



Solutions for environment and development
Soluciones para el ambiente y desarrollo

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

ESCUELA DE POSGRADO

**Potencial del uso de hongos entomopatógenos para el control de
cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en producción orgánica de piña
(*Ananas comosus*)**

por

Wilkin Vladimir Gratereaux Báez

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2009

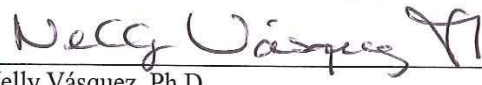
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

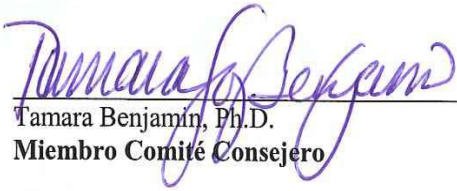
FIRMANTES:



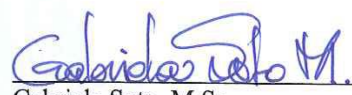
Eduardo Hidalgo, M.Sc.
Consejero Principal



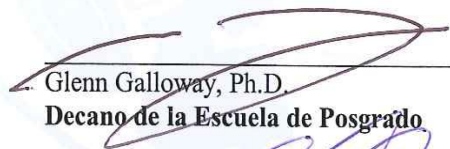
Nelly Vásquez, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



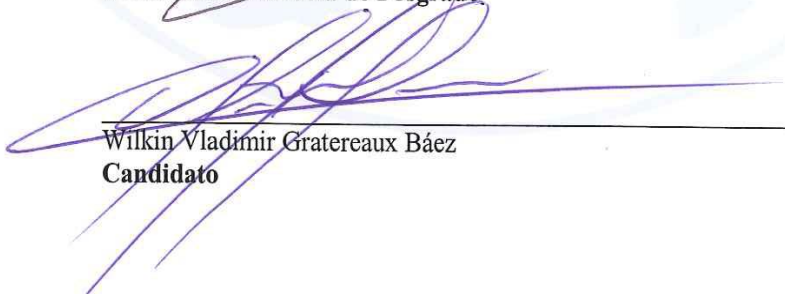
Tamara Benjamín, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gabriela Soto, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Wilkin Vladimir Gratereaux Báez
Candidato

DEDICATORIA

A Dios fuente de todo poder, por darme el conocimiento y la salud para llegar a este punto de la vida “todo lo puedo en Cristo que me fortalece”, por concederme disfrutar estos buenos momentos que he recibido, puesto que sin El “mi camino, mi verdad y mi vida” no podría tener la oportunidad de reconocer su presencia en el andar de mi vida.

A mi madre, Ana Fiordaliza Báez, por sus días de trabajo y sus noches de desvelo para educarme y apoyarme en las decisiones que he tomado en mi vida; por sus constantes oraciones hacia nuestro creador para que brille su luz divina ante sus hijos.

A mi padre, Francisco Gratereaux (Q. E. P. D.), por ser quien junto a mi madre me dio la vida y desde el infinito esta velando mis sueños, orando a Dios para que pueda ser un hombre de bien y pueda alcanzar mis metas siendo un hombre de éxitos.

A mis hermanos, Francisco Guillermo, Cristian Wilfredo, José Delio, Evelyn Rossarina, Luis Francisco, Wandy José y Francisco Martín, porque me han dado su apoyo para que pueda prepararme en la vida alcanzando un peldaño más en la escalera del conocimiento.

Oración “Dios mío”

Señor ayúdame a decir la verdad delante de los fuertes y a no mentir para ganarme el aplauso de los débiles. Si me das fortuna, no me quites la razón. Si me das éxito, no me quites la humildad. Si me das la humildad, no quites mi dignidad. Enséñame a querer a la gente como a ti mismo y a no juzgarme como a los demás. No me dejes caer en el orgullo si triunfo, ni en la desesperación si fracaso. Más bien recuérdame que el fracaso es la experiencia que precede al triunfo. Enséñame que perdonar es lo más grande del fuerte y que la venganza es la primera señal de la debilidad. Si me quitas el éxito, déjame fuerzas para triunfar del fracaso. Si me despojas del don de la salud déjame la gracia de la fe. Si yo faltara a la gente dame valor para disculparme y si la gente faltara conmigo dame valor para perdonar (Mahatma Gandhi).

¡Señor mío si yo me olvido de ti, tú no te olvides de mí! Amén.

AGRADECIMIENTOS

Al comité asesor: M.Sc. Eduardo Hidalgo, M.Sc. Gabriela Soto, Ph.D. Tamara Benjamin, Dra. Nelly Vásquez, por asesorar y apoyar constantemente el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la fundación PROAGROIN, en representación de Jessica Linares, Jorge..... por ser parte fundamental en el desarrollo de esta investigación.

Al profesor de la EARTH M.Sc. Edgar Alvarado, por su colaboración al inicio de mi investigación.

A Ing. Diana Fernanda Lara, por el apoyo y la ayuda prestada para que se cumpliera este anhelo de mi vida.

A los productores; el Sr. José Brenes, Marvin Mora, Esteban Mora de la comunidad de la Españolita, Municipio de Río Cuarto de Grecia, por facilitarnos sus fincas para llevar a cabo esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Claudio Arroyo, Hjalmar Morales, por colaborarme y ayudarme a desarrollar la parte de laboratorio.

A mis compañeros de maestría y de promoción, por todos los aportes e ideas que me dieron y por todos los momentos tan agradables que compartimos juntos.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

BIOGRAFÍA

El autor nació en Constanza, provincia La Vega, República Dominicana el 20 de enero del 1980. Realizó sus estudios primarios en el colegio Nuestra Señora del Valle y su bachillerato lo cursó en la Escuela Agrícola Salesiana donde obtuvo el título de bachiller técnico agrícola. En el año 2004 se graduó de ingeniero agrónomo en la Universidad Católica Tecnológica del Cibao (UCATECI). Desde entonces ha brindado sus servicios profesionales como representante de ventas de agroquímicos, encargado de almacén, producción de plántulas y como encargado sub-zonal de la secretaria de Estado de agricultura. En enero del 2008 ingresa al Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza CATIE, para obtener la maestría en Agricultura Ecológica graduándose en diciembre del 2009.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
BIOGRAFÍA.....	V
CONTENIDO.....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XI
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos del estudio.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
1.2 Hipótesis del estudio.....	2
2 MARCO CONCEPTUAL.....	3
2.1 La piña (<i>Ananas comosus</i>).....	3
2.2 Descripción botánica.....	3
2.3 Principales variedades comerciales.....	5
2.4 Clima y suelo.....	5
2.5 Manejo del cultivo.....	6
2.6 Enfermedades.....	8
2.6.1 Podredumbre del corazón y las raíces (<i>Phytophthora parasitica</i> y <i>P. cinnamoni</i>).....	8
2.6.2 Pudrición de los retoños.....	9
2.6.3 Veteado de la fruta.....	9
2.6.4 Marchites roja (<i>Wilt</i>).....	9
2.7 Plagas.....	9

2.7.1	<i>Cochinilla (Dysmicoccus brevipes)</i>	10
2.7.1.1	Clasificación taxonómica de las cochinillas	11
2.7.1.2	Ciclo de vida de la cochinilla.....	12
2.7.1.3	Morfología, anatomía, biología y ecología de la cochinilla.....	12
2.8	Control biológico.....	16
2.9	Formulación de hongos entomopatógenos	18
2.9.1	<i>Control de calidad de las formulaciones</i>	20
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1	Ubicación y descripción de estudio.....	21
3.1.1	<i>Fase de laboratorio</i>	21
3.1.1.1	Preselección de cepas.....	21
3.1.1.2	Diseño experimental	23
3.1.1.3	Selección de cepas en invernadero.....	23
3.1.1.4	Diseño experimental	25
3.1.1.5	Reproducción y formulación de inóculo para prueba de campo.....	25
3.1.2	<i>Fase de campo</i>	27
3.1.2.1	Evaluación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo.....	28
3.1.2.2	Análisis estadístico.....	29
3.1.2.3	Estimación de la población residual de cochinillas en el campo	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Fase de laboratorio	32
4.1.1	<i>Preselección de cepas</i>	32
4.1.2	<i>Selección de cepas en invernadero</i>	33
4.2	Fase de campo	35
4.2.1	<i>Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo</i>	35
4.2.2	<i>Estimación de la población residual de cochinillas en el campo</i>	40
5	DISCUSIÓN GENERAL	42
5.1.1	<i>Preselección de cepas</i>	42
5.1.2	<i>Selección de cepas en invernadero</i>	43

5.1.3	<i>Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo</i>	44
5.1.4	<i>Estimación de la población residual de cochinillas en el campo</i>	46
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
6.1	Fase de laboratorio	50
6.1.1	<i>Preselección de cepas</i>	50
6.1.2	<i>Selección de cepas en invernadero</i>	50
6.2	Fase de campo	51
6.2.1	<i>Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo</i>	51
6.2.2	<i>Estimación de la población residual de cochinillas en el campo</i>	52
7	BIBLIOGRAFIA	54
	ANEXOS	62

Citar: Gratereaux, W. V. 2009. Potencial del uso de hongos entomopatógenos para el control de cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en producción orgánica de piña (*Ananas comosus*). Thesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: Control biológico de cochinillas, Formulaciones de hongos entomopatógenos, Piña orgánicas.

RESUMEN

La piña (*Ananas comosus*) es la tercera fruta tropical en volumen de producción a nivel mundial después del banano y el mango, con 18,8 millones de toneladas métricas en el 2007. En la actualidad, Costa Rica es el mayor productor de las variedades más cotizadas en los principales mercados de exportación, tales como Champaka F-153 y la variedad MD2. El principal problema en el cultivo de piña orgánica es la cochinilla *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: pseudococcidae), debido al daño causado por succión de savia, por ser el vector del virus del marchitamiento de la piña (PMW a V) y además por medidas cuarentenarias las cuales son la causa del rechazo de embarcaciones completas en los principales países importadores de piña. Este trabajo se ha basado en el control biológico de esta plaga mediante el uso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces ssp.* Una selección de cepas de estos hongos fue realizada bajo condiciones de laboratorio, usando grupos de cuatro y cinco cepas de la misma especie del hongo; estas cepas fueron mezcladas y aplicadas sobre cochinillas a una concentración de 5×10^7 conidios. Porcentajes de mortalidad de entre 33,33 y 100% fueron encontrados 14 días después se realizó la aplicación. En una segunda fase, se evaluó el tratamiento que presentó la mayor mortalidad (BII) a nivel de laboratorio, sobre cochinillas inoculadas artificialmente en plantas de piña de tres meses de edad bajo condiciones de invernadero. Las cepas contenidas en el Tratamiento BII (A3, 0410 y B-B56-16) fueron producidas individualmente y posteriormente mezcladas en todas sus posibles combinaciones para detectar sinergismos. Un total de 16 tratamientos fueron aplicados, alcanzando porcentajes de mortalidad de 26,92 a 54,32% luego de 14 días de evaluación. La mayor mortalidad fue producida por el Tratamiento 12 (cepas A3, 0410 y B-B56-16) con 54,32%, seguido de los Tratamientos 11 (cepas A3, 0421 y 0410), Tratamiento 9 (cepas 0421 y B-B56-16) y Tratamiento 3 (cepa 0410) con 53,50; 51,90 y

50,15% de mortalidad respectivamente. La cepa 0410 fue seleccionada para la fase de campo y fue aplicada en parcelas comerciales de piña orgánica usando dos diferentes formulaciones: líquida (basada en blastosporas y micelio) y polvo mojable (conidios + ingrediente inerte, aplicados en suspensión acuosa con 0,001% de aceite emulsificable) con dos dosis: 3×10^{13} conidios/ha como dosis alta y 3×10^{12} con/ha como dosis baja. Los tratamientos evaluados no presentaron mortalidad durante el periodo de evaluación, debido a factores no determinados en ese estudio. Adicionalmente se evaluaron métodos para la detección de poblaciones residuales de cochinillas usando muestras de suelo en terrenos preparados para el establecimiento de nuevas plantaciones de piña. Los métodos demostraron ser eficientes en la recolección de cochinillas inoculadas artificialmente bajo condiciones de invernadero mas no así cuando fueron usados en campo, probablemente debido a bajas poblaciones presentes en los campos seleccionados.

Mentions: Gratereaux, W. V. 2009. Potential of entomopathogenic fungi for the control of mealybugs (*Dysmicoccus brevipes*) in organic production of pineapple (*Ananas comosus*). Thesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Key words: biological Control of mealybugs, Formulations of entomopathogenic fungi, organic Pineapple.

ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus*) is the third tropical fruit in volume of production worldwide after bananas and mango, with a total of 18,8 million metric tons in 2007. At present, Costa Rica is the major producer of the most quoted varieties in the principal markets of exportation, such as Champaka F-153 and MD2. The main problem in organic pineapple production is the mealybug *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: pseudococcidae), due to direct damage produced by suction of sap, it's condition as vector of the Pineapple Mealybugs Wilt (PMW to V) and also due to quarantine restrictions which are the reason of the rejection of shipments at the entry points from importing countries. This work focus on the biological control of this pest using entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces ssp.* A selection of strains was first carried out under laboratory conditions using groups of four to five strains, of same fungal species, mixed together and applied at a concentration of 5×10^7 conidia/ml, getting mortalities between 33,33 and 100% after 14 days. In a second phase, the treatment showing higher mortality (BII) was evaluated against mealybugs, artificially inoculated into potted, three month old pineapple plants, under greenhouse conditions. The strains contained in the BII treatment (strains A3, 0410 and B-B56-16) were individually produced and mixed in all possible combinations to detect synergisms. A total of 16 treatments were applied reaching mortalities 39,49 to 86,67% after 14 days of evaluation. The higher mortality was produced by Treatment 12 (strains A3, 0410 and B-B56-16) with 86,67%, followed by Treatments 11 (strains A3, 0421 and 0410), Treatment 9 (strains 0421 and B-B56-16) and Treatment 3 (strains 0410) with 85,58; 84,62 and 82,76% of mortality respectively. The strain 0410 was selected for the field phase and was applied on commercial plots of organically grown pineapple, using two different formulations: Liquid (blastospore and mycelium based) and Wettable Powder (conidia + carrier, applied on

aqueous suspension with 0,01% emulsifiable oil), at two doses: 3×10^{13} conidia/ha as high dose and 3×10^{12} conidia/ha as low dose. The evaluated treatments did not present mortality during the period of evaluation, due to factors not determined in this study. Methods for the detection of residual populations of mealybugs using soil samples from prepared field for the establishment of new pineapple plantations were tested. The methods show to be efficient on recovering artificially inoculated mealybugs under laboratory conditions but fail to do so when used in the field, probably due low populations present in the selected fields.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Cepas de hongos preseleccionadas de la colección de entomopatógenos de CATIE	22
Cuadro 2 Tratamientos y combinaciones de cepas utilizadas en la preselección	22
Cuadro 3 Combinación de cepas utilizadas en los tratamientos a nivel de invernadero	24
Cuadro 4 Componentes usados en la formulación en polvo expresado en porcentajes	26
Cuadro 5 Componentes usados en la formulación líquida	27
Cuadro 6 Porcentaje de mortalidad de cochinillas después de 14 días de la inoculación con los tratamientos evaluados.....	32
Cuadro 7 Porcentaje de cochinillas muertas con síntomas de presencia de hongos.....	33
Cuadro 8 Porcentaje de mortalidad de cochinillas después de 14 días de las aplicaciones de los tratamientos evaluados a nivel de invernadero	34
Cuadro 9 Contraste de hipótesis para combinaciones lineales entre los tratamientos evaluados para la variable número de cochinillas vivas en hojas.....	36
Cuadro 10 Estimación de medias y salida realizada por contrastes para la variable número de cochinillas vivas en hojas	36
Cuadro 11 Estimación de parámetros para la variable de interacción Tratamiento - estratos de la plata.....	38
Cuadro 12 Análisis de varianza basado en las sumas de los porcentajes de Bloques para la variable presencia y ausencia de cochinillas.....	39
Cuadro 13 Análisis de varianza basado en las sumas de los porcentajes de los Tratamientos para la variable presencia y ausencia de cochinillas.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología general de una hembra adulta de cochinilla harinosa (Hemiptera: Pseudococcidae y Putoidae) (Ramos 2006).....	15
Figura 2 Combinaciones de cepas aplicadas sobre grupos de cochinillas y puestas en platos petri en la preselección de cepas.....	23
Figura 4 Forma de aplicación y evaluación de los tratamientos en campo y laboratorio.....	29
Figura 3 Validación en laboratorio de la metodología de extracción de cochinillas residuales en campo.....	31
Figura 5 Cochinillas muertas en cámara húmeda con esporulación de hongo <i>Beauveria bassiana</i>	33
Figura 6 Conteo de cochinillas en la interacción Tratamiento – Estratos de la planta.....	39

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

CAM	:	Metabolismo ácido de las crasuláceas
FLBC1:		formulación líquida de <i>Beauveria bassiana</i> concentración uno
FLBC2:		formulación líquida de <i>Beauveria bassiana</i> concentración dos
FPBC1:		formulación en polvo de <i>Beauveria bassiana</i> concentración uno
FPBC2:		formulación en polvo de <i>Beauveria bassiana</i> concentración dos
FLBC0:		formulación líquida de <i>Beauveria bassiana</i> concentración cero
FPBC0:		formulación en polvo de <i>Beauveria bassiana</i> concentración cero
PDA	:	papa dextrosa agar
UFC	:	unidades formadoras de colonias

1 INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) es la tercera fruta tropical en volumen de producción a nivel mundial después del banano y el mango, y llegó a 18,8 millones de toneladas métricas en el 2007 (FAOSTAT, 2008). La actividad piñera en este momento es una de las más relevantes de la producción nacional costarricense, ampliándose el área de producción de 5 000 hectáreas en 1995 a 38,500 hectáreas en el 2007 (De la Cruz *et al.* 2004, Acuña 2006, Bach 2007). En la actualidad, Costa Rica es el mayor productor de las variedades más cotizadas (Champaka F-153 y la variedad MD2), en los principales mercados de exportación. Para el periodo 2006-2007, alcanzó un 32.2% de las exportaciones en comparación con el banano que alcanzó un 27.8%, generando alrededor de US\$ 484.5 millones por año y más de 60 000 empleos, por lo que constituye una importante fuente de ingresos para el país (PROCOMER 2007). Los principales mercados internacionales son los Estados Unidos y la Unión Europea, abastecidos por empresas transnacionales norteamericanas especializadas en producción y comercialización de frutas, como Dole, Chiquita y Del Monte (Quijandria y Berrocal 1997).

