas, así como cierta tendencia de *M. anisopliae* a antagonizar la manifestación de síntomas de *B. bassiana*. En L3 se evidenció el antagonismo de *M. anisopliae* sobre *B. bassiana* cuando la aplicación combinada presentó mayor  $TL_{30}$ , además de disminución significativa de sintomatología debida a *B. bassiana* y una mortalidad total menor (15%) a la de *B. bassiana* aplicado individualmente (52.5%).

La aplicación posterior de *M. anisopliae* no cambió la mortalidad de *B. bassiana*, pero se observó una ligera disminución (10.9%) en L2 y (10%) en L3. La aplicación posterior de *B. bassiana* favoreció la manifestación de 6.8% de síntomas por *M. anisopliae* en L2, mientras que en L3 no ocurrió este fenómeno.

En las combinaciones de *B. popilliae* y los hongos, no se encontraron diferencias entre la mortalidad ocasionada por larvas previamente dosificadas con *B. popilliae* y las que recibieron solo la aplicación de *B. bassiana*.

La mortalidad total disminuyó cuando larvas con *M. anisopliae* fueron previamente dosificadas con *B. popilliae*, concluyendo que *B. popilliae* no actuó como estresor, no desencadenó procesos de debilitamiento en la larva. Tampoco se encontró efecto estresante de *B. popilliae* en larvas aplicadas con *B. bassiana* posteriormente.

Carvajal Pinto, C. 1996. Mortality of *Phyllophaga menetriesi* larvae (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) due to combined applications *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. y *Bacillus popilliae* (Dutky). M.Sc. Thesis CATIE. Turrialba, Costa Rica

Keywords: microbial control, entomopathogen, milky disease, *Phyllophaga menetriesi*, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus popilliae*.

## ABSTRACT

The purpose of these assays was to evaluate combinations of *M. anisopliae* and *B. bassiana*; *B. popilliae* and *M. anisopliae*, and *B. popilliae* and *B. bassiana*, to determine whether there occurs a synergistic or antagonistic effect on the development rate of the disease, total mortality and mortality associated to the symptomology of each patogen.

The study was carried out with *P. menetriesi* larvae in the in two phases; the first evaluated combinations of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in second (L2) and third instar (L3) larvae; the second first evaluated combinations of *B. popilliae* with *B. bassiana* and *M. anisopliae* in L3

In the combinations of the fungi, it was observed that in L2 and L3, the prior application of one of the fungi did not increase the susceptibility the larvae to the second fungus and did not favor the manifestation of symptoms of the second fungus. The simultaneous application of both fungi showed a non-significant reduction of *B. bassiana* mortality in L2, and an increase in asymptomatic mortalities. In L3 antagonism of *M. anisopliae* by *B. bassiana* occurred: the combined application had a higher  $LT_{30}$ , there was a significant



decrease in *B. bassiana* symptoms, and a reduced total mortality (15%) compared with *B. bassiana* applied individually (52.5%). The later application of *M. anisopliae* did not significantly change mortality caused by *B. bassiana*, but a slight numeric decrease was observed: (10.9%) in L2 and (10%) in L3. The later application of *B. bassiana* increased by 6.8% the mortality caused by an earlier application of *M. anisopliae* in L2, while in L3 this phenomenon did not occur.

In the combinations of *B. popilliae* and the fungi, there was no difference in the mortality caused by *B. bassiana* when larvae were previously dosed with *B. popilliae*. Total mortality diminished when larvae treated with *M. anisopliae* were previous dosed with *B. popilliae*. It was concluded that *B. popilliae* did not act as a stressor, rather it anatonized infection with *M. anisopliae*.

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
INDICE DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ANEXOS.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
1.2. Hipótesis de trabajo.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. El hospedante y su manejo.....	4
2.1.1. Distribución geográfica de <i>Phyllophaga menetriesi</i> (Coleoptera: Scarabaeidae).....	4
2.1.2. Biología y daño de <i>P. menetriesi</i> .....	4
2.1.3. Manejo de <i>P. menetriesi</i> .....	7

2.1.4. Control microbioal de <i>P. menetriasi</i> .....	10
2.2. La enfermedad lechosa ( <i>Bacillus popilliae</i> ).....	12
2.2.1. Historia.....	13
2.2.2. Características generales.....	14
2.2.2.1. Morfología.....	14
2.2.2.2. Función de la espora.....	15
2.2.2.3. Especificidad del hospedero.....	16
2.2.2.4. Persistencia.....	17
2.2.3. Patogenésis.....	19
2.2.3.1. Desarrollo en el hospedante.....	19
2.2.3.1.1. Vía inyección.....	19
2.2.3.1.2. Vía infección natural.....	20
2.2.3.1.3. Efecto de la temperatura.....	22
2.2.3.2. Causa de la muerte del insecto.....	22
2.4.1.4. Cultivo.....	23
2.2.5. Epizootiología.....	25
2.2.6. Utilización en el control.....	27
2.3. Muscardinas verde ( <i>Metarhizium anisopliae</i> ) y blanca ( <i>Beauveria bassiana</i> ).....	28
2.3.1. Infección y patogénesis.....	29
2.3.2. Cultivo y producción.....	33
2.3.3. Utilización de hongos en el control.....	34
2.3.3.1. Historia del uso.....	34
2.3.3.2. Utilización en el control de escarabaeidos.....	36

2.4. Combinaciones entre entomopatógenos .....	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
3.1. Localización .....	43
3.2. Materiales experimentales .....	43
3.3. METODOLOGÍA .....	44
3.3.1. ENSAYO I. Combinaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio (HxH L2) .....	44
3.3.1.1. Producción de inóculo .....	44
3.3.1.2. Prueba de viabilidad .....	45
3.3.1.3. Preparación de la suspensión de los hongos .....	46
3.3.1.4. Preparación de larvas .....	47
3.3.1.5. Inoculación de las larvas con los hongos .....	47
3.3.1.6. Diseño experimental .....	48
3.3.1.7. Datos registrados .....	50
3.3.1.8. Procedimientos analíticos .....	50
3.3.2. ENSAYO II. Combinaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio (HxHL3) .....	51
3.3.3. ENSAYO III. Combinación de <i>Bacillus popilliae</i> con <i>B. bassiana</i> y <i>M.</i> <i>anisopliae</i> en larvas de tercer estadio (HxBL3) .....	52
3.3.3.1. Preparación la suspensión de esporas de <i>B. popilliae</i> .....	52
3.3.3.2. Preparación de la dosis .....	52
3.3.3.3. Preparación de larvas .....	53

3.3.3.4. Inoculación de larvas .....	53
3.3.3.5. Diseño experimental .....	54
3.3.3.6. Datos registrados .....	55
3.3.3.7. Procedimientos analíticos .....	56
4. RESULTADOS .....	57
4.1. Ensayo de combinaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio .....	57
4.1.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología .....	57
4.1.2. Efecto de la aplicación previa de un hongo sobre la mortalidad causada por una segunda aplicación del otro hongo .....	61
4.1.3. Efecto de la aplicación simultánea de los dos hongos .....	64
4.1.4. Efecto de una aplicación subsecuente de un hongo sobre la mortalidad causada por la aplicación de otro hongo .....	66
4.1.5. Mortalidad durante las 24 h .....	67
4.1.6. Interacciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio de <i>P.</i> <i>menetriesi</i> .....	69
4.2. Ensayo II. combinaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio .....	74
4.2.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología .....	74
4.2.2. Efecto de aplicación previa de un hongo sobre la mortalidad causada por una segunda aplicación del otro hongo .....	78

4.2.3. Efecto de la aplicación simultánea de los dos hongos.....	79
4.2.4. Efecto de aplicaciones una aplicación subsecuente de un hongo sobre la mortalidad causada por la aplicación de otro hongo.....	81
4.2.5. Interacciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> .....	82
4.3 Ensayo III. Combinación de <i>B. popilliae</i> con <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio.....	87
4.3.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología.....	87
4.3.2. Efecto de aplicación previa de <i>Bacillus popilliae</i> .....	90
4.3.3. Interacciones de <i>Bacillus popilliae</i> y <i>B. bassiana</i> o <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> .....	93
5. DISCUSION GENERAL.....	97
5.1. Combinación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo y tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> .....	97
5.2. Combinaciones pareadas de <i>B. popilliae</i> con <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> .....	100
6. CONCLUSIONES.....	102
7. RECOMENDACIONES.....	105
8. LITERATURA CONSULTADA.....	106
9 ANEXO.....	120

## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Insecticidas utilizados en el control de <i>Phyllophaga</i> sp en Costa Rica.....	7
CUADRO 2. Origen de los entomopatógenos usados en el ensayo.....	44
CUADRO 3. Ingredientes de la dieta utilizada para suministrar inóculo de <i>B. popilliae</i> a larvas de <i>P. menetriesi</i> . La dieta esta basada la de Leppla, Vail y Rye, 1979.....	54
CUADRO 4. Mortalidad total media de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> ( $g_l=28$ , $a=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 56 días después de la primera aplicación.....	57
CUADRO 5. Comparaciones entre tratamientos seleccionados para el tiempo de mortalidad del 50% (TL50) de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> .....	60
CUADRO 6. Comparaciones entre tratamientos seleccionados para el tiempo a 30% de mortalidad de larvas de <i>P. menetriesi</i> L2 (TL30).....	61
CUADRO 7. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación previa (15 días antes) o no de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) a la de <i>B. bassiana</i> (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.....	62
CUADRO 8. Mortalidad asintomática en tratamientos con y sin aplicación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> (1-56 días).....	62

CUADRO 9. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación previa (15 días antes) o no de <i>B. bassiana</i> (P0084) a la de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.....	63
CUADRO 10. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación simultánea de <i>B. bassiana</i> (P0084) y <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) comparada con la aplicación individual de <i>B. bassiana</i> (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días.....	64
CUADRO 11. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación simultánea de <i>B. bassiana</i> (P0084) y <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) comparada con la aplicación individual de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días.....	65
CUADRO 12. Porcentaje promedio de mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación subsecuente de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) a la de <i>B. bassiana</i> (P0084) comparada con la aplicación individual de <i>B. bassiana</i> (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.....	66
CUADRO 13. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación subsecuente de <i>B. bassiana</i> (P0084) a la de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) a comparada con la aplicación individual de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.....	67
CUADRO 14. Mortalidad a las 24 h después de la aplicación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio de <i>Phyllophaga menetriesi</i> .....	68



CUADRO 15. Mortalidad total media de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> ( $g_l=28$ , $a=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 63 días después de la primera aplicación.....	74
CUADRO 16. Comparaciones entre tratamientos seleccionados para el tiempo de mortalidad del 30% (TL30) de larvas de tercer estadio de <i>Phyllophaga menetriesi</i> .....	77
CUADRO 17. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación previa (7 días antes) o no de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) a la de <i>B. bassiana</i> (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.....	78
CUADRO 18. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación previa (7 días antes) o no de <i>B. bassiana</i> (P0084) a la de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.....	79
CUADRO 19. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación el mismo día de <i>B. bassiana</i> (P0084) y <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) comparada con la aplicación individual de <i>B. bassiana</i> . Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.....	80
CUADRO 20. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación el mismo día de <i>B. bassiana</i> (P0084) y <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) comparada con la aplicación individual de <i>M. anisopliae</i> . Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.....	80

CUADRO 21. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación subsecuente de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) a la de <i>B. bassiana</i> (P0084) comparada con la aplicación individual de <i>B. bassiana</i> (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación).....	81
CUADRO 22. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la aplicación subsecuente de <i>B. bassiana</i> (P0084) a la de <i>M. anisopliae</i> (ARE-1) comparada con la aplicación individual de <i>M. anisopliae</i> . Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.....	82
CUADRO 23. Mortalidad total de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> ( $g_l=28$ , $a=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 63 días después de la primera aplicación.....	87
CUADRO 24. Comparaciones entre tratamientos seleccionados para el tiempo de mortalidad a 30% de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> ( TL30).....	90
CUADRO 25. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la dosificación previa con <i>B. popilliae</i> y posterior aplicación de <i>M. anisopliae</i> 15 días después. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la dosificación con <i>B. popilliae</i> .....	91
CUADRO 26. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>P. menetriesi</i> debida a la dosificación previa con <i>B. popilliae</i> y posterior aplicación de <i>B. bassiana</i> 15 días después. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la dosificación con <i>B. popilliae</i> .....	92

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mortalidad total acumulada (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) al inicio del ensayo (b1, m1), 15 días después (b2, m2) y, aplicaciones combinadas *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (b1m2), *B. bassiana* aplicado 15 días después de *M. anisopliae* (m1b2) y ambos aplicados el mismo día (b1m1) ..... 59

FIGURA 2. Síntomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* después de la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1), individual al inicio del ensayo (b1 y m1), 15 días después (b2 y m2), y combinada (b1m2, m1b2 y b1m1). Mortalidad 56 días después de la primera aplicación ..... 59

FIGURA 3. Mortalidad (1 a 56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación simple y combinada de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int = 1.04; p = 0.31) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.04; p = 0.83) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 0.18 ; p = 0.67) ..... 70

FIGURA 4. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int = 1.95; p = 0.17) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.11 ; p = 0.74) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 0.490; p = 0.49) ..... 71

FIGURA 5. Mortalidad debida a *M. anisopliae* (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int =4.21; p =0.049) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.66; p =0.42) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (1-60 DDA) (F logit int = 0 ; p =0.99)..... 72

FIGURA 6. Mortalidad asintomática (1-56 DDA)de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int =1.36; p =0.25) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0; p =0.98) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 1.13; p =0.29)..... 73

FIGURA 7. Mortalidad total acumulada (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) al inicio del ensayo (b1, m1), 7 días después (b2, m2) y, aplicaciones combinadas: *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* (b1m2), *B. bassiana* aplicado 7 días después de *M. anisopliae* (m1b2) y ambos aplicados el mismo día (b1m1)..... 75

FIGURA 8. Sintomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* después de la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) individual al inicio del ensayo(b1 y m1), 7 días después de iniciado el ensayo (b2 y m2) y combinada (b1m2, m1b2 y b1m1). Mortalidad a los 63 días después de la primera aplicación..... 76

FIGURA 9. Mortalidad (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (F int =3.8 ; p = 0.061) b) *B. bassiana* aplicada 7 días después de *M. anisopliae* (Fint =1.2; p =0.26) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* (Fint = 0.4 ; p = 0.5)..... 83

FIGURA 10. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (F int =6.18; p = 0.019) b) *B. bassiana* aplicado 7 días después de *M. anisopliae* (Fint = 0.6; p = 0.44) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* (Fint = 0.6; p= 0.44)..... 84

FIGURA 11. Mortalidad sintomática (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (F int = 0.02 ; p = 0.89) b) *B. bassiana* aplicada 7 días después de *M. anisopliae* (Fint = 1.25; p = 0.27) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* (Fint = 0.02; p = 0.89 )..... 85

FIGURA 12. Mortalidad total acumulada (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación de individual de *M. anisopliae* y *B. bassiana* 15 días despues de iniciado el ensayo (m2 y b2), *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo (*B. popilliae*1), *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *B. bassiana* (bp1b2), *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *M. anisopliae* (bp1m2)..... 89

FIGURA 13. Sintomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* después de la dosificación previa con *B. popilliae* y posterior aplicación de *M. anisopliae* (bp1m2) o con *B. bassiana* (bp1b2) y aplicaciones individuales de *B. bassiana* (b2) y *M. anisopliae* (m2) 15 días despues de iniciado el ensayo..... 90

FIGURA 14. Mortalidad (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por a) la dosificación de *Bacillus popilliae* vía oral al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después (F int =1.33; p=0.26) b) *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después (F int =0.02; p=0.87)..... 93

FIGURA 15. Mortalidad debida a *M. anisopliae* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la dosificación vía oral de *B. popilliae* al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después (F int =4; p =0.059)..... 94

FIGURA 16. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por *B. popilliae* dosificado vía oral al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después (Fint =0.27 ; p =0.60)..... 94

FIGURA 17. Mortalidad asintomática (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por a) la dosificación de *Bacillus popilliae* al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después (F int =1.59 ; p =0.22) b) *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después (Fint =0.71; p=0.41).. ..... 95

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento (5 repeticiones) de larvas de segundo estadio.....	121
ANEXO 2. Mortalidad acumulada por sintomatología de cada tratamiento a los 60 días Larvas de segundo estadio .....	122
ANEXO 3. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a <i>B. bassiana</i> en larvas de segundo estadio.....	123
ANEXO 4. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio .....	125
ANEXO 5. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para larvas que no manifestaron síntomas ni de <i>B. bassiana</i> ni <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio.....	127
ANEXO 6. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para la mortalidad total de larvas de segundo estadio.....	129
ANEXO 7. Programa usado para el análisis de tiempos letales PROC LIFEREG para larvas de segundo estadio .....	131
ANEXO 8. Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento (5 repeticiones) de larvas de tercer estadio.....	135
ANEXO 9. Mortalidad acumulada por sintomatología de cada tratamiento a los 60 días. Larvas de tercer estadio.....	136
ANEXO 10. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a <i>B. bassiana</i> en larvas de tercer estadio.....	137
ANEXO 11. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio.....	139
ANEXO 12. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para larvas que no manifestaron síntomas ni de <i>B. bassiana</i> ni <i>M. anisopliae</i> en larvas de tercer estadio.....	141
ANEXO 13. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para la mortalidad total de larvas de tercer estadio.....	143

ANEXO 14. Programa usado para el análisis de tiempos letales PROC LIFEREG para larvas de tercer estadio.....	145
ANEXO 15. Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento (5 repeticiones) en larvas de tercer estadio ( Hongos x <i>B. popilliae</i> ).....	149
ANEXO 16. Mortalidad acumulada a los 60 días en larvas de tercer estadio ( Honhos x <i>B. popilliae</i> ).....	150



## 1. INTRODUCCIÓN

Las larvas del género *Phyllophaga* causan pérdidas severas en muchos cultivos en América Central incluyendo maíz, sorgo, papa, pastos, café, hortalizas, granos básicos, en plántulas y árboles de especies perennes y forestales (CATIE 1991; King y Saunders 1984). El daño es causado por las larvas del tercer estadio que se alimentan de las raíces de los cultivos, causando el debilitamiento, y frecuentemente la muerte de la planta.

Los métodos disponibles para el control de *Phyllophaga* incluyen prácticas de cultivo como labranza y modificaciones de la cobertura de suelo, y tratamientos preventivos con insecticidas antes o en el momento de la siembra, que son costosos y contaminan el ambiente.

Los organismos entomopatógenos que atacan a especies de escarabaeidos más estudiados son los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii* (= *tenella*) (Glare 1992), y las bacterias *Serratia entomophila* y *Bacillus popilliae* que causa la enfermedad lechosa (Klein y Jackson 1992; Klein 1992; Klein y Kaya 1995).

Las combinaciones entre éstos organismos podrían presentar buenas perspectivas en el control microbiano. La aplicación de un primer patógeno, que actúa como estresor, puede estimular la acción de un segundo patógeno (Thurston 1993), favorecer el desequilibrio fisiológico del insecto (Thurston 1994) o acelerar la evolución de las enfermedades (Ferrón 1969). Entre los casos reportados de sinergismo entre entomopatógenos están *B. popilliae* y *B. tenella* en *Melolontha melolontha* (Ferrón *et al.* 1969), *Serratia entomophila* y *M. anisopliae* en *Costelytra zealandica* (Glare 1994), *Serratia marcescens* y *Bacillus thuringiensis* en *Galleria mellonella* (Steinhaus 1959), virus granulosis y virus de poliedrosis nuclear en *Pseudaletia unipuncta* (Tanada 1959).

El presente ensayo pretende evaluar las combinaciones entre los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como, la combinación de éstos con la bacteria *B. popilliae*, para determinar si existe relación que influya sobre la mortalidad del insecto.

### **1.1. Objetivo general**

Determinar el efecto de la combinación pareada de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *B. popilliae* en la mortalidad de larvas de *P. menetriesi*.

### **1.2. Objetivos específicos**

1. Determinar si la aplicación de un segundo hongo afecta la mortalidad total, tasa de desarrollo y manifestación de los síntomas asociados al primer hongo.
2. Determinar si la aplicación conjunta de dos hongos durante el mismo día afecta la mortalidad total, tasa de desarrollo de la mortalidad y manifestación de los síntomas asociados a ambos hongos.
3. Determinar si la aplicación de un hongo antes que el otro, afecta la mortalidad total, tasa de desarrollo y manifestación de los síntomas asociados al segundo hongo.
4. Determinar si la dosificación previa vía oral de *B. popilliae* afecta la mortalidad total, tasa de desarrollo de la mortalidad y manifestación de síntomas asociados al hongo aplicado después.

## 1.2. Hipótesis de trabajo

Para larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi* y hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Cuando se aplica un segundo hongo después de haberse aplicado un primer hongo:

- a) no cambia la tasa de desarrollo de la mortalidad total.
- b) no cambia la mortalidad total final.
- c) no cambia la mortalidad asociada con síntomas del primer hongo.
- d) no hay interacción de los dos hongos indicativa de sinergismo o antagonismo.

Cuando se aplican dos hongos el mismo día:

- a) no cambia la tasa de desarrollo de la mortalidad total.
- b) no cambia la mortalidad total final.
- c) no cambia la mortalidad asociada con síntomas de ambos hongos.
- d) no hay interacción de los dos hongos indicativa de sinergismo o antagonismo.

Cuando se aplica un hongo antes de un segundo hongo:

- a) no cambia la tasa de desarrollo de la mortalidad total.
- b) no cambia la mortalidad total final.
- c) no cambia la mortalidad asociada con síntomas del segundo hongo.
- d) no hay interacción de los dos hongos indicativa de sinergismo o antagonismo.

En larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* y cuando se dosifica previamente *B. popilliae* vía oral y luego se aplica un hongo:

- a) no cambia la tasa de desarrollo de la mortalidad total.
- b) no cambia la mortalidad total final.

- c) no cambia la mortalidad asociada con síntomas del segundo hongo.
- d) no hay interacción de los dos hongos indicativa de sinergismo o antagonismo.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. El hospedante y su manejo**

#### **2.1.1. Distribución geográfica de *Phyllophaga menetriesi* (Coleoptera: Scarabaeidae)**

*P. menetriesi* se distribuye a través de América Central y en Sudamérica (Frey 1975), aunque Morón (1994) afirma que la penetración de ésta especie hacia Sud América es indefinida. Se encuentra en zonas de 1000 - 2000 mm de precipitación anual en el centro de Guatemala, 2000 - 3000 mm en el Norte de Honduras, 1000-2000 mm en el centro de El Salvador, 2000 -3000 mm en el norte de Nicaragua, mas de 3000 mm en la costa de Pacífico Sud de la costa del Atlántico de Costa Rica y en la frontera de Costa Rica y Panamá con más de 3000 mm (King 1994).

En Costa Rica es poco abundante en regiones secas en el noroeste, pero muy abundante en el centro sur de Costa Rica a una altitud entre 500 y 1800 msnm, especialmente en pendientes volcánicas donde pueden existir altas poblaciones en pasturas y plantaciones de café ( King 1994).

#### **2.1.2. Biología y daño de *P. menetriesi***

King (1984) describió la biología de *P. menetriesi* (Coleoptera: Scarabaeidae) como una especie de ciclo de vida de un año, el cual se inicia cuando los adultos emergen

del suelo durante abril y mayo, en respuesta a las primeras lluvias intensas de la época. No obstante, Shannon (comm. pers.) asevera que la fecha de la primera emergencia puede ser tan temprano como febrero en la zona de Turrialba, Costa Rica, si hay lluvias adelantadas. La emergencia tiene lugar al atardecer, entre las 1745 y las 1815 h en Costa Rica. Las hembras se arrastran o vuelan hacia las ramas bajas, 30 - 60 cm por encima de la tierra, donde se cuelgan con el extremo del abdomen hacia fuera exponiendo la glándula de feromona. Los machos emergen poco después y luego de un pequeño vuelo de búsqueda, se aparean con las hembras durante 10- 15 min., colgando invertidos de la genitalia de la hembra. Luego ambos vuelan en busca de alimento.

Un hospedero preferido es *Erythrina poeppigiana* un árbol leguminoso usado como cultivo de sombra en asociación con el cafeto, en cercas vivas o para cultivo en callejones, pero los adultos se alimentan de un amplio rango de hospederos dicotiledoneos maderables tanto silvestres como cultivados. Después del periodo de alimentación que puede durar muchas horas, los adultos vuelan cortas o largas distancias antes de caer en la tierra, donde cavan en el suelo para ovipositar o descansar hasta la siguiente noche.

El periodo de pre-oviposición observado para hembras de campo recolectadas durante el apareamiento va de 1-2 semanas, pero no como hay certeza acerca de la edad de éstas, este dato puede ser una subestimación. Para hembras criadas en laboratorio fue mucho mayor, por lo menos de 35 días. El periodo de oviposición osciló entre 50 y 100 días para hembras recolectadas del campo y durante este, las hembras pueden llegar a poner hasta 140 huevos. Para seguir con la oviposición requiere de un nuevo apareo. Las hembras requieren alimentarse regularmente para poner la totalidad de los huevos.

Los huevos recién depositados son ovoides, opacos y blancos, se encuentran en el suelo a una profundidad de 5 - 15 cm, en pequeños grupos de 10 - 20 que la hembra pone durante un periodo de 2- 4 días. Después de 10 días los huevos fértiles toman una forma ovalada, casi esférica y se tornan blanco translucido perlado (Hidalgo *et al.* 1996).

Al emerger, la larva joven inicia en forma inmediata una excavación en el suelo, y comienza a alimentarse de materia orgánica y de raíces pequeñas principalmente. Es extremadamente vulnerable en esta etapa y condiciones ambientales ligeramente desfavorables causan rápida mortalidad. En el laboratorio, la mortalidad fue más alta durante el primer estadio, cuando ocurrieron más del 75 % de todas las muertes. King (1984) reportó que el desarrollo desde el periodo de incubación hasta el tercer estadio larval duró de 23 -34 semanas. Las larvas pasan por tres estadios con una duración de 4 - 5 semanas al primer estadio, 8 -9 semanas al segundo estadio y 16 - 18 semanas al tercero (Hidalgo *et al* 1996).

El daño es causado por el tercer estadio larval y es dirigido a las raíces provocando amarillamiento, crecimiento raquítico y acame de la planta. El patrón de distribución del daño en campo es agregado, formando manchones de plantas cloróticas (King 1994).

Algunos datos de incidencia de las larvas de tercer estadio de *Phyllophaga* spp. en algunos cultivos en Centro América se reportaron en el Seminario Taller Centroamericano sobre la biología y Control de *Phyllophaga* spp realizado en 1994, donde se menciona que en Guatemala se encontró 10 - 20 % de plantas dañadas en invernadero de rosas de exportación (Velásquez 1994), en Costa Rica 13 % de plantas en almácigo de café (León 1994), en El Salvador 100 % de plantas de maíz (Mendoza 1994) y en Honduras 23 -39 % de plantas de maíz (Rueda 1994).

Después de alimentarse bien las larvas expulsan su contenido intestinal y construyen una celda en el suelo, donde descansan un periodo prepupal que por generalmente, dura entre 5- 6 meses, antes de su transformación a pupa, que normalmente se produce en febrero o marzo ( King 1994)

Luego del periodo de pupa que tiene duración de un mes aproximadamente, aparecen los insectos adultos. El adulto madura y permanece inactivo hasta que la celda se rompe artificialmente o se induce la emergencia debido a la lluvia calando el suelo. La emergencia ocurre sincronizada con las primeras lluvias fuertes del año (King 1984).

### 2.1.3. Manejo de *P. menetriesi*

Actualmente, los procedimientos de control disponibles consisten de la aplicación preventiva de insecticidas al suelo o a la semilla, labores culturales y el trampeo de adultos.

Los insecticidas usados en el combate de *Phyllophaga*, en su mayoría pertenecen al grupo toxicológico organofosforado (Cuadro 1), los que se recomienda usar cuando se determina la presencia de larvas o cuando el terreno tenga un historial de infestaciones. Las aplicaciones deben ser localizadas a la raíz o adheridos a la semilla, lo que reduce la contaminación de aguas subterráneas y disminuye las cantidades de producto aplicado (Salguero 1994; King y Saunders 1979).

CUADRO 1. Insecticidas utilizados en el control de *Phyllophaga sp* en Costa Rica.

NOMBRE	NOMBRE	FORMULACIÓN	MODO DE	GRUPO TOXICOLÓGICO
acephate	Orthene	G	Sistémico, contacto	Organofosforado
phorate	Thimet	G		Organofosforado
phoxim	Volatón	G	Contacto	Organofosforado, nitrilo
fenamiphos	Nemacur	G	Sistémico	Organofosforado
ethoprophos	Mocap	G	Contacto	Organofosforado
diazinón	Diazinón	G	Contacto	Organofosforado, pirimidin
carbofuran	Furadán	G	Sistémico	Carbamato
chlorpyrifos	Lorsban	G, L	Contacto	Organofosforado, piridina
aldicarb	Temik	G	Sistémico	Carbamato

Fuente: León 1994.

En algunos cultivos la aplicación preventiva de insecticidas antes o en el momento de la siembra, y el tratamiento de la semilla o esqueje no brinda la protección necesaria, porque la persistencia de dichos productos es menor que el tiempo que requiere la planta (ej. caña de azúcar) para emitir las raíces verdades o para producir su cosecha (ej. papa) quedando éstas desprotegidas en el momento en que las larvas están activas (Badilla 1994)

Otras limitaciones al uso de insecticidas incluyen:

- En cultivos perennes (caña de azúcar, café, etc.) los picos poblacionales de la plaga ocurren cuando ya no es posible aplicar el producto en el suelo ( Badilla 1994; Salguero 1994).

- La localización oportuna de las áreas infestadas es difícil, pues el daño es notorio cuando el periodo vegetativo del cultivo está avanzado. Se dificulta su detección en el muestreo porque las larvas pueden migrar verticalmente en el perfil del suelo (Badilla 1994; Salguero 1994; Shannon com. pers.)

- La distribución dispareja de la plaga en el tiempo y en el espacio, hace difícil la determinación del sitio apropiado y época de aplicación (King y Saunders 1979; Salguero 1994). Esto significa que la aplicación preventiva se tiene que hacer en toda el área de cultivo, con consecuencias negativas en cuanto a costos.

- Los huevos son colocados durante un largo periodo, dependiendo de las condiciones climáticas, dando origen a distintas cohortes de larvas y consecuentemente a un periodo largo de daños ( Badilla 1994)



- La movilidad de los productos químicos en suelos pesados y orgánicos es mínima y no llegan al sitio de acción ( Badilla 1994)

- La residualidad y alta toxicidad a humanos y animales domésticos de muchos de los productos efectivos hacen que no puedan ser usados en ciertos cultivos (ej. pastos, cultivos alimenticios próximos al momento de la cosecha). Son ejemplos: aldicarb, carbofuran y ethoprophos (King y Saunders 1984)

- La alta potencialidad para la contaminación ambiental de productos solubles en agua (carbofuran y algunos organoclorinados)

Otra alternativa de manejo es la aplicación de formulaciones líquidas al follaje de árboles trampa como *Caesalpinia pulcherrima* (Malinche) y *Guazuma* spp (Guácimo) donde se alimentan y copulan los adultos (DIECA 1970; King y Saunders 1979; Badilla 1994).

