



**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biología
Ingeniería en Biotecnología**

Centro de Investigación en Biotecnología

Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) como hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola

**Presentado por:
Yerlin Chacón Castro
Cristian Garita Rojas
Christopher Vaglio Cedeño**

**Profesor asesor
MSc. Vladimir Villalba Velásquez**

**Septiembre
2008**

Tabla de Contenidos

Abstract	5
Resumen	5
Introducción	6
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Revisión de literatura	11
Maíz	11
Plagas del maíz	12
Control biológico o Biocontrol	14
Tipos de biocontrol	15
Cría de insectos en el laboratorio	16
Materiales y métodos	19
Lugar de realización del experimento	19
Colecta en campo	19
Crianza en dieta natural	19
Crianza en dieta artificial	24
Identificación de posibles microorganismos biocontroladores	29
Resultados y discusión	31
Colecta y crianza en dieta natural	31
Crianza en dieta artificial	35
Identificación de posibles microorganismos biocontroladores	40
Conclusiones	45
Aportes y alcances del proyecto	46
Referencias bibliográficas	47
Anexo 1	50

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Duración del ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	13
Cuadro 2. Distribución de inoculos de microorganismos biocontroladores	30
Cuadro3.Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> experimental	34
Cuadro 4.Duracion del ciclo de vida según sexo	39

Lista de Figuras

Figura 1. Jaula de colecta en campo	20
Figura 2. Jaula de desarrollo larval para cría	20
Figura 3. Microjaula para desarrollo larval	21
Figura 4. Producción de plántulas de maíz	22
Figura 5. Jaulas de apareamiento	23
Figura 6.Preparacion de las jaulas de apareamiento	24
Figura 7.Microjaula para desarrollo larval con dieta artificial	25
Figura 8.Alimentacion de ejemplares	26
Figura 9.Jaula para el desarrollo de pupas	26

Figura 10. Jaula de copulación	27
Figura 11. Masa de huevos	28
Figura 12. Almacenamiento de masas de huevos	28
Figura 13. Esquema de cría de larvas con dieta natural	35
Figura 14. Hongos en dieta artificial	37
Figura 15. Esquema de de cría de larvas con dieta artificial	40
Figura 16. Hongos aparecidos con posible capacidad biocontroladora	40
Figura 17. Insecto encontrado junto con <i>S. frugiperda</i>	41
Figura 18. Hongos aparecidos en larvas muertas	42
Figura 19. Efecto de un hongo sobre <i>S. frugiperda</i>	43
Figura 20. <i>Penicillium sp.</i>	44
Figura 21. <i>Aspergillius sp.</i>	44

Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola.

Yerlin Chacón Castro¹, Cristian Garita Rojas¹, Christopher Vaglio Cedeño¹ y MSc. Vladimir Villalba Velásquez²

Abstract

To establish a methodology to breed in laboratory the massive production of bio-controllers organisms for *Spodoptera frugiperda* (Smith), some specimens in their larval stage were collected in corn plantations in vegetative phase in different places of Costa Rica. For it, the larvae were brought to the lab in collecting cages in which previously were placed corn leaves to avoid the death of the larvae and transport them to the Biocontrollers Lab of the CIB – ITCR, Cartago. At the arriving they were individualized in small, amber micro cages to avoid cannibalism between larvae, at the beginning of the test the larvae were feed with corn leaves during two months. After that, the artificial diet BIO-MIX H-89 modified were used to feed the insects for the develop of them since egg to pupae phase. During its adult phase butterflies were feed with honey 10% (v/v). An ANOVA analysis was applied to measure significant differences between its life cycle applying each diet, the results show that with artificial diet the life cycle gets shorter to (45,10±1,20) days and the larval state gets longer to (26,80±1,41) days; nevertheless, the first production of this one showed the presence of mushrooms, because of that, the addition of four preservative agents were necessary. The entomopathogenic mushroom *Beauveria bassiana* was identified as a biological controller for this specie over larvae produced using natural diet. Finally, the use of the artificial diet was more effective for breed this specie in laboratory because of the reduction of the life cycle and because of the extension of the larval stage that allows the specie as a host for the biotechnological production of bio – controllers organisms of agricultural interest.

Key words: *Spodoptera frugiperda*, biological control, *Zea mays*, host, controled conditions raising.

Resumen

Con el fin de desarrollar una metodología de crianza en laboratorio que permita la producción masiva de organismos biocontroladores de *Spodoptera frugiperda*, se colectaron ejemplares en estado larval en cultivos de maíz en fase vegetativa en diferentes localidades de Costa Rica. Para ello se utilizaron jaulas plásticas de recolección a las que previamente se les había colocado hojas tiernas de maíz que evitaran la muerte de las larvas y que permitiera ser transportadas hasta el Laboratorio de Biocontroladores del CIB-ITCR, Cartago. Al llegar se individualizaron en microjaulas de plástico ámbar para evitar la muerte de los individuos por canibalismo. Al inicio del ensayo las larvas fueron alimentadas con hojas tiernas de maíz por espacio de dos meses. Luego se evaluó la dieta artificial BIO-MIX H-89 modificada para el desarrollo de huevo hasta pupa y durante la fase de adulto, se utilizó una solución de miel de abeja al 10% (v/v) como fuente de alimento. Se aplicó un ANOVA para medir las diferencias significativas entre cada etapa del ciclo de vida con ambas dietas, donde se encontró que al implementar la dieta artificial se redujo el ciclo de vida de esta especie a (45,10±1,20) días, y se prolongó el periodo larval a (26,80±1,41) días; sin embargo, en la primera elaboración de ésta se presentaron problemas por la aparición de hongos saprófitos, por lo que fue necesario adicionar cuatro preservantes al medio. Se identificó el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como controlador biológico de esta especie sobre larvas producidas en dieta natural. Finalmente, el uso de la dieta artificial fue la más efectiva para criar esta especie en laboratorio porque al reducir el ciclo de vida y ampliar la duración del estadio larval se convierte la especie como hospedante potencial para la producción biotecnológica de organismos biocontroladores de interés agrícola en laboratorio.

Palabras clave: *Spodoptera frugiperda*, control biológico, *Zea mays*, dietas, hospedante, crianza en condiciones controladas.

¹ Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología, ITCR, e-mail: yerlincc@gmail.com.