El principal problema en el cultivo de piña es la cochinilla *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: pseudococcidae), por el daño producido por succión de savia y por medidas cuarentenarias las cuales son la causa del rechazo de embarcaciones completas en los principales países importadores de piña. La cochinilla (*D brevipes*) es vector del virus del marchitamiento de la piña (PMW a V), y este virus produce amarillamiento y retardo del crecimiento ocasionando pérdidas en la producción de hasta un 80% (Hu *et al* 1996). En el manejo convencional, el control de la cochinilla está basado en el uso de insecticidas del grupo organofosforados y carbamatos. Estos pueden ocasionar la destrucción masiva de suelos, contaminación de cursos de agua y de ecosistemas terrestres vecinos con graves consecuencias en su flora y fauna y daños a la salud humana. Por esta razón en los últimos años se han desarrollado sistemas de producción de piña orgánica más sostenibles y amigables con el ambiente, que involucran además del cumplimiento de estándares de producción, el uso de ciertos productos químicos con un grado de toxicidad menor a los aplicados en la producción convencional. Sin embargo, esto no implica la eliminación total de la contaminación ambiental (Rodríguez 2006, Bermúdez 2005).

Una alternativa al uso de insecticidas para el control de la cochinilla *D. brevipipes* es establecer prácticas que formen parte de un manejo integrado de plagas basado en el control biológico. Esto permitirá cumplir con los protocolos sanitarios nacionales e internacionales y los requisitos establecidos por las normas orgánicas, en los cuales la presencia de esta plaga constituye un motivo importante de impedimento de importación. Basado en esto surge la necesidad de realizar la presente tesis de investigación, que busca desarrollar nuevas herramientas para el manejo de la plaga proporcionando productos biológicos alternativos para su control, generando conocimientos y estrategias de aplicación basada en la efectividad de las aplicaciones de hongos entomopatógenos en el cultivo.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Determinar el potencial de algunos hongos entomopatógenos como alternativa para el control de la cochinilla *D. brevipipes* en el cultivo de piña.

1.1.2 Objetivos específicos

Realizar una búsqueda de hongos y prueba de virulencia para seleccionar cepas promisorias para el control de cochinillas en piña

Probar la efectividad de las cepas seleccionadas aplicadas en diferentes formulaciones.

Proponer y evaluar una estrategia de aplicación del hongo en campo.

Desarrollar una metodología de muestreo para monitorear poblaciones residuales de cochinilla en campos listos para nuevas siembras.

1.2 Hipótesis del estudio

Algunas cepas de hongos evaluadas ejercen un control sobre las cochinillas.

La ubicación espacial de los focos residuales de población está ligada a los brotes de infestación en el cultivo.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 La piña (*Ananas comosus*)

La piña es una planta herbácea, perenne, monocotiledónea, que pertenece a la familia Bromeliaceae, es no climatérica porque produce pequeñas cantidades de etileno. Procede de las zonas tropicales y subtropicales de Brasil y Paraguay, de donde se ha diseminado a todas las regiones del mundo que poseen climas aptos para su producción comercial. Las mayores producciones se tienen en Hawaii, México, Costa Rica, Brasil, Colombia, Honduras, Republica Dominicana, Malasia, India, Congo, Kenia, China, Taiwán, Vietnam, Australia, Filipinas, Bangladesh, Tailandia, Indonesia, sur África, Zaire y Costa de Marfil (Paull 1997, Jiménez 1999).

2.2 Descripción botánica

Las plantas recién sembradas poseen raíces primarias de corta vida. En general, la mayoría de las raíces son fibrosas, adventicias secundarias. Las raíces que están en contacto con el suelo son cortas y huecas, excepto en suelos bien aireados (Jiménez 1999). El conjunto del sistema radical de la planta adulta es muy superficial, pero su importancia depende esencialmente de las características físicas del suelo: estructura, aireación y humedad. Su longitud puede llegar hasta los 2 metros, cuando el medio les favorece. Se extienden principalmente por la capa de los 15 cm del suelo; se encuentran algunas a los 30 cm de profundidad (Py 1968).

El tallo crece longitudinalmente después de 12 a 24 meses, es corto y robusto. Está anclado al suelo por el sistema radicular y mide hasta 30 cm de largo, con un ancho de 6.5 cm en la base y 3.5 cm en el centro. La planta adulta mide de 1 a 1.20 m de alta y se inscribe en el volumen de una peonza de 1.30 a 1.50 m de diámetro y de base plana (Py 1968).

En una planta madura existen de 60 a 80 hojas adheridas al tallo, en un arreglo espiral. Miden 30-100 cm de largo, las hojas poseen venas paralelas y tienen espinas, excepto en algunas variedades, que poseen el gen recesivo de espinas, que se puede manifestar bajo situaciones de stress. Retienen un 7% del agua absorbida por las raíces debido a una gran cantidad de pelos o tricomas que protegen a la hoja de la pérdida de agua. Los estomas están en el envés de la hojas y se mantienen cerrados durante el día. Durante la noche, cuando la

temperatura desciende abren las vías estomáticas para fijar el CO₂ (Dióxido de carbono) en forma de malato y aspartato, y por lo tanto la pérdida de agua por evapotranspiración es mínima. Estas características usualmente se presentan en plantas de las familias crasuláceas, cactáceas, agaváceas, bromeliáceas adaptadas a condiciones de temperatura extremas y ambientes secos. Por esa condición reciben el nombre de plantas CAM (Metabolismo ácido de las crasuláceas), siendo la piña la más producida a nivel mundial, seguido de la cactácea *Opuntia* sp. (Black 1986; Achá 2001; Salazar 2001).

La inflorescencia comienza con el ápice del tallo como un cono, el cual pasa por varias etapas y produce flores de color rosa y tres pétalos que crecen en las axilas de unas brácteas verdes o rojas con terminación en forma de punta. Las flores de la base se abren primero; en 20 días todas las flores se abren. Se producen de 100 a 200 flores por inflorescencia y el desarrollo de la fruta es partenocárpico, sin embargo, puede ocurrir polinización cruzada, por lo que se producirán semillas. La piña es una fruta compuesta cuyo corazón es una extensión del pedúnculo. La fruta es un racimo de frutículos individuales (sorosis). Cada frutículo está formado o se origina por medio de las siguientes estructuras: una bráctea por frutículo, un sépalo por bráctea y una flor de tres pétalos que consta de: seis estambres, un estigma, tres ovarios y tres óvulos en tres carpelos. Aunque el clima, en especial la temperatura, afecta el contenido interno de la fruta, la fruta madura contiene de 10 a 15% de azúcares y de 0.3 a 1.5% de acidez total (Jiménez 1999; Py 1968; García y Serrano 2005).

La piña después de su fructificación continúa su crecimiento por medio de una o más yemas axilares, dando origen a ramas (hijuelos) que se desarrollan y producen un nuevo fruto, generalmente de menor tamaño que el primero. De esta forma pueden sucederse numerosas generaciones vegetativas, pero en la agricultura convencional, para la mayoría de los cultivares no resulta rentable ir más allá de las dos cosechas (Quesada 1999; Salazar 2001).

Según (Py 1968, Rebolledo *et al.* 1998, Sinclair 1993), Además de la corona, utilizada para la multiplicación como los demás retoños se distinguen el bulbillo, la roseta y el retoño. El bulbillo, se desarrolla a partir de una yema axilar del pedúnculo. La roseta es mas ancha que la del brote del tallo, esta curvada y presenta en su base una especie de pronunciado engrosamiento. Retoño intermedio, nace entre el brote del tallo y el bulbillo, que se desarrolla a partir de yemas axilares situadas en el punto de unión entre el pedúnculo y el tallo. Estos son

los que más comúnmente se utilizan como material de propagación, por la facilidad de recolección y manejo. El brote del tallo, se desarrolla en los rebrotes axilares del tallo, que tienen la particularidad de estar recubierto por una prehoja y de un cierto número de escamas que presentan características intermedias entre las verdaderas hojas y la prehoja. Cuando la plantación se deja más de un ciclo estos hijos son los que producen la planta sustituta y la producción del siguiente ciclo.

2.3 Principales variedades comerciales

Cayena lisa (hawaiana). Del grupo de las Cayenne, es la principal variedad destinada a la industrialización, y es la más importante del mundo, ya que tiene buenas cualidades para la industria enlatadora y de néctares. Posee de 60 a 80 hojas sin espinas a excepción de la parte terminal de la hoja, fruta cilíndrica, ojos poco profundos, con un peso promedio de 2,5 Kg; en un rango entre los 2 a 4 Kg con una escasa producción de hijuelos, de corazón pequeño (EARTH 2004).

MD2. Es un híbrido de reciente introducción al país que por su presentación y aroma, está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos, siendo la variedad más cultivada en la actualidad. Es una planta de crecimiento rápido y rápida obtención de fruta comercial, ganando a la variedad Champaka hasta tres meses en el período de maduración. La pulpa es firme con alta pigmentación, diferente a los clones de Cayena lisa (EARTH 2004).

Champaka F-153. Es un clon puro de la variedad Cayena lisa, es más resistente a enfermedades que las otras variedades, es una variedad con gran aceptación y alta demanda en los mercados de exportación (EARTH 2004).

Montelirio. Poco sensible a enfermedades, hojas sin espinas en los bordes, frutos entre los 2.5 a 3 kilogramos, de pulpa blanca. Principalmente para consumo de fruta fresca, y jugo, no se recomienda para el enlatado por tener los ojos profundos y el corazón grande. Ideal para el mercado nacional (EARTH 2004).

2.4 Clima y suelo

La temperatura es el principal factor climático que determina el crecimiento de las diferentes partes de la planta y por lo tanto su desarrollo. El crecimiento de raíces y hojas es prácticamente nulo a temperaturas menores de 21 °C y a mayor de 35 °C. El máximo

crecimiento se da entre los 30 y 31 °C. La piña es poco exigente en agua, su requerimiento hídrico oscila entre los 1,200 y 2000 mm distribuidos en el año. La luminosidad es un factor muy ligado a la temperatura y duración del día, las cuales regulan en gran parte la duración del ciclo de la piña, lo óptimo es alcanzar 100 horas luz como promedio (Py 1968).

El cultivo de piña requiere de suelos de buen drenaje, permeable de textura franco limoso y con pH de 5 a 6. Debe evitarse la siembra en suelos arcillosos, de mala estructura, pobre drenaje y con una pendiente mayor al 9%; se recomienda una ligera inclinación de un 2 a 4% (Jiménez 1999).

2.5 Manejo del cultivo

La preparación del suelo es de gran importancia para que el terreno quede libre de malezas y bien afinado para esta planta. La formación de camas se hace mecánicamente mediante el uso de una encamadora con dimensiones de 23 a 24 pulgadas de ancho, 8 pulgadas de profundidad y separadas una de otra por 26 a 28 pulgadas; quedando entre centro y centro de cama una distancia de 48 y 50 pulgadas. Los drenajes se realizan para evitar la erosión causada por el agua y prevenir su estancamiento, estos se deben trabajar siguiendo curvas a nivel con una red de drenajes secundarios con pendientes de 1% que llevarán las aguas a los drenajes primarios. (Jiménez 1999; Py 1968).

La siembra de este cultivo se puede realizar durante todo el año siempre y cuando se cuente con un sistema de riego en zonas donde las precipitaciones no cubren con los requerimientos del cultivo. Los sistemas de siembra incluyen a) el sistema tradicional o de línea sencilla, en el cual se dejan 80 cm entre surcos y 30 ó 40 cm entre plantas; b) el sistema Hawaino o de hileras dobles donde las plantas se siembran separadas una de otra por 25 a 30 cm y por 45 ó 60 cm entre hileras, la distancia entre cada par de hileras es de 70 u 80 cm; c) el sistema de hileras triples en el cual se prevén separaciones de 30 a 40 cm entre líneas y de 30 cm entre plantas de cada línea. La resiembra debe realizarse a los 15 y 22 días después de la siembra para reemplazar aquellas plantas perdidas y uniformizar la plantación (Jiménez 1999; Py 1968).

La piña tiene exigencias nutricionales específicas, por tanto la carencia o exceso de estos pueden afectar la apariencia, vitalidad y calidad de la planta y en consecuencia de la

fruta. Los nutrimentos más importantes son: el nitrógeno, que influye en el rendimiento del cultivo; el potasio, que determina la calidad de la fruta y el fósforo, indispensable para un buen desarrollo radical (Jiménez 1999).

Según Bertch (2003), la piña necesita para producir 55 ton/ha, las siguientes cantidades de fertilizantes:

N ----- 205 kg/ha

P₂O₅ ----- 25 kg/ha

K₂O ----- 328 kg/ha

Ca ----- 86 kg/ha

Mg ----- 25 kg/ha

Los requerimientos de riego cuando es época seca pueden ser suplidos por aspersión o por goteo dependiendo de la disponibilidad y la calidad del agua; se requieren de 15 a 18 mm de agua por semana cuando el riego es por goteo y de 30 a 35 mm si es por aspersión (Jiménez 1999).

La finalidad del control de las malezas es evitar la competencia entre estas y la piña principalmente por agua y nutrientes y evitar que las semillas entren en contacto con la corona donde pueden albergarse y llegar a los mercados de exportación y ser rechazadas. El control de malezas se puede hacer en forma química, manual y por el uso de acolchado plástico (Jiménez 1999; Ávila 2006).

La inducción floral es uno de los aspectos más importantes para obtener una producción uniforme de la fruta. El tiempo más adecuado para la inducción floral es cuando la planta de piña alcanza un desarrollo de 7 a 9 meses después de la siembra, alcanzando un peso de 2.5 a 2.7 kg y una altura entre 0.80 a 1.20 m, lo cual la hace apta para la inducción floral utilizando etileno como regulador de crecimiento y desverdecedor a una concentración de 2 mg/kg de la planta. La inducción debe ser realizada por la noche o cuando la temperatura esta alrededor de 27 °C, no debe haber lluvia y las plantas no deben presentar demasiada agua en las axilas (Castañeda 2003; Jiménez 1999).

La cosecha de la piña se inicia de 5 a 5 ½ meses después de aplicado el regulador de floración. Cuando la producción de piña se destina al mercado local para consumo fresco, ésta

se realiza basándose en la madurez de la fruta. Igual ocurre cuando la producción se envía a la industria, solamente que para este caso hay que desprender la corona y cuando el destino de la fruta es el mercado internacional, se mide el grado brix, el cual busca un requisito mínimo de 12 grados, independientemente del color de la cáscara (Castañeda 2003).

Según Castañeda (2003) y Saborío *et al.* (1996), la cosecha se realiza manual o mecánica. En la cosecha manual se recolectan las frutas maduras, se colocan en grupos y se trasladan a la orilla de la parcela en donde se selecciona por tamaño y luego se transportan en vehículo con la corona hacia abajo para que sirva de colchón. La cosecha mecánica se realiza con equipos movidos con tractor. Esta forma de cosecha es 4 veces más rápida, y se recomienda para extensiones de terrenos grandes las cuales a su vez reducen los daños de manejo en la cosecha.

2.6 Enfermedades

Según (Castañeda 2003, Jiménez 1999 y Py 1968), las enfermedades más importantes del cultivo de la piña son:

2.6.1 Podredumbre del corazón y las raíces (*Phytophthora parasitica* y *P. cinnamoni*)

La podredumbre del corazón y las raíces ocasiona grandes daños en los suelos de drenaje difícil, poco permeables y de pH alto. Se manifiesta en las hojas centrales o "cogollo" y se observa una coloración parda y mal oliente. Las hojas afectadas presentan un color amarillo y pueden ser desprendidas con gran facilidad, apreciándose en su base la pudrición característica de la enfermedad. Ocasionalmente en suelos con mal drenaje, puede presentarse en la inflorescencia.

Phythium, (*Phythium sp*); ataca la parte radicular de la planta causando pudrición. Los síntomas que se presentan son: amarillamiento de hojas tornándose rojas, secado desde el ápice hacia el tallo, la planta produce frutos pequeños y deformes sin valor comercial. Su manejo es similar al de *Phytophthora sp*.

2.6.2 Pudrición de los retoños

Los retoños se pudren por causa de (*Thielaviopsis paradoxa*), conocido como podredumbre negra. El hongo penetra a los retoños principalmente por heridas ocasionadas al separarlos de la madre. Este hongo se le considera responsable de los daños ocasionados durante el transporte de los retoños. Sus síntomas son: color negro o gris en la base de retoños, en la fruta presenta pudrición del corazón y decoloración; su pudrición es de aspecto acuoso.

2.6.3 Veteado de la fruta

Causada por (*Erwinia carotovora*), es uno de los 5 agentes bacteriales más frecuente cuando aumenta la temperatura ambiental. Durante los cinco meses más húmedos, particularmente en altas densidades de siembra del cultivo es cuando la enfermedad aumenta su importancia económica. Sus síntomas son: translucidez de la fruta, decoloración del corazón y frutos mal olientes.

2.6.4 Marchites roja (Wilt)

Es ocasionada por algunos virus, los cuales son transmitidos por las cochinillas como vector. Esta enfermedad se percibe con un enrojecimiento progresivo de las hojas más antiguas, seguido de un encorvamiento de los bordes de las hojas hacia la cara inferior y su extremidad hacia el suelo. Las hojas pierden su turgencia y toman un color rosa amarillento, mientras que la extremidad cambia de coloración parda y seca. Los virus más comunes son: closterovirus (PMWaV-1) y el PMWaV-2 (Castañeda 2003, Jiménez 1999).