También se han usado trampas de luz ultravioleta colocadas cerca a los árboles trampa durante la época de vuelo (mayo), logrando capturas de 2648 adultos de *Phyllophaga* spp por trampa por noche durante la temporada (Badilla 1994; DIECA 1970; Hernandez 1994; Hernandez y Monterroso 1990). Esta alternativa en áreas cerca a cultivos de caña de azúcar, evita las posturas de huevos, disminuyendo las poblaciones de larvas para el siguiente año. Además se asume que sirven como trampas de seguimiento (monitoreo) para la toma de decisiones en la aplicación de insecticidas a los árboles trampa

Entre las técnicas recomendadas para el control cultural están el manejo de los residuos de cosecha y de malezas dentro y en los bordes del campo, laboreo del suelo (DIECA 1970; Hernandez 1994; Carballo 1994),

La infestación es mayor cuando hay malezas gramíneas presentes. Si los suelos están cubiertos por pasto, barbecho o con cercas vivas son muy infestadas por larvas de *P. menetriesi*, pues las hembras prefieren ovipositar en suelos cubiertos por gramíneas y malezas que en suelo limpio, además, las raíces sirven de alimento a las larvas jóvenes (King 1985; Hruska 1987; Weiner y Capinera 1980)

En cuanto al laboreo del suelo para la destrucción de larvas y pupas, se tiene dos enfoques: primero, que el no laboreo del suelo (Shannon 1989) o la mínima labranza (Rivers *et al.* 1977) reduce la proporción de larvas de *Phyllophaga* spp que atacan al cultivo, por ejemplo, para *P. menetriesi* hay mayor daño al maíz en labranza convencional que en mínima o cero labranza (Carballo 1994); y segundo, que arar el suelo expone a las larvas a los estres ambientales, parasitoides y depredadores reduciendo las poblaciones (Musick y Petty 1974), así mismo Carballo y Saunders (1990) reportan menos larvas en suelos arados.

#### **2.1.4. Control microbiano de *P. menetriesi***

El control microbiano consiste de la utilización de los patógenos para mantener la población de las plagas a niveles no económicos. Alves (1986) señala que los microorganismos entomopatógenicos no deben ser considerados como únicos agentes de control, mas bien deben formar parte de un conjunto de medidas, que en armonía con el medio ambiente sean capaces de reducir las poblaciones de insectos plaga.

Las principales estrategias del control microbiano son: conservación, donde el manejo de sistemas juega un rol importante y se conservan los patógenos naturales ya

existentes; inoculación aumentativa, donde los patógenos son multiplicados y periódicamente aplicados en el campo para suprimir a los insectos plaga (Hall 1982).

El enfoque aumentativo incluye aplicaciones inundativas o inoculativas. Las aplicaciones inundativas son conocidas como control temporario o de corto plazo y conducen a la supresión de la plaga por los agentes aplicados y en menor grado por su progenie. Este enfoque es similar al uso de insecticidas químicos porque la mortalidad de los insectos plaga es mas o menos inmediata y no ocurre interacción prolongada entre los enemigos naturales y la plaga.

El enfoque inoculativo o control a largo plazo, depende de la progenie producida por más de una generación del agente, la que se establece por un tiempo prolongado en la población de la plaga. Este enfoque depende de la habilidad de la progenie de diseminarse y persistir en las poblaciones de insectos plaga (Tanada y Kaya 1993). En la práctica, el enfoque inundativo muchas veces también tiene un elemento de inoculación, siendo importante el "ciclaje secundario" (transmisión natural a otros individuos en la población) del patógeno en el efecto letal, así Lacey et al. (1994) sostienen que adultos de *P. japonica* muertos por micosis de *Metarhizium anisopliae* o *Beauveria bassiana* que permanecieron en el suelo manifestaron la infección con la subsecuente producción de conidias, lo que indica el alto potencial de dispersión del inóculo en el suelo por los cadáveres.

El control a largo plazo se aplica contra plagas que tienen alto umbral económico (bosques, césped y pastos) y con patógenos persistentes tanto en el ambiente biótico como en el abiótico o en ambos. En muchos casos el patógeno causa infecciones crónicas y prolongadas y produce un gran número de progenie que persiste en el ambiente. Tal es el caso de *B. popilliae* que en forma de esporas tiene la capacidad de establecerse en el suelo, permaneciendo infectivo hasta más de 7 años. La propagación de esta bacteria depende

de infectar los insectos migrantes y de la deposición de huevos por los adultos en suelos contaminados (Tanada y Kaya 1993)

Para el control de insectos del suelo con los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* y *M. anisopliae* se tienen dos estrategias: a corto plazo, directamente infectando adultos con aplicaciones aéreas o aplicándolos como insecticidas biológicos al suelo para infectar larvas, y a largo plazo por contaminar a hembras adultas que portan el hongo y lo introducen en el suelo donde la progenie infecta a las larvas (Zimmerman 1994).

También se ha usado la inoculación al suelo para propósitos de establecimiento en la población de insectos plaga. Tal es el caso de la aplicación de *Metarhizium anisopliae* contra *Melolontha melolontha* entre 1890 y 1895 en Francia y Zúiza, donde a lo largo de los años se pudo comprobar que logró establecerse en el suelo causando epizootias con mortalidades que oscilan entre el 38 -80 % (Zimmerman, 1992). También *Metarhizium anisopliae* se usó contra *Mahanarva fimbriolata* en el Brasil en 1981, donde después de 23 años de aplicación el patógeno logró establecerse y proporcionar inóculo suficiente para que se produzcan epizootias anuales en las épocas favorables. (Lecuona 1996).

## **2.2. La enfermedad lechosa (*Bacillus popilliae*)**

La enfermedad lechosa es causada entre los insectos de la familia Scarabaeidae subfamilias Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae por la bacteria grampositiva *Bacillus popilliae* (Bacillaceae), que se ubica dentro del grupo de bacterias formadoras de espora y es un parásito obligado de hemolinfa (Dutky 1940).

### 2.2.1. Historia

La enfermedad lechosa fue reportada en 1933 (Klein 1981) posteriormente Dutky (1940) publicó una descripción de dos bacterias que llamó *Bacillus popilliae* y *Bacillus lentimorbus*, ambas esporulaban profusamente en la hemolinfa de larvas vivas de *Popillia japonica*. Eventualmente todas las larvas infectadas sucumbían por la enfermedad. El denominativo de enfermedad lechosa se debe a que la hemolinfa normalmente gris transparente, desarrolla una apariencia blanco opaca debido a que la hemolinfa se llena de esporangios refractarios de la bacteria.

Posteriormente las esporas de *B. popilliae* fueron producidas masivamente dentro de larvas de *P. japonica* y fue distribuida a través del este de EE.UU. para el control biológico de este insecto (Fleming 1968). Dos formulaciones de polvo de esporas fueron producidas bajo los nombre de Doom y Japidemic por Fairfax Biological Laboratory, Inc. Inicialmente las esporas se producían a partir de larvas infectadas colectadas de campo y posteriormente con esporas producidas *in vivo* (infección por inyección a larvas de *P. japonica*).

Enfermedades lechosas causadas por otros patógenos fueron reportadas en escarabaeidos en Europa (Wille 1956), Nueva Zelanda (Dumbleton 1945; Fowler 1972), Australia (Beard 1956, Milner 1974) y en la India (Davis y Alexander 1975). Patógenos similares no fueron encontrados en otros grupos de insectos de suelo ni en insectos asociados al follaje (Milner 1980).

## 2.2.2. Características generales

### 2.2.2.1. Morfología

El cuerpo vegetativo tiene forma de bastón alargado y mide generalmente cerca de  $6.0 \times 1.0 \mu\text{m}$  y se multiplica por fisión binaria (Kalmakoff y Longworth 1980).

La morfología del esporangio maduro, compuesto por la espora y el cuerpo parasporal, es un importante y estable carácter taxonómico puesto que su forma no es afectada cuando crece en otras especies de escarabaeidos según Steinkraus y Tashiro (1966). El tamaño, la forma y la posición de la espora y el cuerpo parasporal son característicos para cada variedad de *B popilliae*. Las variedades caen en cuatro sub-grupos (Milner 1981):

- 1) A1. Con espora larga, cuerpo parasporal frecuentemente pequeño, sobreponiéndose a la espora. Pertenecen a este las variedades *popilliae* (cuerpo parasporal rombode), *melolonthae* (cuerpo parasporal cuadrado), *rhopaea* (cuerpo parasporal en forma de diamante) y NZ tipo I (desconocido).
- 2) A2. Espora larga, cuerpo parasporal a menudo largo separado de la espora. Pertenecen a este la variedad "RM12" que se encontró en *Anoplognathus porosus* (cuerpo parasporal en forma de diamante).
- 3) B1. Espora central alargada, sin cuerpo parasporal. Las variedades *lentimorbus* y "RM9" corresponden a este sub-grupo.

- 4) B2 Espora pequeña en esporangio largo, espora casi siempre excéntrica sin cuerpo parasporal. Las variedades NZ tipo II, *euloomarahae* y una variedad sin nombrarse cuyo hospedero es *Ataenius spretulus*, corresponden a este sub-grupo.

El tamaño del cuerpo parasporal ya no es un carácter absoluto de caracterización desde que Kaya (1992) aisló *B. popilliae* con cuerpos parasporales pequeños y sencillos o largos y múltiples de *Cyclocephala hirta*. Así mismo Zhang *et al.* (1988) sugieren que el cuerpo parasporal no es un carácter estable, pues cambia cuando se infecta distintos hospederos con la misma variedad de *B. popilliae*, y no debería ser usado para la separación de variedades de *B. popillia*. Klein y Jackson (1992) encontraron más de 30 especies de escarabaeidos infectados con la bacteria causante de la enfermedad lechosa y es probable que existan otras relaciones enfermedades lechosas-escarabaeidos no conocidas hasta el momento. A su vez esto sugiere que todas las combinaciones entre forma, tamaño y posición del cuerpo parasporal no son conocidas. Este es el caso de los aislamientos de Costa Rica que al ser comparados con otros aislamientos por T. Jackson (Shannon 1994) tienen morfología distinta tanto de la espora como del cuerpo parasporal.

#### **2.2.2.2. Función de la espora**

La presencia de espora le confiere características que la hace ventajosa como agente de control microbiano sobre las bacterias que no la forman; es resistente a condiciones adversas como baja humedad, desecación, insolación y calor (Bonnetoi *et al.* 1959; White 1940, 1946). Las esporas de *B. popilliae* son capaces de soportar temperaturas del suelo que son fatales para *P. japonica* y pueden permanecer en el suelo durante la ausencia de hospederos hasta que las poblaciones de larvas aumenten (White 1940, Faust 1974). Además de la longevidad de las esporas en el suelo, que puede ser de 25 a 40 años (Ladd y McCabb 1967; Hutton y Burbutis 1974) Estas características permiten la formulación de un producto estable y almacenable durante largos periodos.

La función del cuerpo parasporal no está claramente determinada pero Krieger (1996) sostiene que tiene homología con el cristal (toxina) de *Bacillus thuringiensis* que contiene la endotoxina Cry, que se disuelven en el intestino medio y es activada por las proteasas del intestino, y se cree que forma poros en el epitelio del intestino medio del insecto (Shat y Gazit 1994) que favorecen la penetración de las esporas al hemocele.

### 2.2.2.3. Especificidad del hospedero

Las variedades de *B. popilliae* son muy específicas; infectan naturalmente un rango limitado de escarabaeidos, muchas variedades están confinadas a pocas especies dentro de un solo género (Milner 1981).

*B. popilliae* var. *rhopaea*, por ejemplo ha sido encontrada solo en *Rhophalea verreauxi* (Milner 1981) mientras un escarabajo *Amphimallon morbillosus* fue infectado por una variedad morfológicamente similar. La variedad *melolonthae* ha sido encontrada solo en *M. melolontha* en Europa y la variedad morfológicamente inusual de *A. spretulus* también es específica, pues no se ha descrito para ninguna de los otros dos especies de escarabaeidos comunes en la misma parte de EE UU, *P. japonica* o *Amphimallon majalis*. Un complejo de 5 géneros de escarabaeidos dañinos están presentes en Australia pero ninguna variedad de *B. popilliae* fue descrita en ellos (Milner 1981).

Una posible excepción es la variedad *popilliae* la cual fue registrada en muchos géneros de escarabaeidos recolectados de campo o inyectados en laboratorio (Dutky 1963), sin embargo debe tomarse esta información con precaución pues puede estar involucrada mas de una variedad (Milner 1981), pues mediante la inyección de esporas se puede obtener infección cruzada entre especies (Dutky 1963). Shannon *et al.* (1994) reportan infecciones en campo de *B. popilliae* en *Phyllophaga menetriesi* en Costa Rica, teniendo



estos aislamientos características morfológicas del esporangio diferentes a otras aislamientos reportados (Jackson com. pers.). Dado que la infectividad cruzada entre especies (Klein y Jackson 1992) fue negativa, es probable que esto sea válido también con especies de *Phyllophaga* y se espera que los casos de infección encontrados en campo sean causados por cepas nativas específicas al género *Phyllophaga*.

En pruebas de laboratorio sobre hospederos específicos, se obtuvieron resultados erráticos cuando se probaron especies de escarabaeidos con sus homólogas variedades de *B. popilliae*. Por ejemplo Fowler (1974) alcanzó rara vez infecciones de más de 5% en *C. zealandica* con el tipo I de enfermedad lechosa a pesar de usar dosis altas y muchos métodos de inoculación. Este problema no fue totalmente comprendido pero indudablemente la edad exacta de las esporas para promover la germinación es vital en el proceso de infección. (Milner 1981)

Otros factores relevantes son el estado nutricional del hospedero (Dutky 1963; Milner 1974), la edad de la larva (Milner 1976), la temperatura, el modo de infección, y la dosis de inóculo. Siendo determinantes tres factores que contribuyen a la especificidad del hospedero: germinación de la spora, defensas y estado nutricional del hospedero (Milner 1981).

#### **2.2.2.4. Persistencia**

La persistencia del esporangio en el campo es una de las características que tiene la bacteria para asegurar su perpetuación en condiciones naturales. (Dutky 1963).

Esta característica es responsable de la eficiencia de este patógeno en el control de *P. japonica* ( White y McCabe 1950; Dutky 1963). Una vez establecido, las esporas se

acumulan en las capas superficiales del suelo, las cuales pueden contener cerca a 100 millones de esporas por kilogramo de suelo (Dutky 1963).

Diferentes autores probaron la persistencia de las esporas, obteniendo resultados diferentes. Beard (1964) reportó larvas infectadas con *B. popilliae* en Connecticut-EE UU. donde *P. japonica* causaba problemas. Una década después una fuerte infestación de este escarabaeido hizo dudar de la efectividad de este agente de control, pero este fenómeno se debió a la presencia de una cepa anormal de *B. popilliae* que llegó a ser dominante y disminuir la incidencia en las larvas. Sus características morfológicas eran diferentes y se caracterizaba por baja infectividad (Bulla et al 1978).

Ladd y McCabb (1967) al ensayar la persistencia en 35 parcelas en 11 localidades de Nueva Jersey-EE UU. colonizados hace 25 años para el control de *P. japonica* encontraron que el patógeno estaba todavía presente en todas las localidades en pastos y campos cultivados a poco menos de 2 millas de distancia de las colonias originales.

Más tarde, Hutton y Burbutis (1974) en muestreos realizados en Delaware-EE.UU., en aquellos sitios que fueron inoculados en las década de los años 40, encontraron que la enfermedad lechosa estaba todavía presente y virulenta. La población larval era mas baja y la tasa promedio de infección era más alta ( 26%) que en otras áreas (7%).

Estudios en laboratorio de St. Julian *et al.* (1978) demostraron que las esporas almacenadas por 7 años en suelo o congelador se hacen no infectivas en larvas dosificadas por ingestión (1.5-3 % de infección). Cuando se guardaron 2 meses en suelo mostraron 50 % de infectividad por ingestión y, cuando las esporas se almacenaron 7 años esparcidas sobre portaobjetos, las infectividades por ingestión e inyección fueron del 20 y 50 % respectivamente.

También hay otros factores que inhiben la persistencia de esta bacteria, así Dignan (1994) después de probar el efecto de 14 pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) comúnmente usados en los pastos, sobre el bioinsecticida *B. popilliae* determinó que todos reducían la viabilidad de las esporas y el crecimiento vegetativo y concluyó que el uso de pesticidas sintéticos pueden contribuir a bajar la incidencia de esta enfermedad en las larvas de escarabaeidos.

### **2.2.3. Patogenésis**

#### **2.2.3.1. Desarrollo en el hospedante**

##### 2.2.3.1.1 Vía inyección

El ciclo de vida de *B. popilliae* fue estudiado por Dutky (1940) en larvas de *Popillia japonica* inoculadas con  $2 \times 10^6$  de esporas por inyección intrahemocelica y mantenidas a 30 °C. Evaluó muestras periódicas de hemolinfa y no encontró cambios ni en la morfología ni en el número de esporas en las larvas después de 12 h de inoculadas. Luego observó una disminución gradual del número de esporas hasta que después de 30 h quedaron cerca a la mitad del número original. Hasta ese momento hubo poca cantidad de formas vegetativas usualmente pareadas.

Después de 48 h estaban presentes todavía cerca de un tercio de las esporas, y se presentaron numerosos cuerpos vegetativos aún en pares. Al tercer día después de la inoculación los cuerpos vegetativos comenzaron a ensancharse y muchas células mostraron la presencia de una vacuola oval en el centro. Durante las siguientes 24 h hubo un incremento de la refringencia de la vacuola con la formación de una endospora madura.

Hasta ese momento muchos de los cuerpos vegetativos estaban en estado de esporulación temprano, pocas células tenían buen desarrollo de endosporas, y fueron

engrosando considerablemente hasta hacerse periformes, algunas mostrando un pequeño gránulo en el extremo del polo.

Observaciones periódicas durante las siguientes 24 h mostraron un incremento en el número de células con la formación inicial del gránulo y pocas células con el gránulo alargado para el desarrollo del cuerpo refráctil. Las células tuvieron una apariencia similar a las inyectadas originalmente. Por el sexto día las esporas fueron suficientemente numerosas de tal forma que la turbidez de la hemolinfa pudo ser observada como un cambio de la apariencia externa de la larva. Hasta este momento muchos cuerpos vegetativos estuvieron todavía presentes tanto en el estado de división como en el de esporulación.

El número de esporas alcanzó su máximo cerca al séptimo o décimo día y en ese momento la larva tiene una apariencia inconfundiblemente lechosa. En la hemolinfa se encontró gran cantidad de esporas maduras además un número considerable de cuerpos vegetativos con apariencia granular y sin refringencia. Estas células oscuras son probablemente las partes incapaces de esporular. El número total de esporas en la hemolinfa hasta ese momento estaba entre 2 a 20 billones, alcanzando a un promedio de 5 billones por larva ( Dutky 1940).

#### 2.2.3.1.2. Vía infección natural

El proceso de infección se inicia cuando las esporas bacteriales son ingeridas con suelo y pedazos de raíz por la larva al alimentarse. Las esporas germinan en el lumen del intestino. Los cuerpos vegetativos infectivos son capaces de penetrar las células epiteliales del intestino medio [por una acción parecida a la fagocitosis] y se multiplican. (Dutky 1963; Klein y Kaya 1995; Klein y Jackson 1992).

Una vez dentro el hemocele del huésped, algunos cuerpos vegetativos son capaces de sobrepasar las reacciones de defensa y moverse dentro la hemolinfa, crecen sin la fagocitosis de los hemocitos y se multiplican a través de muchos ciclos vegetativos y finalmente esporulan. (Dutky 1963; Klein y Kaya 1995; Klein y Jackson 1992)

Las células vegetativas son alargadas y se reproducen en un ciclo vegetativo que es seguido por la esporulación que continúa mientras el insecto infectado sirva como un substrato adecuado para su desarrollo. Durante este periodo la multiplicación vegetativa y la esporulación ocurren simultáneamente. Las células vegetativas soportan un limitado número de duplicaciones (menos de 8) y comienzan a esporular, llenando el cuerpo de la larva con esporas y ocasionando su muerte (Dutky 1963). Una larva de *P. japonica* puede contener desde  $6 \times 10^7$  (Dutky 1963) hasta  $5 \times 10^9$  esporas (Dutky 1940)

La acumulación de esporas hace que la hemolinfa normalmente clara se torna turbia, dando como resultado la apariencia blanco lechosa que caracteriza a la larva infectada. La muerte de la larva infectada puede demorar un mes o más (Dutky 1963; Klein y Kaya 1995; Klein y Jackson 1992).

Crocker (1988) dosificó vía oral *B. popilliae* en trozos de zanahoria, encontrando que  $2 \times 10^6$  esporas/larva causaron 37% de enfermedad lechosa en *Phyllophaga crinita*, concluyendo que esta baja mortalidad pudo deberse a que las larvas no ingirieron la totalidad de las esporas y que el patógeno exhibió un nivel relativamente bajo de infectividad.

También Warren y Potter (1983) dosificaron larvas tercer estadio de *Cyclocephala immaculata* en suelo inoculado con *B. popilliae* var. *Cyclocephala* y encontraron que obtenían mortalidades de 95% cuando usaron  $5 \times 10^8$  esporas por gramo de suelo.

### 2.2.3.1.3. Efecto de la temperatura

Hurpin (1968) sostiene que la septicemia debida a *B. popilliae* var. *melolonthae* en *Melolontha melolontha* solo surge dentro del estrecho rango de 15 - 27 °C e indica que estos limites están dados por los requerimientos de multiplicación y esporulación de la bacteria y por los efectos de la temperatura sobre la actividad locomotora y alimentaria de del hospedero. Similares rangos fueron encontrados por Beard (1946) y Dutky (1963) en *P. japonica* infectada por *B. popilliae* var *popilliae*.

### 2.2.3.2. Causa de la muerte del insecto

Al comienzo de la septicemia bacterial el insecto típicamente manifiesta disminución y falta de apetito y deficiencia de movilidad, acompañado por descargas rectales y orales, luego pocos cambios degenerativos del tejido son evidentes, la putrefacción de las larvas muertas es consecuencia de organismos secundarios (Klein y Jackson 1992).

Las causas de la muerte no se conocen con exactitud. Pero se sugiere que puede ser causada por una disminución de concentración de nutrientes esenciales (como proteína) en la hemolinfa, que puede ser causada directamente por *B. popilliae* (al usar las proteínas para desarrollar la patogenésis) o por algún mecanismo de defensa del hospedero, el cual inicia la actividad de enzimas proteolíticas en la hemolinfa para contrarrestar la presencia del patógeno (Bennett *et al.* 1968); o por la presencia de factores tóxicos termolábiles (Dutky 1963). Sharpe y Detroy (1979) mostraron que los cuerpos grasos de larvas infectadas se redujeron en un 75%, sugiriendo que tal agotamiento conduce a la muerte del insecto.

#### 2.4.1.4. Cultivo

La baja eficiencia de esporulación *in vitro* de *B. popilliae* ha sido el factor limitante para expandir el uso de esta bacteria, tiene dificultad para crecer en medio de cultivo artificial y rara vez se ha observado esporulación en medios de uso común. Para obtener resultados positivos se requiere de la selección cuidadosa del medio y de las condiciones de incubación (Steinkraus y Tashiro 1955; Dutky 1963) y de la ruptura de la dormancia de las esporas (Kalmakoff y Longworth 1980). Variadas técnicas fueron usadas para inducir la esporulación *in vitro* de esta bacteria.

Así, Steinkraus y Tashiro (1955) inocularon esporas de *B. popilliae* calentadas a 70 °C durante 15 min sobre un medio de cultivo sólido completo (5 g de triptona, 3 g de extracto de levadura, 3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de glucosa, 1 g de maltosa, 10 g de almidón soluble, 15 g de agar y 1000 ml de agua destilada) incubado a 32 °C. Después de 4 días, cuando observaron buen crecimiento y germinación de las esporas, las transfirieron a un medio pobre en nutrientes (1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g de KCl, 0.2 g de MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g de extracto de levadura, 15 g de agar y 1000 ml de agua destilada) incubado a 32°, 37° y 45°C. Si bien no tuvo lugar crecimiento vegetativo adicional bajo esas condiciones, la esporulación ocurrió entre las 24 y 72 hrs a las tres temperaturas, obtuvieron mayor cantidad de esporas a 37 °C. Así mismo si se incubaba primero a 32° C y luego a 37°C (o primero a 37°C y luego a 45°C), se forman esporas sin necesidad de transferir del medio nutritivo. Al ser inoculadas las esporas así producidas en larvas de *Amphimallon majalis* mostraron alta virulencia cuando fueron inyectadas y menos cuando fueron ingeridas (Steinkraus y Tashiro 1955).

También Haynes y Rhodes (1966) reportaron que *B. popilliae* NRRLB-2309S formó esporas en medio "J" (triptona 0.5 %, extracto de levadura 1.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, glucosa 0.2 %, agar 2% pH 7.5 propuesto por Milner en 1981) líquido, conteniendo carbón

activado (PK, Barney-Cheney Co. Columbus, Ohio) pero no registran datos de infectividad.

Posteriormente Luthy y Ettliger (1970) usaron un medio de cultivo sólido enriquecido que contenía hemocitos de *Phyllophaga anxia* para cultivar esporas de *B. popilliae* (EE.UU.) calentados a 80°C durante 20 min, demostrando que hubo germinación y buen crecimiento vegetativo pero no esporulación.

Schwartz y Sharpe (1970) reportan que esporas de *B. popilliae* var NRRLB-2309M producidas en medio de cultivo no fueron infectivas cuando larvas de tercer estadio de *P. japonica* fueron expuestas a suelo contaminado con 2 billones de esporas/kg o cuando se sumergieron en una suspensión acuosa de 200 000 de esporas/ml. Cuando se inyectaron con 10 000 esporas, infectaron 24% de las larvas. Esporas producidas *in vivo* ocasionaron 40 % de infección cuando fueron inyectadas y 60 % de infección cuando las larvas se expusieron a suelo contaminado o fueron sumergidas en suspensión acuosa.

El polvo comercial de esporas se producía por maceración de larvas infectadas, pero en 1985 se comercializó un producto (Grub Attack) conteniendo esporas producidas *in vitro* (Klein y Kaya 1995). Sin embargo cuando se examinaron los cultivos *in vitro* y se determinó que en vez de *B. popilliae* contenía esporas de *B. polimyxa* y *B. amilolyticus*, razón por la cual no era infectivo a *P. japonica*. Se concluyó que este método no fue efectivo para producir esporas *in vitro* (Stahly y Klein 1992, Klein y Kaya 1995). Posteriormente Redmond y Potter (1995) después de analizar nuevamente muestras del producto, reportan que algunos lotes antiguos de Grub Attack fueron formulados por mezclas de 4 cultivos *in vitro* y que se añadió *B. popilliae* producido *in vivo* a pocos lotes del producto.

Finalmente Krieger et al (1994) aislaron *B. popilliae* var *melolonthae* originario de Alemania y añadiendo carbón activado y almidón mejoraron la tasa de germinación y



crecimiento *in vitro*. La adición de vitaminas, aminoácidos, trehalosa, hemoglobina y extracto de levadura al medio incrementó el crecimiento vegetativo, mientras que la adición de extractos de larvas no tuvo influencia en la tasa de crecimiento. El mejor medio probado fue el agar sangre, así mismo ellos describen un nuevo medio nutriente para la germinación y crecimiento. Posteriormente desarrollaron un método para producir esporangios *in vitro* y los que luego son inyectados a larvas para su crecimiento y esporulación *in vivo* (Krieger et al. 1996)

### **2.2.5. Epizootiología**

La epizootiología estudia la dinámica de las enfermedades en las poblaciones de los insectos de un ecosistema, es un proceso de múltiples interacciones dentro y entre las poblaciones tanto de insectos como de los microorganismos, estando ambas íntimamente relacionadas con el resto de los factores ambientales (Steinhaus 1949).

Esta ciencia no solo comprende el estudio de las enfermedades infecciosas sino también el de no infecciosas que son el resultado de diferentes causas: nutricionales, genéticas, fisiológicas o físicas (Tanada 1963). En ciertos casos, ambas enfermedades pueden estar presentes al mismo tiempo en una población de insectos. Por ejemplo, factores nutricionales pueden inducir anomalías fisiológicas o morfológicas estimulando el desarrollo de enfermedades infecciosas latentes o aumentando la proporción de insectos parasitados por algún entomopatógeno.

La bacteria causante de la enfermedad lechosa *B. popilliae* ha sido introducida en el medio ambiente para su establecimiento permanente en el campo, una vez que se reproduce en el hospedero, se reinocula en el suelo (Klein y Kaya 1995), esto fue evidenciado antes en trabajos preliminares realizados por Dutky (1940) donde 10 % de la

infección ocurrió en el campo dos semanas después del tratamiento e incrementó hasta 45 % un año después.

El desarrollo de la epizootia esta influido por factores abióticos y bióticos como la densidad poblacional y comportamiento de los insectos y la relación con otros organismos no susceptibles en el medio.

Beard (1945) demostró que la densidad de las larvas de *P. japonica* fue importante en el establecimiento de la enfermedad lechosa en el campo cuando no encontró infección 2 meses después de la aplicación de  $1.25 - 5 \times 10^{10}$  esporas/m<sup>2</sup> en parcelas que tenían 30 larvas/m<sup>2</sup>, mientras que en parcelas con 180-480 larvas/m<sup>2</sup> las tasas de infección fueron de 11 - 37 %. Esto indica que las epizootias se favorecen con altas densidades poblacionales del hospedante quizás porque aumentan los contactos entre el hospedante y el patógeno, entre los insectos sanos y el inóculo depositado por los insectos muertos, y además incrementa la susceptibilidad del hospedante hacia el patógeno debido a la competencia por alimento (Watanabe 1987). Se puede decir que los patógenos se comportan como un factor de mortalidad denso-dependiente, es así que necesitan un elevado nivel poblacional del insecto para también activar la población del patógeno (Tanada 1963).

La densidad del entomopatógeno es otro factor importante que determina si la enfermedad llegará o no a niveles epizoóticos. Así Adams y Wheeler (1946) demostraron que con altas tasas de esporas de *B. popilliae* ( $2 \times 10^{10}$ /m<sup>2</sup>) se puede controlar a las larvas de *P. japonica* en 18 meses, pero cuando se usaron tasas bajas  $1 \times 10^8$ /m<sup>2</sup> se requiere alrededor de 4 años para que el control sea efectivo.

Los factores ambientales cumplen una función esencial en el inicio y desarrollo de las epizootias, así la temperatura juega un rol muy importante en la eficacia de *B. popilliae* en campo (Klein 1981). El límite mínimo de temperatura para el desarrollo de *B. popilliae* es 15 °C (Dutky 1940, 1963).