² Profesor e investigador de la Escuela de Biología, ITCR, e-mail: vvillalba@itcr.ac.cr – vvv690@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La agricultura ha acompañado la historia del hombre desde tiempos muy remotos tanto como elemento básico de los procesos de socialización y formación de asentamientos humanos como para la producción de alimentos. Paralelo al crecimiento poblacional fueron incrementándose las necesidades alimenticias, por lo que los sistemas agrícolas se vieron obligados a transformarse para mejorar los rendimientos de su producción. Como resultado de este proceso evolutivo agrícola, existen hoy grandes extensiones de terreno dedicadas a monocultivos, donde se aplican indiscriminadamente insumos químicos, se destruyen ecosistemas y se sobreexplotan tierras, con lo que se ha alterado significativamente el balance entre los elementos de la naturaleza y se ha incurrido en la dependencia de productos sintéticos dañinos para el ambiente y la salud de los seres vivos (Contreras, 2004).

En vista de los numerosos efectos nocivos de la agricultura convencional, en el último siglo se han consolidado sistemas de producción más compatibles con la salud y el medio ambiente, entre los que se puede citar el Manejo Integrado de Plagas (MIP), que tiene un papel protagónico y se define como una estrategia de control de plagas basada en la ecología y en tácticas de manejo, que protegen o favorecen los enemigos naturales de las plagas, permitiendo un uso moderado de plaguicidas, solamente después de un monitoreo sistemático de las poblaciones de plagas que lo justifique (García y Calvijo, 1989).

El maíz es un cultivo muy remoto originario del continente americano, específicamente de México, Centroamérica y Sudamérica, en la última década su cultivo se ha expandido a múltiples partes del mundo, como por ejemplo Europa y Estados Unidos. Es uno de los cereales de mayor importancia, ocupando el tercer lugar en consumo después del arroz y el trigo. En América Latina constituye una de las fuentes principales de nutrición para la población del área debido a que es posible explotarlo para la producción de granos de maíz de siembra (para la exportación), harina, sémola, almidón y gluten (Llanos, 1994); sin embargo, al igual que otras muchas especies vegetales y animales explotadas agrícolamente por el hombre, posee un conjunto de otros consumidores biológicos que encuentran en esta planta los recursos indispensables para su vida como *Spodoptera frugiperda* (Smith), conocido comúnmente como "gusano cogollero del maíz" y que ha sido señalado comúnmente como una plaga severa, debido a la frecuente presencia de este en las mazorcas tiernas que conllevan a una devaluación seria sobre el rendimiento de los granos del cultivo (García y Clavijo S, 1989).

En cuanto al origen del “cogollero del maíz” Andrews y Quezada (1989), indican que es una especie nativa del trópico, con una amplia distribución geográfica, la cual va desde el norte de Argentina y Chile hasta el sur de los Estados Unidos. *S. frugiperda* deposita en las hojas y tallos de maíz entre 40 a 300 huevos en masa, cubiertas por una tela fina formada con las escamas del cuerpo de la hembra adulta. Durante el desarrollo larvario pueden ser confundidos con *Helicoverpa zea* u otros miembros del género *Spodoptera*, pero son fáciles de reconocer porque las larvas poseen 4 puntos negros formando un trapecio en el dorso del antepenúltimo segmento abdominal. Los adultos son palomillas grisáceas, un poco gordas que miden 30 mm de ala a ala.

El ciclo de vida de estos insectos oscila entre 19 y 48 días lo cual depende de la temperatura de las distintas fases (Jassic y Reines, 1974; Piedra, 1974). Este lepidóptero es una plaga clave en las gramíneas como masticador del tejido vegetal y como hemos visto su ciclo de vida se muy influenciado por la temperatura, acortándose entre más elevada sea esta y sucediendo lo opuesto si esta disminuye.

S. frugiperda afecta la productividad de las plantaciones y por ende la economía de muchos agricultores (CATIE, 1990), no solo por la pérdida de los cultivos sino también por la existencia de una constante relación entre el costo del control de la plaga y las pérdidas producidas por esta por lo que es más difícil establecer los umbrales de nivel o de daño económico (Fernández, 2002).

El método de control comúnmente utilizado es el uso de sustancias químicas, las cuales desequilibran el ecosistema, destruyen los organismos benéficos y permiten que la plaga desarrolle poblaciones resistentes a los insecticidas (Valerio, 2006). Los insecticidas sistémicos utilizados son costosos, de alta toxicidad y poco específicos como el Lindano, el cual es miscible en agua y reporta muertes masivas de peces después de su uso, es tóxico para abejas y de alta bioconcentración, también el herbicida Paraquat que produce alta mortalidad en aves y afecta el ciclo reproductivo de reptiles (Villa, 2004). Al analizar esta gama de problemas derivados del uso inadecuado y desmedido de materias químicas, se hace necesario replantearse la manera cómo se manejan los sistemas agrícolas y buscar nuevas soluciones en el control de plagas, tales como el biocontrol, de manera que se restablezca el equilibrio de los ecosistemas y se cultiven, cosechen y consuman alimentos de calidad, que no pongan en riesgo la salud humana y que puedan colocarse en mercados cada vez más exigentes y preocupados por su calidad de vida.

El potencial biotecnológico de los enemigos naturales de plagas es a veces impredecible o incierto, debido a que en muchos casos se desconocen los ciclos biológicos (Villa 2004), las condiciones y/o

requerimientos alimenticios y ambientales ideales para el normal desarrollo del ciclo de vida tanto del hospedante como del biocontrolador lo que trae como consecuencia una limitante al pensar en producciones masivas de éstos benéficos; de ahí la importancia de que se conozcan bajo condiciones controladas estos aspectos del hospedante y su enemigo natural para que le permitan al investigador determinar el potencial de su producción masiva en aquellas especies que presentan un desarrollo poblacional exitoso en el laboratorio (Navarro y Doreste 1995).