2.7 Plagas

Las plantas de piña pueden ser atacadas por varias plagas, las cuales se presentan al nivel de la raíz, tallo, corona, hojas y fruto reduciendo considerablemente el crecimiento, el desarrollo y la productividad de la plantación. Siendo la cochinilla harinosas (*Dysmicoccus brevipes*) la plaga más importante en el cultivo (Jiménez 1999; Py 1968 y Castañeda 2003)

El barrenador de la piña (*Strymon basilides*) es un lepidóptero, la hembra de esta mariposa deposita los huevos en las pequeñas flores que salen en la primera etapa de formación del fruto. Las larvas de color rosado penetran causando cavidades y aunque el fruto

continúa su desarrollo, éste es deforme y pierde su valor comercial. Las larvas pueden durar o permanecer de 13 a 17 días dentro del fruto, emergiendo después y formando una crisálida en las hojas por debajo del fruto.

La gallina ciega (*Phyllophaga menetriesi*), ataca las raíces de las plantas provocando un amarillamiento progresivo hasta causarle la muerte. Ataca durante las etapas de mayor importancia en el cultivo crecimiento vegetativo, floración y fructificación. Los nemátodos son plagas microscópicas (nematelmintos) Cuyo tamaño varía entre los 0.2 a 3 mm; causan daños mecánicos y fisiológicos considerables, penetrando las raíces de la mayoría de los cultivos particularmente en los de ananas o piña tropical; ocasionando debilitamiento en la planta, disminución en la producción causando altas pérdidas económicas en el cultivo. Su importancia va igualando cada vez más a la de las cochinillas. Los géneros más comunes que se pueden encontrar son: (*Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* y *Criconemoides*).

Otras plagas de menor importancia: picudo (*Metamasius sp*), sinfilidos género *Hanseniella*, caracoles (*Opeas pumilon*, *Cecilioides aperta*), escamas (*Diapris bromeliae*), ácaros de la fruta (*Steneotarsonemus ananas*) y el ácaro rojo (*Dolichotetranychus floridanus*).

2.7.1 Cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*)

La cochinilla harinosa de la piña *D. brevipes*, fue originalmente descrita de especímenes colectados de piña en Jamaica. Beardsley (1959), citado por Py (1968), encontró dos tipos distintivos de cochinillas harinosas en Hawaii, las cuales él refirió como la forma partenogenética; y describió la forma sexuada como *D. neobrevipes*. La forma partenogenética de *D. brevipes* esta principalmente confinada a las porciones inferiores de la planta de piña, cerca del nivel del suelo o por debajo, mientras la forma biparental de *D. brevipes* al igual que la de *D. neobrevipes* se localizan sobre la corona y frutos en desarrollo.

La cochinilla es un insecto polífago de color blanco, se alimentan chupando la savia de las plantas transfiriéndole el virus que produce la marchites de la piña (Wilt). Los síntomas presentan una coloración amarillo-rojiza, un secamiento del ápice hacia la base de la hoja y un enrollamiento en el borde de las hojas. El efecto en la planta, se manifiesta en debilitamiento y

retardo del crecimiento, baja calidad del fruto y pobre rendimiento. Los estados de la planta afectados son: Floración, fructificación, poscosecha y estados vegetativos y de crecimiento (Py 1968).

Las poblaciones de hormigas y *D. brevipipes* son mutuamente dependientes, por lo que el control de la cochinilla, frecuentemente se orienta al control de las hormigas. Se pueden encontrar diferentes especies de hormigas pertenecientes a los géneros *Pheidole*, *Solenopsis* y *Camponotus*, estas a su vez, se benefician de la cochinilla alimentándose de las mielecillas producidas por ellas. Las hormigas transportan y realizan construcciones de tierra alrededor de las principales colonias de cochinillas para protegerlas (Py 1968). Sin embargo en un estudio realizado por Ostos, (2006) en *Alpinia purpurata*, no encontró relación entre la ubicación de las hormigas en la plantación y la presencia de focos de infestación de *D. brevipipes*.

2.7.1.1 Clasificación taxonómica de las cochinillas

La superfamilia Coccoidea es la más importante para la agricultura debido a que la mayoría de sus especies se alimentan de plantas cultivadas como son: yuca, piña, papa, tomate, cítricos, café, cacao, caña de azúcar, pimienta, soya, frijol y especies ornamentales, al igual que otros frutos tropicales y subtropicales subtropicales (Carrillo *et al.* 1992, Williams y Granara de Willink 1992, Ostos 2006).

Coccoidea comprende 28 familias de cochinillas y escamas entre existentes y extintas y contiene más de 7500 especies distribuidas mundialmente (Gullan y Martin 2003). Las familias más numerosas en especies son: Diaspididae (2500 especies), Pseudococcidae (2000 especies) y Coccidae (1000 especies).

Según Ramos y Serna (2004), indican que la cochinilla posee la siguiente clasificación taxonómica.

Clase:	Insecta
Orden:	Hemiptera
Suborden:	Homoptera
División:	Sternorrhyncha
Superfamilia:	Coccoidea
Familia:	Pseudococcidae

2.7.1.2 Ciclo de vida de la cochinilla

La cochinilla tiene un ciclo de vida incompleto y es ovovivíparo. Las hembras ponen los huevos (oviparidad) producidos en el extremo posterior del cuerpo en una cavidad debajo de su cuerpo o en una cubierta cerosa llamada ovisaco, los huevos pueden medir entre 0,29 y 0,39 mm de longitud y entre 0,17 y 0,21 mm de ancho, los cuales para madurar y alcanzar su desarrollo puede durar entre 3 y 9 días dependiendo de las condiciones climáticas. El estado ninfal posee tres estadios. En su ciclo de vida muda tres veces, en un periodo de aproximadamente 34 días y unos 27 días después empiezan a producir un promedio 234 crías en un periodo de 25 días. El tiempo de vida es aproximadamente de 90 días, de los cuales 56 los pasa en el periodo adulto. La duración de estas etapas se aplica a un régimen de 23°C (Gullan y Martín 2003).

Estos insectos son altamente dimórficos sexualmente. La hembra adulta es sedentaria, larviforme y áptera, con la cabeza y el tórax fusionados y la segmentación abdominal frecuentemente sin definir. Usualmente las hembras poseen dos o tres estados inmaduros y las patas están frecuentemente reducidas o ausentes. Las hembras se fijan al hospedero utilizando principalmente sus estiletes bucales (Ramos 2006, SEL 2003).

2.7.1.3 Morfología, anatomía, biología y ecología de la cochinilla

Las especies de la superfamilia Coccoidea han sido descritas principalmente a partir de las hembras adultas; los estados inmaduros solo son conocidos en cerca de un 5% de la fauna del mundo y los machos adultos probablemente en menos de un 1% (Llorente *et al.* 1996).

Cuerpo. Puede ser alargado, oval o globular. Las hembras presentan un cuerpo de consistencia blanda, el tamaño y el color del cuerpo varían de acuerdo con la especie, condiciones medioambientales y la forma puede ser alargada, ovoide o casi circular. Sobre la superficie dorsal puede verse la segmentación del cuerpo, pero no se nota una diferencia entre cabeza, tórax y abdomen. Sin embargo, en casi la totalidad de las especies es fácil observar un par de antenas y tres pares de patas (Castillo y Bellotti 1990; Ramos y Serna 2004) (Figura 1).

Cabeza. A pesar que el tagma cefálico se encuentra fusionado con el torácico, se pueden diferenciar ciertas características y algunas estructuras correspondientes a esta área. Es tipo opistognatha.

En vista ventral de la cabeza se observan las siguientes estructuras: aparato bucal de tipo picador chupador, ocupa una posición ventroposterior, causada por el descenso de la región facial, presentándose una situación extrema en la que las piezas bucales aparentan estar en el prosternón, entre las coxas anteriores. Presenta las siguientes estructuras: labio, labro, clípeo, jeringa y estiletes mandibulares y maxilares. Los ojos son semejantes a ocelos porque presentan un solo ommatidio y se localizan laterales a la base de las antenas; suelen poseer poros adjuntos lo cual es una característica taxonómica importante. No posee ocelos, característica de la familia. La antena en la mayoría de las especies tienen ocho segmentos, pero algunas veces pueden estar reducidas a seis o siete segmentos y ocasionalmente pueden estar reducida a dos (Castillo y Bellotti 1990, Snodgrass 1935) (Figura 1).

Tórax. El tórax en la mayoría de las especies de Pseudococcidae y Putoidae presenta la mayor amplitud del cuerpo, posee tres pares de patas, las apófisis esternales del meso y metatórax y dos pares de espiráculos (Figura 1).

Patas. Son caminadoras, poseen los segmentos característicos de un hexápodo: coxa, trocanter, fémur, tibia, tarso (de un solo segmento) y postarso (uña simple). La uña posee en su base dos setas digitiformes, las cuales generalmente son capitadas. La superficie plantar de la uña algunas veces produce un pequeño diente llamado dentículo. Las patas poseen algunas veces poros translúcidos en alguna de sus partes, lo cual es un carácter de importancia taxonómica en el grupo (Snodgrass 1935) (Figura 1).

Abdomen. Ventralmente se observan ocho segmentos claramente diferenciados por líneas intersegmentales. **Lóbulos anales:** son ligeras proyecciones del cuerpo en los dos lados del anillo anal que terminan en un par de setas posteriores que frecuentemente son de importancia taxonómica. Ventralmente en cada lóbulo anal hay un área de diferente grado de esclerotización y a veces también se encuentra la barra del lóbulo anal. Dorsalmente se ubica aquí el último par de cerarios (Williams y Granara 1992).

Anillo anal. Corresponde a la cauda propiamente dicha. Generalmente está bordeado por al menos dos hileras de células que le proporcionan apariencia crenulada y de donde salen tres pares de setas dispuestas bilateralmente, de longitud variable (Williams y Granara 1992). **Círculo:** es una estructura ventral de forma diversa, generalmente ovalada o cuadrangular, ubicada en muchas ocasiones en la parte media de los segmentos abdominales tres y cuatro. **Vulva:** corresponde al orificio genital y se presenta cuando la hembra pasa al estado adulto. Se encuentra entre los segmentos siete y ocho. **Ostiolos:** se presentan en pares, uno ubicado en el dorso de la margen anterior del protórax y el par posterior localizado dorsalmente sobre el segmento abdominal seis. Estructuralmente son abultamientos redondeados de la epidermis en forma de dos labios separados por una depresión (Castillo y Bellotti 1990) (Figura 1).

Cerarios. Se extienden en una línea imaginaria cefalo-caudal en los bordes laterales del dorso y constan de grupos de setas y poros. En cada cerario existen dos o más setas cónicas o lanceoladas prominentes llamadas setas cerarianas y algunas veces setas filiformes denominadas setas auxiliares. El número de cerarios varía dependiendo de la especie, es común encontrar 17 pares. Los cerarios reciben su nombre según su ubicación así: en la cabeza se encuentran los cerarios frontal, preocular y ocular; en el tórax se ubican cinco pares de ellos y en el abdomen se distribuyen nueve pares, uno frente a cada extremo de las ocho líneas intersegmentales y el último en el lóbulo anal (Williams y Granara 1992).

Setas. Las setas del cuerpo se distinguen de las setas de los cerarios. Pueden ser lanceoladas o cónicas en el dorso pero normalmente son flageladas en, al menos, el área media del vientre (Williams y Granara 1992).

Poros. En las chinches harinosas generalmente son de cuatro tipos: **discordes multiloculares**, generalmente se encuentran alrededor de la vulva y contribuyen a la producción del ovisaco; **triloculares**, se observan como un triángulo con bordes romos y tres cavidades internas (lóculos); **quinqueloculares**, son poros con cinco lóculos; **discoides**, generalmente son diminutos y algunas veces cribosos (Castillo y Bellotti 1990).

Ductos tubulares. Son estructuras internas con el orificio en la superficie cuticular; los ductos varían considerablemente en estructura pero normalmente son de dos formas: **ductos con collar oral**, su tamaño y distribución en el cuerpo son variables, dependiendo de la especie, su apariencia bajo el microscopio es de un tubo con orificio simple y con un cilindro

huevo proyectado internamente en la cutícula mostrando una esclerotización en su extremo interno; **ductos con anillo oral**, son similares a los ductos tubulares con collar oral, pero tienen anillo muy conspicuo levantado de la cutícula al rededor de la apertura (Chandler y Watson 1999) (Figura 1).

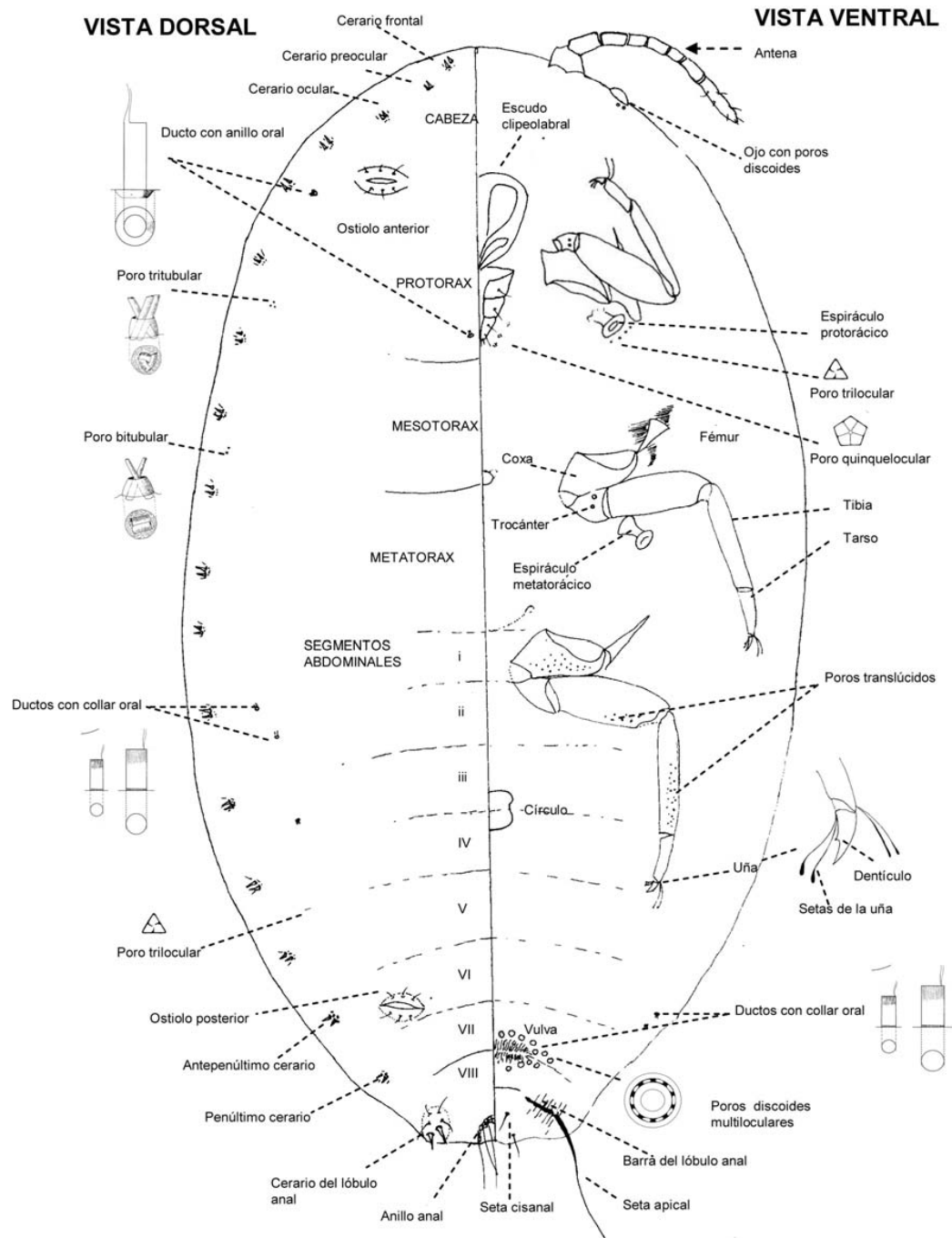


Figura 1 Morfología general de una hembra adulta de cochinilla harinosa (Hemiptera: Pseudococcidae y Putoidae) (Ramos 2006).

2.8 Control biológico

En un agroecosistema las plagas son controladas por la acción de sus enemigos naturales, predadores, parásitos y patógenos, evitando que estas alcancen niveles perjudiciales. Los microorganismos patógenos han sido usados para obtener una reducción de las poblaciones de insectos plagas, dentro de los cuales se incluyen bacterias, virus, nemátodos, protozoos y hongos (Castillo 2006). Los hongos entomopatógenos son organismos heterótrofos, que poseen células quitinizadas y carecen de movilidad. Existen alrededor de 100 géneros y aproximadamente 700 especies de hongos que generalmente son específicas o de amplio espectro de hospedantes (insectos y ácaros). Dentro de los más importantes se mencionan: *Metarhizium sp*, *Beauveria sp*, *Aschersonia sp*, *Entomophthora sp*, *Zoophthora sp*, *Erynia sp*, *Eryniopsis sp*, *Akanthomyces sp*, *Fusarium sp*, *Hirsutella sp*, *Hymenostilbe sp*, *Paecilomyces sp* y *Verticillium sp*, pertenecientes a la clase Zygomycetes e Hyphomycetes (López y Börjes 2001). Por su habilidad de controlar plagas los hongos inician su proceso de infección con la germinación de las esporas adheridas sobre el tegumento de la plaga. Posteriormente este produce un tubo germinativo y un apresorio como producto de la dilatación de la hifa, la cual rompe las áreas membranosas esclerosadas y el químico resultante de la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinazas) facilita la penetración mecánica. A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización, en el cual la hifa se ramifica en el cuerpo del insecto y a partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales (blastosporas). El hongo sale del insecto enfermo a través de las aperturas (boca, ano, orificios de unión de los tegumentos y artejos) y en el exterior forma sus estructuras fructíferas y las esporas. Sin embargo no ocurre gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto (Yeo *et al.* 2003).