Milner (1981) reportó que al enfermedad lechosa desarrolla mejor de 20 a 25 °C y se inhibe a temperaturas menores a 15°C y mayores de 30 °C correspondiendo la temperatura óptima a la media global anual de 24.5 °C. Los rangos reportadas por Cherry *et al.* (1989) en *Cyclocephala parallela* y *Ligyris subtropicus* en Florida-EE.UU., son temperaturas medias del suelo de 18 °C a 28°C las que están dentro el rango de desarrollo reportado por Milner (1981). Klein (1981) explica como las bajas temperaturas del suelo reducen las infecciones de *B. popilliae* en poblaciones de L3 de *Cyclocephala parallela* y *Ligyris subtropicus*: a 18°C sobreviven 19.5 -21 días y a 28 °C 4.5 - 7.5 días respectivamente. Se concluye que en apariencia a la temperatura es un factor crítico en la efectividad de la enfermedad lechosa.

#### **2.2.6. Utilización en el control**

*B. popilliae* ha sido usado como un agente inoculativo para su establecimiento o para aumentar las poblaciones de este patógeno en el campo con el objetivo de establecer un control a largo plazo (Klein 1992). Sin embargo la baja eficiencia de la producción de esporas infectivas en medios artificiales siempre ha sido la gran limitante para la producción comercial (Redmond y Potter 1995).

El uso más conocido de la bacteria de la enfermedad lechosa se dio cuando se introdujo *B. popilliae* al noroeste de EE.UU. en 1939, donde se aplicó polvo de esporas producido *in vivo* en laboratorio. Para su establecimiento en pastos, parques y canchas de golf en 14 estados y el Distrito de Columbia (Klein 1992). El programa de colonización fue considerado exitoso en distribuir el patógeno a través de áreas infestadas por la especie introducida, *P. japonica*; ayudó en la supresión de las poblaciones de esta plaga (Fleming 1968). Cuando el programa terminó en 1954, se encontró que en las áreas tratadas en Connecticut, resurgieron las poblaciones de *P. japonica* y disminuyó la efectividad de la

bacteria. Cuando se construyeron viviendas en esos sitios, se removieron o quemaron las capas superficiales del suelo, eliminando las esporas que permanecían en el suelo. Esta situación puso en duda la persistencia de las esporas en el campo (Fleming 1968; Klein 1981).

Fairfax Biological Laboratory, Inc. continuó obteniendo esporas generadas *in vivo* para sus productos comerciales Doom y Japidemic ( $10 \times 10^8$  esporas /gr de polvo comercial) por más de 40 años. Posteriormente un aparente éxito en la producción *in vitro* fue documentada por Reuter Laboratories Inc. En 1989 Ringer Corporation adquirió los Laboratorios Reuter y continuaron comercializando su producto *in vitro*, Grub Attack pero luego se evidenció en 1990 que las esporas que contenía este producto no correspondían a *B. popilliae* (Stahly y Klein 1992; Redmond y Potter 1995).

En laboratorio aislamientos provenientes de EE.UU. dieron 90% de control en larvas de segundo estadio de *P. japonica*. Posteriormente entre 1990 y 1991 se inocularon 45 sitios de la Isla Terceira, Portugal (donde *P. japonica* había sido introducida), con dosis superiores a las usadas en USA, pero la infección en las larvas fue rara, y se concluyó que esto fue debido a las bajas temperaturas y a la distribución desuniforme de las larvas en el campo. (Lacey et al. 1994).

### **2.3. Muscardinas verde (*Metarhizium anisopliae*) y blanca (*Beauveria bassiana*)**

*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* pertenecen al grupo de los hongos imperfectos (Deuteromycetes= Fungi Imperfecti) un grupo establecido que se caracteriza porque su reproducción sexual aún no ha sido observada.

### 2.3.1. Infección y patogénesis

El desarrollo de la micosis puede ser separada en tres fases (Tanada y Kaya 1993):

a) La adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto. La invasión se inicia con la penetración de la cutícula mediante la adhesión vía mucus o por fuerzas hidrofóbicas no específicas (Charnley 1994), la cutícula constituye la primera y posiblemente la mas importante barrera para la infección (Butt 1994). Como la cutícula es de naturaleza heterogénea, presenta diferencias en sus propiedades físicas y químicas, esto se evidencia por que la germinación de la conidia puede diferir de un sitio a otro, por ejemplo; en la membrana intersegmentaria, en los élitros o en las alas membranosas de los coleópteros (Ferrón 1981; Leucona 1996; Glare 1992 ).

Durante la germinación se produce un tubo germinativo, cuya formación depende de la humedad ambiental, la temperatura, luz y del medio nutricional. Las características de la cutícula también son responsables de la rápida germinación en las alas membranosas y lenta en los élitros, y de la producción de apresorios en la superficie o al final de los comparativamente largos tubos germinativos (Butt 1994). Esto puede o no ocurrir si el tubo germinativo penetra por las aberturas naturales (Alves 1986).

b) La penetración al hemocele. La penetración de la hifa por el integumento hacia el hemocele involucra 2 procedimientos principales (Tanada y Kaya 1993):

1) El físico, debido a la presencia de hifas que rompen las áreas membranosas o esclerotizadas.

2) El químico, resultante de la elaboración de enzimas ( proteasa, lipasa y quitinasas) que facilitan la penetración mecánica.

La penetración puede estar más concentrada en los pliegues intersegmentales, donde los conidios son más fácilmente atrapadas (Leucona 1996), La penetración también puede ocurrir por las aberturas del cuerpo, o por la pared intestinal. La conidia también puede ser digerida por los fluidos digestivos y, si produce toxinas, matar al huésped por toxicosis más que por micosis (Tanada y Kaya 1993).

c) Desarrollo y colonización. A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización del hospedero por el hongo. La hifa que penetra sufre un engrosamiento y se ramifica inicialmente en el integumento del insecto y posteriormente en la cavidad del cuerpo (Alves 1986).

A partir de éste momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (esencialmente blastosporas) que se multiplican por brotación de hifas [budding] (Tanada y Kaya 1993). Puede no ocurrir gran crecimiento hifal dentro el cadáver antes de la muerte del insecto.

Eventualmente todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas pero no se desintegran debido a que el patógeno segrega sustancias antibacteriales. La colonización de los órganos presenta la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malphiggi, sistema nervioso, músculos y finalmente traquea.( Alves 1986). La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, modificaciones patológicas en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo debido al crecimiento vegetativo ( Alves 1986)

Los síntomas externos durante el progreso de la infección se caracterizan por (Madelin 1963):

- a) Mientras el insecto todavía esta vivo. Los síntomas iniciales de la micosis pueden aparecer como manchas oscuras en las patas, en las regiones intersegmentarias o distribuidas por todo el tegumento.
- b) Cambios de conducta. Pérdida de apetito, apatía, movimientos débiles y desacompañados debido a parálisis parciales, finalmente la larva pierde el reflejo de enderezamiento, permaneciendo encorvada.
- c) Decoloración. Los cambios de color típicamente rosáceo en caso de *Beauveria bassiana* y cremoso en caso de *Metarhizium anisopliae* ocurren en insectos atacados por ciertas cepas debido al color mismo del hongo o a pigmentos que éste produce.
- d) Apariencia de micelio blanco por, principalmente, las membranas intersegmentarias, los espiráculos y la cabeza. Puede llegar eventualmente a cubrir el cadáver
- e) Producción de conidias. En el caso de *Metarhizium anisopliae* los cadáveres llegan a cubrirse densamente de conidias de color verde, *Beauveria bassiana* los cubre de conidias y micelio de color blanco.

El tiempo que transcurre entre la infección y la muerte puede variar dependiendo de la interacción de los factores ambientales y propios del huésped y del patógeno. Así cuando se expusieron escarabaeidos a *M. anisopliae* o *B. bassiana* en bioensayos, la muerte ocurre luego de 2 a 3 semanas para larvas de tercer estadio de *C. zealandica* a 20 °C, entre 8 a 21 días para larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi* a 28 °C y de 1 a 3 meses para larvas de tercer estadio de *P. obsoleta* a 21 °C (Shannon 1994).

Los factores que influyen en el proceso infectivo son la cantidad de conidias, y la salud y edad del huésped (Ferrón 1981; Feng *et al.* 1995). Existe una correlación positiva entre el número de conidias y la mortalidad por micosis, con baja dosis de conidias la enfermedad se desarrolla lentamente y afecta solamente a las larvas o adultos más viejos (Ferrón 1981). Para causar mortalidad en laboratorio son necesarias de  $10^6$  a  $10^8$  conidias/ml o  $10^5$  a  $10^8$  conidias /g de suelo (Ferrón 1981).

Con respecto al estado de desarrollo del huésped se ha encontrado que larvas de primer estadio de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) son más susceptibles a *B. bassiana* que las de quinto estadio (Feng et al 1985). También Ferrón y Robert (1975) encontraron que adultos de *Acanthoscelides obtetus* (Coleóptera: Bruchidae) de dos a cuatro horas de edad son más susceptibles a *B. bassiana* que los de cinco días.

También se encontró mayor mortalidad en larvas de *Leptinotarsa decemlineata* cuando se aplicó simultáneamente DDT en dosis subletal y *B. bassiana*. Similar fenómeno resultó de la combinación de *B. brongniartii* y dosis bajas de organoclorinados u organofosforados en *M. melolontha* (Ferrón 1981).

Existen informes acerca de la producción de toxinas por los Deuteromicetes, muchos de ellos en *Beauveria spp* y *M. anisopliae* (Lecuona 1996; Kucera 1980; Lysenko y Kucera 1971; Tanada y Kaya 1993). Su función parece estar relacionada con la muerte del insecto por acción insecticida o inhibición de las reacciones de defensa del hospedante, por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de hemolinfa (Vey y Götz 1986). Algunas son detectables en medios de cultivo usados para producir el hongo (Kodaira 1961). Las destruxinas, un grupo principalmente estudiado en *Metarhizium anisopliae*, son importantes en el desarrollo de síntomas y la rápida producción en el insecto causa la muerte. Son tóxicos solo por ingestión y no por vía trans-integumental (Roberts 1981; Fargues *et al.* 1985) Otros metabolitos secundarios



producidos en el insecto infectado son antibióticos que previenen la descomposición bacteriana y así permiten la momificación del insecto (McCoy et al. 1988).

### 2.3.2. Cultivo y producción

*B. bassiana* y *M. anisopliae* se adaptan bien a los medios artificiales sin perder virulencia. Para la producción masiva se han utilizado diversos substratos naturales como el arroz autoclavado en el que producen grandes cantidades de conidias, tanto en la superficie como entre los granos (Alves 1986). En condiciones de laboratorio el rango óptimo de crecimiento de *M. anisopliae* esta entre 24 - 26 °C de temperatura. Para el crecimiento normal requiere un pH entre 4.7 a 10, siendo el óptimo entre 6.9 a 7.4 (Shaerffenberg 1964).

Muchas técnicas para la producción masiva de Deuteromycetes están disponibles, mayormente para la producción de conidias infectivas. Estas técnicas son en su mayoría variaciones de la producción en substratos sólidos, y se usa la fermentación en dos fases; el micelio es crecido en medio líquido o sólido, seguido de una inoculación a un medio sólido o a un cuerpo inerte o vehículo en el cual las conidias son producidas (Rombach et al 1988; Alves 1986). Este tipo de metodologías es empleado en la producción del producto comercial "Mycotrol" por Mycoger.

Recientemente Bayer AG difundió información de su formulación granulada BIO1020, de *Metarhizium anisopliae*. El hongo es crecido en cultivo líquido, se aprovecha la capacidad de la cepa de formar micelio y se formula en esferas de 5 mm que se rehidratan en el suelo y esporulan en 5 días. La fermentación sumergida es posible para algunas cepas y es considerada para la producción masiva de blastosporas o conidias sumergidas (McCoy 1990).

### 2.3.3. Utilización de hongos en el control

#### 2.3.3.1. Historia del uso

##### *Metarhizium anisopliae*

El primer trabajo de control microbiano fue realizado por Metschnikoff en 1879, quien fue partidario de la producción masiva de este hongo para el control del escarabajo del trigo (*Anisoplia austriaca*) en la Unión Soviética y, en 1884 operó una pequeña planta de producción para suplir de inóculo para la lucha contra el picudo de la remolacha. Krassiltschik (1888) continuó trabajando con el hongo llegando a producir cerca de 55 kg de hongo, y consiguiendo un control de 55 - 80 % de los insectos en pequeñas áreas después de 15 días de aplicación (Alves 1986; Samson et al.1988)

A partir de esa época diversas razas de *Metarhizium* vienen siendo estudiadas sobre muchas especies de insectos. Se sabe que este patógeno ocurre naturalmente sobre más de 300 especies de insectos de diferentes ordenes. Actualmente el uso más significativo de *Metarhizium anisopliae* a nivel comercial está en Brasil donde se usa contra la cigarra de la caña de azúcar *Mahanarva posticata*, y del barrenador de la caña (*Diatrea saccharalis*) (Alves 1986; Samson et al.1988). Con base en el primer ejemplo, el uso contra salivazos en caña se ha difundido ampliamente en América latina durante los últimos años. En Costa Rica se reportó aplicación en más de 6000 ha durante un periodo de cinco años (Badilla et al 1984).

##### *Beauveria bassiana*

Este hongo fue conocido internacionalmente por el producto soviético Boverin, cuya formulación contiene  $6 \times 10^9$  conidios/gr, que fue recomendado contra *Leptinotarsa decemlineata*, *Cydia pomonella* y otras especies de insectos. El patógeno fue aplicado en

combinación con productos químicos (malathion y tricolorphon), para el control de estas plagas con la finalidad de obtener un efecto sinérgico y una reducción de las dosis de los productos químicos. Otro ejemplo significativo de la utilización de este hongo es en el control de *Ostrinia nubilalis* a gran escala en China; fue aplicado en 1977 en aproximadamente 400 000 ha de maíz, llegando a reducir el daño de 60% antes de la aplicación a 2 % después de 5 años de la aplicación (Alves 1986).

La formulación de plaguicidas microbiales es muy importante para el éxito del patógeno. La formulación debe considerar dos importantes factores que no son considerados con los plaguicidas químicos. Primero, el microbio es un organismo vivo y por lo tanto la formulación no debe ser tóxica al organismo. Segundo, los materiales usados en la formulación no deberían contener materiales que sustenten o favorezcan el desarrollo de microorganismos antagónicos presentes en el suelo ( Storey y McCoy 1992).

La persistencia de los pesticidas microbiales es también importante, porque esta incrementa la oportunidad para la infección de plagas objetivo y reduce el costo de re-aplicación. Conidias de *Beauveria bassiana* pueden persistir por más de 2 años, pero persistencias mayores a 6 semanas hacen del pesticida microbial similar a uno químico con efecto residual (Storey y McCoy 1992).

*Beauveria bassiana* como Mycotrol (Mycotech Corp.) es el primer producto fúngico con un registro completo en EE UU. para uso en cultivos alimenticios y actualmente está siendo vendido para su uso contra *Bemisia* spp. (Bradley 1996). También AgrEvo (Hoechst y Schering), produce gránulos dispersables ( $2.5 \times 10^{10}$  conidias/gr de producto) de *Beauveria bassiana* bajo el nombre de "Conidia WG", usado contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

En Nicaragua, el uso de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el manejo de broca del café en parcelas de validación, mostró reducción del daño en 160 ha cuando se aplicó dos veces por año. Este caso muestra la necesidad de la producción de estos hongos a escala comercial para la región (Berrios *et al.* 1995).

### 2.3.3.2 Utilización en el control de escarabaeidos

Después de los trabajos previamente mencionados con *Metarhizium anisopliae* por Metchnikoff en 1879, el uso de este hongo se reportó en 70 especies de escarabaeidos. A continuación se presentan algunos ejemplos.

Se trabajó en la selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de larvas de *Antitrogus* y *Lepidiota* (Col:Scarabaeidae) en caña de azúcar en Australia, cuya estrategia de utilización consistió de la aplicación de formulaciones de micelio o conidias al momento de la siembra (Milner 1992). También se usó aislamientos de *Metarhizium anisopliae* como control efectivo contra *Adoryphorus couloni* en pasturas de Tasmania (Rath 1992).

En Francia, Giard (1893) experimentó con *Beauveria brongniartii* contra larvas de *Melolontha* y encontró métodos de producción a gran escala y aplicación en campo. Actualmente se sigue usando predominantemente este patógeno contra *Melolontha melolontha* y *M. hippocastani*. Se usan dos estrategias para su control: control de las larvas aplicando *Beauveria brongniartii* al suelo y control de adultos por tratamientos aéreos a las plantas alimenticias con el mismo hongo (Zimmerman 1992).

Las larvas de *Phyllophaga* spp. fueron susceptibles a infecciones de *Metarhizium anisopliae* aplicado al suelo a razón de  $10.2 \times 10^6$  esporas por  $m^2$  de suelo o  $10.2 \times 10^{11}$  esporas/ha de suelo en Quebec, Canadá, mostrando mortalidades de 64.42% con dosis de

$2.14 \times 10^8$  esporas/m<sup>2</sup> de suelo (Poprawski 1985). Lim (1979) observó desde 1975 a 1977 que *Metarhizium anisopliae* fue más común que *Beauveria bassiana* en poblaciones de *P. anxia* en el sur de Quebec, también concluyó que las larvas de *Phyllophaga* spp. son más susceptibles a la infección de *Metarhizium anisopliae* que a la de *Beauveria bassiana*, o por lo menos que los aislamientos locales de este hongo son menos virulentos

En Centroamérica, Velásquez (1994) en Guatemala reporta que se establecieron parcelas comerciales de maíz en departamento El Quiché para evaluar la efectividad una cepa del hongo *Beauveria bassiana* en *Phyllophaga* spp. mostrando resultados satisfactorios, pues lograron reducir las poblaciones de 38 a 2 larvas/ m<sup>2</sup>. Posteriormente se evaluó la eficiencia de una cepa de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Phyllophaga* sp. en caña de azúcar, mostrando resultados satisfactorios comparado con la aplicación tradicional del insecticida Counter.

En Costa Rica, el laboratorio de control microbial de insectos de CATIE, evaluó la virulencia en prueba máxima de 140 aislamientos de *Metarhizium* spp. para tres especies de *Phyllophaga* más dañinas en larvas de segundo estadio (L2) y larvas de tercer estadio (L3): *P. menetriesi*, *P. obsoleta* y *P. vicina*. Se encontró que tres de ellos causaron mortalidad mayor que los demás aislamientos, y mostraron ser virulentos en más de una especie ARE-1 (70 % de mortalidad en L3 de *P. menetriesi* y 58 % para L2 de *P. vicina*), ARE-2 (78 % de mortalidad en L2 de *P. menetriesi* y 75 % en L2 de *P. vicina*) y TEP-4 (89 % de mortalidad en L2 de *P. menetriesi*, 58 % en L3 de *P. vicina* y 100 % en L3 de *P. obsoleta*). Se seleccionó la cepa ARE-1 porque a los 33 días incrementa su mortalidad superando a las demás cepas evaluadas de *Metarhizium*, alcanzando un 30 % de mortalidad a los 50 días. Pero la mayoría de las cepas tanto las nativas como las exóticas no causaron mortalidad o fueron débilmente virulentas (CATIE 1993).

Ensayos de patogenicidad con *Beauveria* sobre *P. menetriesi* mostraron que el aislamiento P0084 fue uno de los más patogénicos para *P. menetriesi* con una dosis de

$5.6 \times 10^6$  conidias/ ml de suelo (83 % de mortalidad en larvas de segundo estadio) (CATIE 1993).

## 2.4. Combinaciones entre entomopatógenos

Ejemplos de la coexistencia y el desarrollo simultáneo de diferentes microorganismos en el mismo hospedero son numerosos en la patología de insectos. Las observaciones y las descripciones histopatológicas realizadas por muchos autores muestran que los organismos causales de estas enfermedades asociadas en el mismo individuo son de dos tipos (Vago 1963): entre organismos diferentes, por ejemplo, protozoarios y virus, bacterias y virus, bacterias y hongos; o entre organismos del mismo tipo, por ejemplo, virus de la poliedrosis y de la granulosis, amoeba y microsporidium, bacterias formadoras y no formadoras de esporas.

Estas infecciones concomitantes pueden desarrollarse en diferentes tejidos, en las mismas o en diferentes células, ambos casos han sido mostrado por Vago (1959) en la patogénesis simultánea del virus poliedrosis citoplasmática y el virus granulosis en *Pieris brassicae*. Así, Atger y Vago (1960) notaron que en el cuerpo graso de larvas de *B. mori* coexisten *Nosema bombycis* en el citoplasma y el virus de la poliedrosis nuclear en el núcleo. Weiser (1957) encontró que dos especies de *Nosema*, algunas veces encontradas en la misma larva de *Lymantria dispar*, desarrollan en dos distintos tejidos: *Nosema lymantriae* en el cuerpo graso y *Nosema muscularis* en los músculos.

Similarmente, Bird (1959) mostró que el virus de la poliedrosis y el de la granulosis de *Choristoneura fumiferana* pueden multiplicarse en células adyacentes en el cuerpo graso, hipodermis o hemolinfa, pero nunca coexisten en la misma célula; la infección de una célula por un virus aparentemente inhibe el desarrollo del otro.

Independientemente del tipo de organismos que participan en las combinaciones, sus efectos pueden ser de varios tipos: sinergismo, antagonismo, efecto aditivo, efecto independiente (Tammes 1964; Gardner et al 1986).

**Sinergismo:** se define como una acción cooperativa de dos componentes de una combinación, de tal forma que el efecto total es más grande o más prolongado que la suma de los efectos de cada uno de ellos aplicado independientemente

**Antagonismo:** cuando el efecto total es mas pequeño que el efecto de cada componente aplicado solo.

**Efecto aditivo:** acción cooperativa, tal que el efecto total es igual a la suma de los efectos de los componentes aplicados independientemente.

**Efecto independiente (sin influencia o sub-adición):** el efecto total es igual al efecto del componente más activo aplicado solo.

#### **a) Sinergismo.**

Varios casos de sinergismo entre organismos son conocidos; como los resultados de Steinhaus (1959) al asociar *Serratia marcescens* y *Bacillus thuringiensis* incrementó la mortalidad total de *Galleria mellonella*.

Tanada (1959) encontró que la mortalidad de larvas maduras de *Pseudaletia unipuncta* fue incrementada por la ingestión simultánea de un virus granulosis y un virus de poliedrosis nuclear. Intervalos de 3-5 días entre la ingestión de los virus fueron suficientes para causar modificaciones en la severidad relativa de las dos enfermedades: cuando el virus granulosis es seguido por poliedrosis nuclear el incremento en sensibilidad

de la larva es más pronunciado que cuando la ingestión de poliedrosis precedía al virus granulosis.

Los efectos de sucesivas infecciones sobre larvas de *Melolontha melolontha* L. primero por la enfermedad lechosa (*Bacillus popilliae*) y luego por la micosis *Beauveria tenella* (= *brongniarti*) han sido estudiados en laboratorio en el tercer estadio larval por Ferrón *et. al.* (1969). Ellos encontraron que hubo un efecto estimulativo mutuo de éstas enfermedades con base en el incremento de las tasas de morbilidad y mortalidad, así como disminución del tiempo de desarrollo de cada enfermedad. Este sinergismo muestra la importancia del estado fisiológico del insecto para el éxito del patógeno, pues larvas debilitadas por la bacteriosis presentaron mayor mortalidad total. Se observó dentro los cadáveres de las larvas la presencia de síntomas típicos de la fungosis causada por *B. tenella* y de la enfermedad lechosa (*B. popilliae*), pero no se sabe si la micosis tuvo influencia sobre la cantidad de esporas de la bacteria por larva y sobre la sobrevivencia de las esporas dentro las mismas.

Jackson y Chinn (1993) mezclaron formulaciones granulares de conidias y micelio de *Metarhizium anisopliae* y *Serratia entomophila* para el control de *Costelytra zealandica*, logrando incrementar la mortalidad hasta 60%, superando la mortalidad causada por *Metarhizium anisopliae* (30%).

Thurston *et al.* (1993, 1994) reporta que la mortalidad de *Cyclocephala hirta* por el nematodo entomopatogénico *Heterorhabditis bacteriophora* fue favorecido cuando las larvas se infectaron con *B. popilliae*. Estos datos indican la coexistencia de estos dos patógenos dentro del hospedero y que *B. popilliae* puede ser usado como estresor de *C. hirta* para incrementar la susceptibilidad a *H. bacteriophora*.

Larvas de *Costelytra zealandica* fueron tratadas con *Metarhizium anisopliae* y la bacteria *Serratia entomophila* en combinación y encontraron que la mortalidad del



segundo estadio a los 41 días fue significativamente mayor que la suma de las mortalidades causadas por cada patógeno aplicado solo (Glare 1994)

*Choristoneura fumiferana* es susceptible a infección doble de virus; virus poliedrosis, el cual se multiplica en el núcleo de la matriz traqueal, cuerpo graso y células sanguíneas y, virus granulosis, menos virulento, que se multiplica en el citoplasma de las mismas células. La primera infección con uno de los virus interfiere con el desarrollo de la segunda infección en la misma célula, pero se encontró que células adyacentes pueden infectarse con uno u otro virus. Se encontró que cada virus aplicado individualmente causó cerca a 65% de mortalidad y aplicados juntos causaron 84 % de mortalidad de la cual 25 % fue causada por poliedrosis, 38 % por granulosis y 21 % por infección mixta (Bird 1959).

#### **b) Antagonismo.**

La mayoría de los descubrimientos de antagonismo, se relacionan con la presencia en el mismo hospedero de dos o más organismos, principalmente virus y bacterias, que carecen de un estudio de su relación o de los efectos de esas infecciones combinadas sobre las poblaciones de insectos. Estas relaciones conducen a la competencia y como consecuencia a la disminución de la mortalidad (Hurpin y Robert 1968).

Hurpin y Robert (1968) estudiaron en laboratorio la virulencia de infecciones simultáneas en *M. melolontha* de *B. popilliae* (cepa melolontha), *Rickettsiella melolonthae* y *Vagoiavirus melolonthae*. Dos de estos microorganismos se evaluaron en cada ensayo aplicados en mezcla o separadamente. Se mostró que la mortalidad total, no aumentó por la acción de dos enfermedades comparadas con una, pese a que en general hubo un desarrollo simultáneo de ambas en el mismo individuo y en ciertos casos en los

mismos tejidos. Se manifestaron fenómenos de inhibición entre la bacteria y la rickettsia mostrando que la bacteria tuvo más dificultad de atravesar la pared intestinal.

*B. mori* es susceptible a la infección cruzada de poliedrosis citoplasmática de *Dendrolimus spectabilis*, pero este virus interfiere con la acción del virus poliedrosis citoplasmática de esta especie. Se encontró que el virus de *Dendrolimus* causa 27.65 % de mortalidad, el virus de *Bombix* 64% y la aplicación combinada y simultánea 34.78% (Aruga et al. 1961; Aruga et al. 1963).

La adición de altas dosis de *Bacillus thuringiensis* fue usada en combinación con el virus poliedrosis para el control de larvas de *Trichoplusia ni* y se encontró que el virus aplicado solo ocasiona mortalidad a 252 larvas, *B. thuringiensis* a 407 y la aplicación conjunta y simultánea a 265 (Semel 1961), mostrando cierta tendencia a antagonismo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización

El ensayo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE en Turrialba, Costa Rica.

#### 3.2. Materiales experimentales

En el ensayo se usó como material de experimentación larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi* criadas en laboratorio. Para la cría se recolectaron adultos con trampas de luz, se colocaron en baldes con tierra estéril y ramas de *E. poepiggiana*, se recolectaron las posturas y se llevaron a cajas plásticas conteniendo plántulas de arroz sembradas en tierra estéril. Una vez que alcanzaron el segundo estadio se trasladaron a vasos individuales conteniendo tierra estéril y maíz germinado. Se mantuvieron en dichos vasos hasta que alcanzaron el tercer estadio (Hidalgo *et al.* 1996).

Los entomopatógenos usados fueron un aislamiento de *B. popilliae*, una cepa de origen monospórico del aislamiento P0084 *B. bassiana* y la cepa ARE-1 de *M. anisopliae* (Cuadro 2).

La metodología usada para producir el inóculo se describe en las secciones posteriores.

CUADRO 2. Origen de los entomopatógenos usados en el ensayo.

Entomopatógeno	Lugar de origen	Hospedante
<i>Beauveria bassiana</i> (P0084)	Tierra Blanca (Costa Rica )	<i>P. obsoleta</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i> (ARE-1)	Arenal (Costa Rica)	Muestra de suelo (infectó <i>Galleria mellonella</i> )
<i>Bacillus popilliae</i> (290)	Pérez Zeledón (Costa Rica)	<i>P. menetriesi</i>

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. ENSAYO I. Combinaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio (HxH L2)

##### 3.3.1.1. Producción de inóculo

Se realizó la producción de hongos en medios sólidos siguiendo la metodología de Alves (1986) modificada y adaptada.

Se prepararon las matrices en bolsas de polipropileno. Se colocó 240 g de arroz (Arroz Luisiana, 95 % de grano entero) por bolsa, se agregó agua corriente hasta cubrir el arroz y se dejó reposar por espacio de 3 h. Se escurrió el agua, se cerraron y engraparon las bolsas de polipropileno y se autoclavaron 20 min a 125°C y 3.56 kg/cm<sup>2</sup> de presión

El inóculo inicial fue obtenido de cultivos puros esporulados del hongo de 15 días de cultivo en platos petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) (DIFCO, pH. 3.5 a razón de 39

gr/l) autoclavado. El polvo de conidias fue raspado y diluido en 15 ml de suspensión acuosa 0.057 % de Tween-80 ( polyoxyethylene/20 sorbitan mono-oleato, Fisher). Se agitó dos veces la suspensión de conidias en agitador eléctrico circular (Thermolyne) durante 30 seg antes de inocular 15 ml ( $1 \times 10^7$  conidias/ml aproximadamente) en cada bolsa de polipropileno en la cámara de flujo laminar y se cerró con grapas. Se rotuló y agitó la bolsa para homogeneizar el inóculo en el arroz y se incubó a 25-27 °C durante 4 días en oscuridad total.

Cuando el micelio del hongo inoculado creció sobre el arroz, éste se vertió en bandejas plásticas desinfectadas con solución acuosa de cloro comercial (ZAZ, Compañía Blanco, Costa Rica) a razón de 2.5 % p.c. ( equivalente a 0.05 % p/v de hipoclorito de sodio) y alcohol (70%). Se tapó y se dejó durante 4 - 6 días a 24 °C hasta que esporuló. Luego se destapó parcialmente para permitir el secado de las conidias durante un periodo de dos días más.

Para separar las conidias del arroz, se habilitó un juego de cribas (50 mesh) con papel encerado en la base. Se vertió el contenido de la bandeja y se cubrió con una bolsa plástica asegurada con banda elástica. Se colocó el juego de tamices con arroz en agitador horizontal durante 15 min. Se colocó el polvo de conidias obtenido en un vaso de vidrio de 3 cm de diámetro. Se desecó en una cámara hermética (sílica) colocando el vaso parcialmente destapado durante un día. Luego se tapó y se almacenó a 4 °C en una caja plástica con sílica del en el fondo hasta el momento de realizado el ensayo. Se determinó la viabilidad de las conidias antes de iniciar el ensayo.