Actualmente, existen una gran variedad de organismos que son producidos con fines de control de plagas, basta citar algunos géneros como: *Trichogramma*, *Spalangia*, *Telenomus*, *Cochliomyia*, *Ceratitis*, *Vaculovirus* y *Nomuraea rileyi*. El futuro de la cría de insectos en laboratorio, como disciplina científica, depende según Singh y Moore (1985) citados por Madrigal (2001) del progreso en siete áreas mayores:

- 1- Establecimiento y desarrollo de métodos estandarizados de cría, incluyendo la selección o producción de cepas especiales de insectos hospedantes.
- 2- Estandarización de dietas artificiales, nutricionalmente superiores y económicas.
- 3- Comprensión del comportamiento de los insectos, su biología, requerimientos nutricionales y estímulos físicos y químicos que controlan la alimentación, el apareamiento y la oviposición.
- 4- Control de microorganismos patógenos en el laboratorio y en las dietas, así como también el control de enfermedades ocasionadas por estos.
- 5-Desarrollo de procedimientos de control de calidad y ajuste de las técnicas de multiplicación y crianza.
- 6-Aspectos de ingeniería, incluyendo la aplicación de sistemas automáticos para la incubación y extracción de diferentes estados de desarrollo y elaboración de las dietas, que permitan reducir la manipulación y los costos de producción en el laboratorio.
- 7-Aplicación de sistemas de manejo de crías de insectos para una producción más eficiente, duradera y rentable a través de los años.

En la mayoría de los casos la producción del hospedante es la etapa más difícil y la que, por lo general, requiere de más tiempo de investigación cuando se requiere elaborar una dieta sintética o artificial que permita un desarrollo normal de cada una de las etapas de su metamorfosis. Por tal razón, es necesario mantener colonias de investigación de tantas especies hospedantes potenciales de cada parasitoide como sea posible, con el objetivo de seleccionar aquellos en los cuales se logre resolver problemas relacionados con los parámetros de calidad de la cría según el objetivo que se pretenda con ella (huevos, larvas, prepupas, pupas y/o adultos) y los requerimientos específicos relacionados con los hábitos de control del parasitoide (Chambers, 1977).

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Colectar dentro de plantaciones de maíz en crecimiento vegetativo el gusano cogollero *S. frugiperda* en diferentes regiones del país.
- Fomentar el desarrollo de una cría de *S. frugiperda* bajo condiciones controladas probando la dieta natural basada en hojas de maíz y una dieta artificial.
- Elaborar una dieta artificial nutricionalmente superior que permita la cría masiva de *S. frugiperda* basado en las experiencias de otros defoliadores que garantice el desarrollo desde huevo hasta pupa.
- Estudiar, describir y reportar el ciclo biológico del cogollero del maíz desde su fase de huevo hasta la adulta, indicando el tiempo transcurrido en cada una de las etapas por las que pasa su metamorfosis completa bajo condiciones controladas.
- Observar e identificar posibles parasitoides o biocontroladores de los ejemplares colectados en campo que emerjan o se desarrollen en las jaulas de cría mantenidas en el laboratorio.
- Determinar y desarrollar un protocolo de cría masiva *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones controladas en laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.- Maíz (*Zea mays* L. Gramineae)

El maíz es una planta anual con un gran desarrollo vegetativo, tallo nudoso y macizo con quince a treinta hojas alargadas y abrasadoras. Es una planta monoica que requiere temperaturas de 18 a 26°C y un buen suministro de agua a través de su ciclo vegetativo, principalmente durante la floración; además, se adapta muy bien a suelos de tipo intermedio, con buen drenaje, sueltos, aireados, planos o ligeramente quebrados. No son aconsejables suelos arcillosos debido a su alta retención de humedad, ya que esta condición disminuye el aire del suelo, esencial para el desarrollo de las raíces de esta planta (Llanos, 1994).

En Costa Rica el maíz se cultiva en:

- **Pacífico:** en mayo, con el inicio de las lluvias y en la segunda o tercera semana de agosto.
- **Pacífico Sur:** en marzo o abril y en setiembre u octubre.
- **Valle Central:** se hace una siembra en mayo.
- **San Carlos, Sarapiquí y Guatuso:** en mayo y octubre.
- **Atlántico (Pococí, Guácimo, Jiménez, Siquirres):** en enero, febrero y en julio, agosto.
- **Atlántico Sur (Talamanca):** en mayo y noviembre.
- Zonas altas cuya altitud es superior a 1.200 msnm, sólo se siembra en mayo.

Para las zonas comprendidas entre 0 y 800 msnm, están disponibles las variedades: los Diamantes 8043 y Tico V-7, los híbridos: B-833, X-5065, A3092, H-5, HS5G1, HS3G1, todos de grano blanco. De grano amarillo están disponibles los híbridos Pioneer, X-5800, X-304 A, X-3214 y la variedad EJM-2 (Guararé 8128). Las variedades Los Diamantes EJM-2 y Tico V-7, son distribuidos por las agencias de compra del Consejo Nacional de Producción, así como los híbridos B-833, HS5G1 y HS3G1. Es muy importante usar semilla que sea de alta germinación (mínimo 80%) y de pureza varietal, características que es garantizada por la agencia vendedora de la misma. Para el caso de los maíces híbridos, se debe adquirir nueva semilla para cada siembra. Si la semilla no está tratada con fungicidas, es recomendable agregar 85 g (3 onzas) de Arasan[®] por cada 46 kg (100 libras) de semilla, un día antes de la siembra también puede utilizarse Captan[®] (Orthocide) a razón de 80 g por 46 kg de semilla, hasta una semana antes de la siembra. Para sembrar una hectárea de maíz, se necesitan 20 kg de semilla (Llanos, 1994).

2.- Plagas del Maíz

2.1.- Gusano de la raíz *Diabrotica* spp. Coleoptera: Chrysomelidae)

Las larvas perforan las raíces y la base del tallo, por lo que la planta se marchita y hasta puede morir. Las mayores pérdidas se dan en el estado de crecimiento medio, antes de la floración. Como tratamiento preventivo puede aplicarse cualquier insecticida granulado contra insectos del suelo, en el hoyo de siembra. Un buen combate lo ejerce el Carbofuran[®] especialmente formulado para la semilla (Furadan 3 ST o 4 F, 25 cc/kg semilla) (Pedigo y Rice, 2006).

2.2.- Gusano de la mazorca *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)

El problema es serio cuando el fin del cultivo es la venta de las mazorcas tiernas, ya que este gusano se presenta en el inicio de la formación de ellas y el daño se concentra en la punta de las mismas. Debe combatirse en esta época y suspender las aplicaciones por lo menos tres semanas antes de la cosecha. Generalmente no es una plaga importante en el cultivo de maíz para grano. Los enemigos naturales son, generalmente, suficientes para combatir la plaga. Si se requiere aplicar insecticidas, debe hacerse antes de que la larva penetre al olote y con insecticidas como Acefato[®], Mefosfolan[®], Monocrotofos[®], Foxin[®] o Triclorfon[®] (Pedigo y Rice, 2006).