Por lo general los hongos entomopatógenos son de acción lenta, tardan una semana como mínimo en causar mortalidad o al menos en que el insecto deje de alimentarse. Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos pero dependen de las condiciones ambientales de temperatura y de elevada humedad relativa para alcanzar una mayor patogenicidad y virulencia. Los hongos entomopatógenos son fácilmente aplicados por introducción, manipulación ambiental o aumento inoculativo, pero no para aumentos inundativos (Yeo *et al.* 2003).

El uso de hongos entomopatógenos para reducir poblaciones de insectos plaga ha sido ampliamente estudiado en varios cultivos. Muchos demuestran resultados altamente favorables, sin embargo, otros han tenido sólo éxitos parciales o han fallado completamente (Pacorar 1979; Carballo y Guaharay 2004). Vásquez (2000), evaluó la efectividad de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Entomophthora virulenta*, jabón, cal hidratada, extracto de ajo (*Allium sativum*) y Azadirachtina (extracto de nim *Azadirachta indica*) para el manejo biológico de las cochinillas *D. brevipennis* en piña orgánica. El autor encontró que el jabón, ajo, nim y cal hidratada, fueron los productos que dieron resultados satisfactorios. Los tres entomopatógenos, por su parte, ocasionaron una baja mortalidad de las cochinillas, y la mayoría de veces fueron iguales al testigo.

Las demás aplicaciones para el control biológico son principalmente dirigidas a parasitoides y predadores, como parte de un manejo integrado de plagas más holístico y efectivo. Los llamados parasitoides son insectos que viven a expensas de otro insecto hospedero dentro o fuera de su cuerpo, al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval. Los predadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas en forma más o menos rápida succionándoles la sangre o devorándolos (Johnson 1997). Después de numerosos estudios Johnson en el 1997, demostró que los parasitoides y predadores pueden realizar un control eficiente de las plagas. Aunque su efecto se observa en periodos de meses y no de semanas. Una vez establecidos en un área ellos persisten incluso cuando las poblaciones de plagas han descendido considerablemente, manteniendo las poblaciones debajo de los niveles de daño económico.

Ciertas especies de insectos, como las cochinillas harinosas en los campos de algodón se mantienen a niveles insignificantes por la acción de no menos de 11 especies de parasitoides y 9 especies predadoras. En Hawaii según evaluaciones hechas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), cinco meses después de la liberación del parasitoide de origen chino *Anagyrus kamali*, las poblaciones habían descendido entre 80 y 90 por ciento. Durante su periodo de vida la hembra de *A. kamali* puede ovipositar un huevo en 40 a 60 huevos de cochinilla. También se ha trabajado con el escarabajo predador *Cryptolaemus montrouzieri* M. Este es un comedor voraz de cochinilla rosada y puede comer entre 3000 y 5000 cochinillas en diferentes estados de desarrollo durante su periodo de vida.

Las características de este escarabajo lo hacen propicio para el control rápido de grandes poblaciones de cochinillas obteniéndose resultados en un periodo de entre 6 y 8 semanas (Meyerdirk *et al.* 2005).

El principal problema del uso de predadores es que suelen ser más grandes que los parasitoides y, cuando son diurnos, muchas veces presentan coloraciones o mayor actividad que los hacen más visibles que los parasitoides. Aun así, su rol benéfico no siempre es reconocido. Se han dado casos en que los coccinélidos o mariquitas que destruyen a los pulgones y otras plagas han sido confundidos con insectos dañinos y hasta se les ha aplicado insecticidas. Muchos técnicos en todo el mundo desconocen el eficiente rol de ciertos géneros de chinches que son predadores de huevos y larvas pequeñas, llegando inclusive a considerarlos plagas en publicaciones especializadas (Meyerdirk *et al.* 2005).

2.9 Formulación de hongos entomopatógenos

Para el control biológico de las plagas se han utilizado diversos productos cuyo ingrediente activo son las esporas de hongos entomopatógenos producidas en sustratos sólidos o sistemas de fermentación (Soto *et al.* 2006). La utilización de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas involucra la producción de cantidades masivas del hongo, el cual debe mantener su capacidad infectiva por un período de tiempo considerable. Bajo condiciones de laboratorio mantener la viabilidad de hongos entomopatógenos por mucho tiempo resulta difícil, por lo cual la formulación de entomopatógenos busca aumentar la estabilidad durante el almacenamiento y después de la aplicación (Carballo 1998).

Formular un entomopatógeno consiste en adicionar a las conidias del hongo determinados compuestos inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos, con el fin de lograr una buena homogeneidad, distribución y adhesión de las partículas del hongo en la cutícula del insecto; así como aumentar o mantener la virulencia y mejorar su desempeño en el campo, facilitando su manejo y aplicación (Monzón 2001, Carballo 1998). Para que un hongo pueda ser formulado su viabilidad no debe ser menor de 95 % y el contenido de humedad entre 4 - 6 %, con los cuales se garantiza la estabilidad del producto durante un tiempo de 12 a 18 meses, con una pérdida mínima de las

propiedades físicas y biológicas así como permitir su comercialización (Monzón 2001, Carballo 1998).

Monzón (2001) describe dos tipos de formulaciones de hongos entomopatógenos. La formulación seca o polvo mojable, en la que se utiliza un vehículo de origen mineral o vegetal que ayuda a absorber la humedad de las conidias y mantiene la viabilidad por un tiempo considerable; y la formulación líquida o emulsificable, que utiliza un emulsificante y un líquido solvente, el cual logra mantener suspendidas las conidias en el medio para lograr una mezcla homogénea y además impide la absorción de agua por las conidias y mantiene su viabilidad. Ambos tipos de formulaciones son de fácil aplicación, semejantes a la de cualquier otro producto y su uso depende de la disponibilidad de éste. El tipo de formulación determina la viabilidad de las conidias, manteniéndose mayor en la formulación líquida que en la formulación sólida. Sin embargo, ciertos aceites minerales o derivados de petróleo usados en la formulación líquida no son aceptados en la producción orgánica (Monzón 2001, Pell *et al.* 1998).

La producción de hongos entomopatógenos en medio líquido (blastosporas y micelio) es un proceso conveniente desde el punto de vista de eficiencia y rentabilidad, si se compara con la producción de esporas en sustrato sólido. En medios líquidos se han obtenidos buenos resultados en la producción de entomopatógenos adicionando glucosa, vitaminas, aminoácidos y metales traza a un medio basal (Jackson *et al.* 2004). Polona y Aleksander (2001) y Deshpande, M (1999), consideran que en la obtención de entomopatógenos a partir de medio líquidos el crecimiento de la biomasa está influenciado por variables de la actividad metabólica de los organismos y viscosidad del medio. Para el desarrollo de hongos entomopatógenos es necesario generar información sobre rendimiento y toxicidad de estos contra los insectos. Alcázar (2002), realizó un estudio para seleccionar el impulsor más eficiente en la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* encontrando que el uso por separado de impulsores de flujo radial y axial (Rushton-Maxflo) alcanzaron un rendimiento máximo de $4,3 \times 10^8$ blastosporas/ml. En otro estudio similar Jackson et al (2004) reportaron un rendimiento de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* de $7,9 \times 10^8$ blastosporas/ml en fermentador portátil, encontrando un alto potencial para la producción de blastosporas, con muy bajo nivel de contaminación bacterial.

2.9.1 Control de calidad de las formulaciones

La comercialización de controles biológicos basados en hongos entomopatógenos requiere de un control adecuado de las propiedades biológicas, físicas y químicas realizadas por el departamento de control de la calidad de la firma productora que aseguren al usuario un producto de máxima eficacia en condiciones de campo (Vélez *et al.* 1997; Carballo 1998; Monzón 2001; Aroonrat *et al.* 2003)

Algunas pruebas microbiológicas recomendadas son:

- Concentración de esporas: Establece la dosificación del producto.
- Germinación de esporas: Determina la viabilidad del hongo en la formulación.
- Pureza: Revela la proporción del agente biológico en la formulación e identifica los microorganismos contaminantes con el objetivo de mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos.

Debido al alto uso de agroquímicos en las plantaciones de piña en Costa Rica, se hace necesario ofrecer una alternativa de control biológico de cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) que proporcione un manejo más amigable con el ambiente.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación y descripción de estudio

3.1.1 Fase de laboratorio

Las pruebas de selección de cepas se realizaron en el laboratorio de control microbial del CATIE, ubicado en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago, Costa Rica. El CATIE se encuentra localizado a 9°52' latitud Norte y 83°38' latitud Oeste, a una altura de 602 msnm, con un rango de temperatura que oscila entre los 22 y 28° C, con precipitación promedio anual de 2600 mm y 87% de humedad relativa (Chávez 2007).

3.1.1.1 Preselección de cepas

Para aumentar el número de aislamientos evaluados se elaboraron combinaciones de cepas por cada género guardando la misma relación en concentración. Donde se utilizaron aislamientos de los géneros *Paecilomyces*, *Beauveria* y *Metarhizium* de la colección de entomopatógenos del CATIE. Con la finalidad de determinar si las diferentes cepas de hongos (Cuadro 1) eran capaces de causar enfermedad a las cochinillas se realizó una prueba de patogenicidad en condiciones de laboratorio. Las cepas que presentaron una mayor efectividad fueron preseleccionadas, las cuales posteriormente fueron evaluadas en una segunda prueba de selección en invernadero.

Para la prueba de patogenicidad se realizaron suspensiones con las diferentes combinaciones de cepas (Cuadro 2) a una concentración de 5×10^7 conidias/ml en agua destilada agregándole Breake Thru® como coadyuvante a razón de 1 ml/litro. Las suspensiones se aplicaron sobre grupos de 10 cochinillas de tercer y cuarto estadios utilizando una microgeringa Hamilton® de cincuenta microlitros, a cada unas de las cochinillas se les realizó una sola aplicación de un microlitro de la suspensión en cada tratamiento. Estas fueron colocadas en platos Petri con trozos de papa y un papel filtro en el fondo. Para mantener un ambiente con alta humedad relativa dentro de los platos Petri los tratamientos fueron puestos en cajas plásticas con papel toalla humedecido en el fondo y con sus respectivas tapas.

El conteo de las cochinillas muertas se realizó 24 horas después de la aplicación y cada 48 horas durante catorce días.

Cuadro 1 Cepas de hongos preseleccionadas de la colección de entomopatógenos de CATIE

No	Hongos	Código de cepas
1	<i>Beauveria bassiana</i>	G-ATI-2
2	<i>Beauveria bassiana</i>	0601
3	<i>Beauveria bassiana</i>	A3
4	<i>Beauveria bassiana</i>	G-CBR-3
5	<i>Beauveria bassiana</i>	0465
6	<i>Beauveria bassiana</i>	0421
7	<i>Beauveria bassiana</i>	0410
8	<i>Beauveria bassiana</i>	B-B56-16
9	<i>Beauveria bassiana</i>	G-ALLA-1
10	<i>Beauveria bassiana</i>	ACHI-2
11	<i>Beauveria bassiana</i>	0412
12	<i>Paecilomyces ssp.</i>	0485
13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	C-SRA-2
14	<i>Metarhizium anisopliae</i>	6-BCH-1
15	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0430
16	<i>Metarhizium anisopliae</i>	RCO2
17	<i>Metarhizium anisopliae</i>	G6TE-22
18	<i>Metarhizium anisopliae</i>	CFAL-4

Cuadro 2 Tratamientos y combinaciones de cepas utilizadas en la preselección

No	Tratamientos	Combinaciones de cepas
1	BI	G-ATI-2; 0601; 0465
2	BII	A3; 0421; 0410; B-B56-16
3	BIII	G-ALLA-1; 0412; ACHI-2; G-CBR-3
4	PI	0485
5	MI	C-SRA-2; 6-BCH-1; 0430
6	MII	RCO2; G6TE-22; CFAL-4
7	Testigo	agua

Nota: Las combinaciones se realizaron al azar.



Figura 2 Combinaciones de cepas aplicadas sobre grupos de cochinillas y puestas en platos petri en la preselección de cepas.

3.1.1.2 Diseño experimental

El ensayo de laboratorio se implementó bajo un diseño estadístico irrestricto al azar con seis tratamientos más un testigo con tres repeticiones (Cuadro 2).

Las variables analizadas fueron el porcentaje total de mortalidad y el porcentaje de mortalidad con desarrollo de síntomas de hongo. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y las inferencias estadísticas (prueba de hipótesis y estimaciones de parámetros) se realizaron mediante la prueba estadística LSD de Fisher, considerando un nivel de significancia del 5%. Los datos fueron procesados con el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2009).

En las evaluaciones se utilizó el siguiente modelo matemático: $Y_{ij} = \mu + \tau_j + \epsilon_{ij}$

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Término de error independiente supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante

3.1.1.3 Selección de cepas en invernadero

Habiendo seleccionado el tratamiento más promisorio en la fase de laboratorio, se procedió a disgregar la mezcla de cepas en todas sus posibles combinaciones para determinar si las cepas que formaron el tratamiento preseleccionado presentaban sinergismo o antagonismo entre ellas. Se realizó una prueba de efectividad en invernadero evaluando las

cepas de manera individual y en todas las combinaciones posibles para seleccionar las que presentaran una mayor efectividad (Cuadro 3).

Cuadro 3 Combinación de cepas utilizadas en los tratamientos a nivel de invernadero

Tratamientos	Combinación	Tratamientos	Combinación
T1	a	T9	bd
T2	b	T10	cd
T3	c	T11	abc
T4	d	T12	acd
T5	ab	T13	abd
T6	ac	T14	bcd
T7	ad	T15	abcd
T8	bc	Testigo	agua

Nota: Las letras a, b, c y d representan a las cepas individuales (A3, 0421, 0410 y B-B56-16 respectivamente) y las combinaciones representan las mezclas utilizadas.

Las cepas preseleccionadas se multiplicaron en platos Petri con PDA y se inocularon en 200g de arroz esterilizado en una autoclave a 1.3 kg/cm² de presión y 121°C durante 30 minutos. Posteriormente a los 11 y 14 días después de la inoculación se determinaron las concentraciones de conidias por gramo de arroz. Utilizando una balanza marca OHAU US se pesó un gramo del arroz inoculado y se diluyó en 200 ml de agua esterilizada con Twenn 80® (Polyxiethylene Surbita Monolaurate) como dispersante. Se ultrasonificó durante 10 minutos y luego agitando por 5 minutos en un agitador de vórtice marca Corning para separar o liberar las conidias. Para el conteo de las esporas se utilizó un hematócmetro Bright Line de 0.1 mm de profundidad, y un microscopio Olympus CH2.

Para la aplicación bajo invernadero se prepararon 2 litros de suspensión de conidias por cada cepa a una concentración de 5×10^7 conidias/ml utilizando agua con un pH de 5.8 y adicionalmente se agregó Breake Thru® como coadyuvante-dispersante a razón de 1 ml/litro. El pH se midió usando una cinta de coloración pHDrion microcine (Anexo 3).

Previo a la aplicación de los tratamientos las plantas de piña de aproximadamente 3 meses de edad fueron inoculadas con cochinillas. Un mes después de la inoculación se aplicaron los tratamientos, asperjando 65 ml de la suspensión en cada planta (Anexo 4). Se realizaron dos aplicaciones con un periodo de 3 días entre cada una de ellas y se evaluó la mortalidad a los 14 días después de la primera aplicación.

3.1.1.4 Diseño experimental

El ensayo de invernadero se implementó bajo un diseño estadístico de bloques completos al azar con quince tratamientos más un testigo y siete repeticiones.

Los datos correspondientes a la variable porcentaje de mortalidad fueron transformados a rangos, por no cumplir con el supuesto de normalidad evaluada mediante la prueba de Shapiro – Wilks. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y las inferencias estadísticas (prueba de hipótesis y estimaciones de parámetros) se realizaron mediante la prueba estadística de Duncan, considerando un nivel de significancia del 5%. Los datos fueron procesados con el software Infostat (Di Rienzo *et al.* 2009).

En las evaluaciones se utilizó el siguiente modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \epsilon_{ijk}$

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto del j-ésimo bloque

ϵ_{ij} = Término de error independiente supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante

3.1.1.5 Reproducción y formulación de inóculo para prueba de campo.

La cepa seleccionada se multiplicó en platos Petri con PDA y luego fue reproducida en forma masiva mediante dos metodologías: 1- utilizando arroz como sustrato para la obtención de polvo de conidias y 2- fermentación líquida para obtener blastosporas en suspensión. El inóculo primario se preparó como una suspensión de conidias en agua destilada estéril con Tween 80® al 0,5% como dispersante a una concentración de 1×10^9 con/ml, luego se procedió a inocular los medios para la producción masiva.

Para la producción de polvo de conidias, se agregó un total de 40ml de la suspensión a bolsas plásticas conteniendo 400 g de arroz previamente esterilizado, en una autoclave de marca American por 35 minutos a una presión de 1.3 kg/cm^2 y a una temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente a los 20 días después de la inoculación se abrieron las bolsas para permitir el secado del arroz y se determinó la concentración de conidias por gramos de arroz usando la cámara de conteo de Neubauer de 0.1mm de profundidad.

Para la extracción de conidias se utilizaron dos métodos el de agitación y extracción al vacío. Para la extracción por agitación se procedió a colocar el arroz en un tamiz de 300 mesh con su base, y luego se agitaron por 10 minutos en un agitador horizontal. Para la extracción al vacío, se utilizó un Mycoharvester ® modelo H1. El polvo de conidias obtenido tanto del tamizado como el de la cámara de vacío se unieron y se le determinó la concentración final de conidias por gamos de producto.

Se preparó una formulación base utilizando el polvo de conidias como ingrediente activo y agregando Bentonita como vehículo y polvo intangible de Sílica y Goma guar como estabilizantes para la suspensión. Los ingredientes de la fórmula fueron calculados en porcentaje y estabilizada a una concentración de 1×10^{13} con/kg para la dosis alta y 1×10^{12} con/kg para la dosis baja (Cuadro 4).