### **3.3.1.2. Prueba de viabilidad**

Antes de realizar los ensayos, se extrajeron 3 porciones de aproximadamente 0.008 gr de polvo de conidias previamente agitado y se diluyó cada porción en 5 ml de

suspensión acuosa 0.057% de Tween 80 en un tubo de ensayo esterilizado tapado. Se agitó 3 min y se ultrasonificó 1 min, dos veces cada tubo.

Luego se inoculó 3 platos con PDA por cada tubo, se colocó 100 µl de agua destilada estéril y 75 µl de la suspensión de conidias en la superficie del medio y se uniformizó la suspensión en la superficie del PDA. Se cerró con parafilm y se incubó a 24 °C durante 20 h.

Con el aumento 400x del microscopio de luz se contaron 100 conidias por plato y se calculó el porcentaje de germinación como el promedio de conteos de 9 platos. Producciones de conidias con porcentajes de germinación de 80 -90 % fueron consideradas aptas para ser usadas en experimentos de laboratorio.

### **3.3.1.3. Preparación de la suspensión de los hongos**

De cada tubo se extrajeron 3 muestras pesadas (aproximadamente de 0.008 g) de polvo de conidias, se suspendieron en 50 ml de solución acuosa 0.057% de Tween 80, se agitaron 3 min y ultrasonificaron 1 min dos veces, y se realizaron conteos del número de conidias para 2 alícuotas por muestra con hematocímetro 1/400 mm<sup>2</sup> (profundidad 0.1mm). Se contaron 8 cuadros pequeños de 5 cuadros grandes (40 conteos) para cada alícuota (80 conteos en total).

Se calculó el promedio por cuadro pequeño y se multiplicó por (400x10<sup>4</sup>), para obtener el número de conidios/ ml. El número de conidias por gramo en el polvo original se calculó multiplicando la concentración de conidios/ml por el volumen y dividiendo por el peso de la muestra. Después de corregir por la viabilidad de las conidias, se preparó 300 ml de suspensión a 1x10<sup>8</sup> conidias viables/ml de agua estéril destilada y solución acuosa 0.057% de Tween 80 . La suspensión fue agitada tres veces con un vortice y sujeto a dos

ciclos de 1 min en un baño ultrasonificador para separar cadenas o aglomeraciones de conidias.

#### **3.3.1.4. Preparación de larvas**

Las larvas en el segundo estadio larval, aproximadamente 8 días después de la muda, se colocaron en celdas individuales de bandejas para hacer hielo con papel filtro seco en el fondo y se las mantuvieron en ayuno durante 24 h en condiciones de laboratorio a 24°C. Transcurrido este tiempo, se eliminaron las larvas muertas, débiles o pequeñas y se destinaron aleatoriamente las larvas a los tratamientos.

#### **3.3.1.5. Inoculación de las larvas con los hongos**

Se inocularon grupos de 8 larvas mediante inmersión en 300 ml de suspensión de conidias contenido en un recipiente plástico de 13x10x5 cm. Para efectuar la inmersión se adaptó una bandeja de 12 celdas para cultivo de tejidos, abriendo hoyos en el fondo de cada celda y cubriendo con malla plástica para permitir la entrada de la suspensión cuando se sumerge la bandeja. En cada celda se colocó una larva y luego se introdujo la bandeja en el recipiente durante 30 seg, agitando la bandeja para asegurar que las larvas fueran completamente cubiertas. Durante los periodos entre la inmersión de los distintos grupos de larvas, se colocó el recipiente con la suspensión de hongo sobre un agitador magnético para asegurar que los conidios se mantuvieran en suspensión.

Después de la aplicación las larvas de todos los tratamientos fueron colocadas en una celda de bandejas de cubos de hielo con papel filtro el fondo, se cubrió la bandeja con papel absorbente humedecido y se protegió con bolsa plástica. Se dejaron en observación durante 24 h a 25 °C de temperatura en oscuridad. Se registró la mortalidad por manipuleo a las 24 h y luego se colocó cada larva viva en un vaso plástico (de 7cm de

diámetro y 10cm de altura) con tierra (tierra/bagazo en relación 3:1, esterilizada a 200 °C por 24 h) humedecida. y los vasos así preparados se protegieron en bandejas cubiertas con bolsas plásticas. Fueron guardadas durante el ensayo a 25 °C en oscuridad total. Se les suministró semanalmente, para su alimentación, semillas de maíz germinadas con raicillas.

Las larvas correspondientes a los testigos y los tratamientos b2 y m2 recibieron un baño de inmersión en una solución acuosa 0.057% de Tween 80, en una bandeja idéntica a la usada en los otros tratamientos al inicio del ensayo, para homogenizar el manipuleo de las larvas. Se colocaron las larvas individualmente en cada celda y se sumergieron durante 30 seg

Las larvas de tratamientos que recibieron la segunda aplicación de inóculo, se sacaron de los vasos plásticos individuales a los 15 días de la primera aplicación. Se colocaron en una celda de la bandeja de inmersión, se sumergieron tal como se procedió en la primera aplicación, y se observaron durante 24 h para registrar mortalidades debidas al manipuleo. Luego se colocaron nuevamente en los vasos individuales con tierra.

Para el tratamiento con aplicación simultánea, se dejó un lapso de 6 h entre la inmersión de *Beauveria bassiana* y la de *Metarhizium anisopliae*. Se sumergieron las larvas primero en la suspensión de *Beauveria bassiana*, se colocaron en celdas individuales de bandejas de hielo con papel filtro en el fondo, para evitar que las conidias de *Beauveria bassiana* fueran lavadas por la segunda inmersión y luego se procedió a la segunda inmersión con la suspensión de *Metarhizium anisopliae*.

#### **3.3.1.6. Diseño experimental**

El ensayo tuvo un diseño completamente al azar con ocho tratamientos y seis repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 8 larvas.



Mediante la aplicación de un patógeno antes o después del otro, se observó la influencia del orden de aplicación en la manifestación de síntomas y mortalidad total. Los tratamientos consistieron de la combinación de ambos patógenos aplicados uno antes que el otro y viceversa, aplicación de cada hongo solo y un testigo absoluto sin aplicación de patógeno alguno.

Los tratamientos fueron:

- 1) B1M2. Combinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Aplicación (A) de *M. anisopliae* quince días después de la de *B. bassiana*.
- 2) M1B2. Combinación de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. A de *B. bassiana* quince días después de la de *M. anisopliae*.
- 3) B1M1. A simultánea de *B. bassiana* y *M. anisopliae* al inicio del ensayo.
- 4) B1. A de *B. bassiana* al inicio del ensayo.
- 5) M1. A de *M. anisopliae* al inicio del ensayo.
- 6) B2. A de *B. bassiana* quince días después del inicio del ensayo.
- 7) M2. A de *M. anisopliae* quince días después del inicio del ensayo.
- 8) T0. Testigo absoluto, larvas sin ningún entomopatógeno pero con inmersión en solución acuosa 0.057% de Tween 80

Dentro el diseño experimental principal hubo tres diseños pequeños con arreglo factorial 2x2. Cada arreglo factorial consistió de una de las combinaciones (B1M1, B1M2 o M1B2) además de cada hongo aplicado individualmente (B1 solo y M1 solo, en el caso de la combinación B1M1) y el testigo.

### 3.3.1.7. Datos registrados

Se evaluaron las larvas cada siete días, hasta los 56 días de iniciado el ensayo, registrando la mortalidad total: número total de insectos muertos de cada tratamiento, es decir, la suma de los insectos muertos con sintomatología de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, mixta (ocasionada por ambos hongos) y asintomáticos; la mortalidad causada por cada hongo y la causada por ambos hongos en el caso de las combinaciones. Además se registraron las mortalidades a las 24h, considerando que esta mortalidad podría deberse al manipuleo de las larvas mas que al efecto de los entomopatógenos.

Se registró la evolución de los síntomas, anotando la presencia de pigmentaciones anormales, cambios en el cuerpo (forma y textura) de las larvas y cambios de comportamiento.

Para realizar el diagnóstico de la causa de la muerte de las larvas, se las incubó en su vaso individualmente, durante 3 días para permitir la expresión máxima de los síntomas. Se diagnosticó la presencia de esporulación de los dos hongos por estudio microscópico

### 3.3.1.8. Procedimientos analíticos

Las variables fueron evaluadas como los porcentajes de mortalidad indicados en las secciones anteriores expresadas como proporciones para ANDEVA.

Se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) por PROGLM con enlace logit para las variables indicadas a continuación. En caso de proporciones de 0 o 1, en lugar de calcular el logit como  $p = \ln(p/(1-p))$ , se calculó la proporción con un ajuste : cuando  $p =$

1, se igualó a  $p1 = 1 - (1/(2*n))$  y cuando  $p=0$ , se igualó a  $p1 = 1/(2*n)$  ( Barry Moser comm. pers.). Se realizaron comparaciones ortogonales entre los tratamientos de interés y para interacciones :

a) Mortalidad total acumulada entre los 1 a 56 días.

b) Mortalidad con sintomatología de infección de cada hongo y mortalidad sintomática entre 1 y 56 días.

### ANALISIS DE TIEMPOS LETALES

Se analizaron los datos de las evaluaciones semanales de mortalidad total mediante el PROC LIFEREG con transformación a distribución WEIBULL de SAS, para obtener los estimados de los tiempos letales ( $TL_{30}$  y  $TL_{50}$ ).

### **3.3.2. ENSAYO II. Combinaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio (HxHL3)**

Para este ensayo se siguieron los mismos procedimientos y métodos de análisis que para el Ensayo I, con la diferencia de que se usaron larvas de tercer estadio, la segunda aplicación de la combinación se realizó siete días después de iniciado del ensayo, y las ecuaciones continuaron hasta los 63 días. La reducción del lapso de tiempo entre la primera y la segunda aplicación se basa en la observación de que la cepa de *Beauveria bassiana* actuó muy rápido en el Ensayo I, resultando que muchas larvas del tratamiento B1M2 murieron antes de poder hacer la aplicación de *Metarhizium anisopliae*.

### **3.3.3. ENSAYO III. Combinación de *Bacillus popilliae* con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio (HxBL3)**

#### **3.3.3.1. Preparación la suspensión de esporas de *B. popilliae***

Para preparar la primera suspensión se usó inóculo conservado como hemolinfa secada al aire en portaobjetos. La hemolinfa había sido extraída de una sola larva de *P. menetriesi* el 23 de noviembre de 1994 y almacenada a temperatura del laboratorio (aprox. 24°C). El inóculo fue removido con agua destilada estéril, la suspensión obtenida se colocó en tubos de centrifuga estériles. Las esporas fueron centrifugadas de la suspensión a 2.7 krpm durante 10 min. y se extrajo el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta estéril. Las esporas se resuspendieron y se lavaron nuevamente en agua destilada estéril tres veces (St. Julian y Hall 1968). Se obtuvo una suspensión concentrada de aproximadamente  $1 \times 10^9$  esporas/ml

#### **3.3.3.2. Preparación de la dosis**

La suspensión concentrada se sometió a un tratamiento de calor a 70°C durante 10 min para eliminar microorganismos contaminantes. Milner (1981) y St Julian y Hall (1968) reportan que el tratamiento de calor tienen el efecto de aumentar la infectividad de las esporas. Se siguió la metodología para preparar y ajustar la densidad de la suspensión de esporas para inoculación sugerida por Dutky (1942).

Se extrajo con una micropipeta 10 µl de la suspensión concentrada y se diluyó en 1 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó con agitador eléctrico circular. Se separó una alícuota de la suspensión muestra y se llenó el hematocímetro de conteo de bacterias de 1/50 mm de profundidad. Con un aumento 400x se contó el número de esporas en 5

cuadros grandes (8 cuadros pequeños por cuadro grande) de cada lado del hematocímetro, contando un total de 40 cuadros pequeños/ alicuota.

El número de esporas de 8 cuadros pequeños de 5 cuadros grandes (40 conteos) de 3 gotas de la suspensión muestra (repeticiones) se promediaron y se multiplicaron por  $(400 \times 10^4)$  para obtener el número de esporas/ ml de la suspensión concentrada.

La dosis por larva fue de  $2 \times 10^6$  esporas en 10  $\mu$ l de suspensión acuosa.

### **3.3.3.3. Preparación de larvas.**

Se usaron larvas de tercer estadio (2 semanas después de la muda). El manejo pre-dosificación fue similar al descrito en la sección 3.3.1.4.

### **3.3.3.4. Inoculación de larvas**

La metodología de aplicación de los hongos fue descrita anteriormente en la sección 3.3.1.5.

Para dosificar *B. popilliae* se suministró un cilindro pequeño (sacabocados nº 4) de 0.5 cm de espesor de dieta para *Helicoverpa zea* modificada (Cuadro 2) a cada larva que previamente fue inoculada con una gota superficial de 10  $\mu$ l de suspensión de esporas de *B. popilliae*. Posteriormente las larvas permanecieron en las celdas individuales de bandejas para hacer hielo durante 24 hrs con la de dieta dosificado. Se usaron solo las larvas que consumieron el total de la dieta.

Una vez transcurridas las 24 hrs, las larvas se pasaron a vasos plásticos de 7 cm de diámetro y 10 cm de altura conteniendo tierra estéril humedecida y un grano de maíz germinado como alimento, el mismo que se cambió cada 15 días.

Las larvas correspondientes a los testigos recibieron la dieta sin dosificar, en el mismo periodo en que la recibieron las larvas que se dosificaron.

Las larvas correspondientes a los tratamientos que requieren la aplicación de hongos, fueron sacadas de los vasos individuales con tierra y se sometieron a inmersión y manejo similar al detallado en la sección 3.3.1.5.

CUADRO 3. Ingredientes de la dieta utilizada para suministrar inóculo de *B. popilliae* a larvas de *P. menetriesi*. La dieta esta basada la de Leppla, Vail y Rye, 1979.

MATERIALES	CANTIDAD
Agua	2 litros
Frijol rojo	145 g
Agar	35 g

#### 3.3.3.5. Diseño experimental.

El ensayo tuvo un diseño completamente al azar con seis tratamientos y seis repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 8 larvas.

Los tratamientos fueron:

- 1) M2 Aplicación de *M anisopliae* 15 días después de iniciado el ensayo.
- 2) B2. Aplicación de *B. bassiana* 15 días después de iniciado el ensayo.
- 3) BP1. Dosificación de *B. popilliae* al inicio del ensayo.
- 4) BP1M2. Combinación de *B. popilliae* y *M anisopliae*, dosificando *B. popilliae* al inicio del ensayo y 15 días después aplicando *M anisopliae*.
- 5) BP1B2 Combinación de *B. popilliae* y *B. bassiana*, dosificando *B. popilliae* al inicio del ensayo y 15 días después aplicando *B. bassiana*.
- 6) T0. Testigo, larvas sin aplicación de entomopatógenos pero alimentadas con la dieta y sumergidas en solución acuosa 0.057% de Tween 80.

Dentro del diseño principal hubo dos arreglos factoriales 2x2. Cada arreglo factorial consistió de una de las combinaciones (BP1M2 o BP1B1) más los tratamientos de hongo solo, *B. popilliae* solo (*B. popilliae*1) y el testigo(T0).

#### **3.3.3.6. Datos registrados**

Se evaluaron las larvas a las 24h, y cada siete días a partir del primer día , registrando la mortalidad total: número total de insectos muertos de cada tratamiento, es decir, la suma de los insectos muertos con sintomatología de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, mixta (ocasionada por *B. popilliae* y el hongo) y asintomáticos; las mortalidades causadas por cada patógeno (en los tratamientos donde se aplicaron individualmente) y la mortalidad causada por ambos patógenos en el caso de las combinaciones. Se registraron las mortalidades hasta los 60 días de iniciado el ensayo.

Se registró la evolución de los síntomas, anotando la presencia de cambios en el color de la hemolinfa, pigmentaciones anormales, cambios en el cuerpo (forma y textura) y cambios de comportamiento.

Para realizar el diagnóstico de la causa de la muerte por fungosis, las larvas se las incubaron en su vaso individualmente durante 3 días, para permitir la expresión máxima de los síntomas. Se diagnosticó la presencia de esporulación de los dos hongos por estudio microscópico.

Para el caso de *B. popilliae*, se extrajeron muestras semanales de hemolinfa de 10 larvas (dosificadas y criadas para éste fin). La muestra se obtuvo realizando una punción en el área cefálica, extrayendo una gota que se observó con ayuda del microscopio de contraste de fases para detectar la presencia de cuerpos vegetativos o esporas.

#### **3.3.3.7. Procedimientos analíticos**

Los procedimientos analíticos son similares que para los anteriores ensayos.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayo de combinaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio.

#### 4.1.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología

Los tratamientos que presentaron mayores mortalidades fueron los que llevaban la aplicación inicial de *B. bassiana*: *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicados el mismo día (b1m1), *B. bassiana* aplicado al inicio del ensayo (b1), y *B. bassiana* aplicado 15 días antes que *M. anisopliae* (b1m2) (Cuadro 4). Del resto de los tratamientos solo los que recibieron la segunda aplicación de *B. bassiana* (m1b2 y b2) llegaron al 30% de mortalidad durante el periodo de evaluación. La mortalidad del testigo fue menor al 10%.

El análisis de varianza de las mortalidades totales (transformadas a logit) al final del ensayo (56 días) indicó que hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Ftrat = 55.35 p= 0.0001)

CUADRO 4. Mortalidad total media de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* (gl=28,  $\alpha=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 56 días después de la primera aplicación.

Tratamiento <sup>1</sup>	Mortalidad media	
	%	logit <sup>2</sup>
b1m1	95.0	2.35 a
b1	96.0	2.26 a
b1m2	92.1	2.07 a
m1b2	47.5	-0.13 b
b2	30.8	-0.91 bc
m1	18.9	-1.58 cd
T0	7.5	-2.25 d
m2	0.0	-2.67 d

<sup>1</sup>b1m1 = *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicados el mismo día  
b1m2 = *B. bassiana* aplicado 15 días antes que *M. anisopliae*

b1 = *B. bassiana* aplicado al inicio del ensayo.  
T0 = testigo

m1=*M. anisopliae* aplicado al inicio del ensayo      m1b2=*M. anisopliae* aplicado 15 días antes que *B. bassiana*  
b2=*B. bassiana* aplicado 15 días después del inicio del ensayo      m2=*M. anisopliae* aplicado 15 días después del inicio  
<sup>2</sup> Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según la prueba de Tukey (gl=28; p<0.05%)

### **Desarrollo de las enfermedades ( 1 a 56 días de la primera aplicación)**

Las curvas de progreso de mortalidad de cada tratamiento en el tiempo (Figura 1) muestran que los tratamientos con aplicación inicial de *B. bassiana* alcanzan niveles superiores de desarrollo que los que no la recibieron. Los tratamientos prominentes alcanzan el pico de mortalidad (> 90 %) a los 28 días aproximadamente. La curva de m1b2 alcanza su pico (47.5 %) a los 56 días. Las curvas de los demás tratamientos no sobrepasan el 30% de mortalidad.

Las sintomatologías asociadas a mortalidad en cada tratamiento se muestran en la Figura 2. Sobresale la proporción mayoritaria de larvas con síntomas de *B. bassiana* en los tratamientos que recibieron la primera aplicación de éste hongo. En tratamientos que recibieron la segunda aplicación de *B. bassiana* la proporción de larvas con síntomas de infección por este hongo es menor. La todas las larvas que desarrollaron síntomas de infección por *M. anisopliae* corresponden a los tratamientos que recibieron la primera aplicación de este hongo. En todos los tratamientos se presentaron larvas que murieron sin síntomas claros de infección por hongo (asintomáticas).

La segunda aplicación de *M. anisopliae* (m2) no causó ninguna mortalidad y, cuando se aplicó después de *B. bassiana* (b1m2) tampoco hubo mortalidad atribuible a *M. anisopliae* (Cuadro 4 y Figura 2). Cuando se aplicó *M. anisopliae* primero (m1) no se alcanzó el nivel de mortalidad obtenido para esta cepa en trabajos anteriores (Shannon comm. pers.) Posiblemente en este ensayo existió alguna diferencia en las condiciones de prueba. Pero no es posible determinar si esto se debe al estado de las larvas, las condiciones abióticas en que se realizó el ensayo, o una pérdida de virulencia del inóculo del hongo.

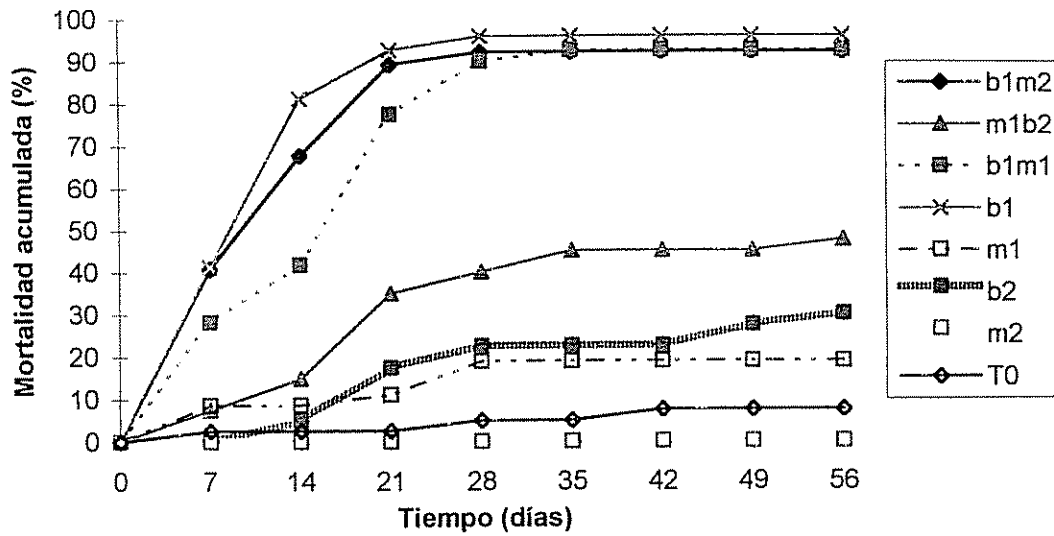


FIGURA 1. Mortalidad total acumulada (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) al inicio del ensayo (b1, m1), 15 días después (b2, m2) y, aplicaciones combinadas *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (b1m2), *B. bassiana* aplicado 15 días después de *M. anisopliae* (m1b2) y ambos aplicados el mismo día (b1m1).

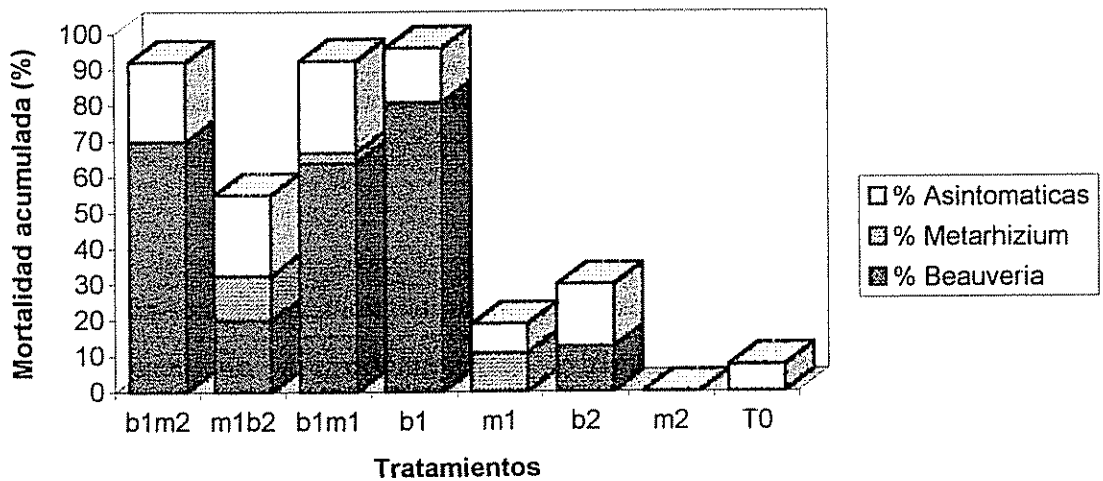


FIGURA 2. Sintomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* después de la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1), individual al inicio del ensayo (b1 y m1), 15 días después (b2 y m2), y combinada (b1m2, m1b2 y b1m1). Mortalidad 56 días después de la primera aplicación.

## Tiempos letales (TL30 y TL50)

Los tiempos estimados para matar al 50 % (TL<sub>50</sub>) de las larvas de *P. menetriesi* de segundo estadio se muestran en el Cuadro 5.

Los menores TL<sub>50</sub> corresponden a los tratamientos que recibieron una primera aplicación de *B. bassiana*, así mismo junto con el tratamiento m1b2, fueron los únicos tratamientos que alcanzan este nivel de mortalidad durante el periodo de evaluación lo presentan.

CUADRO 5. Comparaciones entre tratamientos seleccionados<sup>1</sup> para el tiempo de mortalidad del 50% (TL<sub>50</sub>) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi*.

Tratamiento	TL <sub>50</sub> (días) <sup>2</sup>	Límites de Confianza a 90 %	
		inferior	superior
b1	9.86	7.80	11.92
b1m2	15.60	12.88	18.32
b1m1	17.36	14.69	20.03
m1b2	23.03	11.46	34.60

<sup>1</sup> No se presentan valores de TL<sub>50</sub> para tratamientos b2, m1, m2 y testigo porque la mortalidad no llegó a 50% durante el periodo del experimento.

<sup>2</sup> TL<sub>50</sub> para tratamientos según SAS Proc LIFEREG con distribution = Weibull

Se observa menor TL<sub>50</sub> cuando se aplicó *B. bassiana* individualmente al inicio del ensayo que cuando se aplicó combinado con *M. anisopliae* (b1m2 y b1m1). Cuando se aplicaron los dos hongos durante el mismo día el TL<sub>50</sub> aumentó más que cuando se aplicó *M. anisopliae* 15 días después. Parece que, bajo las condiciones del ensayo, *M. anisopliae* redujo la tasa de mortalidad de *B. bassiana* y que este efecto fue mayor cuando los dos hongos se aplicaron el mismo día.

CUADRO 6. Comparaciones entre tratamientos seleccionados<sup>1</sup> para el tiempo a 30% de mortalidad de larvas de *P. menetriesi* L2 (TL<sub>30</sub>).

Tratamiento	TL <sub>30</sub> (días) <sup>2</sup>	Limites de Confianza a 95%	
		inferior	superior
b1	8.12	6.74	9.50
b1m2	10.30	8.47	12.13
b1m1	11.16	9.37	12.94
m1b2	40.46	33.03	47.89
b2 <sup>3</sup>	54.52	44.41	64.63
m1 <sup>3</sup>	94.01	69.02	119.00
Testigo <sup>3</sup>	183.43	112.67	254.19

<sup>1</sup> Valor de TL<sub>30</sub> para m2 no se presenta porque no hubo mortalidad durante el periodo del experimento

<sup>2</sup> TL<sub>50</sub> para tratamientos según SAS Proc LIFEREG con distribution = Weibull

<sup>3</sup> Extrapolación fuera del periodo de evaluación del experimento

Debido a la menor mortalidad total, el TL<sub>30</sub> es un mejor estimador de la tasa de mortalidad en los demás tratamientos. Todos los tratamientos de *M. anisopliae* combinado con *B. bassiana* dieron mayores tasas de mortalidad que *M. anisopliae* solo. A diferencia que lo discutido anteriormente, la aplicación de *M. anisopliae* antes de *B. bassiana* no causó una reducción de la tasa de mortalidad de *B. bassiana*, más bien hubo una reducción del TL<sub>30</sub> en el tratamiento m1b2 comparado con b2 aplicado solo. Sin embargo la diferencia no fue significativa.

#### 4.1.2. Efecto de la aplicación previa de un hongo sobre la mortalidad causada por una segunda aplicación del otro hongo

##### Aplicación de *M. anisopliae* previo a *B. bassiana*

Los análisis presentado aquí y en las secciones 4.1.3 y 4.1.4 se basan en la mortalidad acumulada durante el periodo de evaluación del ensayo. Por lo tanto representan la máxima expresión de enfermedad registrado durante este periodo.

CUADRO 7. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación previa (15 días antes) o no de *M. anisopliae* (ARE-1) a la de *B. bassiana* (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
m1b2	40	47.5	12.5	17.5	17.5
b2	40	30.0	15.0	0.0	15.0
F logit		4.48 *	0.06 ns	15.89 **	0.01 ns

n=número total de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns = no significativa a  $p \leq 0.05$

No hubo diferencia significativa de la mortalidad debida a *B. bassiana* entre larvas que habían sido previamente aplicadas con *M. anisopliae* y las que recibieron solamente una aplicación de agua destilada estéril y Tween 80 (ADET) (Cuadro 7). Tampoco hubo ningún aumento significativo de la mortalidad sin síntomas visibles de infección por hongo (asintomáticas). Se evidenció que esta sintomatología se debe principalmente al efecto de *B. bassiana* (Cuadro 8) cuando larvas aplicadas con *B. bassiana* al inicio del ensayo (b1) mostraron diferencias altamente significativas de mortalidad asintomática con respecto a las que no la recibieron.

CUADRO 8. Mortalidad asintomática en tratamientos con y sin aplicación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1-56 días).

Contraste de Tratamientos	Mortalidad				F para logit <sup>1</sup>
	con		sin		
	%	logit	%	logit	
con b1 vs sin b1	23.6	-1.29	9.8	-2.09	11.18**
con b2 vs sin b2	16.7	-1.67	14.4	-1.83	0.37ns
con m1 vs sin m1	19.6	-1.55	12.2	-1.93	0.91ns
con m2 vs sin m2	11.1	-2.03	16.2	-1.71	1.44ns

<sup>1</sup> Significancia de F: \*\* =  $p \leq 0.01$ ; ns = no significativa

Incluyendo todas las causas de mortalidad, hubo un aumento significativo de la mortalidad debido a la aplicación previa de *M. anisopliae* debido a la acción de este hongo. Se concluye que en este ensayo *M. anisopliae* no incrementó la susceptibilidad de las larvas de segundo estadio a una segunda exposición de *B. bassiana*.

#### Aplicación de *B. bassiana* previo a *M. anisopliae*

CUADRO 9. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación previa (15 días antes) o no de *B. bassiana* (P0084) a la de *M. anisopliae* (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
b1m2	34	92.1	69.9	0.0	22.2
m2	39	0.0	0.0	0.0	0.0
F logit		140.01**	45.34**	1.12 ns	7.76 **

n = número total de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns = no significativa a  $p \leq 0.05$

La diferencia de mortalidad total entre las larvas aplicadas previamente con *B. bassiana* y las que recibieron ADET fue altamente significativa, pero se puede atribuir totalmente a la infección de *B. bassiana* y mortalidad sintomática, que como se muestra en el Cuadro 9, es debida principalmente al efecto de este mismo hongo.