2.3.- Taladrador del tallo *Diatraea lineolata* Walk. (Lepidoptera: Pyralidae)

Normalmente este insecto mantiene poblaciones bajas, debido al parasitismo ejercido en las larvas por *Iphiaulax* sp. y *Apanteles diatraeae* (Himenoptera: Braconidae), y por el parasitismo de huevos ejercido por miembros de la familia *Trichogrammatidae*. En sitios en que la plaga ha sido seria, se debe practicar la rotación de cultivos, destruir los residuos de cosecha, especialmente en las partes inferiores de los tallos, sembrar tempranamente y realizar una buena fertilización. En lugares donde el insecto llega a convertirse en plaga, el combate químico es a menudo ineficaz y restringido a la época entre la eclosión del huevo y antes de que la larva penetre el tallo. Lo más recomendable es aplicar productos en polvo o granulados en el cogollo cuando más del 25% de las plantas presenten masas de huevos (Llanos, 1994).

2.4.- Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

La larva cuando está desarrollada mide de 3,5 a 4,0 cm de longitud (cuadro 1). Tiene coloraciones que varían desde un verde claro a oscuro, con dos rayas negras sobre el lomo y otras claras a los lados del cuerpo, el daño de esta plaga lo inicia la larva joven haciendo ventanitas en las hojas. Las larvas grandes se alimentan vorazmente del cogollo haciendo agujeros grandes e irregulares y dejando abundante excremento como huella. El cultivo es afectado en casi todas sus etapas, a nivel de plántula como cortador; al llenado de grano, como elotero y en todas las etapas ocasionalmente corta y horada los tallos. La flor masculina puede ser dañada hasta resultar en una disminución del contenido de polen, que incidirá en la producción (Pérez, 1995).

Cuadro 1. Duración en días de las fases de larva, pupa y adulto, según el sexo, en relación a las diferentes temperaturas.

Temperatura °C	Larva						Pupa						Adulto					
	Hembra			Macho			Hembra			Macho			Hembra			Macho		
	n	X	s	n	X	S	n	X	n	n	X	s	n	X	S	n	X	S
35,3	28	14,4	1,25	18	14,5	0,91	23	6,0	0,82	18	6,2	0,38	23	4,4	1,72	18	4,2	1,66
34,9	18	14,3	2,01	29	13,4	1,26	18	5,7	0,69	29	6,1	0,64	18	4,8	2,24	27	4,7	2,50
30,5	32	15,6	0,91	28	15,9	1,47	32	6,7	0,83	28	7,3	0,55	32	7,1	2,04	28	6,1	1,74
29,5	36	14,8	0,93	35	14,9	0,92	36	6,8	0,92	35	7,4	0,80	34	9,8	2,86	31	8,9	3,04
25,0	59	20,1	1,47	31	20,4	1,35	59	8,8	0,39	31	10,0	0,31	59	11,83	4,50	31	10,4	3,24
24,2	47	19,0	1,53	47	18,7	1,03	47	10,2	0,44	47	11,9	0,47	46	11,7	3,25	45	13,1	5,69
19,9	21	39,7	3,66	13	38,6	2,41	21	17,9	1,46	13	20,5	1,56	21	14,6	8,49	13	17,5	6,20
18,5	27	36,0	1,72	30	37,1	1,63	27	20,0	0,52	37	22,9	1,03	25	17,4	6,33	26	19,9	4,29

Fuente: García y Clavijo (1989).

En la región plantada con maíz en el Pacífico Sur de Costa Rica, el principal problema con esta plaga, es cuando ataca al cogollo de la planta, en las otras etapas del cultivo no es importante el daño. Como alternativa de tipo cultural para el control de la plaga se considera la uniformidad en la fecha de siembra para evitar re-infestaciones; siembras de altas densidades en compensación por la mortalidad causada a las plántulas; fertilización adecuada y el uso de labranza mínima y/o cero labranza; además de hacer rotaciones con leguminosas y destruir las gramíneas (Pérez, 1995).

El control químico, como alternativa inmediata del agricultor, se basa en el uso de insecticidas aplicados al suelo antes de la siembra y la de aplicar granulados al cogollo. Además, pueden usarse soluciones líquidas y polvos, estos son más efectivos en épocas secas, cuando las lluvias son menos persistentes debido a que en esta época no son arrastrados a los mantos acuíferos subterráneos. Existen algunos enemigos naturales que se han detectado como depredadores de este insecto, entre los que sobresalen *Polybia* spp., *Doru taeniatum*; el nematodo *Hexameris* sp., los parasitoides *Rogas laphygmae*, ciertos tachínidos, icneumonídeos y braconídeos. Así mismo el uso de virus y hongos representan un potencial en el manejo de este insecto; sin embargo, hasta ahora no se ha desarrollado tecnología al respecto; en México se utiliza el *Trybliographa* sp como parasitoide de huevos para el control del gusano “cogollero” (*Spodoptera frugiperda*) (Pedigo y Rice, 2006).

3.- Control Biológico o Biocontrol

Según la IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants por sus siglas en inglés) (2004) el concepto de Producción Integrada (PI) se define como un “sistema de cultivo que, siendo capaz de mantener la productividad, rentabilidad y competitividad de las explotaciones, sea de utilidad para la sociedad actual y futura, produzca alimentos de alta calidad, conserve y utilice los recursos y mecanismos naturales y aplique medios y técnicas aceptables por la sociedad que reemplacen los insumos contaminantes y aseguren una producción sostenible, garantizando el mantenimiento del medio ambiente y la salud de las personas”. Entendido de esta manera, Aparicio y Manzanares (2007) engloban bajo este concepto tres aspectos básicos que deben aplicarse a los cultivos: medidas preventivas y culturales, control racional con productos fitosanitarios y control biológico. Tiene diversidad de ventajas, que no pueden ofrecer la mayoría de los otros medios de control de plagas que se disponen en la actualidad porque aportan tres ventajas específicas: permanencia, seguridad y economía (National Academy of Sciences 1978).