Cuadro 4 Componentes usados en la formulación en polvo expresado en porcentajes

Ingredientes	Porcentaje	Función
Sílica	0,75	Estabilizador de suspensión
Goma Guar	0,25	Estabilizador de suspensión
Bentonita	77,8	Inerte o vehículo
<i>Beauveria bassiana</i>	21,2	Ingrediente activo

Para la fermentación líquida del hongo se preparó un medio a base de agua destilada, abono foliar nitrogenado (Bayfolan ®), soya, papa y dextrosa (Cuadro 5). Volúmenes de 500 ml del medio fueron colocados en erlenmayer de un litro para luego ser autoclavado por 35 minutos a una presión de $1,3 \text{ kg/cm}^2$ y una temperatura de 121°C . Luego de que el medio estaba a temperatura ambiente se procedió a inocularlo con la cepa seleccionada y a colocarle un capilar de vidrio que proporciona un flujo de aire producido por unos burbujeadores para acuario, filtrado con un filtro Milipore de 0,2 micrómetros para evitar contaminación. A los 7 días de la inoculación e incubación se procedió a colectar el medio de crecimiento y homogeneizarlo utilizando una licuadora. El inóculo resultante fue una mezcla de blastosporas y fragmentos de micelio de los cuales se determinó la concentración reportando como UFC (unidades formadoras de colonias) y se utilizó esta unidad para definir la cantidad a utilizar para alcanzar las dosis definidas para aplicar en campo (1×10^{13} ufc/ml como dosis alta y 1×10^{12} ufc/ml como dosis baja).

Para la aplicación en campo de la formulación en polvo, se les adicionó aceite mineral agrícola a una concentración de 300 ml y NU FILM como dispersante a base de Pinolene, poli-1-p-menteno a una concentración de 75 ml por estañón de 200 litros. En cuanto a la formulación líquida solo se le agregó el dispersante.

Cuadro 5 Componentes usados en la formulación líquida

Ingredientes	Volumen	Función
Agua destilada	500 ml	Disolvente
Abono foliar (Bayfolan)	30 ml/l	Nutriente
Soya	10 gr/l	Nutriente
Papa	45 gr/l	Nutriente
Dextrosa	40 gr/l	Nutriente
<i>Beauveria bassiana</i> (Micelio y blastosporas)	20 ml/l	Ingrediente activo

Nota: para inocular el medio se utilizaron 40 ml de una suspensión de conidias (*Beauveria bassiana*) a una concentración de 1×10^9 con/ml.

3.1.2 Fase de campo

El ensayo de campo se realizó en tres fincas de los productores orgánicos ubicado en las coordenadas 10°25'386" latitud Norte y 84° 11'652" longitud Oeste, del asentamiento campesino de Montelirio y el caserío La Españolita, del distrito Río Cuarto, del cantón de Grecia, provincia Alajuela (Info Grecia 2009). Desde el punto de vista geográfico el presente estudio se ubica en el cantón de Grecia. Este es el tercer cantón de Alajuela y se localiza en la parte Oeste del Valle Ínter montano Central (Info Grecia 2009). En su sector nororiental (distrito Río Cuarto) limita al norte y oeste con San Carlos, al sur con Valverde Vega y al este con los cantones Alajuela y Sarapiquí. Su clima es húmedo con abundantes precipitaciones durante el año. Se trata de un cantón principalmente agrícola, sus principales productos figuran los granos, la yuca y la piña, así como la producción forestal. Sin embargo, la ganadería ocupa el lugar más importante dentro de las actividades económicas del lugar, tanto en lo que concierne a la venta de carne como de leche (Municipalidad de Grecia 2008, Quesada 2001).

3.1.2.1 Evaluación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo

Para evaluar la efectividad de la cepa seleccionada y formulada se estableció un ensayo de campo en plantaciones comerciales de piña entre 3 y 5 meses de crecimiento. Las unidades experimentales fueron parcelas constituidas por 6 hileras con una longitud de 20 metros para un área total de 0.0176 hectáreas por unidad experimental.

De dicha cepa se aplicó una concentración de 3×10^{13} con/ha para la dosis alta y 3×10^{12} con/ha para la dosis baja. Usando un volumen total por unidad experimental de 25 litros a una concentración de 2.1×10^7 con/ml para la dosis alta y 2.1×10^6 con/ml para la dosis baja, las cuales fueron calculadas para una área de 0.0176 hectáreas por unidades experimentales en cada bloque. Se realizaron 5 aplicaciones y 5 evaluaciones en total, con un intervalo de 15 días entre aplicación. Los muestreos se realizaron antes de cada aplicación iniciando después de la segunda aplicación. Las aplicaciones se realizaron por aspersion al follaje de la planta y perpendicular a la base de la planta de lado a lado en cada surco. Para esto se utilizó una bomba de mochila motorizada marca AGROBOSS – FA 900 con una capacidad de 0,7 kw/5,500 RPM, a una presión de 30-35 kg/cm² (figura 3).

Los tratamientos evaluados fueron: 1-Formulación líquida de *Beauveria bassiana* (FLBC1) en dosis alta (3×10^{13}), 2-FLBC2 en dosis baja (3×10^{12}), 3- Formulación en polvo de *B.bassiana* aplicada en suspensión acuosa (FPBC1) en dosis alta, 4- FPBC2 en dosis baja, dos testigos referenciales (FLBC0) y (FPBC0) y un testigo absoluto, los testigos referenciales correspondieron a la aplicación de las formulaciones y concentraciones cero, y el absoluto sólo se la aplicó agua. Se realizaron tres repeticiones para un total de 21 unidades experimentales.

Para las evaluaciones en cada unidad experimental se tomaron siete plantas como puntos de muestreos. En cada unidad experimental se extrajo una planta al azar por muestreo para realizar un conteo minucioso de cantidad y mortalidad de cochinillas. Las plantas extraídas fueron llevadas al laboratorio y se despegaron las hojas una por una; las cochinillas vivas y muertas se contabilizaron para determinar el porcentaje de mortalidad de ninfas y adultos en cada uno de los tratamientos. Las cochinillas muertas se observaron en el estereoscopio y se llevaron a cámara húmeda para determinar si fueron atacadas por el hongo evaluado o algún parasitoide o depredador.

Para el reporte de presencia y ausencia de cochinillas se tomaron al azar seis puntos de muestreo en forma de zig – zag, para lo cual en cada unidad experimental se tomaron alrededor de cada punto de muestreo cuatro plantas, para reportar presencia y ausencia de cochinillas.



Figura 3 Forma de aplicación y evaluación de los tratamientos en campo y laboratorio.

3.1.2.2 Análisis estadístico

Para evaluar la efectividad en el campo de la cepa formulada, se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar, con 4 tratamientos, 2 testigos referenciales, 1 testigo absoluto y 3 repeticiones para un total de 21 unidades experimentales.

El análisis de los resultados se realizó de acuerdo a cada una de las variables. Para el análisis de las variables, porcentaje de mortalidad, número de cochinillas vivas en hojas y la variable de interacción tratamientos - estratos de la planta, se utilizaron modelos lineales generalizados, utilizando regresión de Poisson.

Para la variable presencia y ausencia de cochinillas se realizaron frecuencias del éxito y fracaso entre bloques y tratamientos y se llevaron a suma de los porcentajes, con los cuales se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y se aplicaron pruebas de medias de acuerdo al diseño de muestreo propuesto. Las inferencias estadísticas (prueba de hipótesis y estimaciones de parámetros) se realizarán mediante la prueba estadística LSD de Fisher, considerando un nivel de significancia del 5% (Di Rienzo *et al.* 2009). Los datos serán procesados con el software Infostat.

Para las evaluaciones se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

F_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto del j-ésimo bloque

ϵ_{ij} = Término de error independiente supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante

3.1.2.3 Estimación de la población residual de cochinillas en el campo

Como parte del desarrollo de herramientas para la toma de decisiones en la estrategia de control de cochinillas se trabajó en la adaptación de una metodología para la detección de poblaciones residuales de cochinillas, con mira a predecir cuales podrían ser las áreas más problemáticas y que deberían recibir un tratamiento de manejo de plagas más intensivo en el cultivo establecido.

Para la extracción de cochinillas presentes en el suelo se desarrollaron 2 métodos tomando como referencia el método de extracción de nematodos de suelo de la Universidad de Costa Rica (UCR 2008) y el proceso de manejo postcosecha de la *Alpinia purpurata* (Ostos 2006) en el cual se utiliza el lavado de las flores en pilas para la eliminación de las cochinillas. Se realizaron tres repeticiones por cada prueba, las cuales fueron efectuadas en el área del laboratorio de control microbioal del CATIE con la finalidad de ajustar y validar el método de extracción para la muestras de campo.

El primer método (extracción por densidad) consistió en extraer una muestra de aproximadamente 2 kg de suelo, el cual se inoculó con 10 cochinillas de 2^{do}, 3^{ro} y 4^{to} estadios revolviéndolas hasta incorporar los insectos al suelo. La muestra inoculada fue colocada en el fondo de un balde y suspendida en 7 - 10 litros de agua. La muestra en suspensión fue agitada manualmente durante 1 minuto para facilitar la liberación de las cochinillas y posteriormente se dejó reposar por 2 minutos, con el fin de que las partículas más pesadas se sedimenten y por densidad las cochinillas floten. Al cabo de este periodo, con una lupa se observaron las

cochinillas que estuvieron a flote y fueron recolectadas. Por último la suspensión fue nuevamente agitada y se dejó reposar por 2 minutos y luego se colectaron para ser contadas.

El segundo método (extracción por tamizado) se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el método uno con la variante de que las cochinillas no fueron extraídas directamente. La suspensión fue pasada a través de un juego de cribas superpuestas de 8 – 3 - 0,355 y 0,250 mm respectivamente (Figura 2). Posteriormente la criba de 0,250 mm fue lavada con abundante agua durante un minuto, y luego se colectaron los residuos en un plato Petri para contabilizar las cochinillas con el uso de un estereoscopio.



Figura 4 Validación en laboratorio de la metodología de extracción de cochinillas residuales en campo.

La determinación de presencia a nivel de campo se realizó mediante un muestreo sistemático con tres repeticiones de 1,600 m², en forma de cuadrícula a 10 X 10 m, utilizando un marco cuadrado de 25 X 25 cm en cada punto de muestreo. Dentro del cuadro se tomó una muestra de suelo de aproximadamente 2kg a 5 cm de profundidad. Las muestras fueron examinadas, utilizando el método de detección seleccionado en la fase anterior, para determinar la población por m² en cada punto de muestreo. Además se realizaron las observaciones de restos de cosecha y otros hospederos, reportando presencia o ausencia de cochinillas.

Con los datos de población de cochinillas por punto de muestreo se generaron mapas usando la interpolación de datos con el programa Surfer 8, para observar el patrón de agregación de las plagas. Realizando muestreos de poblaciones posteriores en el cultivo se colectaron datos en el mismo lugar para correlacionar con los generados en el primer muestreo.

4 RESULTADOS

4.1 Fase de laboratorio

4.1.1 Preselección de cepas

La búsqueda de cochinillas infectadas en campo de forma natural no produjo resultados satisfactorios, razón por la cual se utilizaron aislamientos de los géneros *Paecilomyces*, *Beauveria* y *Metarhizium* de la colección de hongos entomopatógenos del CATIE.

Las pruebas para medir la efectividad de las cepas evaluadas en el porcentaje de mortalidad de cochinillas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p=0,0001$). A los catorce días de evaluación, las unidades experimentales alcanzaron porcentajes de 33,33 a 100% a excepción del testigo, en el cual no hubo mortalidad (Anexo1, 2). El mayor porcentaje de mortalidad lo produjo el Tratamiento BII con 100%, seguido de los Tratamientos MII y BI con 70 y 66,67% de mortalidad respectivamente; mientras que el menor porcentaje lo presentó el Tratamiento BIII con un 33,33% (Cuadro 6). El tratamiento BII fue seleccionado para realizar la prueba de invernadero.

Cuadro 6 Porcentaje de mortalidad de cochinillas después de 14 días de la inoculación con los tratamientos evaluados

Tratamientos	Cepas combinadas	Porcentaje de mortalidad	
BII	A3; 0421; 0410; B-B56-16	100,00	a
MII	RCO2; G6TE-22; CFAL-4	70,00	b
BI	G-ATI-2; 0601; 0465	66,67	b
MI	C-SRA-2; 6-BCH-1; 0430	46,67	b c
PI	0485	36,67	c
BIII	G-ALLA-1; 0412; ACHI-2; G-CBR-3	33,33	c
Testigo	-----	0,00	d

Nota: Los tratamientos BI, BII y BII están constituido de *Beauveria Bastiana*, los tratamientos MI y MII están constituido de *Metarhizium anisopliae* y el tratamiento PI esta constituido de *Paecelomyces ssp.*

*Prueba LSD Fisher Alfa = 0,05 DMS = 27,55690.CV 31,17
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)*

De los insectos muertos que fueron colocados en cámara húmeda para permitir el desarrollo de los hongos, se observó esporulación en insectos de todos los tratamientos

(figura 4). El mayor número de insectos esporulados perteneció al tratamiento BI, alcanzando casi un 70% del total de los insectos incubados, mientras que el tratamiento PI solo presentó un 8,33% de casos con esporulación (Cuadro 7). Pese a la diferencia visible en el comportamiento de la esporulación, no se logró establecer diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p=0,1255$) a los 5 días después de llevados a cámara húmeda

Cuadro 7 Porcentaje de cochinillas muertas con síntomas de presencia de hongos

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad	
BI	69,64	a
MII	52,50	a
BII	46,67	a
MI	25,00	a
BIII	22,22	a
PI	8,33	a
Testigo	0,00	a

Prueba LSD Fisher Alfa = 0,05 DMS = 53,14160. CV 94,68



Figura 5 Cochinitas muertas en cámara húmeda con esporulación de hongo Beauveria bassiana.

4.1.2 Selección de cepas en invernadero

El análisis de los resultados correspondientes al porcentaje de mortalidad de cochinillas al evaluar las cepas individuales y en forma combinada del Tratamiento BII (*Beauveria bassiana*), previamente seleccionado en la prueba de invernadero, registra diferencias significativas para los tratamientos evaluados ($p=0,0001$). A los catorce días de evaluación las unidades experimentales alcanzaron porcentajes de 86,67 a 39,49% a excepción del Testigo, el cual presentó 0,46% de mortalidad (Anexo 5). El mayor porcentaje de mortalidad lo produjo el Tratamiento 12 con 86,67%, seguido de los Tratamientos 11, 9 y 3 con 85,58; 84,62 y 82,76%

de mortalidad respectivamente; mientras que el menor porcentaje lo presentó el Tratamiento 2 con un 39,49%. (Cuadro 8).

El tratamiento 3, constituido por una sola cepa, fue preferido ante los tratamientos 12, 11 y 9 debido a que estos últimos estaban conformados por mezclas de cepas, lo cual dificulta el proceso de producción y manejo del bioinsecticida. Además que entre dichos tratamientos no hubo diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 8 Porcentaje de mortalidad de cochinillas después de 14 días de las aplicaciones de los tratamientos evaluados a nivel de invernadero

Tratamientos	Combinaciones	Porcentaje de mortalidad	
12	A3, 0410, B-B56-16	86,67	a
11	A3, 0421,0410	85,58	a
9	0421, B-B56-16	84,62	a b
3	0410	82,76	a b
15	A3, 0421, 0410, B-B56-16	74,18	a b
14	0421, 0410, B-B56-16	73,88	a b
5	A3, 0421	70,07	a b
7	A3, B-B56-16	66,98	a b
13	A3, 0421, B-B56-16	57,62	a b
1	A3	57,35	a b
6	A3, 0410	55,31	a b
8	0421, 0410	52,04	a b
4	B-B56-16	44,29	a b
10	0410, B-B56-16	43,54	a b
2	0421	39,49	b c
16	testigo	0,46	c

Prueba Duncan Alfa = 0,05. CV 42,16

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

4.2 Fase de campo

4.2.1 Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo

No se observaron cochinillas muertas en las plantas tratadas ni en los testigos durante el periodo de evaluación. Debido a esta circunstancia no fue posible establecer ninguna prueba estadística y detectar diferencias entre los tratamientos.

Para la variable número de cochinillas vivas en hojas se realizó una regresión de Poisson para determinar el valor de (p) en las diferentes combinaciones lineales, donde tomando una constante se realizaron contrastes para compara un tratamiento frente a los demás (Anexo.7). Para las combinaciones 1, combinación 2, combinación 3, combinación 5, combinación 6, combinación 8, combinación 9, combinación 10, combinación 11, combinación 13, combinación 14, combinación 15 el valor ($p=0,0001$) indicando diferencias significativas para cada unas de las combinaciones. Para las combinaciones 4, combinación 7, combinación 12 el valor ($p=0,5576$), ($p=0,0846$) y ($p=0,6854$) respectivamente, indicando que no hay diferencias significativas para cada unas de esas combinaciones (Cuadro 9).

Cuadro 9 Contraste de hipótesis para combinaciones lineales entre los tratamientos evaluados para la variable número de cochinillas vivas en hojas

Combinación lineal	Contrastes	gl	Chi²	p-valor
Comb.1	Trat. 1 vs Trat. 2	1	69.73	<0.0001
Comb.2	Trat. 1 vs Tra. 3	1	20.81	<0.0001
Comb.3	Trat. 1 vs Trat. 4	1	98.72	<0.0001
Comb.4	Trat. 1 vs Trat. 5	1	0.34	0.5576
Comb.5	Trat. 1 vs Trat. 6	1	17.40	<0.0001
Comb.6	Trat. 2 vs Trat. 3	1	149.94	<0.0001
Comb.7	Trat. 2 vs Trat. 4	1	2.97	0.0846
Comb.8	Trat. 2 vs Trat. 5	1	78.90	<0.0001
Comb.9	Trat. 2 vs Trat. 6	1	142.47	<0.0001
Comb.10	Trat. 3 vs Trat. 4	1	186.05	<0.0001
Comb.11	Trat. 3 vs Trat. 5	1	15.95	0.0001
Comb.12	Trat. 3 vs Trat. 6	1	0.16	0.6854
Comb.13	Trat. 4 vs Trat. 5	1	109.17	<0.0001
Comb.14	Trat. 4 vs Trat. 6	1	178.26	<0.0001
Comb.15	Trat. 5 vs Trat. 6	1	12.96	0.0003
Total	-----	15	-1.26	>0.9999

Prueba Regresión Poisson

El valor ($p \leq 0,05$) indica diferencias significativas

Para determinar en cuales de los tratamientos hubo una menor presencia de cochinillas se realizaron comparaciones de medias y se aplicaron contrastes para determinar en cuales de ellos existía diferencias significativas (Cuadro 10).