Como se observa en la Figura 1, mucha de esta mortalidad ocurrió antes de hacer la segunda aplicación de *M. anisopliae*. Como no se obtuvo mortalidad por *M. anisopliae* cuando fue aplicado individualmente ni cuando se aplicó previamente *B. bassiana*, se puede afirmar que la aplicación de *B. bassiana* no susceptibiliza a las larvas de segundo estadio a una segunda aplicación de *M. anisopliae*.

En resumen ninguno de los dos hongos aplicado previamente al otro susceptibilizó a una segunda aplicación del otro hongo.

### 4.1.3. Efecto de la aplicación simultánea de los dos hongos

#### Aplicación simultánea comparada con la aplicación simple de *B. bassiana*

No hubo diferencia significativa de mortalidad debida a *B. bassiana* entre larvas que fueron aplicadas con los dos hongos el mismo día y larvas que recibieron la aplicación simple de *B. bassiana*. Tampoco hubo aumento significativo en la mortalidad sintomática, pero se observa un ligero aumento numérico.

La mortalidad total debida a la aplicación combinada de *B. bassiana* y *M. anisopliae* durante el mismo día (b1m1) es similar a la mortalidad total causada por la aplicación individual de *B. bassiana*. A pesar de esto, es interesante observar que, cuando se aplicó *M. anisopliae*, hubo una reducción de mortalidad con síntomas de *B. bassiana* y un aumento correspondiente a la mortalidad sintomática (que se atribuye también a *B. bassiana*). Aunque las diferencias no fueron significativas, quizás esta sea una indicación de algún efecto de antibiosis de *M. anisopliae* sobre *B. bassiana*.

CUADRO 10. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación simultánea de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) comparada con la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
b1m1	39	95.0	58.9	2.8	33.2
b1	31	96.0	80.7	0.0	15.2
F logit		0.06 ns	3.44 ns	0.14 ns	3.16 ns

n = número total de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns = no significativo a  $p \leq 0.05$



## Aplicación simultánea comparada con la aplicación simple de *M. anisopliae*

CUADRO 11. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación simultánea de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) comparada con la aplicación individual de *M. anisopliae* (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
b1m1	39	95.0	58.9	2.8	33.2
m1	38	18.9	0.0	10.7	8.2
F logit		96.31**	33.07**	3.62 ns	8.6**

n = número total de insectos evaluados \*\* = significativo a  $p \leq 0.01$  \* = significativo a  $p \leq 0.05$  ns = no significativo a  $p \leq 0.05$

Se observaron diferencias significativas altas de la mortalidad total entre la aplicación combinada de los dos hongos el mismo día y la aplicación individual de *M. anisopliae*, que se debe principalmente a la acción *B. bassiana* y mortalidad sintomática que, como se observó anteriormente se puede asumir es debida al efecto de *B. bassiana*.

Sin embargo no hubo incremento de la mortalidad por *M. anisopliae* en la combinación, mas bien se mostró una ligera disminución, tal vez por la rápida tasa de desarrollo de *B. bassiana* que no permite a *M. anisopliae* causar mayor mortalidad.

En resumen, la mortalidad debida a la aplicación combinada de los dos hongos el mismo día, se debe en su mayoría a la acción de *B. bassiana*, y es superior a la acción de *M. anisopliae* aplicado solo.

#### 4.1.4. Efecto de una aplicación subsecuente de un hongo sobre la mortalidad causada por la aplicación de otro hongo

##### Aplicación subsecuente de *M. anisopliae*

Se observa una ligera disminución no significativa de la mortalidad con síntomas de *B. bassiana* por la aplicación subsecuente de *M. anisopliae*. Al igual que en el caso de la aplicación simultánea de estos hongos, se observa un aumento (no significativo) de la mortalidad sintomática. Se comentó que esto podría deberse a un efecto de antibiosis de *M. anisopliae* sobre *B. bassiana*.

CUADRO 12 Porcentaje promedio de mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación subsecuente de *M. anisopliae* (ARE-1) a la de *B. bassiana* (P0084) comparada con la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
b1m2	34	92.1	69.9	0.0	22.2
b1	31	96.0	80.7	0.0	15.2
F logit		0.22 ns	0.85 ns	0.01 ns	0.34 ns

n = número total de insectos evaluados \*\* = significativo a  $p \leq 0.01$  \* = significativo a  $p \leq 0.05$  ns = no significativo a  $p \leq 0.05$

Tomando en cuenta la totalidad de los síntomas, la mortalidad es casi idéntica en los dos tratamientos indicando que la segunda aplicación de *M. anisopliae* no cambió la mortalidad debido a la primera aplicación de *B. bassiana*

## Aplicación subsecuente de *B. bassiana*

CUADRO 13. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación subsecuente de *B. bassiana* (P0084) a la de *M. anisopliae* (ARE-1) a comparada con la aplicación individual de *M. anisopliae* (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 56 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
m1b2	40	47.5	12.5	17.5	17.5
m1	38	18.9	0.0	10.7	8.2
F logit		2.24 ns	2.47 ns	6.69 *	0.85 ns

n = número total de insectos evaluados \*\*=significancia a  $p \leq 0.01$  \*=significancia a  $p \leq 0.05$  ns=no significativa a  $p \leq 0.05$

Se observa un aumento significativo de 6.8% de la mortalidad por *M. anisopliae* debida a la aplicación posterior de *B. bassiana*, mostrando que la aplicación subsecuente de *B. bassiana* favoreció la manifestación de mortalidad por *M. anisopliae*.

En resumen el desarrollo de *B. bassiana* tiende a disminuir por la aplicación subsecuente de *M. anisopliae*. La aplicación posterior de *B. bassiana* favoreció en la manifestación de la mortalidad por *M. anisopliae*.

### 4.1.5. Mortalidad durante las 24 h

Durante la ejecución del ensayo, se tomó en cuenta la posibilidad de que algunas larvas murieran por el manipuleo durante la aplicación de los tratamientos. Se iba a excluir esta causa de mortalidad de los análisis, pero se encontró que había mayor nivel de mortalidad que la esperada en algunos tratamientos. Por lo tanto se analizaron estos datos para determinar si existían diferencias entre los tratamientos que llevaban la aplicación inicial de *B. bassiana* (b1, b1m2) o *M. anisopliae* (m1, m1b2)

La mortalidad durante las 24 horas siguientes a la primera aplicación de *B. bassiana* (P0084) presentó diferencias altamente significativas ( $p=0.0001$ ) con los que no fueron inoculados con hongo, pero fueron sometidos al baño de inmersión con ADET (Cuadro 13). Este hecho podría deberse a la acción de toxinas que algunas cepas de *B. bassiana* producen, que al ser ingeridas matan, no permitiendo el desarrollo y la expresión del patógeno.

Alternativamente podría deberse a una respuesta letal de la larva a los procesos normales durante la infección simultánea de una cantidad anormal de inóculo de hongo. Esta observación se apoya en el hecho de que algunas larvas que murieron en las 24 h posteriormente desarrollaron síntomas típicos de la micosis por *B. bassiana*.

En el caso de la mortalidad 24 h después de la aplicación de *M. anisopliae* el grupo de tratamientos que se inoculó con éste hongo, también mostró diferencia significativa con respecto al grupo que no lo recibió. No se observó desarrollo posterior de síntomas de micosis por *M. anisopliae*.

CUADRO 14. Mortalidad a las 24 h después de la aplicación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio de *Phyllophaga menetriesi*

Contraste de tratamientos	n	Mortalidad				F <sup>1</sup>
		con hongo		sin hongo		
		%	logit	%	logit	
Con bI vs testigo	57	8.7	-1.76	0.8	-6.3	26.7**
Con mI vs testigo	78	2.5	-5.73	0.8	-6.3	4.8 *

<sup>1</sup> Significancia de F : \*\*= $p \leq 0.01$  \*  $p \leq 0.05$

#### 4.1.6. Interacciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio de *P. menetriesi*

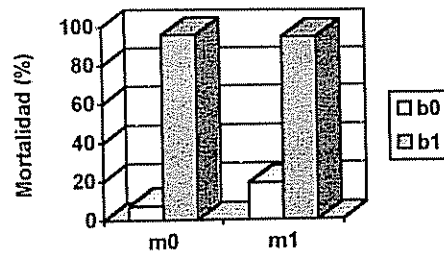
No hubo interacción significativa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae* en cuanto a la mortalidad total ni cuando se aplicaron el mismo día, ni cuando un hongo se aplica antes que el otro (Figura 3).

Se concluye que existió independencia en la acción de cada hongo en su capacidad de causar enfermedad y que no hubo evidencia de sinergismo o antagonismo entre ellos al terminar el periodo de evaluación. Lo mismo ocurrió en cuanto a la mortalidad asociada con síntomas de infección por *B. bassiana* (Figura 4); aunque hubo tendencia a bajar la incidencia de síntomas cuando se aplicó *M. anisopliae*, ningún valor de F para interacción resultó significativo.

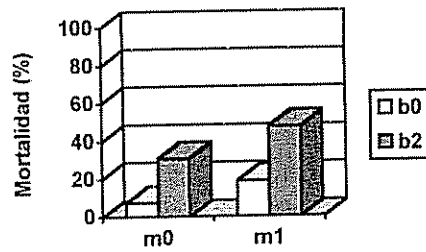
A diferencia de lo anterior, *B. bassiana* antagonizó la expresión de *M. anisopliae* cuando los dos hongos se aplicaron el mismo día (Figura 5a). Aunque el efecto fue pequeño, la interacción fue significativa, parece probable que esta disminución se debe a la rápida tasa de desarrollo de mortalidad por *B. bassiana* que podría reducir la oportunidad de *M. anisopliae* para manifestarse. Sin embargo cuando *M. anisopliae* se aplicó antes que *B. bassiana*, se incrementó la manifestación de síntomas de *M. anisopliae*, aunque la interacción en este caso no fue significativa (Figura 5b).

No hubo evidencia de sinergismo o antagonismo de los hongos en cuanto a la mortalidad sintomática (todos los valores de F para las interacciones carecen de importancia) (Figura 6) y como se vió en la sección 4.1.2 esta sintomatología es evidentemente debida a *B. bassiana*.

a)



b)



c)

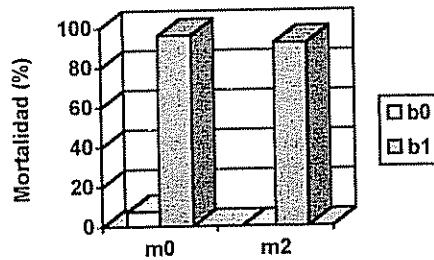
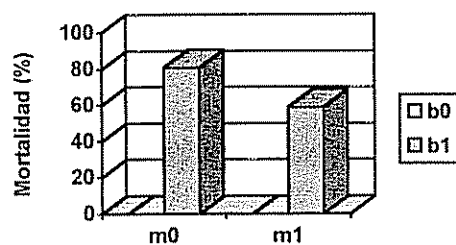
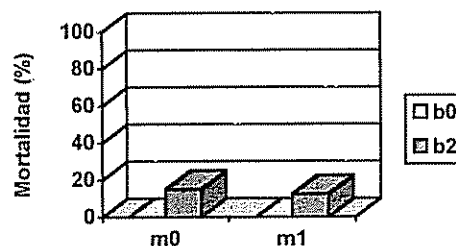


FIGURA 3. Mortalidad (1 a 56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación simple y combinada de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int = 1.04; p = 0.31) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.04; p = 0.83) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 0.18 ; p = 0.67)

a)



b)



c)

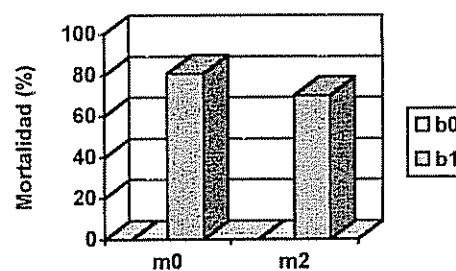
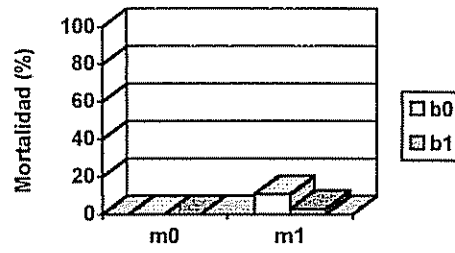
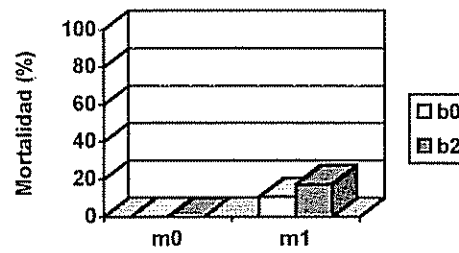


FIGURA 4. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int = 1.95;  $p = 0.17$ ) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.11 ;  $p = 0.74$ ) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 0.490;  $p = 0.49$ ).

a)



b)



c)

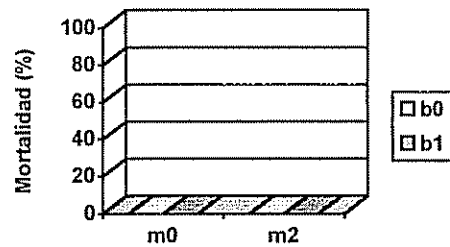
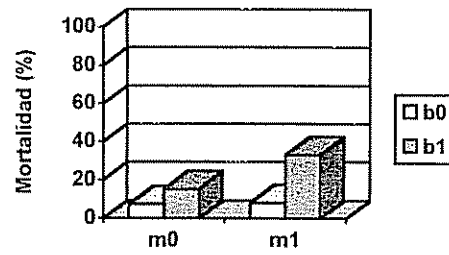


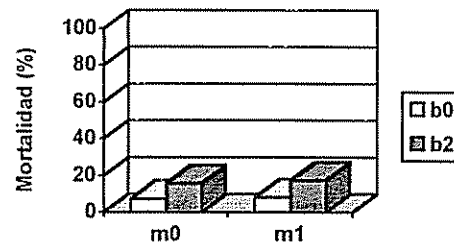
FIGURA 5. Mortalidad debida a *M. anisopliae* (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int =4.21; p =0.049) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0.66; p =0.42) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (1-60 DDA) (F logit int = 0 ; p =0.99).



a)



b)



c)

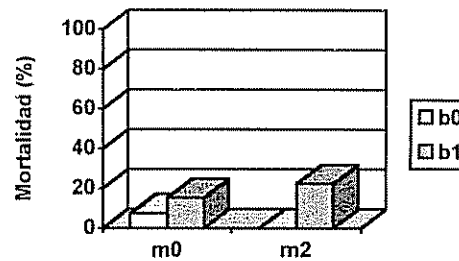


FIGURA 6. Mortalidad asintomática (1-56 DDA) de larvas de segundo estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día (Flogit int = 1.36;  $p = 0.25$ ) b) *B. bassiana* aplicada 15 días después de *M. anisopliae* (Flogit int = 0;  $p = 0.98$ ) c) *M. anisopliae* aplicado 15 días después de *B. bassiana* (Flogit int = 1.13;  $p = 0.29$ ).

## 4.2. Ensayo II. combinaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio.

### 4.2.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología .

Aunque el análisis de varianza de las mortalidades totales (transformadas a logit) al final del ensayo (56 días) indicó que hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Ftrat = 6.27 p=0.0002), no hubo tendencia clara en cuanto a los que fueron o no diferentes del testigo (aplicados con ADET).

Solamente los tratamientos m1b2, b1 y b1m2 tuvieron mayor mortalidad que el testigo al final del periodo de evaluación. Ninguno de los tratamientos con solo *M. anisopliae* (m1 y m2) resultaron con mortalidades diferentes al testigo, otra vez el desempeño fue inferior al esperado (comentado antes con larvas de segundo estadio).

CUADRO 15. Mortalidad total media de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* (gl=28,  $\alpha=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 63 días después de la primera aplicación.

Tratamiento <sup>1</sup>	Mortalidad media	
	%	logit <sup>2</sup>
m1b2	55.0	0.21 a
b1	52.5	0.11 ab
b1m2	42.5	-0.37 abc
b2	40.5	-0.54 abcd
b1m1	15.0	-1.79 bcd
m2	10.0	-2.06 cd
T0	10.0	-2.16 cd
m1	5.0	-2.38 d

<sup>1</sup>b1m1 = *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicados el mismo día  
b1m2 = *B. bassiana* aplicado 15 días antes que *M. anisopliae*  
m1b2 = *M. anisopliae* aplicado 15 días antes que *B. bassiana*  
b2 = *B. bassiana* aplicado 15 días después del inicio del ensayo  
m2 = *M. anisopliae* aplicado 15 días después de iniciado el ensayo

b1 = *B. bassiana* aplicado al inicio del ensayo  
m1 = *M. anisopliae* aplicado al inicio del ensayo  
T0 = testigo.

<sup>2</sup>Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre si según la prueba de Tukey (gl=28; p< 0.05%)

## Desarrollo de las enfermedades (1-63 días después de la primera aplicación)

Las curvas de progreso de mortalidad de cada tratamiento en el tiempo (Figura 7) muestran que, excepto el tratamiento b1m1, el desarrollo de los tratamientos que llevan *B. bassiana*, aplicado al inicio o siete días después son similares y alcanzan mayores niveles de mortalidad más rápidamente que los demás. Estos tratamientos alcanzan el pico de mortalidad (< 55 %) entre los 49 a 63 días. *M. anisopliae* (m2) comienza a causar mortalidad recién a los 42 días y junto al tratamiento b1m1 no sobrepasan el 20 % de mortalidad. Aunque la mortalidad final del tratamiento b1 fué ligeramente inferior a la del tratamiento m1b2, el tratamiento b1 tuvo un aumento marcadamente más rápido que los demás tratamientos durante los primeros 35 días del ensayo

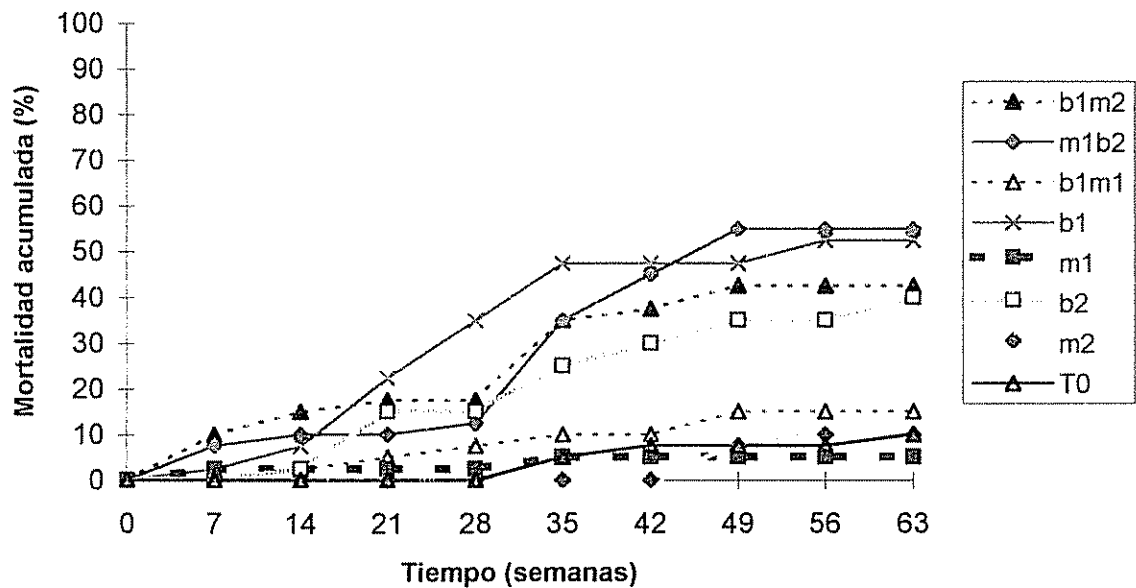


FIGURA 7. Mortalidad total acumulada (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) al inicio del ensayo (b1, m1), 7 días después (b2, m2) y, aplicaciones combinadas: *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* (b1m2), *B. bassiana* aplicado 7 días después de *M. anisopliae* (m1b2) y ambos aplicados el mismo día (b1m1).

Las sintomatologías asociadas a la mortalidad en cada tratamiento se muestran en la Figura 8. La mayor causa de mortalidad de las aplicaciones combinadas es *B. bassiana*, la presencia de muertes asintomáticas se registró en todos los tratamientos.

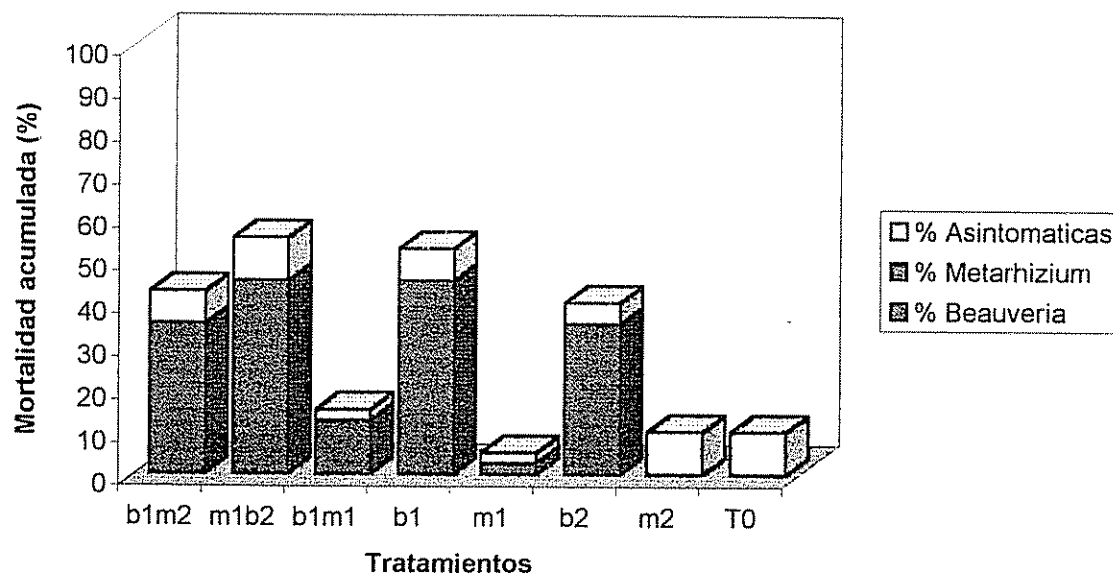


FIGURA 8. Sintomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriasi* después de la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) individual al inicio del ensayo (b1 y m1), 7 días después de iniciado el ensayo (b2 y m2) y combinada (b1m2, m1b2 y b1m1). Mortalidad a los 63 días después de la primera aplicación.

#### Tiempos letales ( $TL_{30}$ y $TL_{50}$ )

Debido a la baja mortalidad final en el experimento, se presentan solamente los estimados del  $TL_{30}$  para este ensayo (Cuadro 16)

CUADRO 16. Comparaciones entre tratamientos seleccionados<sup>1</sup> para el tiempo de mortalidad del 30% (TL<sub>30</sub>) de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga menetriesi*.

Tratamiento	TL <sub>30</sub> (días) <sup>2</sup>	Límites de Confianza a 95 %	
		inferior	superior
m1b2	41.32	31.80	50.83
b1	43.47	33.20	53.73
b1m2	47.81	36.43	59.18
b2	58.60	44.05	73.14
b1m1 <sup>3</sup>	123.37	82.19	164.55
T0 <sup>3</sup>	164.46	100.62	228.21
m2 <sup>3</sup>	172.21	105.14	239.28

<sup>1</sup> No se presentan valores de TL<sub>30</sub> para el tratamiento m1 porque la mortalidad llegó ni al 10 %

<sup>2</sup> TL<sub>30</sub> para tratamientos según SAS Proc LIFEREG con distribution=Weibull

<sup>3</sup> Extrapolación fuera del periodo de evaluación del experimento

Las aplicaciones individuales de *B. bassiana* (b1 y b2) junto a las combinaciones de ambos hongos dieron tasas de mortalidad similares, sin embargo, la combinación de ambos hongos el mismo día (b1m1) mostró un incremento significativo en el tiempo TL<sub>30</sub>, indicando que, bajo las condiciones del experimento *M. anisopliae* redujo la tasa de mortalidad de *B. bassiana*. El desarrollo inicial más rápido de la mortalidad en el tratamiento b1 no fue reflejado en éste análisis.

#### 4.2.2. Efecto de aplicación previa de un hongo sobre la mortalidad causada por una segunda aplicación del otro hongo.

##### Aplicación de *M. anisopliae* previo a *B. bassiana*

Los análisis presentados aquí y en las secciones 4.2.3 y 4.2.4 se basan en la mortalidad acumulada durante el periodo de evaluación del ensayo. Representando la expresión máxima de las enfermedades registrada en este periodo.

CUADRO 17. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación previa (7 días antes) o no de *M. anisopliae* (ARE-1) a la de *B. bassiana* (P0084). Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
m1b2	40	55.0	45.0	0.0	10.0
b2	40	40.0	35.0	0.0	5.0
F logit		1.5 ns	1.2 ns	2.0 ns	0.4 ns

n=número de insectos evaluados \*\*= significancia a  $p \leq 0.01$  \*= significancia a  $p \leq 0.05$  ns= no significativo a  $p \leq 0.05$

A pesar de un pequeño incremento numérico, no hubo aumento significativo de la mortalidad debida a *B. bassiana* entre larvas que habían sido previamente aplicadas con *M. anisopliae* y las que recibieron solamente una aplicación de ADET (Cuadro 17). Tampoco hubo incremento significativo de la mortalidad total debido a la aplicación previa de *M. anisopliae*. Se concluyen que *M. anisopliae* no incrementa la susceptibilidad de larvas de tercer estadio a una segunda aplicación de *B. bassiana*.

### Aplicación de *B. bassiana* previo a *M. anisopliae*

CUADRO 18. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación previa (7 días antes) o no de *B. bassiana* (P0084) a la de *M. anisopliae* (ARE-1). Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
b1m2	40	42.5	35.0	0.0	7.5
m2	40	10	0.0	0.0	10.0
F logit		7.6 *	16.6 **	0.0 ns	0.1 ns

n=número de insectos evaluados \* \* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns= no significativo a  $p \leq 0.05$

La diferencia de mortalidad entre larvas aplicadas previamente con *B. bassiana* y las que recibieron ADET fue significativa (Cuadro 18), pero se puede atribuir totalmente a la infección de *B. bassiana* y mortalidad asintomática. La ausencia de mortalidad por *M. anisopliae* indica que no hay susceptibilización de las larvas por la aplicación previa de *B. bassiana* a una segunda aplicación de *M. anisopliae*.

#### 4.2.3. Efecto de la aplicación simultánea de los dos hongos

##### Aplicación simultánea comparada con la aplicación simple de *B. bassiana*

La diferencia entre mortalidad en larvas aplicadas con *B. bassiana* y larvas que recibieron la doble aplicación el mismo día es altamente significativa (Cuadro 19). La presencia de *M. anisopliae* interfirió con el desarrollo de mortalidad de *B. bassiana*, pues mortalidad ocasionada por *B. bassiana* es mayor (52.5%) que la causada por la aplicación

combinada de los dos hongos durante el mismo día (15%) Se concluye que, bajo las condiciones de este ensayo, *M. anisopliae* antagonizó el efecto letal de *B. bassiana*.

CUADRO 19. Mortalidad clasificada por síntomas de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación el mismo día de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) comparada con la aplicación individual de *B. bassiana* Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
b1m1	40	15.0	12.5	0.0	2.5
b1	40	52.5	45.0	0.0	7.5
F logit		9.7 **	12.3 **	0.0 ns	0.4 ns

n=número de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns= no significativo a  $p \leq 0.05$

#### Aplicación simultánea comparada con la aplicación simple de *M. anisopliae*

CUADRO 20. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación el mismo día de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) comparada con la aplicación individual de *M. anisopliae*. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
b1m1	40	15.0	12.5	0.0	2.5
m1	40	5.0	0.0	2.5	2.5
F logit		0.9 ns	2.7 ns	4.0 ns	0.0 ns

n=número de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns= no significativo a  $p \leq 0.05$

No se encontraron diferencias significativas de la mortalidad debida a *M. anisopliae* entre la aplicación simple de *M. anisopliae* y la aplicación combinada de ambos hongos



aplicados el mismo día (Cuadro 20), aunque hubo un ligero aumento no significativo de la mortalidad total en la aplicación combinada, solo alcanzó el 15% al final del periodo de evaluación. Por lo tanto, no hubo sinergismo o antagonismo.

#### 4.2.4. Efecto de aplicaciones una aplicación subsecuente de un hongo sobre la mortalidad causada por la aplicación de otro hongo.

##### Aplicación subsecuente de *M. anisopliae*

La aplicación 7 días después de *M. anisopliae* no incrementa la mortalidad debida a *B. bassiana*, por el contrario, se observa una ligera pero no significativa disminución en la mortalidad total y en la manifestación de síntomas de *B. bassiana* (Cuadro 21). Así, aunque el desarrollo de mortalidad de *B. bassiana* tiende a disminuir por la aplicación subsecuente de *M. anisopliae*, no se puede aseverar con seguridad que hubo antagonismo.

CUADRO 21. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la aplicación subsecuente de *M. anisopliae* (ARE-1) a la de *B. bassiana* (P0084) comparada con la aplicación individual de *B. bassiana* (P0084) Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación).

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
b1m2	40	42.5	35.0	0.0	7.5
b1	40	52.5	45.0	0.0	7.5
F logit		0.6 ns	1.2 ns	0.0 ns	0.0 ns

n=número de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns = no significativo a  $p \leq 0.05$

### Aplicación subsecuente de *B. bassiana*

CUADRO 22. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriasi* debida a la aplicación subsecuente de *B. bassiana* (P0084) a la de *M. anisopliae* (ARE-1) comparada con la aplicación individual de *M. anisopliae*. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la primera aplicación.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomáticas
m1b2	40	55.0	45.0	0.0	10.0
m1	40	5.0	0.0	2.5	2.5
F logit		9.0 **	16.6**	4.0 ns	0.1 ns

n=número de insectos evaluados \*\* = significancia a  $p \leq 0.01$  \* = significancia a  $p \leq 0.05$  ns= no significativo a  $p \leq 0.05$

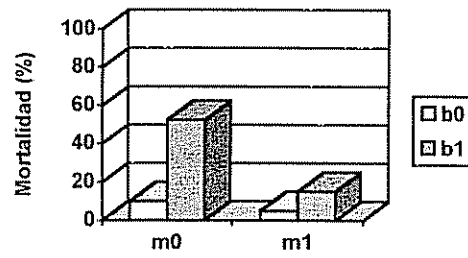
La mortalidad total debida a la aplicación 7 días después de *B. bassiana* a la de *M. anisopliae* supera significativamente la mortalidad de la aplicación individual de *M. anisopliae*: este incremento se debe principalmente a la micosis causada por *B. bassiana*.

La aplicación subsecuente de *B. bassiana* no favorece la manifestación de mortalidad debida a *M. anisopliae*, que no superó el 2.5% en ambos tratamientos.