Una de las definiciones de biocontrol, según Van Driesche *et al* (2007) explica que esta herramienta depende de la palabra población, pues de alguna manera siempre se involucra el uso de poblaciones de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea temporal o permanentemente. Esta herramienta se viene aplicando como método científico hace poco más de un siglo cuando se introdujo en California *Rodolia cardinalis* (Coleoptera:coccinellidae), proveniente de Australia, con el fin de controlar la escama *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera:Margarodidae) (Barrera, 2000). Y

de manera similar en muchos países se hace uso de insectos benéficos para controlar plagas, tanto en cultivos protegidos como en cultivos a campo abierto, con resultados que satisfacen tanto a productores como a consumidores (Com. Pers. Vladimir Villalba, 2008). El control biológico como hemos visto, es una disciplina muy amplia del conocimiento, basada en el principio natural de que muchas especies de organismos se alimentan, viven y se reproducen a costa de otros, cuyas poblaciones son reguladas por las primeras en los diferentes ecosistemas (Madrigal, 2001); comprende además una amplia gama de organismos como insectos, hongos, virus, bacterias y sus toxinas, nemátodos y otros, los cuales han sido agrupados según Barrera en clases según sus características y que son citadas a continuación:

- **Depredadores:** los cuales consumen varios organismos durante su vida y buscan activamente su alimento, pueden consumir una amplia rango de presas (polívoros), otros un rango más estrecho (oligóvoros) y otros muy específicos (monóvoros).
- **Parasitoides:** Se caracterizan por desarrollarse dentro o sobre su hospedero, el estado larvario es parasítico mientras los adultos son de vida libre y muy activos para buscar a los organismos que parasitan.
- **Patógenos:** son microorganismos parasíticos que frecuentemente matan a su huésped, los más usados son bacterias, virus, hongos y protozoarios, los nemátodos aunque no son microorganismos se incluyen en este grupo debido a sus características técnicas.
- **Parásitos:** que debilitan a su hospedero sin matarlo, pero no son muy empleados.
- **Antagonistas** que influyen sobre la abundancia de las plagas pero que no se alimentan directamente de ellas, su mecanismo de acción consiste en exclusión competitiva, que puede ser física o mediante sustancias excretadas (antibióticos).

3.1.- Tipos de Biocontrol

Existen varias clases de biocontrol de las cuales se distinguen básicamente tres: por conservación, por introducción y por incremento (Barrera, 2000):

- **Biocontrol por conservación:** se pretende conservar a los enemigos naturales nativos, los cuales se dirigen preferentemente contra plagas endémicas.
- **Biocontrol por introducción:** Este consiste en la introducción o establecimiento de nuevas especies frecuentemente con el propósito de controlar plagas exóticas aunque también se pueden

controlar plagas nativas que carecen de enemigos naturales efectivos; esta forma de control también es llamada control biológico clásico.

- **Biocontrol por incremento:** generalmente cuando se habla de este tipo de biocontrol las dos formas anteriores no han sido efectivas por lo que se recurre a la cría masiva y su posterior liberación inoculativa o inundativa, sin embargo esta metodología suele elevar los costos.

También se menciona una cuarta clase de control biológico, el de **nueva asociación** que se da cuando la plaga objetivo es una especie nativa o una especie invasora de origen desconocido y los enemigos naturales son colectados de especies diferentes a las que están relacionadas taxonómica y ecológicamente con la plaga (Van Driesche *et al.*, 2007).

4.- Cría de insectos en laboratorio

Al implementar el manejo integrado de plagas es necesario considerar todos los aspectos que componen el agroecosistema del cultivo de interés, en ocasiones, cuando se incursiona en el biocontrol de alguna especie que se ha trabajado poco se hace indispensable el muestreo en campo para introducir insectos plaga al laboratorio con el fin de efectuar ensayos que permitan determinar con cuáles condiciones ambientales (altitud, temperatura, humedad, pH, entre otras) se desarrolla mejor la cría del organismo plaga. Por otra parte, al establecer una metodología de crianza en laboratorio se pueden identificar insectos parasitoides, hiperparasitoides, microorganismos (hongos y bacterias) y virus que amplíen la gama de especies con actividad biocontroladora, no obstante, sería ventajoso analizar y determinar las condiciones óptimas de desarrollo de los ejemplares biocontroladores para poder criarlos masivamente (Portilla, 2006; Valerio, 2006).

Según Cohen, (2004); el desarrollo de biocontroladores es de suma importancia para conocer la metamorfosis completa y el nicho ecológico que juegan las especies hospedantes en los agroecosistemas. A su vez la reproducción de estos bajo estas condiciones garantiza una constante fuente de material libre del peligro de contaminaciones de los insectos por patógenos u otros, cosa que no sucede con las colectas hechas en campo las cuales solo son viables si el hospedante o la plaga se encuentra en grandes cantidades.

Este mismo autor sugiere que las características ideales del insecto hospedante bajo condiciones de laboratorio, es el que posee las siguientes características:

- Es fácilmente aceptado por las especies benéficas que van a ser cultivadas.
- Puede ser cultivado con facilidad sobre el medio del huésped, el cual está bien adaptado a procedimientos de insectario.
- Posee un grado rápido de incremento (fecundidad alta o ciclos cortos de vida, o ambos).
- Sea uniparental o no, presenta problemas serios de apareo.
- No produce subproductos dañinos, tales como secreciones melosas, seda o cera.
- Tiene hábitos alimenticios no especializados (se puede usar más de un huésped como medio).
- Es inmune a enfermedades.
- Presenta poca actividad interna.

Los insectos hospedantes utilizados en la producción masiva de entomófagos, pueden ser divididos en dos categorías: naturales y artificiales. El primer grupo generalmente es atacado en la naturaleza por los insectos benéficos, sucediendo lo contrario con los hospedantes artificiales (Boscán 1988); sin embargo, el potencial biocontrolador de algunos insectos es a veces impredecible o incierto por cuanto en muchos de ellos se desconocen los ciclos biológicos y las condiciones y/o requerimientos climáticos ideales para el normal desarrollo de su ciclo de vida, tanto del hospedante como del biocontrolador lo que trae como consecuencia un limitante al pensar en producciones masivas de éstos benéficos (Andrews y Quezada, 1989). Es aquí donde radica la importancia de criar en laboratorio insectos y conocer bajo condiciones controladas las características biológicas del hospedante, su enemigo natural y por ende, el potencial que el controlador tiene *per se* y además el potencial de su producción masiva en aquellas especies que presenten un desarrollo poblacional exitoso en el laboratorio (Navarro y Doreste, 1995).