Cuadro 10 Estimación de medias y salida realizada por contrastes para la variable número de cochinillas vivas en hojas

Tratamientos	Descripción	Medias
3	(FPBC1)	12 a
6	(FPBC0)	13 a
5	(FLBC0)	18 b
1	(FLBC1)	19 b
2	(FLBC2)	35 c
4	(FPBC2)	39 c
7	Testigo	102 d

Prueba Regresión Poisson

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Para la variable número de cochinillas vivas en hojas, se pudo observar una alta variabilidad en el número de insectos en cada una de las plantas muestreadas dentro de cada tratamiento durante el período de evaluación. En este período el tratamiento que obtuvo la menor presencia de cochinillas fue el tratamiento 3, constituido por la formulación en polvo y la concentración alta (FPBC1). Este, a su vez, no tuvo diferencias significativas con el tratamiento 6, constituido por la formulación en polvo y la concentración cero (FPBC0). Lo que descarta que el hongo haya sido el que causó la reducción en la presencia de cochinillas.

A pesar de que el número de cochinillas observadas en las plantas muestreadas dentro de los tratamientos fue muy variable para cada fecha de evaluación, para la variable de interacción tratamiento - estratos de la planta se encontraron diferencias significativas para los tratamientos ($p=0,0001$), para los estratos de la planta ($p=0,0001$) y para la interacción tratamientos - estratos ($p=0,0001$). Donde tomando un tratamiento como constante se compara: un tratamiento frente a los demás (Trat 1 vs resto), y tomando un estrato de la planta como constante lo compara con los demás (EP 1 vs resto) y donde compara la interacción tratamiento- estratos de la planta o (Trat 1 vs EP 1 y el resto).

Cuadro 11 Estimación de parámetros para la variable de interacción Tratamiento - estratos de la plata

Parámetros	Est.	E. E.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald Chi ²	p-valor
Constante	2,04	0,09	1,85	2,22	477,12	<0,0001
T1	-1,13	0,19	-1,50	-0,76	36,00	<0,0001
T2	-1,49	0,22	-1,91	-1,06	46,88	<0,0001
T3	-1,65	0,23	-2,11	-1,20	50,51	<0,0001
T4	0,43	0,12	0,19	0,66	12,60	0,0004
T5	-0,68	0,16	-1,00	-0,37	18,06	<0,0001
T6	-0,79	0,17	-1,12	-0,47	22,56	<0,0001
EP1	2,26	0,10	2,07	2,45	532,32	<0,0001
EP2	1,04	0,11	0,82	1,25	91,06	<0,0001
T1_EP1	-0,60	0,20	-1,00	-0,20	8,59	0,0034
T1_EP2	-0,54	0,23	-1,00	-0,08	5,20	0,0226
T2_EP1	0,53	0,22	0,09	0,97	5,49	0,0192
T2_EP2	0,18	0,25	-0,30	0,67	0,55	0,4599
T3_EP1	-0,49	0,25	-0,98	-8,80E-04	3,86	0,0496
T3_EP2	-0,39	0,28	-0,95	0,17	1,87	0,1716
T4_EP1	-2,28	0,15	-2,57	-2,00	247,22	<0,0001
T4_EP2	-0,71	0,15	-1,00	-0,42	23,32	<0,0001
T5_EP1	-1,53	0,19	-1,89	-1,16	66,29	<0,0001
T5_EP2	-0,50	0,20	-0,89	-0,11	6,42	0,0113
T6_EP1	-1,83	0,20	-2,23	-1,43	81,03	<0,0001
T6_EP2	-0,78	0,21	-1,20	-0,36	13,32	0,0003

Prueba **Regresión Poisson**

El valor ($p \leq 0,05$) indica diferencias significativas

En la Figura 5 podemos notar que hay una clara diferencia en cuanto al número de cochinillas presente en la interacción Tratamiento – Estratos de la planta, donde el testigo se diferencia de los demás por tener una mayor presencia de cochinillas. En la figura 6 los Tratamientos 1 (FLBC1) y 3 (FPBC1) son los que presentan una diferencia significativa mayor. Siendo el Tratamiento 3 el que tiene una mayor diferencia.

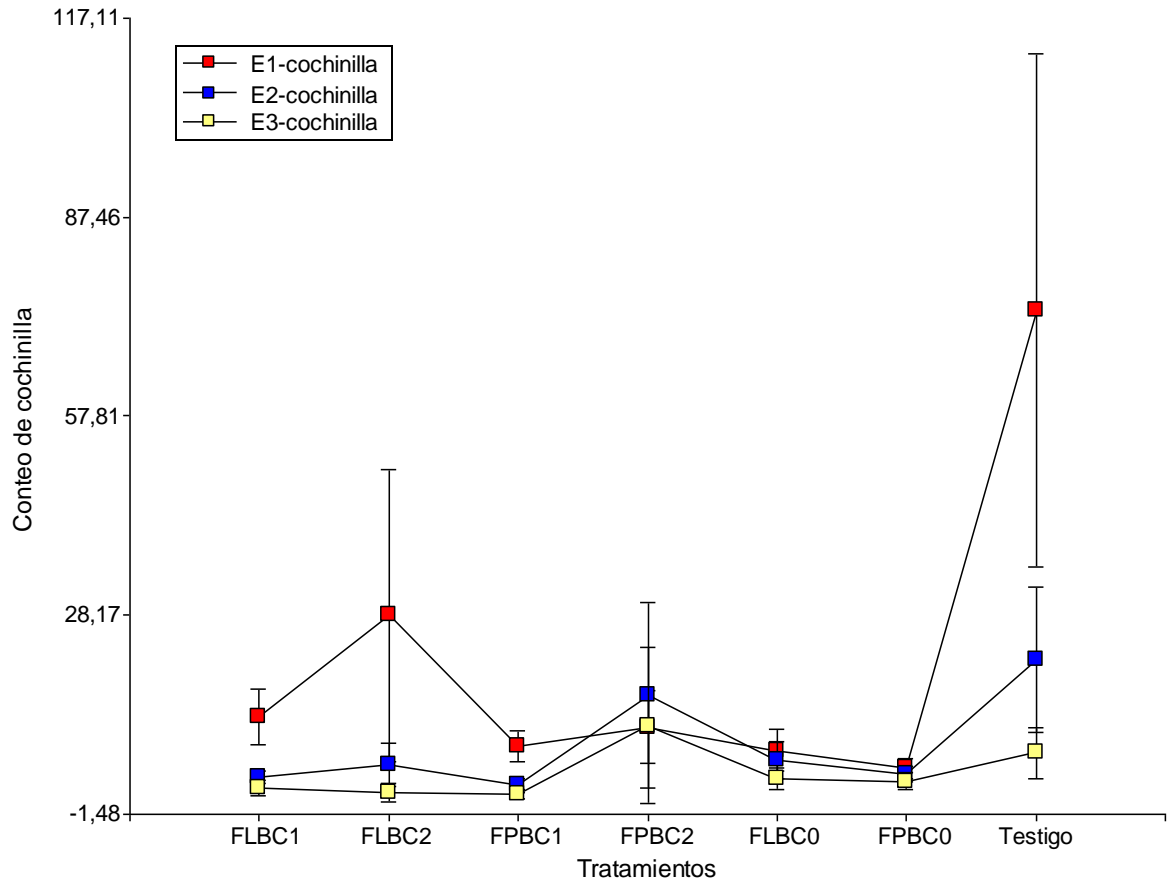


Figura 6 Conteo de cochinillas en la interacción Tratamiento – Estratos de la planta

Los resultados evaluados para la variable presencia y ausencia de cochinillas indican que hubo diferencias significativas para los bloques ($p=0,0007$), siendo el bloque 2 el que tuvo una menor presencia de cochinillas. Mientras que entre los bloques 3 y 1 no hubo diferencias significativas. Para los 6 tratamientos no se observaron diferencias significativas ($p=0,6084$) lo que indica que son todos iguales al testigo.

Cuadro 12 Análisis de varianza basado en las sumas de los porcentajes de Bloques para la variable presencia y ausencia de cochinillas

Bloques	Medias	n
B2	0,54	7 a
B3	0,68	7 b
B1	0,78	7 b

Prueba LSD de Fisher = 0,05

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$)

Cuadro 13 Análisis de varianza basado en las sumas de los porcentajes de los Tratamientos para la variable presencia y ausencia de cochinillas

Tratamientos	Medias	n	
T1	0,60	3	a
T6	0,64	3	a
T5	0,65	3	a
T3	0,65	3	a
T2	0,69	3	a
T4	0,71	3	a
T7	0,72	3	a

Prueba LSD de Fisher = 0,05

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

4.2.2 Estimación de la población residual de cochinillas en el campo

En las pruebas preliminares para seleccionar el mejor método para la extracción de la cochinilla del suelo se pudo extraer el 90% de las cochinillas inoculadas en un tiempo de 20 minutos utilizando el método de separación por flotación (método 1), mientras que con el segundo método, utilizando cribas, se extrajo un 76% de las cochinillas inoculadas, requiriendo un tiempo aproximado de 60 minutos para procesar 3 muestras. En el segundo método se utilizó bastante agua para el lavado de la cribas, se acumuló mucha basura de los rastros del suelo y cuando las muestras fueron pasadas a platos petri para contar en el estereoscopio, las cochinillas estaban en el fondo de los platos lo que dificultaba la visibilidad y la extracción.

En ambos métodos de extracción se pudo observar que las cochinillas cuando son incorporadas al suelo pierden gran parte de la capa cerosa que la cubre, aunque esto no impide que las cochinillas floten cuando se le agrega agua en el balde. También se pudo observar que los insectos de primeros estadios son muy difíciles de encontrar aún con el uso de una lupa o estereoscopio. Esto se debe al manejo del suelo donde los insectos de primeros estadios tienen el cuerpo muy débil y son destrozados en el periodo de incorporación, al igual que los que logran sobrevivir son muy pequeños y se pierden entre los rastros. Basados en los resultados de efectividad en la recuperación de cochinillas se seleccionó el método 1 como herramienta para muestreo a nivel de plantaciones comerciales.

Debido a que los productores orgánicos de la zona de estudio no tenían campos listos para la siembra durante el periodo que comprendió este trabajo de tesis, la detección de poblaciones residuales de cochinillas en el suelo se realizó en campos de productores de piña bajo el sistema de producción convencional. Pese a que la cochinilla es también un problema en plantaciones convencionales, algunas prácticas de manejo como la aplicación al suelo de insecticidas del grupo de los Carbamatos y, conjuntamente con las aplicaciones de herbicidas en las plantaciones cosechadas para acelerar el proceso de secado de los rastrojos de cosecha, al igual que las aplicaciones de cal (Hidróxido de calcio) como reductor de la acidez del suelo, reducen las poblaciones de cochinilla a niveles no detectables con el método seleccionado (Vásquez 2000). Como resultado, no se encontraron cochinillas en los lotes de los productores convencionales muestreados, por tanto no se presentan acá los mapas de distribución planteados en la metodología. El método de muestreo logró detectar solamente insectos del Orden Hemiptera, Familia Cydnidae, los cuales son reportados como plagas en otros cultivos pero no eran el objetivo de este estudio.

5 DISCUSIÓN GENERAL

5.1.1 Preselección de cepas

El alto porcentaje de mortalidad que presentaron algunos de los tratamientos pudo haberse debido, a que en esta fase a cada uno de los especímenes de cochinillas se les realizó una aplicación directa del inóculo asegurando el contacto de los hongos con el insecto, también a que en esta etapa se trabajó bajo condiciones ambientales controladas de humedad y temperatura. Investigaciones similares confirman los resultados obtenidos en esta prueba de laboratorio; Tavassoli *et al.* (2008), evaluaron la eficacia de tres diferentes cepas de entomopatógenos del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de ácaros rojo de aves de corral *Dermanyssus gallinae* in vitro. Los tratamientos fueron aplicados directamente sobre grupos de 30 ácaros de diferentes estadios, colocados en platos Petri con papel filtro humedecido, encontrando que las tres cepas evaluadas presentaron una tasa de mortalidad de 45,1% a 100% a los 8 días después de aplicados los tratamientos.

El alto porcentaje de control encontrado en los tratamientos que presentaban cepas combinadas de *Beauveria bassiana* pudo haber sido el producto de un fuerte sinergismo que aumentó su virulencia. En estudios similares, Cárdenas *et al.* (2007) evaluaron la eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. Evaluando en el laboratorio y el campo la mortalidad de la broca, causada por seis mezcla de cepas de *B. bassiana*. Encontraron que en laboratorio el porcentaje de mortalidad de las brocas por acción de los tratamientos fluctuó entre el 73,3 y 100% sin registrarse mortalidad en el testigo, y en campo el porcentaje de mortalidad de las brocas estuvo entre el 50,3 y 66,6% utilizando una concentración de 1×10^8 y 1×10^9 conidios/árbol. Por el contrario Carvajal (1996), evaluó combinaciones de cepas de *Beauveria sp.* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metch.) y *Bacillus popilliae* (Dutky) para el control de larvas de *Phyllophaga menetriesi* (coleoptera: Scarabaeidae) y demostró que aplicaciones combinadas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, aplicadas subsecuentemente el mismo día, redujeron la mortalidad a un 15% en comparación con aplicaciones individuales que presentaron un 52.5% de mortalidad; evidenciando un posible antagonismo.

Las experiencias contrastantes de otros investigadores en cuanto al resultado de la mezcla de cepas sobre su capacidad de producir mortalidad en los insectos plaga, hacen que se deba ser precavido al utilizar esta técnica pues es posible perder cepas promisorias si se encuentran en mezcla con otras capaces de antagonizar su actividad. Sin embargo, la ventaja en cuanto al número de aislamientos que se pueden incluir en un proceso de selección hace de esta una técnica importante. En el caso de esta investigación, la obtención de un 100% de mortalidad con uno de los tratamientos nos asegura que las cepas involucradas están expresando su virulencia sin problemas y para verificar si existió sinergismo en la mezcla se procedió a la segregación de las cepas dentro del grupo seleccionado en todas sus posibles combinaciones probando su eficacia en la prueba bajo condiciones de invernadero, de la cual se presentan resultados a continuación.

5.1.2 Selección de cepas en invernadero

Los resultados observados demuestran el potencial de las cepas aplicadas para controlar la plaga bajo las condiciones particulares del experimento y justifican la selección final de la cepa para ser probada en la fase de campo. Pese a los resultados positivos de control, estos no deben tomarse como datos concluyentes hasta validar su efectividad bajo el hábitat natural de la plaga. La metodología usada en invernadero no simuló bien las condiciones naturales del cultivo o la plaga debido a que las cochinillas inoculadas aún no estaban bien establecidas en las plantas de piña haciéndolas quizás más susceptibles a la parasitación por parte del hongo entomopatógeno, también a que bajo invernadero las condiciones ambientales son más adecuadas para el establecimiento y supervivencia del hongo y desarrollo de epizootias, al no estar expuestas a los rayos ultravioleta que matan a sus conidios. Resultados similares obtuvo Shipp *et al.* (2003) quienes evaluaron la influencia de la humedad y el microclima en invernadero sobre la eficacia de *Beauveria Bastiana* para el control de los artrópodos (*Aphis gossypii*, *Frankliniella occidentalis* y *Trialeurodes vaporariorum*) en el invernadero. Encontrando que la infección en adultos de *A. gossypii*, *F. occidentalis* y *T. vaporariorum* alcanzaron niveles de 71 a 77% de mortalidad, manteniendo una humedad relativa de 89 a 97% durante un periodo de tiempo de 7 días a una temperatura de 25°C. Por otra parte a nivel de invernadero tampoco se cuenta con la presencia de las hormigas que suelen crear una cubierta de suelo sobre las colonias de cochinillas para protegerlas. Esta barrera física que se da en condiciones de campo disminuye sensiblemente la

efectividad de la aplicación del biocontrolador al no permitir que este entre en contacto con el cuerpo de las cochinillas. Este contacto es primordial para que se dé la germinación del hongo con la subsecuente infección y muerte del insecto.

5.1.3 Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo

Basados en los resultados observados en las fases de laboratorio e invernadero se podrían sugerir algunas posibles razones por las cuales no se obtuvo control a nivel de campo. Entre ellas se puede remarcar que el hongo necesita entrar en contacto directo con la cutícula de los insectos para germinar y causar mortalidad. Esto pudo haber sido dificultado por las barreras físicas a nivel de campo que se suman a la cubierta de cera que estas tienen. Por el sistema de distribución de la plaga, la cual se presenta por focos y esos focos a su vez en colonias. Por la ubicación donde las cochinillas normalmente se encuentran (el envés y en el interior de las axilas de las hojas) lugar a donde es difícil llegar con los volúmenes de aplicación utilizados.