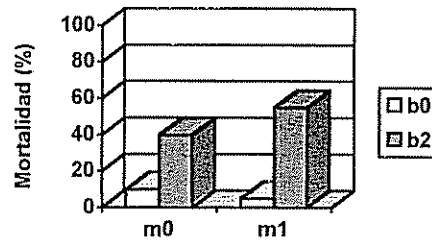
#### 4.2.5. Interacciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio de *P. menetriasi*

No hubo interacción significativa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae* en cuanto a la mortalidad total, sin embargo, cabe resaltar que en la aplicación combinada de ambos durante el mismo día (Figura 9a), hay tendencia de *M. anisopliae* de disminuir la mortalidad total.

a)



b)



c)

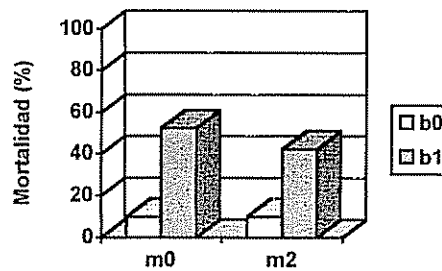
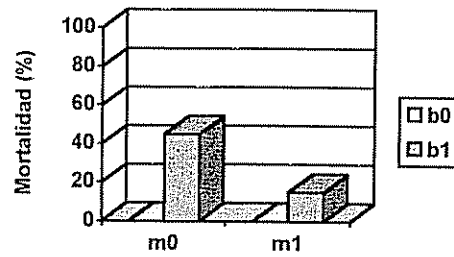
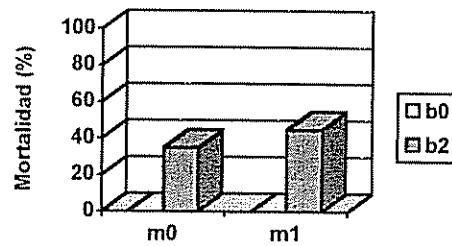


FIGURA 9 Mortalidad (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día ( $F_{int}=3.8$ ;  $p \leq 0.061$ ) b) *B. bassiana* aplicada 7 días después de *M. anisopliae* ( $F_{int}=1.2$ ;  $p \leq 0.26$ ) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* ( $F_{int}=0.4$ ;  $p \leq 0.5$ ).

a)



b)



c)

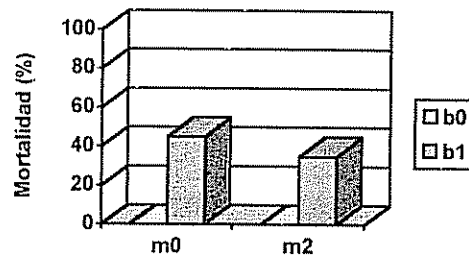
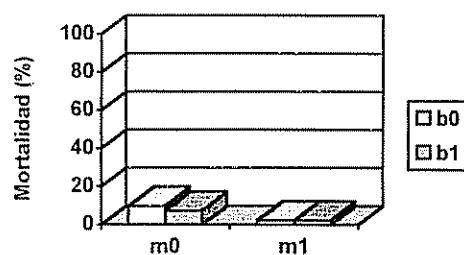
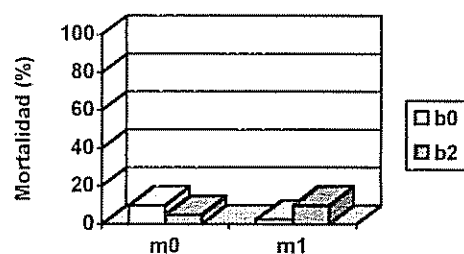


FIGURA 10. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día ( $F_{int} = 6.18$ ;  $p \leq 0.019$ ) b) *B. bassiana* aplicado 7 días después de *M. anisopliae* ( $F_{int} = 0.6$ ;  $p \leq 0.44$ ) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* ( $F_{int} = 0.6$ ;  $p \leq 0.44$ ).

a)



b)



c)

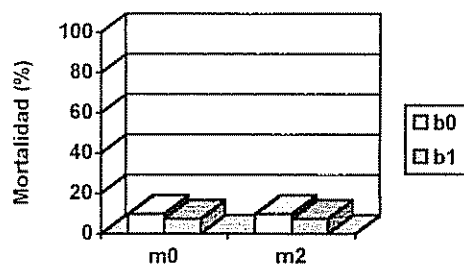


FIGURA 11 Mortalidad sintomática (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la aplicación de *B. bassiana* (P0084) y *M. anisopliae* (ARE-1) a) durante el mismo día ( $F_{int} = 0.02$ ;  $p \leq 0.89$ ) b) *B. bassiana* aplicada 7 días después de *M. anisopliae* ( $F_{int} = 1.25$ ;  $p \leq 0.27$ ) c) *M. anisopliae* aplicado 7 días después de *B. bassiana* ( $F_{int} = 0.02$ ;  $p \leq 0.89$ ).

Se puede concluir que existió independencia entre *M. anisopliae* y *B. bassiana* cuando se aplicaron uno antes que el otro (Figura 9b y 9c). Pero, cuando se aplicaron combinados el mismo día el efecto de *M. anisopliae* sobre la mortalidad causada por la aplicación de *B. bassiana*, casi llega a ser significativo ( $p=0.06$ ).

Este efecto se hace mas contundente cuando se analiza la mortalidad asociada a sintomas de *B. bassiana* (Figura 10a), donde se encontró que *M. anisopliae* disminuye significativamente la mortalidad debida a *B. bassiana* ( $p=0.02$ ). Cuando se aplicó un hongo antes que el otro, continuó la falta de interacción (Figura 10b y 10c)

La mortalidad asociada a sintomas de *M. anisopliae* en el experimento fue tan baja (solo murió una larva en el tratamiento m1) que una conclusión de sinergismo o antagonismo por *B. bassiana* carecería de sentido. Las mortalidades asintomáticas tampoco aportan evidencias de sinergismo o antagonismo. Sin embargo, es interesante observar que, a diferencia que lo visto en el ensayo con larvas de segundo estadio, no hay un aclara relación de este con la aplicación de un hongo específico (Figura 11).

### 4.3. Ensayo III. Combinación de *B. popilliae* con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio.

#### 4.3.1. Progresión de la enfermedad y sintomatología

Los tratamientos que presentaron mayores mortalidades fueron los aplicados con *B. bassiana* (Cuadro 23) y la aplicación sencilla de *M. anisopliae*. El resto de los tratamientos no sobrepasaron el 30% de mortalidad total durante el periodo de evaluación. El testigo mostró una mortalidad menor al 3% durante el desarrollo del ensayo.

El análisis de varianza de las mortalidades totales (transformadas a logit) al final del ensayo (63 días) mostró que hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos (F=6.29 p=0.0012)

CUADRO 23. Mortalidad total de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* (gl=28,  $\alpha=0.05$ ). Mortalidad acumulada a los 63 días después de la primera aplicación

Tratamiento	Mortalidad media	
	%	Logit <sup>2</sup>
bp1b2	50.0	0.067 a
b2	47.5	-0.08 a
m2	22.2	-1.40 ab
T0	2.5	-2.55 b
bp1	2.5	-2.55 b
bp1m2	2.5	-2.55 b

<sup>1</sup> bp1b2 = *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *B. bassiana*

b2 = *B. bassiana* aplicado 15 días después de una dosificación de ADE

m2 = *M. anisopliae* aplicado 15 días después de una dosificación de ADE

T0 = Testigo

bp1 = *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo

bp1m2 = *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *M. anisopliae*

<sup>2</sup> Medias eguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre si según la prueba de Tukey (gl=28; p ≤ 0.05)

No hubo diferencias significativas entre las aplicaciones combinadas de un hongo más *B. popilliae* y la aplicación sencilla del hongo correspondiente. *B. popilliae* no dio mortalidad diferente al testigo.

Es importante mencionar que el manejo de *B. popilliae* en el momento de realizar el ensayo fue basado en experiencias de investigadores en EE UU. y Europa, no se tenía experiencias propias con materiales locales. Se sabe que existen algunas diferencias entre las variedades *B. popilliae*, y existe la posibilidad de que la baja manifestación de enfermedad de *B. popilliae* se deba a este factor.

#### **Desarrollo de las enfermedades ( 1-63 días después de la primera aplicación)**

Las curvas de progreso de mortalidad de cada tratamiento en el tiempo (Figura 12) muestran que los tratamientos con aplicación de *B. bassiana* alcanzan niveles superiores de desarrollo que los que no la recibieron. Los tratamientos prominentes alcanzan su pico de mortalidad (47.5 -50%) a los 63 días. La curva de m2 también alcanza su pico al final del ensayo, el resto de tratamientos muestran una mortalidad muy baja (2.5%).

La frecuencia de las sintomatologías asociadas a mortalidad en cada tratamiento se muestran en la Figura 13. La proporción de mortalidad asintomática aumentó ligeramente cuando las larvas aplicadas con *B. bassiana* se dosificaron previamente con *B. popilliae* (bp1b2). La dosificación previa con *B. popilliae* y posterior aplicación de *M. anisopliae* (bp1m2) presentó mortalidad enteramente asintomática. En el caso de *M. anisopliae* aplicado 15 días después de iniciado el ensayo (m2) el 80% de la mortalidad alcanzada correspondió a las muertes asintomáticas.



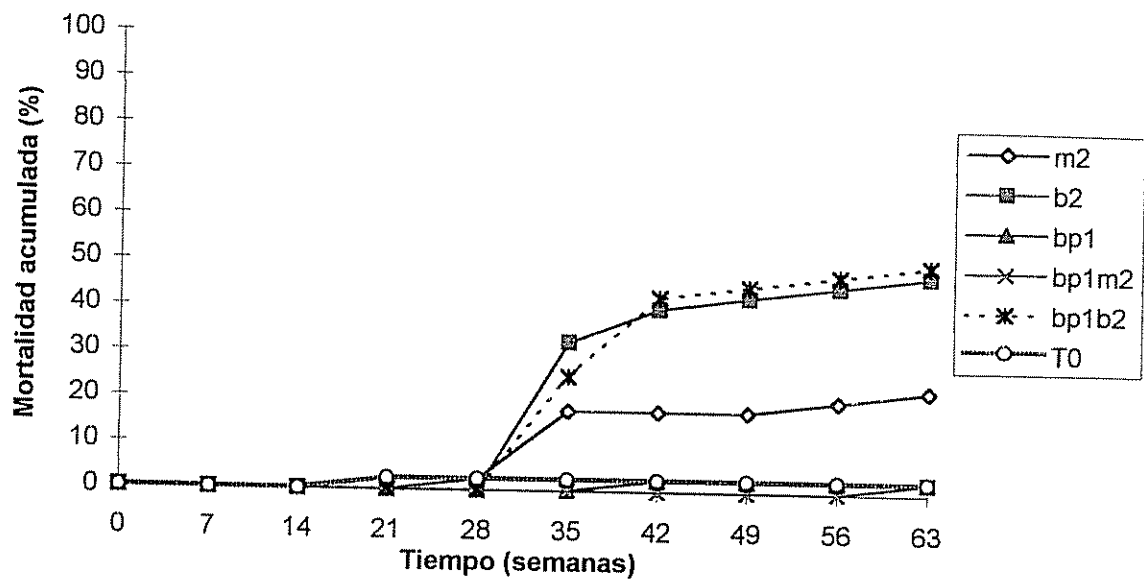


FIGURA 12. Mortalidad total acumulada (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causado por la aplicación de individual de *M. anisopliae* y *B. bassiana* 15 días después de iniciado el ensayo (m2 y b2), *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo (*B. popilliae*1), *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *B. bassiana* (bp1b2), *B. popilliae* dosificado 15 días antes que *M. anisopliae* (bp1m2).

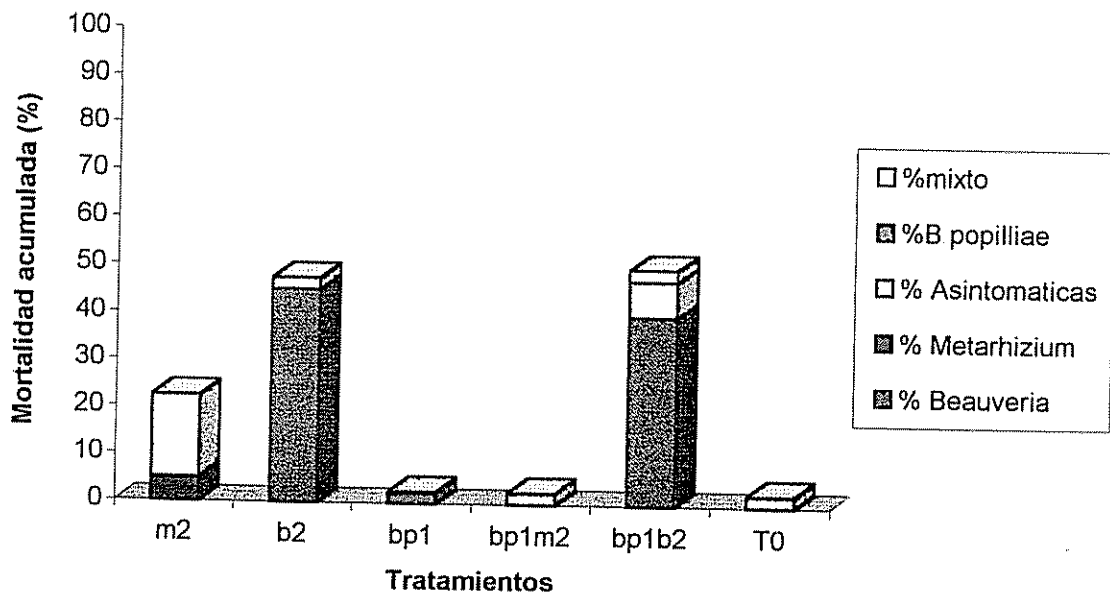


FIGURA 13. Sintomatologías asociadas a la mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* después de la dosificación previa con *B. popilliae* y posterior aplicación de *M. anisopliae* (bp1m2) o con *B. bassiana* (bp1b2) y aplicaciones individuales de *B. bassiana* (b2) y *M. anisopliae* (m2) 15 días después de iniciado el ensayo.

### Tiempos letales (TL<sub>30</sub> y TL<sub>50</sub>)

Los menores tiempos letales se registraron para los tratamientos que recibieron aplicación de *B. bassiana* y fueron los únicos que alcanzaron el TL<sub>30</sub> durante el periodo de evaluación.

Los TL<sub>30</sub> muestran igual comportamiento que el TL<sub>50</sub>, disminuyendo para los tratamientos que recibieron la aplicación de *B. bassiana*. El TL<sub>30</sub> de ambos tratamientos difirió significativamente del tratamiento sencillo con *M. anisopliae* que, a su turno, fue más bajo que el testigo.

CUADRO 24. Comparaciones entre tratamientos seleccionados<sup>1</sup> para el tiempo de mortalidad a 30% de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* (TL<sub>30</sub>)

Tratamiento	TL <sub>30</sub> (días) <sup>2</sup>	Límites de Confianza a 90%	
		inferior	superior
bp1b2	44.48	38.74	50.23
b2	51.80	44.79	58.82
m2 <sup>3</sup>	76.12	63.80	88.45
T0 <sup>3</sup>	177.30	110.03	244.58

<sup>1</sup> No se presentan valores de TL<sub>30</sub> para los tratamientos bp1m2 y bp1 porque la mortalidad no llegó al 3% durante el periodo del experimento

<sup>2</sup> TL<sub>30</sub> para tratamientos según SAS Proc LIFEREG con distribution =Weibull

<sup>3</sup> Extrapolación fuera del periodo de evaluación del experimento

#### 4.3.2. Efecto de aplicación previa de *Bacillus popilliae*.

##### Dosificación previa de *B. popilliae* y posterior aplicación de *M. anisopliae*

Aunque la diferencia no es significativa, la mortalidad total de larvas dosificadas previamente con *B. popilliae* es menor que la causada cuando se aplica solo *M. anisopliae*

(Cuadro 25). La falta de significancia en este caso se debe a la mayor varianza de los datos de mortalidad total comparado con las varianzas de las otras variables (CME para: mortalidad total =1,24; mortalidad con síntomas de *M. anisopliae* = 0.03; mortalidad asintomática =0.40)

CUADRO 25. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la dosificación previa con *B. popilliae* y posterior aplicación de *M. anisopliae* 15 días despues. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la dosificación con *B. popilliae*.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. popilliae</i>	<i>M. anisopliae</i>	Asintomaticas
bp1m2	40	2.5	0.0	0.0	2.5
m2	40	22.5	0.0	5.0	17.5
F logit		2.67 ns	0.0 ns	8.0 *	4.6 *

n = número total de insectos evaluados \*\*=significancia a  $p \leq 0.01$  \*=significancia a  $p \leq 0.05$  ns=no significativa a  $p \leq 0.05$

La mortalidad con síntomas de *M. anisopliae* muestra diferencias entre las que recibieron la dosificación previa de *B. popilliae* y las que no (Cuadro 25); larvas con dosificación previa de *B. popilliae* no manifestaron síntomas de micosis, pues la totalidad de la mortalidad registrada es asintomática, lo que también fue significativamente mayor en el tratamiento que no recibió dosificación de *B. popilliae*.

La dosificación previa de larvas con *B. popilliae* en dieta artificial parece haber impedido el desarrollo de mortalidad por *M. anisopliae*, tanto con y sin síntomas de infección por este hongo. Este resultado implica que *B. popilliae* puede antagonizar la acción de *M. anisopliae*.

Cabe recalcar que no se registraron mortalidades con síntomas de *B. popilliae* en el tratamiento bp1m2. Los análisis de hemolinfa realizados semanalmente a las larvas preparadas para ese fin (10 por tratamiento), no registraron la presencia ni de cuerpos

vegetativos ni de esporas de *B. popilliae* durante el periodo de evaluación del ensayo, concluyendo que el inóculo de *B. popilliae* no causó la enfermedad lechosa en las larvas de tercer estadio, posiblemente por el método usado para la dosificación (*per os*) y por el manejo previo que se dio al inóculo. Evaluaciones semanales de las larvas dosificadas únicamente con *B. popilliae* permitieron observar un cambio en las condiciones fisiológicas de las larvas, que derivaron en pérdida del apetito y desarrollo inferior al resto de larvas del experimento. Esta situación puede indicar la existencia de un efecto subletal de *B. popilliae*, pero en el experimento no se tomaron datos sobre este fenómeno.

#### Dosificación previa de *B. popilliae* y posterior aplicación de *B. bassiana*

CUADRO 26. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* debida a la dosificación previa con *B. popilliae* y posterior aplicación de *B. bassiana* 15 días después. Mortalidad acumulada de 1 a 63 días después de la dosificación con *B. popilliae*.

Tratamiento	n	Porcentaje de Mortalidad			
		Total	<i>B. bassiana</i>	<i>B. popilliae</i>	Asintomaticas
bp1b2	40	50.0	40.0	0.0	7.5
b2	40	47.5	45.0	0.0	2.5
F logit		0.05 ns	0.5 ns	0.0 ns	0.65 ns

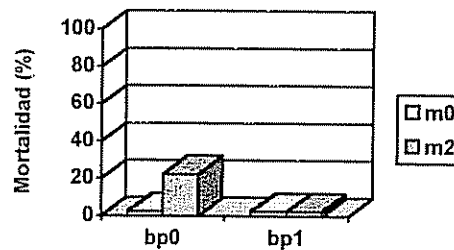
n = número total de insectos evaluados \*\*=significancia a  $p \leq 0.01$  \*=significancia a  $p \leq 0.05$  ns=no significativa a  $p \leq 0.05$

La dosificación previa de *B. popilliae* no favorece la micosis de *B. bassiana*, las mortalidades son muy similares. Se debe mencionar que se registró una larva con mortalidad mixta (presencia de esporas en la hemolinfa y micosis en los tejidos) para en el tratamiento de dosificación previa de *B. popilliae* y posterior aplicación de *B. bassiana*. Primero aparecieron síntomas de la enfermedad lechosa, visibles externamente a los 35 días, luego a los 42 días la larva murió por micosis típica de *B. bassiana*.

#### 4.3.3. Interacciones de *Bacillus popilliae* y *B. bassiana* o *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio de *P. menetriesi*.

No se encontró interacción significativa entre *B. popilliae* y *M. anisopliae* en cuanto a la mortalidad total, aunque se nota que la dosificación *per os* (vía oral) previa de *B. popilliae* tiende a disminuir la mortalidad en bp1m2 (Figura 14a), Opuestamente a lo que se esperaba *B. popilliae* no actuó como estresor, ni favoreció la acción de *M. anisopliae*, más bien la tendencia fue contraria.

a)



b)

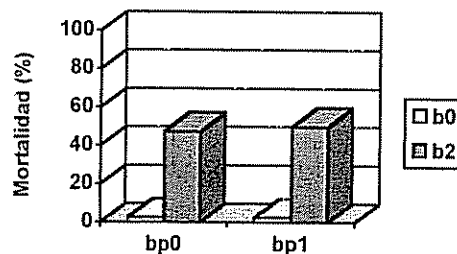


FIGURA 14. Mortalidad (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por a) la dosificación de *Bacillus popilliae* vía oral al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después ( $F_{int} = 1.33$ ;  $p = 0.26$ ) b) *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después ( $F_{int} = 0.02$ ;  $p = 0.87$ ).

Tampoco hubo interacción significativa entre *B. popilliae* y *B. bassiana*, (Figura 14b) concluyendo que *B. bassiana* actuó independientemente a la dosificación previa de *B. popilliae*. No se encontró evidencia de que *B. popilliae* actúe como estresor de larvas de tercer estadio dosificadas *per os* a una segunda aplicación de *B. bassiana*.

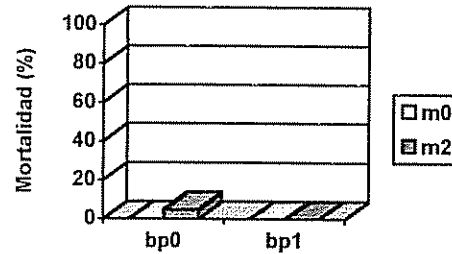


FIGURA 15. Mortalidad debida a *M. anisopliae* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por la dosificación vía oral de *B. popilliae* al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después (F int =4; p =0.059).

La mortalidad debida a *M. anisopliae* en larvas dosificadas 15 días antes con *B. popilliae* presenta tendencia a disminuir. Aunque la interacción fue casi significativa (p=0.059), la magnitud del efecto es pequeño (5% vs 0% de larvas muertas con síntomas).

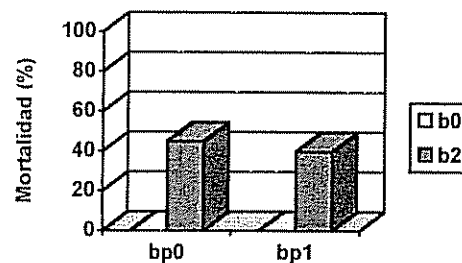
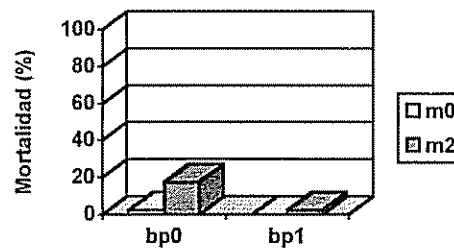


FIGURA 16. Mortalidad debida a *B. bassiana* (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por *B. popilliae* dosificado vía oral al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después (Fint =0.27 ; p =0.60)

La mortalidad debida a *B. bassiana* cuando se dosificaron las larvas 15 días antes con *B. popilliae*, no muestra significancia para la interacción, confirmando la independencia de acción de *B. bassiana*. Cabe recalcar que como se comentó anteriormente en el tratamiento bp1b2 se presentó una larva (2.5%) con infección mixta de *B. popilliae* y *B. bassiana*, que no está incluida en la Figura 16.

a)



b)

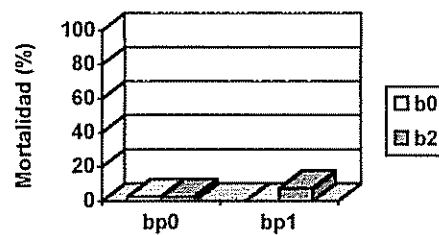


FIGURA 17. Mortalidad asintomática (1-63 DDA) de larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* causada por a) la dosificación de *Bacillus popilliae* al inicio del ensayo y de *M. anisopliae* (ARE-1) 15 días después ( $F_{int}=1.59$ ;  $p=0.22$ ) b) *B. popilliae* dosificado al inicio del ensayo y *B. bassiana* aplicada 15 días después ( $F_{int}=0.71$ ;  $p=0.41$ )

Se puede observar que cuando se dosifica previamente *B. popilliae* y luego se inocula *M. anisopliae* (Figura 17a), la proporción de muertes asintomáticas disminuye, siendo ésta la sintomatología principal de la mortalidad en el tratamiento m2 (17.5%) que incide directamente en la mortalidad total.



## 5. DISCUSION GENERAL

### 5.1. Combinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi*

En larvas de tercer estadio hubo reducción de la mortalidad total cuando se aplicaron *B. bassiana* y *M. anisopliae* el mismo día. Se obtuvo 52.5% de mortalidad en aplicación individual y 15 % en la aplicación combinada. La reducción se debía principalmente a la disminución de la proporción de larvas que murieron con síntomas de *B. bassiana* evidenciando el antagonismo de *M. anisopliae* sobre *B. bassiana* en las condiciones del experimento.

La misma tendencia de reducción de síntomas de *B. bassiana* fue evidenciada en larvas de segundo estadio, aunque no se observó una reducción de mortalidad total y la diferencia no fue significativa, no se registró un descenso de la mortalidad total debido a un incremento no significativo de mortalidad asintomática.

Estas tendencias podrían indicar algún efecto de antibiosis de *M. anisopliae* sobre *B. bassiana*, efecto que también sugieren las curvas de desarrollo de la mortalidad, donde la curva de la combinación b1m1 presenta un desarrollo inferior a la de *B. bassiana* aplicada individualmente. Este descenso de mortalidad ocurrió a los 14 días, hecho que incrementó ligeramente el  $TL_{50}$ . Debido a que en la aplicación durante el mismo día, las larvas se sumergieron primero en la suspensión de *B. bassiana* y 4 h después en suspensión de *M. anisopliae*, existía la posibilidad de que las conidias fueran lavadas con la segunda inmersión. Sugiere que esta hipótesis puede descartarse porque, en una prueba de observación 8 larvas fueron lavadas 10 min después de la aplicación por inmersión de *B.*

*bassiana* y no mostraron menor mortalidad por *B. bassiana* que otras larvas que no fueron lavadas.

Aunque las aplicaciones combinadas el mismo día dieron mortalidad total mayor que *M. anisopliae* el efecto fue significativo solamente en larvas de segundo estadio y no fue acompañado de una disminución significativa de síntomas de *M. anisopliae*. Evidentemente el rápido desarrollo de *B. bassiana* domina en estos casos.

Cuando se aplicó *M. anisopliae* después que *B. bassiana* en larvas de segundo y tercer estadio, la mortalidad total no fue diferente, pero se observó un 10% de disminución de la mortalidad con síntomas de *B. bassiana*. En el segundo estadio también hubo una disminución del desarrollo de la mortalidad comparado con la curva de *B. bassiana* aplicada individualmente. Este cuadro sintomatológico también hace pensar en una tendencia de *M. anisopliae* de antagonizar la manifestación de *B. bassiana*.

Cuando se aplicó *B. bassiana* después que *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio, se encontró un incremento significativo de 10.7 a 17.5% de la mortalidad por *M. anisopliae*. *B. bassiana* favoreció la manifestación de *M. anisopliae*, posiblemente por la acción estresante de *B. bassiana* que debilitó a las larvas haciendo que los mecanismos de defensa disminuyeran, y así susceptibilizando las larvas al desarrollo de *M. anisopliae* que se encontraba en proceso infectivo disminuido. Se debe hacer referencia a que en general la mortalidad por *M. anisopliae* fue baja, posiblemente por una disminución de virulencia del inóculo, pues como ya se mencionó en la sección 4.1.1, el nivel de mortalidad de esta cepa fue mayor en ensayos anteriores (CATIE 1993). Contrariamente, en larvas de tercer estadio se observa que hubo una ligera pero no significativa disminución en la mortalidad total y en la manifestación de síntomas de *B. bassiana*, en este caso no se puede aseverar la existencia de antagonismo.

Aplicaciones previas de *M. anisopliae* o *B. bassiana* en larvas de segundo y tercer estadio, no favorecieron la manifestación de un segundo hongo, concluyendo que no se presenta ni sinergismo ni antagonismo.

Se encontró que los tratamientos que recibieron *B. bassiana* al inicio presentaron mayor mortalidad 24 h después de la aplicación. Este hecho pudo deberse a la acción de toxinas producidas por este hongo, que luego de ser ingeridas matan a las larvas. Aunque muchas de estas larvas no desarrollaron síntomas típicos de micosis, es interesante que cuando fueron incubadas durante 3 días, manifestaron los síntomas típicos de *B. bassiana*.

En resumen, las tendencias observadas son consistentes con las hipótesis que *M. anisopliae* puede inhibir el desarrollo de *B. bassiana*, y que, con menos seguridad; *B. bassiana* puede fomentar el desarrollo de *M. anisopliae* en larvas de *P. menetriesi*. Cabe recordar que las condiciones bajo las cuales se observó esto fueron de alta dosificación de ambos hongos y usando un método de inmersión, condiciones que deben favorecer la infección. Quizás bajo condiciones más parecidas a las que se encuentran en el campo, de menor concentración de inóculo y con exposición en el suelo, no se observaron los mismos fenómenos. Sin embargo, esta evidencia llama la atención a que se debería proceder con cautela antes de usar estos dos hongos en aplicaciones conjuntas, tal como ha sido sugerido por la industria (Laverlan, sf) y probado experimentalmente (Falguni Guharay com. pers.)

En el segundo estadio, las aplicaciones al inicio del ensayo mostraron 95 % y quince días después se redujo a 30.8%. En el tercer estadio larvario la mortalidad debida a la aplicación al inicio del ensayo fue de 50% y 7 días después de 31.3%.

## 5.2 Combinaciones pareadas de *B. popilliae* con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio de *P. menetriesi*

Cuando se dosificó *B. popilliae* vía oral, la infección por *B. popilliae* fue baja, tal vez porque la dosificación mediante la dieta no garantizó que la larva ingiriera la totalidad del inóculo o tal vez por la reducción de virulencia del inóculo. La viabilidad vía inyección del inóculo usado en este trabajo fue comprobado en otros ensayos (Eduardo Hidalgo, com. pers.), alcanzando 50% de mortalidad en 26 días con una dosis de  $2.5 \times 10^5$  esporas/larva (10% de la dosis usada aquí). También, al ingerir el inóculo se encontró que hubo un cambio en el comportamiento de las larvas y una disminución del apetito y sufrieron una disminución del apetito. A pesar de que no hubo infección (evidenciado por la ausencia de bacterias en la hemolinfa), hubo un efecto debilitante debido a la dosificación del inóculo.