El estudio de los ciclos biológicos puede verse también facilitado con el empleo de dietas artificiales, las cuales han servido para la cría de insectos en laboratorio, siendo fundamentalmente utilizadas en especies con importancia económica, ya sea por su papel perjudicial para el hombre, por su utilización en lucha biológica, para alimentación de otros animales o para la elaboración de productos de consumo. En todos estos casos, lo que se ha pretendido es conseguir un gran número de ejemplares de una especie determinada para una posterior experimentación y/o explotación (Cohen, 2004).

En estos casos el cultivo masivo de los insectos entomófagos suele tener los siguientes propósitos:

- Estudiar a los insectos mismos para determinar con más precisión aspectos sobre sus hábitos, ciclo biológico y relaciones con el hospedante.

- Proporcionar grandes números de individuos para hacer liberaciones en el campo .y facilitar su establecimiento.
- Estar en condiciones de ampliar la distribución de una especie previamente introducida o nativa.
- Contar con una fuente de insectos entomófagos para liberarlos cada cierto tiempo en áreas donde el hospedante ha escapado a su control.
- Para lograr los propósitos anteriores, es necesario involucrar tres campos fuertemente interrelacionados: los insectos benéficos, sus hospedantes (plagas) y el sustrato alimenticio o planta bajo la cual se alimenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Lugar de realización del experimento

Este estudio se realizó en el invernadero de investigación, en el laboratorio de biocontroladores, en el laboratorio de biología y en el laboratorio de docencia de cultivo de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en Cartago.

2.- Colecta en campo

Durante los meses de junio a noviembre de 2007, se efectuaron colectas manuales de los insectos en plantaciones de maíz en la fase de crecimiento vegetativo; específicamente, sobre aquellas plantas que presentaban en las hojas apicales signos de defoliación y restos de excrementos del gusano plaga. Los lugares en donde se realizó la colecta fueron Santa Eulalia de Atenas localizada en las coordenadas 09°58'51" N; 84°24'23" O a 698 m.s.n.m, Santiago de Paraíso sobre las coordenadas 55°11'80" N; 19°70'02" E a 1326 m.s.n.m; La Trinidad de Moravia que se encuentra en las coordenadas 10°00'46" N; 84°01'20" O a 1.385 m.s.n.m, en Cartago a 1.435 m.s.n.m que se sitúa en las coordenadas 09°43'57" N; 83°54'51" O, Ciudad Quesada, San Carlos a 650 m.s.n.m localizado en las coordenadas 10°37'02" N; 84°30'53" O y en Nicoya a 123 m.s.n.m en las coordenadas 10°06'14" N; 85°26'13" O.

3.- Crianza en dieta natural

Haciendo uso de pinzas entomológicas se buscaron larvas de *Spodoptera frugiperda* en el pseudotallo de las plantas de maíz y se transfirieron a una microjaula plástica rectangular de 13,3 cm de ancho; 19,0 cm de largo y 6,0 cm de alto (Figura 1) en la que previamente se había retirado parte de la tapa con la ayuda de una hoja de bisturí # 10 caliente para colocar tela fina de organza que favoreciera la libre circulación del aire dentro de la misma; además, se colocaron hojas tiernas de maíz que sirvieran de alimento a las larvas colectadas, pudiendo transportarlas vivas desde el campo hasta el laboratorio.



Figura 1. Jaula de colecta utilizada para tomar ejemplares de *Spodoptera frugiperda* del campo y ser introducidos al laboratorio.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIB se elaboraron las jaulas de desarrollo larval en recipientes plásticos cilíndricos de 17,0 cm de altura y 16,0 cm de diámetro en la base (Figura 2). A las mismas, se le cortaron las tapas con una hoja de bisturí #10, la cual se calentaba en un mechero de alcohol constantemente para facilitar el corte del plástico, luego se colocó un pedazo de tela fina de organza sobre una superficie de silicone frío en el borde de la tapa para favorecer la circulación del aire dentro de la misma.



Figura 2. Jaulas de desarrollo larval utilizadas para la cría de *S. frugiperda* utilizando una dieta basada en hojas tiernas de maíz.

Al llegar al CIB, las larvas colectadas se individualizaron cada una en microjaula de desarrollo larval (Figura 3) que media 2,3 cm de altura y 6,5 cm de diámetro, en ellas se introdujeron pedacitos de hojas tiernas de maíz que les sirvieron de alimento a las larvas colectadas en campo (Figura 3); se rotulaban con un código formado por una letra que indicaba la generación a la que pertenecía y por un número que indicaba el número de larvas que habían en cada ciclo.



Figura 3. Microjaula de desarrollo larval para la introducción, individualización y establecimiento de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio que evitara el canibalismo entre estas.

Las jaulas se colocaron en un estante de madera a una temperatura promedio de 19,5° C con una humedad relativa promedio del 48% durante el día y del 67% en la noche, las hojas de maíz tierno que le servían de alimento a las larvas se cambiaban todos los días y se seguía un control en la bitácora de trabajo donde se anotaban las observaciones importantes de cada ejemplar tales como: cambio de instar, presencia de exuvia, así como el día en que cada larva pasaba a la fase de pupa y la fecha de emergencia de los adultos para determinar la duración promedio de cada etapa en días según la dieta y el sexo de los ejemplares evaluados.

Estadísticamente se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para una variable con el paquete estadístico Statistix 7, por ello las larvas de *S. frugiperda* no fueron pesadas ni medidas, únicamente se contabilizó el tiempo que tardó la metamorfosis de la especie en cada instar.

Paralelamente al proyecto de crianza en laboratorio, en el invernadero de investigación de la escuela de Biología, ITCR, se tomaron 100 semillas de maíz amarillo (*Zea mays*) y se pusieron a pregerminar en un beacker de 300 ml con 100 ml de agua destilada (Figura 4-A), luego de haber transcurrido alrededor de 72 h, se plantaron dos semillas pre-germinadas por hoyo de siembra en bandejas de plástico rectangulares de 20,5 cm de ancho por 26,7 cm de largo con un sustrato comercial estéril (Figura 4-B). Estas plantas sirvieron como fuente de alimento para las larvas colectadas en campo y con ayuda de una piseta cada dos días fueron regadas para evitar su deshidratación; de ellas se tomaban 2 ó 3 hojas según el vigor de su follaje de tal forma que las plántulas de maíz no murieran (Figura 4-C) y se colocaban en la microjaula de desarrollo larval. Transcurridas dos semanas después de haber preparado la primera bandeja se siguió el mismo procedimiento para garantizar el alimento de la creciente población mantenida en el laboratorio.