Por otra parte la presencia de hormigas (*Solenopsis geminata*) en todas las plantas donde se encuentran las cochinillas pudo haber jugado un papel importante. *S. geminata* construye una cubierta de tierra en torno a la colonia de cochinillas para protegerlas del sol, agua y cualquier patógeno que pueda eliminarla. Las hormigas también son el primer factor de dispersión de las cochinillas. En estudios realizados por Daane *et al.* (2007), quienes evaluaron la relación entre hormigas argentinas (*Linepithema humile*), cochinillas (*Pseudococcus viburni*) y varias especies de enemigos naturales (*Pseudaphycus flavidulus* y *Leptomastix epona*) en viñedos de California, demostraron que la densidad y los niveles de infestación más altos de cochinillas en frutas se dieron donde hubo una mayor presencia de hormigas. Por el contrario, donde hubo una menor presencia o exclusión de hormigas la infestación fue menor. Los autores documentaron la presencia de un mutualismo entre la hormiga y el homóptero, donde los fluidos que salen de las cochinillas alimentan a las hormigas y éstas protegen a las cochinillas de los enemigos naturales. Por el contrario Ostos (2006), evaluó la influencia de características del paisaje y prácticas de manejo sobre la incidencia de cochinillas (Hemiptera) en *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. Encontrando que no hay relación entre las hormigas con la distribución de la población de cochinillas en el cultivo. En contraste con Ostos, en el

presente estudio pudimos notar que la abundancia de hormigas dentro de la piña resulta ser un indicador de la presencia de cochinillas, más aún si estas se encuentran aglomeradas en lugares como el tronco o base de la planta y en hojas cercanas a la base. Durante todo el periodo de evaluación se observó esta fuerte asociación, a tal punto que la detención de los focos de cochinillas se podía realizar tomando como referencia la presencia de hormigas en la base de la planta. Por tal razón la eliminación de estos formícidos podría ayudar a disminuir el ataque generalizado de las cochinillas en el cultivo, y se pueden tomar estos focos como punto críticos de contaminación donde hay que realizar aplicaciones dirigidas para el control de la plaga.

Otro factor que pudo disminuir la efectividad de los hongos fue el aumento en la intensidad de las lluvias que cayeron durante las últimas 3 aplicaciones las cuales pudieron haber disminuido la concentración del inóculo debido al lavado.

La evaluación de la efectividad de los hongos entomopatógenos va en incremento según nos aproximamos a las condiciones normales del cultivo y la plaga. Este trabajo presenta porcentajes de mortalidad de la plaga muy promisorios a nivel de laboratorio e invernadero, pero las condiciones de campo no permitieron constatar que estos resultados sean extrapolables. Los múltiples factores biofísicos que intervienen a nivel de campo, aunados a los específicos sugeridos en este trabajo, convierten la falta de mortalidad en una incógnita cuya respuesta puede ser de alta complejidad. El nivel de detalle y esfuerzo utilizado en este trabajo para detectar la mortalidad en campo son difícilmente utilizados por el productor para constatar la efectividad de los tratamientos que utiliza para control de esta plaga. Esto es de gran importancia como una consideración para futuros trabajos en este campo pues se demuestra que la verdadera efectividad del hongo entomopatógeno seleccionado para el control de cochinilla, en este u otros cultivos, debe comprobarse a nivel de campo. Además hay que rescatar que si la cepa seleccionada ha demostrado ser capaz de causar altos niveles de control del insecto, se debe invertir más tiempo en investigaciones dirigidas a lograr en campo la repetitividad de los resultados observado en laboratorio.

En la producción piñera se utiliza una gran cantidad y diversidad de agroquímicos muy tóxicos y peligrosos, ya que son parte de un paquete tecnológico destinado al control de enfermedades, plagas y arvenses. Para el control de enfermedades los fungicidas que más se utilizan son:

Aliette® 80WP (Fosetil-Al), Ridomil Gold®SL (Metalaxil) y Benomyl. El control de plagas se realiza mediante el uso de insecticidas como: Diazinon, Carbaryl®48 SC (Carbaril), AMDRO® (Hidrametilon), como nematicidas están: Mocap (ethoprophos), Vidate (Oxamil), Furadan® 48F (Carbofurn). A esto se les suman el uso de herbicidas (Bromacil), coadyubantes y reguladores de crecimiento, los cuales se mueven fácilmente a través del suelo, por lo que llegan a los mantos acuíferos y los contaminan (Soler *et al.* 2001). Esto atenta contra la salud humana, animal y en contra del recurso natural más importante de todos: el agua. El mal uso y manejo de agroquímicos eventualmente conlleva al incumplimiento de requisitos interpuestos por los principales mercados de exportación (Europa y Estados Unidos) de piña Costarricense, poniendo en peligro al sector piñero. La exportación de piña en la actualidad realiza una contribución al PIB de un 0,08%, con un crecimiento porcentual del sector de 32,4% comparado con el crecimiento porcentual de Costa Rica, que es un 5,09%, generando 14,000 empleos directos (CANAPEP 2008). Por tal razón realizar investigaciones como esta focalizada en generar alternativas para disminuir el uso de químicos mediante la aplicación del control biológico, son necesarias para alcanzar una agricultura más sostenible y amigable con el ambiente al mismo tiempo que se asegura la continuidad en el acceso a los mercados internacionales.

5.1.4 Estimación de la población residual de cochinillas en el campo

Desarrollar herramientas para detectar posibles focos de infestación por cochinillas en campos en preparación para la resiembra de piña ofrece una gran ventaja para el manejo oportuno y focalizado. Siendo esta una plaga fitófaga se presume que su supervivencia durante el tiempo de preparación del terreno, cuando el cultivo no está presente, podría darse en rastrojos de cosecha u hospederos alternos. Utilizando los dos métodos propuestos para este estudio, fue posible detectar un buen porcentaje de las cochinillas artificialmente inoculadas en las muestras de suelo evaluadas a nivel de laboratorio. En ambos métodos de extracción se pudo observar que las cochinillas cuando son incorporadas al suelo pierden gran parte de la capa cerosa que la cubre, aunque esto no impide que las cochinillas floten cuando se le agrega agua en el balde como método de detección. También se pudo observar que los insectos de primeros estadios son muy difíciles de encontrar aún con el uso de una lupa o estereoscopio. Esto podría deberse a que con el manejo durante su incorporación en las muestras de suelo los insectos de estadios tempranos pueden ser triturados ya que tienen el cuerpo muy débil, al

igual que los que logran sobrevivir son muy pequeños y se pierden entre los rastrojos. Aun con la limitante al detectar estadios pequeños de la cochinilla, los métodos lograron detectar hembras adultas. Esto es muy importante ya que estas hembras son las responsables de depositar los huevos que darán origen a las nuevas infestaciones dentro de la plantación de piña. Basados en los resultados de efectividad en la recuperación de cochinillas y en el menor tiempo y equipo requerido para su ejecución, se seleccionó el método 1 como herramienta para muestreo a nivel de plantaciones comerciales. Este método requiere únicamente de baldes y una provisión de agua para ser ejecutado y se considera factible de realizar por todos los productores. Una desventaja de los métodos de monitoreo es que requieren de una alta inversión en mano de obra y análisis pero pueden ser la base para iniciar el control eficiente de la plaga.

Hubo cambios en la planificación para la fase de detección de cochinillas a nivel de plantación comercial, bajo las condiciones normales en las que este método propuesto sería aplicado. Debido a que los productores orgánicos de la zona de estudio no tenían programada la preparación de suelo y siembra durante el periodo que comprendió este trabajo de tesis, la detección de poblaciones residuales de cochinillas se realizó en campos de productores de piña bajo el sistema de producción convencional presentes en la misma zona. Pese a que la cochinilla es también un problema en plantaciones convencionales, las poblaciones en los campos seleccionados estuvieron por debajo de los niveles detectables con el método utilizado. Como resultado, no se encontraron cochinillas en los lotes de los productores convencionales muestreados, por tanto no se presentan acá los mapas de distribución planteados en la metodología. El método de muestreo logró detectar solamente insectos del Orden Hemiptera, Familia Cydnidae, los cuales son reportados como plagas en otros cultivos pero no eran el objetivo de este estudio. Esto pudo deberse a que en los campo a nivel convencional las prácticas de manejo de residuos son muy diferentes a las realizadas en campos orgánicos debido a las restricciones de las certificadoras. En los campos convencionales la aplicación al suelo de insecticidas del grupo de los Carbamatos y, conjuntamente con las aplicaciones de herbicidas en las plantaciones cosechadas para acelerar el proceso de secado, al igual que las aplicaciones de cal (Hidróxido de calcio) como reductor de la acides del suelo limitan la presencia de cochinillas (Vásquez 2000). En cambio en campos de productores orgánicos no pueden realizar aplicaciones de Carbamatos y menos usar

herbicidas para acelerar el proceso de secado de los rastrojos, los cuales son chapeado por los productores y depositados en medio de las hileras. Otros utilizan una trituradoras pero estas pueden dejar rastrojos de un tamaño considerable, donde pueden alojarse las cochinillas. El periodo de descomposición de los rastrojos de piña tarda aproximadamente de tres a cuatro meses incluso encontrándose partes vegetativas verdes aun cuando se esta realizando las nuevas siembras (Fuentes 2007). Los cuales pueden ser un foco de incidencia de cochinilla si la plaga puede vivir en esos rastrojos y reproducirse aceleradamente tomando en cuenta el ciclo biológico de las cochinillas, el cual es de tres meses alcanzando su madurez sexual a los 34 días aproximadamente.

Otro factor importante de mencionar es que al realizar observaciones al alrededor de las fincas muestreadas se pudo constatar que los productores utilizan como barreras vivas en sus cultivos de piña, plantas de *Hibiscus* comúnmente conocida en Costa Rica como campana y en otros países de Latinoamérica como cayena. Se observaron también la utilización de eucalipto como barrera y plantación forestal al alrededor de las fincas. Las cuales son plantas ornamentales y forestales identificadas como hospederas de cochinillas, por lo que hay que prestar mucha atención a las plantas utilizadas para tal fin. Al igual se realizaron observaciones en cuanto a las plantas que se desarrollan dentro de los cultivos ya establecidos y se determinó la presencia de arvenses de la familia cyperaceae, las cuales son altamente hospederas de la plaga, encontrándose cochinillas alojadas en la parte radical de las plantas. Martínez *et al.* (2005), evaluaron la fauna de chinches harinosas (Hemiptera: Coccoidea) asociada a plantas de interés como son: *Hibiscus sp*, *Gliricidia sepium*, *Erythrina abyssinica* y *Eucalyptus sp*. Dentro de las cuales encontraron nueve especies de chinches perteneciente a seis géneros, entre las cuales encontraron: *Dysmicoccus bispinosus* (25,92%), *Dysmicoccus brevipes* (11,11%), *Paracoccus marginatus* (22,22%), *Nipaecoccus nipae* (11,11%), las cuales acumulan el 70,36 % de la población total encontradas; mientras que el resto, *Planococcus minor* (3,70%), *Pseudococcus longispinus* (7,40%), *Pseudococcus sp.* (3,70%), *Dysmicoccus grassii* (7,40%) y *Ferrisia virgata* (7,40%), presentaron una frecuencia muy baja; al aparecer una o dos especies por tipo de planta. La existencia de hospederos alternos de cochinillas alrededor del cultivo de piña y de plantas arvenses dentro del cultivo, puede estar favoreciendo la presencia de la plaga y permitiendo la continuidad de su ciclo reproductivo en periodos en los que el cultivo no está presente. El manejo integral de la cochinilla dentro del cultivo debe

tomar en cuenta la amenaza potencial de las especies utilizadas como barreras, cercas vivas, malezas e incluso los usos de la tierra aledañas al cultivo, dado que estos reservorios de plaga hacen más difícil el manejo y estrategias de control.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Fase de laboratorio

6.1.1 Preselección de cepas

El tratamiento BII, constituido por cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (A3; 0421; 0410; B-B56-16) presentó el mayor porcentaje de mortalidad de cochinillas y un alto porcentaje de insectos muertos con esporulación de hongo en el periodo de evaluación.

Existe un sinergismo marcado entre las mezclas de cepas de *Beauveria bassiana* evaluadas en la prueba de laboratorio.

Se recomienda realizar aislamientos de hongos entomopatógenos nativos de la zona de estudio, para evaluar el potencial de control sobre la cochinilla (*D. brevipēs*) bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

6.1.2 Selección de cepas en invernadero

Los tratamientos 12, 11 y 9 presentaron los mayores porcentajes de mortalidad de cochinillas en la prueba de invernadero (86,67; 85,58 y 84,62 % respectivamente).

El tratamiento 3 (cepa 0410) con un 82,76% fue la mejor alternativa para la evaluación de campo, debido a la dificultad que implica el proceso de producción y manejo de varias cepas en forma combinada, además no presentó diferencias estadísticas con los anteriores tratamientos.

En invernadero no hubo presencia de hormigas, la cual facilitó que el hongo entrara en contacto directo con la plaga lo que causó un mayor porcentaje de mortalidad.

Para mejorar las condiciones de selección de cepas a nivel de invernadero, se recomienda darle un mayor tiempo de adaptación a las cochinillas inoculadas en las plantas para que estas se coloquen en posiciones que normalmente utilizan bajo condiciones naturales.

También extender el periodo de evaluación de los hongos incluyendo mayor número de formulaciones y métodos de aplicación.

6.2 Fase de campo

6.2.1 Estimación de la efectividad de los hongos para el control de cochinillas en el cultivo

No se encontraron cochinillas muertas en las evaluaciones realizadas, lo que indica que el hongo *Beauveria bassiana* en campo no tiene ningún efecto sobre la mortalidad de las cochinillas bajo las condiciones en que fue aplicado en este estudio.

Se recomienda seguir investigando el por qué esta cepa que obtuvo un excelente resultado en la fase de laboratorio, cuando se llevó a campo no presentó efecto alguno. Esto porque los productores están usando este hongo como una alternativa al manejo de cochinillas sin tener un estudio de rigor científico que demuestre cual es el porcentaje real de control obtenido con estos productos a nivel de plantaciones comerciales. También se recomienda realizar un estudio con aplicaciones del hongo durante el ciclo completo del cultivo y en diferentes etapas de este, para determinar en que etapa del cultivo es más eficiente realizar aplicaciones del hongo y en cuales no es recomendable. Se recomienda llevar a cabo estudios de frecuencias de aplicación en campo así como estudios de dosis letales para no tener que utilizar más ingrediente activo que lo necesario. También se hace necesario desarrollar mediciones de las condiciones macro y micro climáticas para relacionarlas con el desempeño del hongo y poder definir cuál es el mejor momento para la aplicación. Se recomienda realizar estudios con el fin de determinar si la adaptabilidad y virulencia de los hongos aplicados en el campo, son afectadas por el manejo de la piña como monocultivo y evaluar si el microclima generado en sistemas agroforestales y de policultivos favorece la efectividad de hongos entomopatógenos.

Para la variable número de cochinillas vivas en hojas se descarta que el hongo (*Beauveria bassiana*) haya sido el que causo una disminución en la presencia de cochinillas en el cultivo, debido a que en este período el tratamiento que obtuvo la menor presencia de cochinillas fue el tratamiento 3, constituido por la formulación en polvo y la concentración alta. Este, a su vez, no tuvo diferencias significativas con el tratamiento 6, constituido por la

formulación en polvo y la concentración cero. Se recomienda hacer aplicaciones tomando en cuenta las condiciones climáticas, las cuales en este estudio fueron negativas para el establecimiento del hongo en el campo, debido a las constantes lluvias después de realizadas las aplicaciones.

Para la variable de interacción tratamiento – estratos de la planta (presencia de cochinillas en los diferentes estratos de la plantas), se descarta la posibilidad que el hongo haya inducido que las cochinillas se concentraran más en la parte inferior de la planta. Esto debido al aumento en la intensidad de las lluvias que cayeron durante las últimas 3 aplicaciones, las cuales pudieron haber ocasionado que las cochinillas no ascendieran a las partes superior de la planta para protegerse de la humedad, la cual es un factor negativo para su reproducción y dispersión. Al igual que por naturaleza la plaga vive en las raíces y base de las plantas para estar protegida de los rayos solares.

Para la variable presencia y ausencia de cochinillas en el cultivo se determinó que la aplicación del hongo no logró disminuir la presencia de las cochinillas en las plantas. Por tal razón se recomienda estudiar más sobre el sistema de agregación y dispersión de la plaga.

Existe un mutualismo entre los formícidos y el homóptero, los cuales protegen las cochinillas creándoles una cubierta de tierra en torno a la colonia protegiéndolas de los rayos solares, la lluvia, de los depredadores y parasitoides y de cualquier patógeno que pueda causarles mortalidad.

6.2.2 Estimación de la población residual de cochinillas en el campo

Para la extracción de cochinillas en el suelo se determinó utilizar el método 1 (detección de las cochinillas por flotación en agua), el cual obtuvo un mayor porcentaje de insectos recuperados en las evaluaciones que se les realizaron en el laboratorio, al igual que es más fácil su aplicación a nivel de campo, se reduce al máximo la utilización de agua y se empleo un menor tiempo durante la evaluación. Por lo que se recomienda aplicarla a nivel de campo para así validarla o modificarla.

Para la detección de poblaciones residuales de cochinilla en campo no se pudieron realizar los mapas de agregación porque en las evaluaciones realizadas no fueron detectadas,

por lo que se recomienda aplicar esta metodología de extracción de cochinillas en campos de productores de piña orgánica durante la época de siembra, ya que ellos tienen un manejo de residuos y de aplicaciones en sus campos diferentes a los productores convencionales que propician la permanencia de poblaciones residuales de la plaga.

En observaciones realizadas sobre plantas hospederas de cochinillas, se pudo constatar varias plantas las cuales son hospederas de la plaga como son: *Hibiscus*, *Cyperaceae* y *Eucalyptus*. Se recomienda tomar en consideración estas plantas para uso en barreras vivas, al igual que se recomienda realizar una investigación más profunda sobre la presencia de cochinillas en estos hospederos alternos los cuales son muy utilizados en el área piñera.