Es interesante que, aunque las larvas dosificadas parecían más débiles, se observó una disminución significativa de 5% a 0% de infección con *M. anisopliae* y de 17.5 a 2.5 % de mortalidad asintomática cuando *M. anisopliae* fue aplicado por inmersión 15 días después. Posiblemente, la dosificación con *B. popilliae* habría estimulado algún mecanismo de defensa de la larva o los cambios observados de vigor reflejan cambios fisiológicos que disminuyen la susceptibilidad de la larva a *M. anisopliae*. Estos posibles cambios no tuvieron efecto significativo sobre la capacidad de *M. anisopliae* para manifestarse ni sobre la mortalidad sintomática o total.

En la combinación *B. popilliae* y *B. bassiana* no se observó menor tiempo de desarrollo de *B. bassiana* contrariamente a lo que reportan Ferron *et al* (1969), quienes al inocular vía oral (forzada) *B. popilliae* ( $2 \times 10^7$  esporas/larva) y *B. tenella* (= *brongniartii*) ( $1 \times 10^7$  conidias/gr de suelo) a larvas de tercer estadio de *Melolontha melolontha* encontraron una acción sinérgica de estos patógenos, tanto en el porcentaje de

mortalidad como en los tiempos de desarrollo de las infecciones, en especial para *B. tenella*, que redujo a la mitad su tiempo de desarrollo

Se observó una larva con infección mixta de *B. bassiana* y *B. popilliae*, la observación de síntomas visibles de *B. popilliae* (35 días) precedió 7 días a la manifestación de la micosis, confirmando la presencia de esporas con un análisis de hemolinfa

Posiblemente el lapso de tiempo entre la dosificación de *B. popilliae* y la inoculación de *B. bassiana* fue de suma importancia para el proceso infectivo en nuestro ensayo, pues estos autores encontraron que los casos de micosis sola con rápida proliferación de micelio, fueron más numerosos en la combinación cuando las blastosporas de *B. tenella* fueron inoculadas después de un lapso de tiempo mayor entre la dosificación de *B. popilliae* y la inoculación del hongo, concluyendo que mientras más avanzada la bacteriosis mayor efecto de debilitamiento causó en las larvas. Concluyeron además que el sinergismo se manifiesta cuando uno de los dos patógenos no está en condiciones suficientes para asegurar la infección (dosis baja). Esto hace pensar en la posibilidad de que la dosis de *B. bassiana* usada fue muy alta y no permitió la manifestación de *B. popilliae*, además del pequeño lapso de tiempo que transcurrió entre la dosificación (2 semanas).

## 6. CONCLUSIONES

- Larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi* que recibieron la aplicación de *B. bassiana* al inicio, presentaron las mayores mortalidades (96 y 52.5 % respectivamente).
- Los resultados indican que podría haber un efecto del estado de desarrollo larval de *P. menetriesi* sobre la susceptibilidad a la aplicación de *B. bassiana*, disminuyendo el nivel de infección en larvas maduras.

### 1. Aplicación subsecuente de un hongo.

- La aplicación posterior de *M. anisopliae* no cambió la mortalidad de *B. bassiana* pero se notó una ligera disminución (10.9%) en el segundo estadio y (10%) en el tercer estadio.
- La aplicación posterior de *B. bassiana* favoreció en un 6.8% la expresión de síntomas por *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio. En larvas de tercer estadio esta aplicación no favoreció la manifestación de síntomas de *M. anisopliae*.

### 2. Aplicación simultánea de los dos hongos.

- Cuando se aplica *M. anisopliae* y *B. bassiana* el mismo día, el TL<sub>50</sub> de larvas de segundo estadio aumenta. Se evidenció que la presencia de *M. anisopliae* retarda el desarrollo de mortalidad causada por *B. bassiana*.
- La mortalidad final debida a *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicados el mismo día fue similar a la debida a la aplicación simple de *B. bassiana*, pero se encontró que en

combinación hubo una reducción numérica de síntomas de *B. bassiana* del 21.8% e incrementó de mortalidad asintomática en un 18%. Esta tendencia se evidenció con larvas de tercer estadio cuando se encontró que la presencia de *M. anisopliae* antagonizó el desarrollo de *B. bassiana* ( $p=0.0015$ ) y presentó un  $TL_{30}$  menor al de la aplicación simple.

- La mortalidad debida a aplicación conjunta de *M. anisopliae* y *B. bassiana* el mismo día no fue diferente a la debida a la aplicación simple de *M. anisopliae* en larvas de segundo ni en larvas de tercer estadio, pero se pudo observa en larvas de segundo estadio la tendencia de *B. bassiana* de no permitir el desarrollo de *M. anisopliae* debido a su rápido desarrollo dentro del insecto.

### **3. Efecto de la aplicación previa de un hongo.**

- La aplicación previa de *B. bassiana* o *M. anisopliae* no incrementa la susceptibilidad de larvas de segundo ni tercer estadio a la acción del otro hongo aplicado después

- Existe independencia en la mortalidad ocasionada por *B. bassiana* y *M. anisopliae* cuando uno se aplica antes que el otro en larvas de segundo y tercer estadio.

- La manifestación de síntomas de *B. bassiana* disminuye por la presencia previa de *M. anisopliae* en larvas de segundo y tercer estadio ( $p=0.02$ ).

### **4. Efecto de la dosificación previa vía oral de *B. popilliae***

- No existe diferencia en las mortalidades ocasionadas por la dosificación previa con *B. popilliae* y aplicación de *B. bassiana* y la aplicación simple de *B. bassiana*, aunque se encontró un ligero incremento de muertes asintomáticas

- La mortalidad total es menor cuando se dosifica vía oral previamente *B. popilliae* y luego se aplica *M. anisopliae* a larvas de tercer estadio.
- *B. popilliae* aplicado 15 días antes que *M. anisopliae* no se comporta como estresante en larvas de tercer estadio para facilitar la acción del hongo.
- *B. popilliae* aplicado 15 días antes que *B. bassiana* no estresa larvas de tercer estadio ni facilita la acción del hongo aplicado posteriormente.
- La dosificación vía oral previa de *B. popilliae* no actúa como estresante ni facilita la acción de *B. bassiana* en larvas de tercer estadio de *P. menetriesi*.
- La dosificación vía oral de  $2 \times 10^6$  esporas por larva de esta cepa de *B. popilliae* produce síntomas de trastornos, presumiblemente fisiológicos, sin causar infección.

##### **5. Mortalidad a las 24 h**

- Hubo mortalidad asintomática durante las 24 h después de la aplicación, principalmente asociada a *B. bassiana* que podría deberse a la acción de toxinas producidas por este hongo.



## 7. RECOMENDACIONES

En las combinaciones de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en larvas de segundo y tercer estadio se recomienda probar dosis menores de *B. bassiana* para cumplir con la hipótesis de que la actividad sinérgica se presenta cuando uno de los dos patógenos se no encuentra bajo las condiciones suficientes de desarrollo y actúa como estresante.

También se debería probar un método de inoculación menos estricto, por ejemplo la inoculación del suelo con conidias de hongo.

En las combinaciones de *B. popilliae* y *M. anisopliae* o *B. bassiana* se recomienda ampliar el lapso de tiempo entre la dosificación y la inoculación con el hongo, así mismo reducir la dosis del hongo para cumplir con la hipótesis antes planteada.

## 8. LITERATURA CONSULTADA

- ADAMS, J ; WHEELER, E. 1946. Rate of development of milky disease in Japanese beetle populations. J Econ Entomol. (USA) 39 :248-254.
- ALVES, S 1986. Controle microbiano de insetos. Brasil. Manole. 407 p.
- ALGER, P; VAGO, C. 1960. Pathogénésis simultanea de virose et de nosémide chez le lepidopteres. Rev. Pathol. Vég Entomol. 31:205-209
- ARUGA, H ; HUKUHARA, N. ; YOSHITAKE, N. ; AYUDHYA, I. 1961. Interference and latent infection in the citoplasmatic polyhedrosis of the silkworm, *Bombix mori* (Linnaeus) J. Insect Path. (USA) 3 :81-92.
- ARUGA, H. ; HUKUHARA, T. ; FUKUDA, S. ; HASHIMOTO, Y. 1963. Interference between Cytoplasmic-polyhedrosis viruses of the silkworm, *Bombix mori* (Linnaeus), and of the pine caterpillar, *Dendrolimus spectabilis* (Butler). J. Insect Path. (USA) 5 :415-421.
- BADILLA, F. ; SAENZ, C. ; CHAN, I. 1994. Resultados obtenidos en el Manejo Integrado de *Aeneolamia postica* y *Prosapia* spp (Homoptera:Cercopidae) en diferentes regiones de Costa Rica. Resúmenes. p 88.
- BEARD, R. 1946. Competition between two entomogenous bacteria. Science (USA) 103: 371-372.
- BEARD, R. 1956. Two milky diseases of Australia scarabs. Canadian Entomologist (Canada) 88:640-647.
- BENNET, G ; SHOTWELL, O. ; HALL, H. ; HEARN, W. 1968. Haemolymph proteins of healthy and diseased larvae of the Japanese beetle, *Popillia japonica*. J. Inv. Path. (USA) 11 :112-118.
- BERRIOS, M; MORALES, R.; BUSTAMANTE, M. 1995. Uso de hongos entomopatogenos para el manejo de broca del café en Nicaragua. MIP. Avances Técnicos Tomo VI. CATIE/INTA-MIP. p 75.

- BIRD, F. 1959 Polyedrosis and granulosis viruses causing single and double infection in the spruce budworm, *Choristoneura fumifera*. J. Invert. Pathol. (USA) 1:406-430.
- BLACK, S. 1968. Citology of milky disease bacterium. I. Morphogenesis of *B. popilliae* in vivo. J. Insect Path (EUA) 14:148-157.
- BONNEFOI, A; TOUCAS, M; CHAUMONT, M. 1959. Essais do thermo-resist ale 18 organismos responsable de la maladise lai teuse de larvae du hanneton (*Melolontha melolontha*). Entomophaga (Francia) 4:227-231.
- BRADLEY, C. 1996. Mycotech Expands Production Capability. Society for Inv. Pathol vol 28 (1) Newsletter.
- BULLA, L. ; COSTILOW, R ; SHARPE, E. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. Adv Appl. Microbiol. (EUA) 23 : 1-18.
- BUTT, T. 1994. Structural studies on the infection precesses of entomogenous fungus. In IV International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial control. Proceedings. p 311-314.
- CARBALLO, M. 1994. Las prácticas de cultivo y su efecto sobre Phyllophaga en maíz. In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba-Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- CARBALLO, M ; SAUNDERS, J. 1990. Manejo del suelo, rastrojo y plagas: interacciones y efecto sobre el maíz. Turrialba (Costa Rica) 40 (2) :183-189.
- CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA-NATURAL RESOURCES INSTITUTE. 1993. Informe técnico anual Proyecto MIP de las Plagas del suelo. Turrialba, Costa Rica. 20 p.
- CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA-NATURAL RESOURCES INSTITUTE, 1994. Informe técnico anual Proyecto MIP de las Plagas del suelo. Turrialba, Costa Rica. 9 p.
- CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA-NATURAL RESOURCES INSTITUTE, 1995. Informe técnico anual Proyecto MIP de las Plagas del suelo. Turrialba, Costa Rica. 35 p.

- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central: Guía de campo. CATIE Serie técnica. Manual técnico nº4. 185 p.
- CHARNLEY, A. 1994. Recent advances in the study of entomopathogenic fungus. In IV International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial control. Proceedings. p 292-298.
- CHERRY, R.; BOUCIAS, D. 1989. Incidence of *B. popilliae* in different life stages of sugarcane grubs (Col: Scarabaeidae). J. Entomol. Sci. (EUA) 24(4):526-530.
- CRANSHAW, W.; KLEIN, M. 1994. Microbial control of insect pest and landscape plants. In LESLIE, A. Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals, CRC Press. p.489-505
- CROCKER, R. 1991. Laboratory testing of milking spore disease, *Bacillus popilliae*, for control of *Phyllophaga crinita* white grubs. Pr. Texas Agricultural Experiment Station (USA) 4912 :89-91.
- DeBACH, P. 1968. Enfermedades microbianas de los insectos. In \_\_\_\_\_ Control biológico de plagas de insectos y malas hierbas. Trad. C. M. Castaños. Mexico D.F., Mexico. Compañía Editora Continental. 607-618.
- DIAZ CALVO, M. 1992. Respuesta de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Col.: Scarabaeidae) a *Bacillus popilliae* Dutky. Tesis M Sc. CATIE Turrialba, C.R. 67p.
- DIECA. 1970. Combata los jobotos; técnicas de como destruir esta plaga. El plaguero al día. DIECA. 8p.
- DINGMAN, G. 1994. Inhibitory effects of turf pesticides on *B. popilliae* and the prevalence of milky disease. Applied and Envi. Microb. (USA) 60:2343 -2349.
- DULMAGE, H.; RHODES, R. 1973. Production of pathogens in artificial media. In BURGESS, H. D.; HUSSEY, N.Y. Microbial Control of insects and mites. Academic Press, London, pp 507-540.
- DUMBLETON, L. 1945. Bacterial and nematode parasites of soil insects. New Zealand J. Science and Technology. 27:76-81.

- DUTKY, S. 1940. Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae. *J. of Agricultural Research (USA)* 60(1): 57-68.
- DUTKY, S. 1942. Method for the preparation of spore-dust mixtures of type A milky disease of Japanese Beetle larvae for field inoculation. New Jersey, EE.UU. USDA. 8p
- DUTKY, S. 1963. The milky disease. In Steinhaus, A., ed. *Insect pathology. An Advanced Treatise Volumen 2.* New York, EE.UU. Academic Press. p. 75-114.
- FARGES, J.; ROBERT, P. ; VEY, A. 1985. Effect of destruxins A, B and E on the pathogenesis of *M. anisopliae* in larvae of the Col:Scarabaeidae. *Entomophaga (Francia)* 30(4):353-364.
- FAUST, R. 1974. Bacterial disease. In *Insect disease*, Cantwell, G.E. de. New York, Marcel Dekker. v1. p 87-183.
- FENG, Z. ; CARRUTHER, R. ; ROBERTS, D. ; ROBSON, D. 1985. Age-specific dose-mortality effect of *B. bassiana* (Deuteromycete: Hiphomycete) on the European common borer *Ostrinia nubilalis* (Lep: Pyralidae). *J. Inv. Patol (USA)* 46 (3):259-264.
- FERRON, P. 1981. Pest control by fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In BURGESS, H.D. (Ed.) *Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980.* London, UK. Academic Press. p 183-192.
- FERRON, P.; HURPIN, B.; ROBERT, P. 1969. Sensibilisation des larves de *Melolontha melolontha* L. a la mycose a *Beauveria Tenella* par une infection préalable a *Bacillus popilliae*. *Entomophaga (Francia)* 14 (4): 417 -429.
- FERRON, P.; ROBERTS, P. 1975. Virulence of entomopathogenic fungus (Fungus imperfecti) for the adult of *Acanthoscelides obtectus* (Col: Bruchidae). *J. Inv. Pathol (USA)* 25:379-388.
- FERRON, P. 1981. Pest control by the fungus *Beauveria* and *Metarhizium*. In BURGESS, H.D. (Ed.) *Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980.* London, UK. Academic Press. p 466-467.

- FLEMING, W. 1968. Integrated control of the Japanese beetle: a historical review United States Department of Agriculture Technical Bulletin 1383. Washington-EUA.
- FOWLER, M. 1972. A new milky disease organism from New Zealand. J. Inv. Pathol (USA) 19:409 - 410.
- FREY, VON G. 1975. Bestimmungstabelle der sudamerikanischen Arten der Gattung *Phyllophaga* Harris und ihrer Untergattung *Phytalus* Er. (Col. Melolonthinae). Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey 26 :201-226.
- GARDNER, W.; PENDLEY, A. 1986. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and its beta-exotoxin in fall armyworm (Lep. Noctuidae) neonate larvae. Florida entomologist (USA) 69(3):531-541.
- GLARE, T. 1992. Fungal pathogens of scarabs. In Jackson, T.; Glare, T. eds. Use of pathogens in Scarab Pest Management. Hampshire, UK. Intercept. p. 63-73.
- GLARE, T. 1994. Stage-dependent synergism using *Metarhizium anisopliae* and *Serratia entomophila* against *Costelytra zealandica*. Biocontrol Science and Technology. (USA) 4:321-329.
- HALL, R.; PAPIEROK, B. 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology. (USA) 84 :205-240.
- HAYNES, W.; RHODES, L. 1966. Spore formation by *Bacillus popilliae* in liquid medium containing activated carbon. J. Bacteriol. (USA) 13 :161-166.
- HIDALGO, E.; SMITH, S.; SHANNON, P. 1996. Metodología para la cría masiva de *Phyllophaga* spp (Col. Scarabaeidae). In VI Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas. Memorias. Mexico. p. 107.
- HILJE, L.; CARTIN, V. 1990. Diagnostico acerca del combate químico de las polillas de la papa (Lep. Gelechiidae) en Cartago, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) 17: 27-33.
- HERNANDEZ, A.; MONTERROSO, D. 1990. El sistema de alarma; un componente del Manejo Integrado de Plagas. Talika (Mexico) 6:17-28

- HOLDRIDGE, L. 1978. Ecología basada en zonas de vida. Trad. del inglés Jiménez, H. San José, Costa Rica. IICA. 216 p.
- HRUSKA, A. 1987. Weedy groundcover increases damage to cassava by white grubs in Costa Rica. *Trp. Agric. (Trinidad)* 64 (3) :212-216
- HURPIN, B.; ROBERT, P. 1968. Experiments on simultaneous infections of the common cockchafer, *Melolontha melolontha*. *J. Inv. Path. (USA)* 11: 203-213.
- HURPIN, B.; VAGO, G. 1958. Les maladies du hanneton commun (*Melolontha melolontha*) (Col: Scarabaeidae). *Entomophaga (Francia)* 3:285-330.
- HUTTON, P.; BURBUTIS, P. 1974. Milky disease and Japanese beetle in Delaware, J. *Econ. Entomol. (USA)* 67(2): 247-248.
- JACKSON, T.; CHINN, W. 1993. The effect of *Metarhizium anisopliae* formulations, and their combination with *Serratia entomophila*, on grass grub larvae. *In Proc. 46<sup>th</sup> N.Z. Plant Protection Conf. (USA)*. p.206-209.
- KAYA, H.; KLEIN, M.; BURLANDO, T. 1992. Prevalence of two *Bacillus popilliae* Dutky morphotypes and blue diseases in *Cyclocephala hirta* Leconte (Col: Scarabaeidae) populations in California. *Pan. Pac. Entomol. (USA)* 68(1) :38-45
- KALMAKOF, J.; LONGWORTH, J. 1980. Microbial control of insect pests. New Zealand. New Zealand Department of scientific and industrial Research. Bulletin 228. 98p.
- KING, A. 1984. Biology and Identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in Central America. *Tropical Pest Management (UK)* 30(1): 36-50.
- KING, A. 1985. Factors affecting infestation by larvae of *Phyllophaga* spp. (Col: Scarabaeidae) in Costa Rica. *Bull. ent. Res. (UK)* 75: 417-427.
- KING, A. 1994. La biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* en América Central. *In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba - Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.

- KING, A ; SAUNDERS, J. 1984. The invertebrate Pest of annual Food crops in Central America; A guide to their recognition and control. London, UK, Overseas Development Administration. p. 81-82.
- KLEIN, M ; JACKSON, T. 1992. Bacterial diseases of scarabs. In Use of pathogens in scarab pest management. T. Jackson and T. Glare eds. Andover- UK. Intercept. p 43-61.
- KLEIN, M. 1944. Procedure for preparing milky disease stock culture slides. New Jersey, USA. USDA. 1 p.
- KLEIN, M. 1981. Advances in the use of *Bacillus popilliae* for Pest Control. In BURGESS, H.D. (Ed.) Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. London, UK. Academic Press. p 183-192.
- KLEIN, M. 1992. Bacterial diseases of scarabs. In Jackson, T.; Glare, T. eds. Use of pathogens in Scarab Pest Management. Hampshire, UK. Intercept. p 43-56.
- KLEIN, M ; KAYA, H. 1995. *Bacillus* and *Serratia* species for scarab control. Mem Inst Oswaldo Cruz (Brasil) 90(1):87-95.
- KODAIRE, Y. 1961. Toxic substances to insect produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospore destructor*. Agricultural and Biological Chemistry (USA) 25(3):261-262.
- KRIEGER, L ; SCHERF, S ; ZHANG, J ; FRANKEN, E ; SCHNETTER, W. 1994. Isolation and Characterization of *Bacillus popilliae* subsp. *melolonthae*, pathogenic for the grubs of *Melolontha melolontha*. In VI International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control. Abstracts. V 2. Montpellier - Francia. p. 338.
- KRIEGER, L ; JACKSON, T ; SCHNETLER, W. 1996. *Bacillus popilliae*, unrarely of an enigma. In III International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Cordoba - España. p 45
- KUCERA, M. 1980. Proteases from the fungus *M. anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. J. Inv. Pathol. 12:316-320.



- LADD, T. ;McCABE, P. 1967. Persistence of spores of *Bacillus popilliae*, the causal organism of type A milky disease of *Japanese beetle* larvae in New Jersey soils. *J. of Econ. Entom. (USA)* 60 :493-495.
- LACEY, L. ; AMARAL, J. ; KLEIN, M. ; SIMOES, N. ; MARTINS, A. ; MENDEZ, C. 1994. Microbial control of japanese beetle (Col:Scarabaeidae) on Tercera Island (Azores, Portugal): The role of operational research. In IV International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial control. Proceedings. p 409 - 410.
- LACEY, L. ; AMARAL, J. ; KLEIN, M. ; SIMOES, N. ; MARTINS, A. ; MENDES, C. 1994. Microbial control of japanese beetle *Popillia japonica* on Tercera Island : The role of operational research. In Colloquium on the Invertebrate Pathology and microbial control ( Francia) Proceedins. pp. 409-415.
- LANE, B. ; TRINCI, A. 1991. Endogenous reserves and survival of blastospores of *B. bassiana* harvest from carbon and nitrogen limited batch cultires. *Mycol. Res. (USA)* 95(7):821-828.
- LEUCONA, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires - Argentina. *Marianos Mas.* 338 p.
- LEÓN, R. 1994 Informe de Costa Rica. In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba - Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- LEPPLA, N. ; VAIL, P. ; RYE, J. 1979. Mass rearing and handling techniques for the cabbage looper. In IAEA/FAO Training Course on Use of isotopes and radiation in Integrated Pest Management (IPM) with Special Preference to Sterile Insect Technique, (1979, Gainesville). Proceedings. Gainesville, EE UU. p 59-75.
- LIN, K. 1979. Bionomics of the comun june beetle *Phyllophaga anxia* (Col: Scarabaeidae) with particular reference to distribution, life history and natural enemies in the Southern Quebec. Thesis Ph.D. (unpublished). McGill Univ. Montreal, Quebec, Canadá. 230 p.
- LUTHY, L. ; ETTLINGER, H. 1970. Behavior of milky disease organism in tissue culture system. *J. Inv. Path. (EUA)* 16:325-330.

- LYSENKO, O; KUCERA, M. 1971. Microorganisms as sources of new insecticidal chemicals toxins. In BURGESS, H.; HUSSEY, N. eds. Microbial Control of Insects and MITES. Academic Press. p. 205 -227.
- MADÉLIN, M. 1963. Diseases caused by Hyphomycetous fungi. In Steinhaus, A., ed. Insect pathology. An Advanced Treatise Volumen 2. New York, EE.UU. Academic Press. p. 233-264.
- MADÉLIN, M. 1963. Diseases caused by Hiphomycetes fungy. In Steinhaus, A ed. Insect pathology. An Advanced Treatise. v2. New York, EE.UU. Academic Press. p 250 -252.
- MENDOZA, H. 1994. Informe de El Salvador In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba-Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- McCOY, C. 1990. Entomogenous fungus as microbial pesticides In R.BAKE and P.DUNN eds, New directions in biological control: alternatives for supressing. Agricultural Pest and Science. Atlantis, New York. p 139 -159.
- McCOY, C.; SAMSON, R. ;BOUCIAS, D. 1988. Entomogenous fungus. In Handbook of natural pesticides. Microbial insecticides. part a. Entomogenous Protozoa and fungus. C. Ignoffo ed. v 5. p 151-236.
- MILNER, R. 1974. A new variety of milky disease *Bacillus popilliae* var *rhopaea* from *Rhopaea verreauxi*. Aust. J. Biol. Sci.(Australia) 27 :235-247.
- MILNER, R. 1976. A laboratory evaluation of the pathogenicity of *Bacillus popilliae* var. *rhopaea*, the agent of milky disease in *Rhopaea verreauxi* (Col :Scarabaeidae) J. Invert. Pathol. (USA) 28 :185-190.
- MILNER, R. 1981. Identification of the *Bacillus popilliae* group of insect pathogens. In BURGESS, H.D ed. Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. London, UK. Academic Press. p. 45-60.
- MILNER, R.; WOOD, Y ; WILLIAM, E. 1980. The development of milky disease under laboratory and field temperatures regimes. J. Inv. Path. (USA) 36:203-210.

- MORON, R. 1994. Coleopteros lamelicorneos de Villa de Allende, Estado de Mexico. Tesis Lic. Biol. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Automona de Mexico, Mexico DF. pp 141.
- MOSSER, B. 1996. PROGLM of SAS/STAT. Luosiana, Luosiana StatUniversity, Departament of Experimental Statistics. (comm. pers.)
- NOTINI, G.; MATHLEIN, R. 1944. Grönmykos förorsakad au *M. anisopliae* (Metsch) Sorok. I. Grönmykosen sum biologisk insektbekä mphings medel Statens Vartskyddssanstalt Vedd. 43:1-58.
- O'BRIEN, R. 1967. Insecticides: action and metabolism. Academic Press. NY, EUA. 332 p. 292-2298.
- POINAR, G. THOMAS, G. 1984. Labostory guide to insect pathogens and parasites. New york, USA. 391 p.
- POPROWSKY, T. 1985. Natural enemies of *Phyllophaga* spp (Col:Scarabaeidae) in the southern Quebec, with especial reference to entomophatogens. Thesis Ph.D. McGill Univ. Montreal, Quebec, Canadá 336p.
- RATH, A. 1992. *M. anisopliae* for control of the tasmanian pasture scarabs *Adoryphorus coulomi*. In Use of pathogens in scarab pest management. T. Glare ed. UK. p 217-228.
- REDMOND, C; POTTER, D. 1995. Lack of efficacy of in vivo and putatevely in vivo produce *B. popilliae* against field population of japanese beetle (Col:Scarabaeidae) grub in Kentuky. J. Econ. Entomol. (USA) 88(4): 846-854.
- RIVERS, R ; PIKE, K. ; MAYO, Z. 1977. Influence of insecticides and corn tillage systems on larval control of *Phyllophaga anxia*. J. Econ. Entomol. (USA) 70 (6) : 794-796.
- ROBERTS, D. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In Microbial Control of Pest and Planth diseases. H. Burges. ed. Academic Press. London. p. 254-298.
- ROMBACH, M; AGUDA, R.; ROBERTS, D. 1988. Production of *B. bassiana* (Deuteromycotina:Hiphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. Entomophaga (Francia) 13 (3):315-324.

- RUEDA, J. 1994. In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba - Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- SALGUERO, V. 1994. Control químico de *Phyllophaga*. In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba-Costa Rica). Resumen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- SAMSON, R. ; EVANS, H. ; LATGE, J. 1988. Atlas of Entomopathogenic fungi. Berlin-alemania. Springer- Verlag. 98p.
- SEMEL, M. 1961. The efficiency of a Polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* for control, of the cabbage looper on cauliflower. J. Econ. Entomol. (USA) 54(4) :698-701.
- SCHWARTZ, P.; TOWNSHEND, B. 1968. Effects of milky disease in haemolymph coagulation and on the number of hemocytes in infected larvae of japanese beetle. J. Inv. Pathol. (USA) 12:(288-293).
- SCHWARTZ, P.; SHARPE, E. 1970. Infectivity of spores of *B. popilliae* produced on laboratory medium. J. Inv. Path. (USA) 15:126-128.
- SHARP, E.; DETRON, Y. 1979. Flat body depletion, a debilitating result of milky disease in japanese beetle larvae. J. Inv. Pathol. (USA) 34:92-94.
- SHAERFENBERG, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycose by the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*. J. Insect Path. (USA) 6(1):8-10.
- SHAI, Y.; GAZIT, E. 1994. A combined syntetiand spectroscopi approach to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. II International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Society of Invertebrate Pathology. Proceedings. Francia.
- SHANNON, P. ; SOTO, J. ; REYES, L. ; ZELAYA, R. ; AYALA, J. 1989. La influencia del tipo de labranza sobre las perdidas en el cultivo de maíz causadas por *Phyllophaga menetriesi* (Col:Scarabaeidae) y otras plagas del suelo. Documento de trabajo. Proyecto Plagas de suelo n ° 5. 2p.

- SHANNON, P.; HIDALGO, E.; SMITH, C.; SMITH S. 1995. In CATIE, Semana Científica Vol. 1. Turrialba, Costa Rica. p 117-119.
- SHANNON, P. 1994. Annual technical report. In Informe Proyecto MIP - Plagas de suelo. p 14-17.
- SHETLAR, D.J. 1994. Turfgrass insect and mite management. In Watschke, T.L.; Dermodeen, P.H.; SHETLAR, D.J. eds. Managing turfgrass pests. Lewis Publishers. Boca Raton. p.171-343.
- ST JULIAN ; BULLA, L.; DETROY, R. 1978. Stored *Bacillus popilliae* spores and their infectivity against *Popillia japonica* larvae. J. Invertebr. Pathol. (USA) 32 (3):258-263.
- ST. JULIAN; HALL; H. 1968. Infection of *Popillia japonica* with heat-activated spores of *Bacillus popilliae*. J. Invert Pathol. (USA) 10: 48-53.
- STATILY, D.; KLEIN, M. 1992. Problems with in vitro production of spores of *B. popilliae* for use in biocontrol of the japanese beetle. J. Inv. Pathol. (USA) 60:283-291.
- STEINHAUS, E. 1949. Principles of insect pathology. New York. Mc Graw and Hill. 757p.
- STEINHAUS, K. 1959. Studies on the milky disease organism; I. Parasitic growth and sporulation of *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol (USA) 74:621-624.
- STEINHAUS, K. 1959. Studies on the milky disease organism; II. Saprophytic growth of *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol (USA) 74:625-632.
- STEINKRAUS, K; TASHIRO, H. 1955. Production of milky disease spores (*B. popilliae* Dutky) and *Bacillus lentimorbus* (Dutky) on artificial media. Science (USA) 121:873-874.
- STOREY,G.; Mc COY,C. 1992. Potencial for biological control of soil insects using microbial pesticides in the Caribbean. Florida Entomologist (EUA) 75(4):533-548.