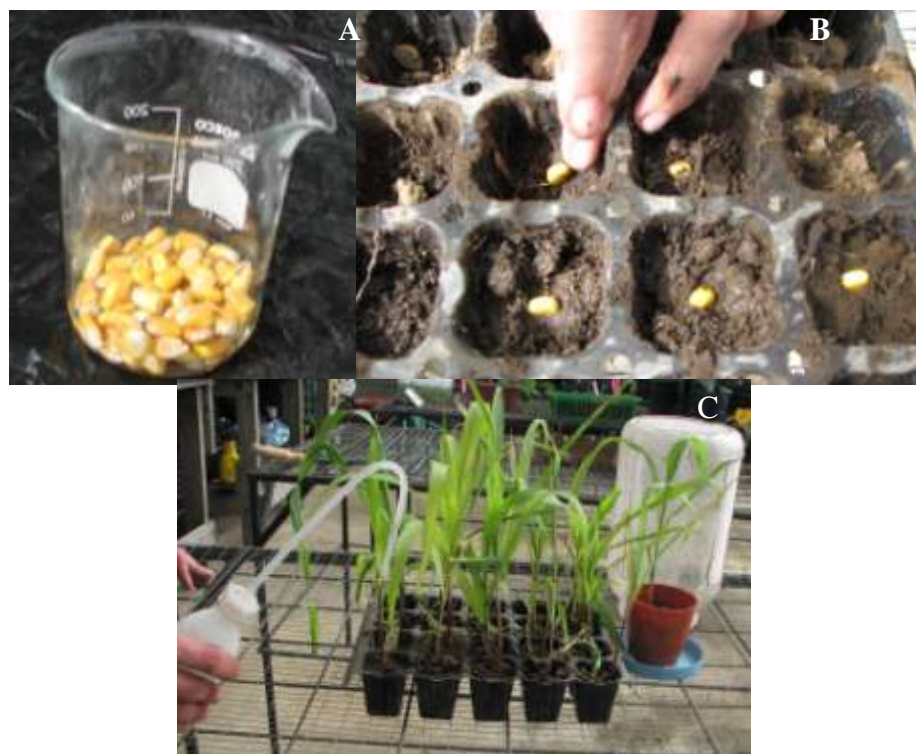


Figura 4. Producción de plántulas de *Zea mays* (maíz amarillo) en invernadero. A- Cariópsides en proceso de pregerminación; B- Siembra de maíz pregerminado en bandejas con sustrato estéril; C- Riego de las plántulas con piceta y agua destilada estéril.

Una vez que las larvas de *Spodoptera frugiperda* habían alcanzado la fase de pupa, se prepararon las jaulas de apareamiento a partir de potes cilíndricos de plástico de 14,0 cm de diámetro en la base y 24,5 cm de altura, a los que previamente se le hizo con ayuda de una hoja de bisturí # 10 caliente cuatro cortes rectangulares con forma de ventanas de 18,0 cm de alto y 5,0 cm de ancho, así como uno de forma circular bordeando la circunferencia de la base, seguidamente se pegó con silicone frío un trozo de tela fina de organza sobre cada corte para permitir la libre circulación del aire dentro de la jaula (Figura 5).



Figura 5. Jaulas de apareamiento utilizadas para cruzar adultos de *Spodoptera frugiperda*.

En estas jaulas de apareamiento, se colocaban adultos hembras y machos para favorecer la cópula y se les introducía una planta de maíz en una pequeña maceta con sustrato comercial estéril para favorecer la oviposición de las hembras sobre las hojas de la planta (Figura 6). Después de la oviposición, se quitaba la tapa de la jaula y se extraía la maceta que contenía la planta de maíz para su revisión, conteo, identificación y colecta de la (s) masa (s) de huevos sin eclosionar, las cuales eran separadas y colocadas en microjaulas de desarrollo larval antes descrita (Figura 3).

Si se observaba en las jaulas de apareamiento la emergencia de las larvas de primer instar, estas eran extraídas con la ayuda de un pincel de cerdas finas y eran transferidas a microjaulas de desarrollo larval en las cuales se habían colocado hojas tiernas de maíz para iniciar de nuevo el ciclo. En la bitácora se anotaba la fecha de cruce y el número de identificación de cada individuo para determinar la duración del ciclo de vida según el sexo en las larvas alimentadas con dieta natural.



Figura 6. Preparación de una jaula de apareamiento.

4.- Crianza en dieta artificial

En una segunda etapa del proyecto se probó la dieta artificial BIO-MIX H-89 MODIFICADA (BIO SERV., INC. 1976) reportada por Navarro y Doreste (1995) para la cría del gusano elotero (*Heliothis zea*). Para ello, se cocinaron 167 g de frijoles blancos con suficiente agua, una vez fríos, se maceraron y se filtraron en un paño con el fin de utilizar sólo la fase líquida de la mezcla; esta solución se trasvasó a un beaker de 1000 ml, el cual fue colocado en una plantilla con calor moderado y en constante agitación manual con una espátula metálica, seguidamente, se colocaron 200 ml de agua destilada en un beaker plástico de 500 ml, se calentó en un microondas y se agregaron 40 g de levadura, la cual se agitó vigorosamente con una espátula metálica para homogeneizar la mezcla. Esta solución se dejó fermentar por 10 min aproximadamente y luego se trasvasó cuantitativamente al beaker de 1000 ml, una vez disuelta la disolución se agregaron uno a uno: 100 g de germen de trigo; 4,33 g de ácido ascórbico; 1,67 g

de ácido sórbico; 2,67 g de metil-p-hidroxi-benzoato y 3 ml de formaldehído al 40% hasta que el reactivo anterior estuviera totalmente disuelto en el medio. Por último, se aforó el beacker a 1 L con agua destilada y se adicionaron 20 g de agar. Al alcanzar el punto de ebullición, el medio se vertió en placas Petri de vidrio previamente rotuladas y se almacenó a 5 °C.