7 BIBLIOGRAFIA

- Acuña, G. 2006. Producción de piña en caribe y pacífico sur de Costa Rica. Piña en Costa Rica: producción y ambiente. Ambientetico no. 158: 2-3.
- Achá, D; Fontúrbel F. 2001. Las plantas C3, C4 y CAM. Portal de biología y ciencia de la salud. Universidad mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 1 (4): 28–33.
- Alcazar, A. 2002. Efecto de la aireación y agitación en la propagación de *Beauveria bassiana* empleando tres tipos de impulsores. Tesis M. Sc. Instituto Tecnológico de Durango, México. p. 68.
- Aroonrat, T; Manop, S; Ketunuti, U. 2003. Preparation of Spray – Dried wettable powder formulations of *Bacillies thuringiensis* based Biopesticides. J. Econ. Entomol. 96 (2): 292 - 299.
- Ávila, J. 2006. Medición de la escorrentía superficial y la erosión en piña, *Ananas comosus L. (Farinosae:bromeliaceae)*, cultivada usando acolchado plástico, en el cantón de guácimo, zona caribe de Costa Rica. Tesis Ing. Agron. Guácimo, Costa Rica, EARTH. p. 61.
- Bach, O. 2007. Decimotercero informe estado de la nación en desarrollo humano sostenible: Agricultura e implicaciones ambientales con énfasis en algunas cuencas hidrográficas principales. San José, Costa Rica. p. 22.
- Badii, M. y Abreu J. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. International Journal of Good Conscience. 1(1):82-89.
- Beardsley, J.W. 1959. On the taxonomi of pineapple mealybugs in Hawaii, with a description of a previously unnamed species (Homoptera Pseudococcidae). Proceed Hawaii Entomology Society. 17(1): 29-37.
- Bermúdez, F. 2005. Control de daño por *Strymon basilides* (lepidóptera: lycaenidae) en la piña. Tesis Ing. Agron. Guácimo, Costa Rica, EARTH. p. 33.

- Bertsch, F. 2003. Absorción de nutrimentos por los cultivos. Asociación Costarricense de la ciencia del suelo (ACCS). San José, Costa Rica. p. 241-246.
- Black, C. 1986. Effects of CO₂ Concentration on Photosynthesis and Respiration of C₄ and CAM Plants. In: H.Z. Enoch and B.A. Kimball (Eds.). Carbon Dioxide Enrichment of Greenhouse Crops. Volume II. Physiology, Yield, and Economics. Boca Raton, Fla. USA. p. 29-40.
- CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). 2008. Compromiso de responsabilidad socio-ambiental. Impacto ambiental y socio económico. (En Línea). Consultado el 08 dic. 2009. Disponible en: <http://www.canapep.com/estadisticas>
- Carballo, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo integrado de Plagas, 47: 1-4.
- Carballo, M; Guharay F. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Manual técnico (CATIE) No 53, Turrialba, Costa Rica. p. 232.
- Cárdenas, R; Villalba, G; Bustillo, P; Montoya, R; Góngora, B. 2007. Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. Cenicafé. 58(4): 293-303.
- Carrillo, A; Ordóñez, H; Cárdenas, J. 1992. Cochinillas (Homoptera: Pseudococcidae) de la raíz del cafeto y su relación con el síndrome del mal de viñas. Memorias técnicas de investigaciones en café. Guatemala no.1: 79-84.
- 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* (Metch.) Sorok y *Bacillus popilliae* (Dutky). Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. p. 150.
- Castañeda, P. 2003. Manual Técnico. Sobre producción y manejo post cosecha de piña para la exportación. El Salvador, San Salvador. p. 35-44.

- Castillo, J; Belotti, A. 1990. Caracteres diagnósticos de cuatro especies de piojos harinosos (Pseudococcidae) en cultivos de yuca (*Manihot esculenta*) y observaciones sobre algunos de sus enemigos naturales. *Revista Colombiana de Entomología*, 16(2): 33-43.
- Castillo, S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia sp.* y *Prosapia sp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Peten, Guatemala. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. p. 64.
- Chandler, L; Watson, G. 1999. Identificación de cochinillas o piojos harinosos de importancia en la región del Caribe. Commonwealth Science Council y CAB INTERNATIONAL, p. 32.
- Chaves, N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. p. 82.
- Daane, K; Sime, K; Fallon, J; Cooper, M. 2007. Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. *Ecological Entomology*. 32: 583-596.
- De la Cruz, E; Ruepert, C; Wesseling, C; Monge, P; Chaverri, F; Castillo, L; Bravo, V. 2004. Los Plaguicidas de Uso Agropecuario en Costa Rica: Impacto en la Salud y el Ambiente. Informe de consultoría para Área de Servicio Agropecuario y Medio Ambiente de la Contraloría General de la República. Heredia: IRET, Universidad Nacional Autónoma. p. 22.
- Deshpande, M. V. (1999). Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*. 25(3): 229 - 243.
- Di Rienzo, J; Balzarini, M; Casanoves, F; González, L; Tablada, E; Díaz, M; Robledo, C. 2009. Estadística para las ciencias agropecuarias. 4 ed. Córdoba, Argentina. p. 322.
- EARTH, 2004. Perfil de Producto Piña. Centro para la formación empresarial. EARTH, Limón, Costa Rica. p. 23.

- FAOSTAT, 2008. Bases de datos de producción y comercio agrícola mundial. (En línea). Consultado el 24 Octubre 2008. Disponible en: <http://www.faostat.fao.org/>
- Fuentes, J. 2007. Fundamentación de los parámetros constructivos y cinemáticos del órgano del corte para la trituración de rastrojo de piña. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 16(2): 57.
- García, M; Serrano, H. 2005. La piña *Ananas comosus* Merr. (Bromeliaceae) algo más que un fruto dulce y jugoso. *Contactos* no. 56: 55-61.
- Gullan, P; Martín, J. 2003. Sternorrhyncha (jumping plant lice, whiteflies, aphids, and scale insects). *Annual Review of Entomology*, 42:23-50.
- Hata, T; Hara, A; Jang, E; Tenbrink, V. 1992. Pest Management before Harvest and insecticidal dip alter Harvest as a Systems approach to quarantine security for red ginger. *Journal Economical Entomology*, 85(6): 2310-2316.
- Hu, J. S; Sether, D. M; Ullman, D. E. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology*. 45: 829-836.
- Info Grecia, 2009. Cantón de Grecia, Costa Rica. Info Grecia, provincia Alajuela, Costa Rica. (En Línea). Consultado: 09 Oct. 2009. Disponible en: <http://www.infogrecia.com/Grecia/GreciaysuHistoria/tabid/70/Default.aspx>
- Jackson, M; Payne, R; Odelson, D. 2004. Liqui-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 31: 149-154.
- Jiménez, J. 1999. Cultivo de la piña. Manual práctico para el cultivo de piña de exportación. 1ª ed. Cartago, Editorial tecnología de Costa Rica. p. 217.
- Johnson, M. 1997. Look out for the Pink Hibiscus Mealybug. USDA-APHIS Program Aid No. 1606. (En línea). Consultado: 25 Nov. 2008. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/domestic/downloads/phm.pdf

- López L.V; Hans Börje J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad 6: 12 – 15.
- Llorente, J, García, A; Gonzáles, E. 1996. Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México. Hacia una síntesis de su conocimiento. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, p. 660.
- Martinez, M; Blanco, E; Suris, M. 2005. Fauna de chinches harinosas (Hemiptera: Coccoidea) asociada a plantas de interés: i. plantas arbóreas. Protección vegetal. 20(2): 125-127.
- Meyerdirk, D; Warkentin1, R; Attavian, E; Gersabeck, A; Adams, M. and Francis G. 2005. Biological Control of Pink Hibiscus Mealybug Project Manual. (En línea). Consultado: 25 Nov. 2008. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2005/050414.htm>
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos (CATIE, GTZ). Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica, no. 63: 95-103.
- Municipalidad de Grecia, 2008. Generalidades del cantón de Grecia, provincia Alajuela, Costa Rica. (En Línea). Consultado: 09 Oct. 2009. Disponible en: <http://www.grecia.go.cr/generalidades.html>
- Ostos, A. 2006. Influencia de características del paisaje y practicas de manejo sobre la incidencia de cochinillas (Hemiptera) en *Alpinia purpurata* (Vleill) K. Schum. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 65.
- Pacorar, J. F. 1979. El Centro de Introducción y cría de insectos útiles y los resultados de la investigación en apoyo a la producción agraria. Revista Peruana de Entomología, 22: 99-102.
- Paull, R. E. 1997. Pineapple. Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. Mitra, S.K. (ed.). New York. CAB International. p. 291-323.
- Pell, J. K; Barker, A; Clark, S; Wilding, N; Alderson, P. 1998. Use of a novel sporulation monitor to quantify the effects of formulation and storage on conidia production by dried

- mycelia of the entomopathogenic fungus *Zoopthora radicans*. *Biocontrol Sci Technol*, 8:13–21.
- Polona, Z; Aleksander, P. 2001. The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged cultivations as Bioprocess Parameter. *Food Technical Biotechnology*. 39(3): 237-252.
- Procomer (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica). 2007. Se rompe record de exportaciones. (En línea). Consultado: 24 Octubre 2008. Disponible en: http://www.procomer.com/Espanol/Publicaciones-11/revista_enlace_mundial-11-01.html.
- Py, C. 1968. La piña tropical. Colección agricultura tropical. Editorial BLUME. Barcelona, España. p. 269.
- Quesada, H. A. 1999. Situación de la actividad Piñera en nuestro país. Programa nacional de piña. San José, Costa Rica. p. 31.
- Quesada, I. 2001. Ocupación del territorio en San Carlos de Alajuela: flujos migratorios y precarismo rural (1950-1984). *Anuario de Estudios Centroamericanos*, Universidad de Costa Rica, 27(2): 101-120.
- Quijandria, G; Berrocal, J. 1997. La industria de la piña en Costa Rica. Análisis de sostenibilidad. Centro Latinoamericano para la Competitividad y el Desarrollo Sostenible (CLACDS). San José, Costa Rica. p. 23.
- Ramos, A. 2006. Chinchas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae y Putoidae) en cinco cultivos de la región andina colombiana. Tesis Mag. Sc. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p. 90.
- Ramos, A; Serna, F. 2004. Coccoidea de Colombia, con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía* 57(2) (En Línea) Consultado 11 Febrero 2009. Disponible en: <http://www.agro.unalmed.edu.copublicacionesrevistadocsart.coccoidea%203.pdf/>

- Rebolledo, M. A; Driza, A. D; Rebolledo M. L. 1998. Tecnología para la producción de piña en México. México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; División Agrícola. p. 159.
- Rodríguez, A. 2006. Producción de piña en caribe y pacífico sur de Costa Rica. Piña en Costa Rica: producción y ambiente. Ambientetico no. 158: 6-7.
- Saborío, D; Camacho, O. 1996. Descripción del manejo poscosecha y factores de rechazo de piña (var. Cayenna lisa y clon Champaka) para exportación de la zona norte de Costa Rica. Agronomía Costarricense, 20(1): 67-73.
- Salazar, V. L. 2001. Influencia de algunos factores socio culturales en la adopción de cultivares mejorados de piña (*Ananas comosus*), en tres organizaciones de productores y productoras del distrito de Pital, Cantón San Carlos. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica. Escuela de ciencias exactas y naturales. p. 131.
- SEL (Systematic Entomology Laboratory). 2003. Scale insects: general information. (En Línea). Consultado: 07 Nov. 2008. Disponible en: www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm 2003.
- Sinclair, E. 1993. The pineapple plant. In Pineapple pests and disorders. Department of Primary Industries. Ed. by Broadly, R.H; Roger, H. Queensland, Australia. p. 8-11.
- Soler, R; Scaloni, I; Núñez, S. 2001. Bioecología y estrategia de control del chanchito blanco de la vid en la zona sur de Uruguay. Facultad de agronomía. INIA, Las Brujas. Uruguay. p. 17.
- Soto, A; Gutiérrez, C; González, M; Roldan, H; Wong, L. 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill) contra palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Xalapa, México. 45(2): 195-200.
- Snodgrass, R. 1935. Principles of insect morphology. New York: Mc.Graw Hill, p. 667.

- Tavassoli, M; Ownag, S; Pourseyed H; Mardani K. 2008. Laboratory evaluation of three strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling *Dermanyssus gallinae*. *Avian Pathology*. 37(3): 259-263.
- UCR (Universidad de Costa Rica). 2008. Extracción de nematodos de suelo. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Escuela de Agronomía. San José, Costa Rica. p. 1-4.
- Vásquez, O. 2000. Manejo de cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en el cultivo de piña orgánica en la zona del lago de Yojoa, Honduras. Tesis Ing. Agron. Zamorano, Honduras. p. 43.
- Vélez, P; Posada, F; Marin, P; González, M; Osorio, E; Bustillo, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones del café. La Habana, Cuba. Boletín Técnico No. 17. p. 37.
- Williams, D; Granara de Willink, M. 1992. Mealybugs of Central and South América. London, UK, CAB Internacional. p. 635.
- Yeo, H; Pell, J; Alderson, P; Clark, S; Pye, B. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manage Sci* 59: 156 – 165.

ANEXOS

Anexo 1. Datos acumulados del porcentaje de cochinillas muertas y porcentaje con presencia de hongos

Tratamientos	Repeticiones	No. muertas	No. Con hongos	% mortalidad	% presencia con hongos
BI	1	7	5	70	71,43
BI	2	8	3	80	37,50
BI	3	5	5	50	100,00
BII	1	10	4	100	40,00
BII	2	10	4	100	40,00
BII	3	10	6	100	60,00
BIII	1	3	0	30	0,00
BIII	2	4	0	40	0,00
BIII	3	3	2	30	66,67
MI	1	4	1	40	0,00
MI	2	6	0	60	0,00
MI	3	4	3	40	75,00
MII	1	10	2	100	20,00
MII	2	8	3	80	37,50
MII	3	3	3	30	100,00
PI	1	4	1	40	25,00
PI	2	3	0	30	0,00
PI	3	4	2	40	0,00
Testigo	1	0	0	0	0,00
Testigo	2	0	0	0	0,00
Testigo	3	0	0	0	0,00

Anexo 2 Análisis de varianza para las variables porcentaje de mortalidad y porcentaje de cochinillas con presencia de hongo

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% mortalidad	21	0,84	0,77	31,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18428,57	6	3071,43	12,40	0,0001
Tratamientos	18428,57	6	3071,43	12,40	0,0001
Error	3466,67	14	247,62		
Total	21895,24	20			

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% presencia con hong	21	0,47	0,24	94,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11343,17	6	1890,53	2,05	0,1255
Tratamientos	11343,17	6	1890,53	2,05	0,1255
Error	12892,01	14	920,86		
Total	24235,18	20			

Anexo 3 Número de esporas, conidios por gramos de arroz y gramos de arroz utilizados para las dos aplicaciones en invernadero

Cepas	Número de esporas		Conidios/gramo		Gramos de arroz	
	1 ^{er} conteo	2 ^{do} conteo	1 ^{er} conteo	2 ^{do} conteo	1 ^{ra} aplicación	2 ^{da} aplicación
A3	12,83	16,50	2,6X10 ⁸	3,3X10 ⁸	384.61	303.03
0421	22,50	16,50	4,5X10 ⁸	3,3X10 ⁸	222.22	303.03
0410	64,33	79	1,3X10 ⁹	1,6X10 ⁹	76.92	62.50
G-BSG-16	39	46	7,8X10 ⁸	9,2X10 ⁸	128.20	108.70

Nota: Los gramos de arroz fueron calculados para 2000 ml de suspensión a una concentración de 5X10⁷ conidios/ml

Anexo 4 Cálculo total de la suspensión en ml para las siete repeticiones de cada tratamiento

Tratamientos	a	b	c	d
T1 a	455			
T2 b		455		
T3 c			455	
T4 d				455
T5 ab	227,5	227,5		
T6 ac	227,5		227,5	
T7 ad	227,5			227,5
T8 bc		227,5	227,5	
T9 bd		227,5		227,5
T10 cd			227,5	227,5
T11 abc	151,69	151,69	151,69	
T12 acd	151,69		151,69	151,69
T13 abd	151,69	151,69		151,69
T14 bcd		151,69	151,69	151,69
T15 abcd=BII	113,75	113,75	113,75	113,75
Total	1706,32	1706,32	1706,32	1706,32

Anexo 5 Análisis de varianza para la variable rangos porcentaje de mortalidad de cochinillas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG % mortalidad	82	0,50	0,32	42,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18300,01	21	871,43	2,85	0,0008
Bloque	4971,81	6	828,63	2,71	0,0215
Tratamiento	13328,20	15	888,55	2,90	0,0017
Error	18363,49	60	306,06		
Total	36663,50	81			

Anexo 6 Parámetros para las combinaciones lineales entre los tratamientos evaluados para la variable número de cochinillas vivas en hojas

Parámetros	Est.	E.E.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi²	p-valor
Constante	3.84	0.05	3.75	3.93	6725.67	<0.0001
Cat_Bloque_B1	1.40	0.05	1.31	1.50	869.29	<0.0001
Cat_Bloque_B2	0.43	0.05	0.33	0.54	62.63	<0.0001
Cat_Tratamiento_T1	-1.66	0.06	-1.79	-1.54	679.86	<0.0001
Cat_Tratamiento_T2	-1.06	0.05	-1.15	-0.96	444.13	<0.0001
Cat_Tratamiento_T3	-2.09	0.08	-2.24	-1.94	741.33	<0.0001
Cat_Tratamiento_T4	-0.95	0.05	-1.05	-0.86	390.24	<0.0001
Cat_Tratamiento_T5	-1.71	0.07	-1.84	-1.59	691.32	<0.0001
Cat_Tratamiento_T6	-2.05	0.08	-2.20	-1.90	738.92	<0.0001

	Valor	gl
Log Likelihood	10927.77	96
Deviance	6392.19	96
Escala (fijada)	1.00	

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
Cat_Bloque	2	1270.18	<0.0001
Cat_Tratamiento	6	2108.80	<0.0001

Anexo 7 Contrastes para las combinaciones lineales entre los tratamientos evaluados para la variable número de cochinillas vivas en hojas

Parámetro	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Constante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bloque_B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bloque_B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento_T1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento_T2	-1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Tratamiento_T3	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Tratamiento_T4	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	1	1	0
Tratamiento_T5	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	-1	0	1
Tratamiento_T6	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	-1	-1

Nota: la letra C indica las combinaciones realizadas y los tratamientos y bloques los parámetros contractados.

Anexo 8 Análisis de varianza para la variable presencia y ausencia de cochinillas

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Valor s	21	0,73	0,55	13,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,25	8	0,03	4,10	0,0143
BLOQ	0,21	2	0,11	14,08	0,0007
TRA	0,03	6	0,01	0,77	0,6084
Error	0,09	12	0,01		
Total	0,34	20			