- STOREY,G.; GARDNER,W. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. *Appl Envl Microbiology* (USA) 52(1): 1-3.
- TAMMES, P. 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Neth.J.Path.* 70 (196):73-80.
- TANADA, Y. 1959. Synergisms between two viruses of the army worm *Pseudoplusia unipuncta* (Haworth)(Lep: Noctuidae). *J. Insect Path* (USA) 1: 215-231.
- TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. *Insect pathology*. California, EE.UU. Academic Press. 666 p.
- TANADA,Y. 1963. Epizootiology of infection disease. In Steinhaus, E.A. de. *Insect Pathology; an advanced treatise*. New York, Academic Press. v2. pp 423-475.
- TURSTON, G. ; KAYA, H. ; BURLANDO, T. ; HARRISON, R. 1993. Milky disease bacterium as a stressor to increase susceptibility of scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. *J. Invertebr. Pathol.* (USA) 61(2) :167-172.
- TURSTON, G. ;KAYA, H. ;GAULER, R. 1994. Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease- infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. *Biol.Control.* (USA) 4(1) : 67-73.
- VAGO, C. 1959. On the pathogenesis of simultaneous virus infection in insects. *J. Invert. Pathol.* (USA) 1: 75-79.
- VAGO,C. 1963. Predispositions and interrelations in insect diseases. In *Insect pathology, An Advanced Treatise*. E. A. Steinhaus ed. New York- USA. Academic Press. Vol I. p. 339 -379.
- VELASQUEZ, A. 1994. In Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga spp.* (Primero, 1994, Turrialba - Costa Rica). Resúmen. Turrialba, Costa Rica. No publicado. sp.
- VEY, A.; GÖTZ ,P. 1986. Antifungal cellular defense mechanism in insects. In Gupta, A.P. ed. *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*. New York, John Willey. pp 89 -115.

- WARREN, G. ; POTTER, D. 1983. Pathogenicity of *Bacillus popilliae* (Cyclocephala strain) and other milky disease bacteria in grubs of the Southern Masked Chafer (Col :Scarabaeidae). J. Invert. Path (USA) 76(1) : 69-73.
- WATANABE, E. 1987. The host population . In Fuxa, J.R. and Tanada, Y eds. Epizootiology of insect diseases. NeYork. John Willey. pp 41-112.
- WEINWER, L. ; CAPITERA, J. 1980. Preliminary study of the white grub *Phyllophaga fimbripes* (Le Conte) (Col :Scarabaeidae). J. Kansas Entom. Soc. (USA) 53 :701-710.
- WEISER, J. 1957. Mikrosporidien der schwommspinner and goldaflers . Z. Ageow. Entomol. 40:509-527.
- WHITE, R. 1940. Survival of tipe A milky disease of japanese beetle larvae under adverse field condition . J. Econ Entom. (EUA) 33(2):303-306.
- WHITE, R. 1946. Effects of the sun's rays upon the viability espores os *B. popilliae* Dutky, the organ causin milky dosease of Japanese beetle larvae. USDA. Bur. Entomol.Path Quar, E 703 . 40.
- WHITE, R.; McCABE, P. 1950. The effect of milky disease on japanese beetle population over a ten year period. USA. Bur, Entomol.Path. Quar. Pub. E-801.
- WILLE,H. 1956. *Bacillus fribourgensis* n. so. errger einer "milky disease" in engerting von *Melontha melolontha*. L. Mittei longer der Schweizerische Entomologische Gesellshatt 29:271-282.
- ZHANG, Z. ; HUANG, X. 1988. Study of influence of *Beauveria bassiana* on oviposition of *Nephotettix cincticeps* and *Nilaparata lugens*. In Study and application of entomogenous fungi in China. Vol 1. Y. Li, Z. Li, Z. Liang, J. Wu, Z. Wu, Q. eds. Academic Pedriodical Press Beijing. p 85 -89
- ZIMMERMAN, G. 1992. Use of the fungus *B. brongniartii*, for the control of European cockchafers *Melolontha* spp In Use of pathogens in scarab pest management. UK. T.Glare ed. p 199 -206.
- ZIMMERMAN,G, 1994. *M. anisopliae* , an entomophatogenic fungus. Pflanzenschutz-Nachrichtes Bayes. (Alemania) 45:113 -128.

# ANEXOS



ANEXO 1. Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento ( 5 repeticion) de larvas de segundo estadio.

Tratamiento	Semanas																								
	1			2			3			4			5			6			7			8			
	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	
b1m2	36.86	0.00	4.00	40.86	14.36	0.00	12.50	26.86	18.71	0.00	2.86	21.57	0.00	0.00	2.86	2.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
m1b2	2.50	2.50	2.50	7.50	2.50	5.00	0.00	7.50	7.50	0.00	12.50	20.00	5.00	2.50	5.00	12.50	0.00	2.50	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
b1m1	15.00	0.00	13.21	28.21	10.71	2.86	0.00	13.57	33.21	0.00	2.50	35.71	5.00	0.00	7.50	12.50	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
b1	31.81	0.00	9.52	41.33	34.19	0.00	5.71	39.90	11.43	0.00	0.00	11.43	3.33	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
m1	0.00	5.71	2.86	8.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	2.50	2.50	0.00	5.36	7.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
b2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	7.50	12.50	2.50	0.00	2.50	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
m2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TO	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

b = *Beauveria bassiana*  
m = *Metarhizium anisopliae*  
a = asintomaticas  
T = total

ANEXO 2. Mortalidad acumulada por sintomatología de cada tratamiento a los 60 días.  
Larvas de segundo estadio

Tratamiento	Sintomatologías			
	% b	% m	% a	%T
b1m2	69.93	0.00	22.21	92.14
m1b2	20.00	12.50	22.50	55.00
b1m1	63.93	2.86	25.71	92.50
b1	80.76	0.00	15.24	96.00
m1	0.00	10.71	8.21	18.93
b2	15.00	0.00	15.00	30.00
m2	0.00	0.00	0.00	0.00
T0	0.00	0.00	7.50	7.50

b = *Beauveria bassiana*  
m = *Metarhizium anisopliae*  
a = asintomaticas  
T = total

ANEXO 3. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a *B. bassiana* en larvas de segundo estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
1 blm2 4 5
1 m1b2 0 8
1 blm1 8 8
1 b1 5 6
1 m1 0 8
1 b2 0 8
1 m2 0 8
1 T0 0 8
2 blm2 5 7
2 m1b2 1 8
2 blm1 4 7
2 b1 5 6
2 m1 0 7
2 b2 2 8
2 m2 0 8
2 T0 0 8
3 blm2 7 8
3 m1b2 1 8
3 blm1 4 8
3 b1 4 7
3 m1 0 8
3 b2 1 8
3 m2 0 8
3 T0 0 8
4 blm2 1 4
4 m1b2 2 8
4 blm1 5 8
4 b1 7 7
4 m1 0 7
4 b2 3 8
4 m2 0 8
4 T0 0 8
5 blm2 6 7
5 m1b2 1 8
5 blm1 2 8
5 b1 4 5
5 m1 0 8
5 b2 0 8
5 m2 0 7
5 T0 0 8

```

;

```

data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model p logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci walddci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 4. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
1      b1m2          0      5
1      m1b2          3      8
1      b1m1          0      8
1      b1            0      6
1      m1            1      8
1      b2            0      8
1      m2            0      8
1      T0           0      8
2      b1m2          0      7
2      m1b2          1      8
2      b1m1          1      7
2      b1            0      6
2      m1            0      7
2      b2            0      8
2      m2            0      8
2      T0           0      8
3      b1m2          0      8
3      m1b2          1      8
3      b1m1          0      8
3      b1            0      7
3      m1            1      8
3      b2            0      8
3      m2            0      8
3      T0           0      8
4      b1m2          0      4
4      m1b2          2      8
4      b1m1          0      8
4      b1            0      7
4      m1            2      7
4      b2            0      8
4      m2            0      8
4      T0           0      8
5      b1m2          0      7
5      m1b2          0      8
5      b1m1          0      8
5      b1            0      5
5      m1            0      8
5      b2            0      8
5      m2            0      7
5      T0           0      8

```

```

;
data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model p logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci walddci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 5. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para larvas que no manifestaron síntomas ni de *B. bassiana* ni *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
1 blm2 1 5
1 mlb2 2 8
1 blm1 0 8
1 b1 1 6
1 m1 0 8
1 b2 1 8
1 m2 0 8
1 T0 1 8
2 blm2 1 7
2 mlb2 0 8
2 blm1 2 7
2 b1 1 6
2 m1 1 7
2 b2 2 8
2 m2 0 8
2 T0 0 8
3 blm2 1 8
3 mlb2 3 8
3 blm1 4 8
3 b1 3 7
3 m1 0 8
3 b2 2 8
3 m2 0 8
3 T0 1 8
4 blm2 2 4
4 mlb2 1 8
4 blm1 3 8
4 b1 0 7
4 m1 1 7
4 b2 0 8
4 m2 0 8
4 T0 0 8
5 blm2 1 7
5 mlb2 1 8
5 blm1 4 8
5 b1 0 5
5 m1 1 8
5 b2 1 8
5 m2 0 7
5 T0 1 8
;

```

```

data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model p logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci waldci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```



ANEXO 6. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para la mortalidad total de larvas de segundo estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
1 blm2 5 5
1 mlb2 5 8
1 blm1 8 8
1 b1 6 6
1 m1 1 8
1 b2 1 8
1 m2 0 8
1 T0 1 8
2 blm2 6 7
2 mlb2 2 8
2 blm1 7 7
2 b1 6 6
2 m1 1 7
2 b2 4 8
2 m2 0 8
2 T0 0 8
3 blm2 8 8
3 mlb2 5 8
3 blm1 8 8
3 b1 7 7
3 m1 1 8
3 b2 3 8
3 m2 0 8
3 T0 1 8
4 blm2 3 4
4 mlb2 5 8
4 blm1 8 8
4 b1 7 7
4 m1 3 7
4 b2 3 8
4 m2 0 8
4 T0 0 8
5 blm2 7 7
5 mlb2 2 8
5 blm1 6 8
5 b1 4 5
5 m1 1 8
5 b2 1 8
5 m2 0 7
5 T0 1 8

```

```

;
data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model p logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci walhci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 7. Programa usado para el análisis de tiempos letales PROC LIFEREG para larvas de segundo estadio.

```

data a;
input rep trat $ semana frec censor control;
cards;
  1 b1      .   1   0   1
  1 m1      .   1   0   1
  1 b2      .   1   0   1
  1 m2      .   1   0   1
  1 b1m1    .   1   0   1
  1 b1m2    .   1   0   1
  1 m1b2    .   1   0   1
  1 T0      .   1   0   1
  2 b1      .   1   0   1
  2 m1      .   1   0   1
  2 b2      .   1   0   1
  2 m2      .   1   0   1
  2 b1m1    .   1   0   1
  2 b1m2    .   1   0   1
  2 m1b2    .   1   0   1
  2 T0      .   1   0   1
  3 b1      .   1   0   1
  3 m1      .   1   0   1
  3 b2      .   1   0   1
  3 m2      .   1   0   1
  3 b1m1    .   1   0   1
  3 b1m2    .   1   0   1
  3 m1b2    .   1   0   1
  3 T0      .   1   0   1
  4 b1      .   1   0   1
  4 m1      .   1   0   1
  4 b2      .   1   0   1
  4 m2      .   1   0   1
  4 b1m1    .   1   0   1
  4 b1m2    .   1   0   1
  4 m1b2    .   1   0   1
  4 T0      .   1   0   1
  5 b1      .   1   0   1
  5 m1      .   1   0   1
  5 b2      .   1   0   1
  5 m2      .   1   0   1
  5 b1m1    .   1   0   1
  5 b1m2    .   1   0   1
  5 m1b2    .   1   0   1
  5 T0      .   1   0   1
  1 b1m2    1   2   0   0
  1 b1m2    2   1   0   0
  1 b1m2    3   2   0   0
  1 b1m2    8   0   1   0
  1 m1b2    1   1   0   0
  1 m1b2    2   2   0   0
  1 m1b2    4   1   0   0
  1 m1b2    5   1   0   0

```

1	mlb2	8	3	1	0
1	blm1	1	1	0	0
1	blm1	2	1	0	0
1	blm1	3	5	0	0
1	blm1	4	1	0	0
1	blm1	8	0	1	0
1	b1	1	2	0	0
1	b1	2	3	0	0
1	b1	4	1	0	0
1	b1	8	0	1	0
1	m1	4	1	0	0
1	m1	8	7	1	0
1	b2	4	1	0	0
1	b2	8	7	1	0
1	m2	8	8	1	0
1	T0	6	1	0	0
1	T0	8	7	1	0
2	blm2	1	4	0	0
2	blm2	2	1	0	0
2	blm2	4	1	0	0
2	blm2	8	1	1	0
2	mlb2	4	2	0	0
2	mlb2	8	6	1	0
2	blm1	1	2	0	0
2	blm1	2	3	0	0
2	blm1	3	2	0	0
2	blm1	8	0	1	0
2	b1	1	2	0	0
2	b1	2	4	0	0
2	b1	8	0	1	0
2	m1	1	1	0	0
2	m1	8	6	1	0
2	b2	2	2	0	0
2	b2	4	1	0	0
2	b2	7	1	0	0
2	b2	8	4	1	0
2	m2	8	0	1	0
2	T0	8	8	1	0
3	blm2	1	2	0	0
3	blm2	2	4	0	0
3	blm2	3	2	0	0
3	blm2	8	0	1	0
3	mlb2	3	3	0	0
3	mlb2	5	1	0	0
3	mlb2	8	1	0	0
3	mlb2	8	3	1	0
3	blm1	1	4	0	0
3	blm1	3	1	0	0
3	blm1	4	3	0	0
3	blm1	8	0	1	0
3	b1	1	4	0	0
3	b1	2	2	0	0
3	b1	3	1	0	0
3	b1	8	0	1	0
3	m1	3	1	0	0

3	m1	8	7	1	0
3	b2	3	2	0	0
3	b2	7	1	0	0
3	b2	8	5	1	0
3	m2	8	8	1	0
3	T0	1	1	0	0
3	T0	8	7	1	0
4	b1m2	1	1	0	0
4	b1m2	2	2	0	0
4	b1m2	8	1	1	0
4	m1b2	1	1	0	0
4	m1b2	4	4	0	0
4	m1b2	8	3	1	0
4	b1m1	1	2	0	0
4	b1m1	2	1	0	0
4	b1m1	3	5	0	0
4	b1m1	8	0	1	0
4	b1	1	3	0	0
4	b1	2	1	0	0
4	b1	3	3	0	0
4	b1	8	0	1	0
4	m1	1	2	0	0
4	m1	4	1	0	0
4	m1	8	4	1	0
4	b2	3	2	0	0
4	b2	8	1	0	0
4	b2	8	5	1	0
4	m2	8	8	1	0
4	T0	8	8	1	0
5	b1m2	1	4	0	0
5	b1m2	3	3	0	0
5	b1m2	8	0	1	0
5	m1b2	4	2	0	0
5	m1b2	8	6	1	0
5	b1m1	1	1	0	0
5	b1m1	3	3	0	0
5	b1m1	4	1	0	0
5	b1m1	5	1	0	0
5	b1m1	8	2	1	0
5	b1	1	2	0	0
5	b1	2	2	0	0
5	b1	8	1	1	0
5	m1	4	1	0	0
5	m1	8	7	1	0
5	b2	3	1	0	0
5	b2	8	7	1	0
5	m2	8	7	1	0
5	T0	4	1	0	0
5	T0	8	7	1	0

```

proc print;
proc lifereg outest=models covout;
Class rep trat;
weight freq;
A:model semana*censor(1)=rep trat / dist=weibull;

```

```
output out=out quantiles= .1 .3 .5 std=std p=predtime
control=control;
data out;set out;
      var=std*std;

PROC SORT; By trat _PROB_;
proc means mean noprint;
  By trat _PROB_;
  var PREDTIME var;
  output out=b mean= PREDTIME var;

data b;set b;
  std=sqrt(var/5);

proc print;*var trat _PROB_ PREDTIME std;
proc print;*var trat _PROB_ PREDTIME std;

run;
□
```

ANEXO 8. Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento ( 5 repeticiones).  
Larvas de tercer estadio.

Tratamientos	1			2			3			4			5			6			7			8			9									
	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T	% b	% m	% a	% T						
b1m2	7.50	0.00	2.50	10.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	17.50	0.00	0.00	17.50	2.50	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	2.50	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
m1b2	5.00	0.00	2.50	7.50	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	2.50	30.00	0.00	2.50	22.50	10.00	0.00	0.00	10.00	7.50	0.00	2.50	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
b1m1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
b1	2.50	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	5.00	15.00	0.00	0.00	15.00	12.50	0.00	0.00	12.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
m1	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
b2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50	0.00	0.00	12.50	7.50	0.00	2.50	10.00	5.00	0.00	0.00	5.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
m2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
T0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

b = *B. bassiana*  
m = *M. anisopliae*  
a = asintomáticas  
T = total

ANEXO 9. Mortalidad acumulada por sintomatología de cada tratamiento a los 60 días.  
Larvas de tercer estadio

Tratamiento	Sintomatología			
	% b	% m	% a	% T
b1m2	35.00	0.00	0.00	42.50
m1b2	45.00	0.00	10.00	55.00
b1m1	12.50	0.00	2.50	15.00
b1	45.00	0.00	7.50	52.50
m1	0.00	2.50	2.50	5.00
b2	35.00	0.00	5.00	40.00
m2	0.00	0.00	10.00	10.00
T0	0.00	0.00	10.00	10.00

b = *B. bassiana*  
m = *M. anisopliae*  
a = asintomáticas  
T = total



ANEXO 10. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a *B. bassiana* en larvas de tercer estadio.

```

data a;
length survive $3;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
  1   blm2           3       8
  1   mlb2           6       8
  1   blm1           0       8
  1   b1             6       8
  1   m1             0       8
  1   b2             3       8
  1   m2             0       8
  1   T0             0       8
  2   blm2           2       8
  2   mlb2           5       8
  2   blm1           0       8
  2   b1             2       8
  2   m1             0       8
  2   b2             3       8
  2   m2             0       8
  2   T0             0       8
  3   blm2           6       8
  3   mlb2           3       8
  3   blm1           2       8
  3   b1             5       8
  3   m1             0       8
  3   b2             5       8
  3   m2             0       8
  3   T0             0       8
  4   blm2           0       8
  4   mlb2           2       8
  4   blm1           1       8
  4   b1             2       8
  4   m1             0       8
  4   b2             0       8
  4   m2             0       8
  4   T0             0       8
  5   blm2           3       8
  5   mlb2           2       8
  5   blm1           2       8
  5   b1             3       8
  5   m1             0       8
  5   b2             3       8

```

```

      5   m2           0   8
      5   T0          0   8
;
data a;set a;

proc glm;
  classes rep trat;
  model logit=rep trat;
  means trat/tukey;
  contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
  contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
  contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
  contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
  contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
  contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
  contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
  contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
  contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
  make 'LRCI' out=CI1;
  make 'WALDCI' out=CI2;

  classes rep trat;
  model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci walddci;
  contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
  contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
  contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
  contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
  contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
  contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
  contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
  contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
  contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 11. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para síntomas asociados a *M. anisopliae* en larvas de tercer estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log (p1/(1-p1));
datalines;
  1   b1m2           0           8
  1   m1b2           0           8
  1   b1m1           0           8
  1   b1             0           8
  1   m1             0           8
  1   b2             0           8
  1   m2             0           8
  1   T0             0           8
  2   b1m2           0           8
  2   m1b2           0           8
  2   b1m1           0           8
  2   b1             0           8
  2   m1             0           8
  2   b2             0           8
  2   m2             0           8
  2   T0             0           8
  3   b1m2           0           8
  3   m1b2           0           8
  3   b1m1           0           8
  3   b1             0           8
  3   m1             1           8
  3   b2             0           8
  3   m2             0           8
  3   T0             0           8
  4   b1m2           0           8
  4   m1b2           0           8
  4   b1m1           0           8
  4   b1             0           8
  4   m1             0           8
  4   b2             0           8
  4   m2             0           8
  4   T0             0           8
  5   b1m2           0           8
  5   m1b2           0           8
  5   b1m1           0           8
  5   b1             0           8
  5   m1             0           8
  5   b2             0           8

```

```

      5      m2      0      8
      5      T0     0      8
;
data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'  trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'  trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'  trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'  trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'  trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'  trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'   trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'   trat 1 -1 1 0 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'   trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci waldci;
contrast 'blm2 vs b1'  trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'  trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'  trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'  trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'  trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'  trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'   trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'   trat 1 -1 1 0 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'   trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 12. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para larvas de tercer estadio que no manifestaron síntomas ni de *B. bassiana* ni *M. anisopliae*.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
  1   b1m2           2       8
  1   mlb2           0       8
  1   b1m1           0       8
  1   b1             0       8
  1   m1             0       8
  1   b2             0       8
  1   m2             0       8
  1   T0             0       8
  2   b1m2           0       8
  2   mlb2           1       8
  2   b1m1           0       8
  2   b1             0       8
  2   m1             0       8
  2   b2             2       8
  2   m2             2       8
  2   T0             0       8
  3   b1m2           1       8
  3   mlb2           2       8
  3   b1m1           1       8
  3   b1             1       8
  3   m1             1       8
  3   b2             0       8
  3   m2             0       8
  3   T0             4       8
  4   b1m2           0       8
  4   mlb2           0       8
  4   b1m1           0       8
  4   b1             1       8
  4   m1             0       8
  4   b2             0       8
  4   m2             2       8
  4   T0             0       8
  5   b1m2           0       8
  5   mlb2           1       8
  5   b1m1           0       8
  5   b1             1       8
  5   m1             0       8
  5   b2             0       8
  5   m2             0       8
  5   T0             0       8

```

```

;
data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci walddci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;
□

```

ANEXO 13. Programa usado para el análisis de varianza PROC GLM y PROC GENMODE para la mortalidad total de larvas de tercer estadio.

```

data a;
input rep trat $ count n;
p=(count/n)*100;
p1=p/100;
arc=arsin (sqrt(p1));
if count=n then p1=1-(1/(2*n));
if count=0 then p1=1/(2*n);
logit=log(p1/(1-p1));
datalines;
  1   b1m2           5           8
  1   m1b2           6           8
  1   b1m1           0           8
  1   b1             6           8
  1   m1             0           8
  1   b2             3           8
  1   m2             0           8
  1   T0             0           8
  2   b1m2           2           8
  2   m1b2           6           8
  2   b1m1           0           8
  2   b1             2           8
  2   m1             0           8
  2   b2             5           8
  2   m2             2           8
  2   T0             0           8
  3   b1m2           7           8
  3   m1b2           5           8
  3   b1m1           3           8
  3   b1             6           8
  3   m1             2           8
  3   b2             5           8
  3   m2             0           8
  3   T0             4           8
  4   b1m2           0           8
  4   m1b2           2           8
  4   b1m1           1           8
  4   b1             3           8
  4   m1             0           8
  4   b2             0           8
  4   m2             2           8
  4   T0             0           8
  5   b1m2           3           8
  5   m1b2           3           8
  5   b1m1           2           8
  5   b1             4           8
  5   m1             0           8
  5   b2             3           8
  5   m2             0           8
  5   T0             0           8

```

```

;
data a;set a;
if survive='yes' then delete;

proc glm;
classes rep trat;
model logit=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc glm;
classes rep trat;
model arc=rep trat;
means trat/tukey;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

proc genmod;
make 'LRCI' out=CI1;
make 'WALDCI' out=CI2;

classes rep trat;
model count/n=rep trat/dist=bin link=logit lrci waldci;
contrast 'blm2 vs b1'   trat 0 -1 0 1 0 0 0 0;
contrast 'mlb2 vs m1'   trat 0 0 0 0 -1 1 0 0;
contrast 'blm1 vs m1'   trat 0 0 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'blm1 vs b1'   trat 0 -1 1 0 0 0 0 0;
contrast 'blm2 vs m2'   trat 0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'mlb2 vs b2'   trat 0 0 0 0 -1 0 1 0;
contrast 'b2 int m1'    trat 1 0 0 0 -1 -1 1 0;
contrast 'b1 int m1'    trat 1 -1 1 0 0 -1 0 0;
contrast 'b1 int m2'    trat 1 -1 0 1 0 0 0 -1;

run;

```



ANEXO 14. Programa usado para el análisis de tiempos letales PROC LIFEREG para larvas de tercer estadio.

```

data a;
input rep trat $ semana frec censor control;
cards;
1 b1 . 1 0 1
1 m1 . 1 0 1
1 b2 . 1 0 1
1 m2 . 1 0 1
1 blm1 . 1 0 1
1 blm2 . 1 0 1
1 mlb2 . 1 0 1
1 T0 . 1 0 1
2 b1 . 1 0 1
2 m1 . 1 0 1
2 b2 . 1 0 1
2 m2 . 1 0 1
2 blm1 . 1 0 1
2 blm2 . 1 0 1
2 mlb2 . 1 0 1
2 T0 . 1 0 1
3 b1 . 1 0 1
3 m1 . 1 0 1
3 b2 . 1 0 1
3 m2 . 1 0 1
3 blm1 . 1 0 1
3 blm2 . 1 0 1
3 mlb2 . 1 0 1
3 T0 . 1 0 1
4 b1 . 1 0 1
4 m1 . 1 0 1
4 b2 . 1 0 1
4 m2 . 1 0 1
4 blm1 . 1 0 1
4 blm2 . 1 0 1
4 mlb2 . 1 0 1
4 T0 . 1 0 1
5 b1 . 1 0 1
5 m1 . 1 0 1
5 b2 . 1 0 1
5 m2 . 1 0 1
5 blm1 . 1 0 1
5 blm2 . 1 0 1
5 mlb2 . 1 0 1
5 T0 . 1 0 1
1 blm2 2 2 0 0
1 blm2 5 1 0 0
1 blm2 6 1 0 0
1 blm2 7 1 0 0
1 blm2 9 3 1 0
1 mlb2 5 3 0 0
1 mlb2 6 2 0 0
1 mlb2 7 1 0 0
1 mlb2 9 2 1 0

```

1	blm1	9	8	1	0
1	b1	3	2	0	0
1	b1	4	1	0	0
1	b1	5	2	0	0
1	b1	9	2	1	0
1	m1	9	8	1	0
1	b2	3	2	0	0
1	b2	6	1	0	0
1	b2	9	5	1	0
1	m2	9	8	1	0
1	T0	9	8	1	0
2	blm2	1	2	0	0
2	blm2	2	1	0	0
2	blm2	9	7	1	0
2	mlb2	4	1	0	0
2	mlb2	5	2	0	0
2	mlb2	6	2	0	0
2	mlb2	7	1	0	0
2	mlb2	9	2	1	0
2	blm1	9	8	1	0
2	b1	3	1	0	0
2	b1	4	1	0	0
2	b1	9	6	1	0
2	m1	9	8	1	0
2	b2	2	1	0	0
2	b2	3	2	0	0
2	b2	5	2	0	0
2	b2	9	3	1	0
2	m2	7	1	0	0
2	m2	8	1	0	0
2	m2	9	6	1	0
2	T0	9	8	1	0
3	blm2	1	2	0	0
3	blm2	5	5	0	0
3	mlb2	1	2	0	0
3	mlb2	2	1	0	0
3	mlb2	5	2	0	0
3	mlb2	9	3	1	0
3	blm1	4	1	0	0
3	blm1	5	1	0	0
3	blm1	7	1	0	0
3	blm1	9	5	1	0
3	b1	2	1	0	0
3	b1	4	1	0	0
3	b1	5	3	0	0
3	b1	8	1	0	0
3	b1	9	2	1	0
3	m1	1	1	0	0
3	m1	5	1	0	0
3	m1	9	6	1	0
3	b2	3	1	0	0
3	b2	5	1	0	0
3	b2	7	1	0	0
3	b2	9	2	1	0
3	m2	9	8	1	0
3	T0	5	2	0	0
3	T0	6	1	0	0
3	T0	9	1	0	0

3	T0	9	4	1	0
4	blm2	9	8	1	0
4	mlb2	7	2	0	0
4	m1b2	9	6	1	0
4	blm1	7	1	0	0
4	blm1	9	7	1	0
4	b1	3	1	0	0
4	b1	4	1	0	0
4	b1	8	1	0	0
4	b1	9	5	1	0
4	m1	9	8	1	0
4	b2	9	8	1	0
4	m2	7	2	0	0
4	m2	9	8	1	0
4	T0	9	8	1	0
5	blm2	3	1	0	0
5	blm2	5	1	0	0
5	blm2	7	1	0	0
5	blm2	9	5	1	0
5	mlb2	1	1	0	0
5	m1b2	5	2	0	0
5	m1b2	9	5	1	0
5	blm1	2	1	0	0
5	blm1	3	1	0	0
5	blm1	9	6	1	0
5	b1	2	1	0	0
5	b1	3	2	0	0
5	b1	4	1	0	0
5	b1	9	4	1	0
5	m1	9	8	1	0
5	b2	5	1	0	0
5	b2	6	1	0	0
5	b2	7	1	0	0
5	b2	9	5	1	0
5	m2	9	8	1	0
5	T0	9	8	1	0

```

;
proc print;
proc lifereg outest=models covout;
Class rep trat;
weight freq;
A:model semana*censor(1)=rep trat / dist=weibull;
output out=out quantiles= .1 .3 .5 std=std p=predtime
control=control;
proc print;
run;
data out ; set out;
var = std*std;

proc sort;by trat _prob_;
proc means mean noprint;
by trat _prob_;
var predtime var;
output out=b mean=predtime var;

data b; set b;
std=sqrt (var/5);

```

```
proc print;*var trat _prob_ predtime std;
```

```
run;
```

```
□
```

ANEXO 15 Promedio de mortalidades semanales por sintomatología de cada tratamiento ( 5 repeticiones) en larvas de tercer estadio

Tratamientos	Semana																	
	1						2						3					
	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	
m1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
b1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1m2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1b2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
T0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	

Tratamientos	Semana																	
	4						5						6					
	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	
m1	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	2.50	12.50	0.00	0.00	15.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
b1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	32.50	0.00	0.00	0.00	0.00	32.50	7.50	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	
bp1m2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1b2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	0.00	5.00	0.00	0.00	25.00	15.00	0.00	0.00	0.00	2.50	
T0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Tratamientos	Semana																	
	7						8						9					
	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	% t	%b	% m	% a	% bp	% mix	
m1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	
b1	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
bp1m2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	
bp1b2	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	
T0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

b = *B. bassiana*  
m = *M. anisopliae*  
a = asintomaticas  
pb = *B. popilliae*  
mix = sintomatología asociada a dos entomopatogenos  
t = total

ANEXO 16. Mortalidad acumulada a los 60 días en larvas de tercer estadio

Tratamientos	Sintomatología					
	b	m	a	bp	mix	t
m1	0.00	5.00	17.50	0.00	0.00	22.50
b1	45.00	0.00	2.50	0.00	0.00	47.50
bp1	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	2.50
bp1m2	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50
bp1b2	40.00	0.00	7.50	0.00	2.50	50.00
T0	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	2.50

b = *B. bassiana*

m = *M. anisopliae*

a = asintomaticas

pb = *B. popilliae*

mix = sintomatología asociada a dos entomopatógenos

t = total