A partir de la tercera generación de larvas de *S. frugiperda* reproducidas en laboratorio, se implementó la dieta artificial colocándole a cada larva individualizada una porción de 1 cm³ del medio tres veces por semana hasta que completara su etapa de crisálida en una microjaula de desarrollo larval de 3,5 cm de altura y 4,5 cm de diámetro (Figura 7). Cada vez que se colocaba el medio fresco a las larvas en crecimiento, los residuos del mismo así como las heces de éstas eran removidos de la microjaula con la ayuda de una espátula de aluminio para evitar la contaminación o la aparición de microorganismos patógenos que pudiesen afectar el desarrollo y crecimiento del pie de cría (Figura 8). Cuando las larvas entraban a su fase pupal estas eran extraídas de la microjaula de desarrollo larval y eran transferidas a una jaula más grande hasta que ocurriera la emergencia de los adultos (Figura 9).



Figura 7. Microjaula de desarrollo larval para la cría de *Spodoptera frugiperda* empleando una dieta artificial.



Figura 8. Alimentación de los ejemplares de *S. frugiperda*.



Figura 9. Jaula para el desarrollo de pupas de *S. frugiperda* en laboratorio.

Al emerger los adultos tanto hembras como machos fueron transferidos a una jaula de copulación de 11,5 cm de altura y 12,0 cm de diámetro (Figura 10), previamente ésta se forró por dentro con hojas de papel bond 20 blanco de reciclaje (incluyendo la tapa) para evitar que las posturas de huevos quedaran adheridas a las paredes de la jaula, permitiendo así, la manipulación de las masas de huevos. En el fono de la jula se colocó en un envase plástico pequeño un trozo de algodón impregnado con una solución de miel de abeja al 10% (v/v) para que sirviera de alimento a los adultos mientras permanecían en su actividad copulativa.



Figura 10. Jaula de copulación para adultos de *Spodoptera frugiperda*.

A los adultos colocados dentro de la jaula de copulación, se les dio un seguimiento diario de su comportamiento para controlar la oviposición; cada día eran revisadas y se cortaban los trozos de papel que contenían las masas de huevos (Figura 11), las cuales eran colocadas en bolsas plásticas transparente, rectangulares, de 21,0 cm de largo y 10,2 cm de ancho a las que se les realizaba un nudo en la parte superior para evitar el escape de larvas del primer instar si ocurría la eclosión de los huevos en altas horas de la noche (Figura 12). Este procedimiento de cambio y reposición del papel bond 20 reciclado dentro de la jaula de copulación se realizaba todos los días mientras existía oviposición y masas de huevos colocadas por parte de las hembras de esta especie. Cuando ocurría la eclosión de las larvas del primer instar y con la ayuda de un pincel de cerdas finas eran transferidas a microjaulas plásticas que previamente contenían dieta artificial para reiniciar con otro ciclo generacional del hospedante.



Figura 11. Masa de huevos en su último estadio de madurez ovipositada en un trozo de papel en una jaula de apareamiento, en la esquina superior izquierda se observan dos larvas de primer instar.



Figura 12. Bolsas plásticas utilizadas en el almacenaje de masas de huevos, en la eclosión de los mismos y en la individualización de las larvas de primer instar.

5.- Identificación de posibles microorganismos biocontroladores

A partir del pie de cría establecido anteriormente, se empezó a observar el deceso de seis individuos en estadio larval, cuyo segmento abdominal se tornaba necrótico, disminuía su tamaño y presentaba crecimiento microbiano con apariencia polvosa y algodonosa, en algunos casos. Estas larvas sintomáticas fueron separadas del resto que formaban parte del pie de cría.

Con el fin de aislar los microorganismos con posible actividad biocontroladora se utilizó la cámara de aislamiento de microorganismos del CIB la cual fue previamente encendida por 20 min y desinfectada con un algodón impregnado de alcohol al 70%, para mantener la superficie, el equipo y las herramientas de trabajo en condiciones asépticas. Antes de su uso se dejó enfriar por 15 min.

Dentro de la cámara se tomaron 100 ml de agua destilada estéril y el siguiente material previamente esterilizado: ocho tubos de ensayo, una rejilla, una pipeta de 10 ml, ocho pipetas de 2 ml, un pipeteador, seis larvas de *S. frugiperda* parasitadas por un hongo y seis placas Petri con los siguientes medio de cultivo selectivo: seis placas con V8, cuatro con PDA, dos con pulido de arroz (A), dos con un medio de Zanahoria (Z), dos con el medio Jofee (J), dos con el medio DC y cuatro placas Petri estériles vacías proporcionadas todas por el profesor Vladimir Villalba. Con ayuda de un atomizador, se roció toda la cristalería con alcohol al 70% antes de introducirla a la cámara.

Utilizando las pinzas entomológicas se sacó la primera larva y se colocó sobre una de las tapas de la placa Petri vacía, se partió a la mitad con el bisturí y se introdujo en el tubo de ensayo #1, al cual se le había adicionado previamente 10 ml de agua destilada estéril con una pipeta, el tubo se agitó manualmente y con fuerza durante un minuto; con una pipeta de 2 ml estéril se sembró por extensión una alícuota de 1ml de inóculo quedando distribuidos los tratamientos como lo muestra el Cuadro 2.

Cuadro 2. Distribución azarosa de los inóculos con posibles microorganismos biocontroladores sembrados por extensión en medios de cultivo selectivos para hongos y bacterias.

Individuo	Medio					
	V8*	PDA*	J	A*	DC	Z*
1	x		x			x
2	x	X		x		
3	x			x	x	
4	x	X			x	
5	x	X	x			
6	x	X				x

*: Medios de cultivo selectivos para hongos.

Una vez hecha la siembra de los microorganismos provenientes de la primera larva, se colocó una cinta de plástico alrededor de cada placa Petri sembrada para evitar la entrada de esporas de microorganismos indeseables u otros patógenos, se rotularon los cultivos y se sacaron de la cámara para flamear con alcohol al 95% y poder utilizar de nuevo la superficie de trabajo y las herramientas utilizadas (pinzas y bisturí). Cada larva fue cortada con una hoja de bisturí diferente y se siguió el mismo procedimiento con las cinco larvas restantes. Las muestras aisladas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad por 48 h en el Laboratorio de Biocontroladores.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó un asa micológica, se flameó y se cortó un pequeño cuadro de 1 cm² de los medios que contenían los primeros aislamientos con la colonia de interés y se sembraron en los nuevos medios selectivos ya descritos y gelificados. Dos muestras en el medio V8 y dos muestras en PDA, conservando un duplicado del inóculo en cada tipo de medio selectivo de cultivo utilizado. Las placas Petri se sellaron con cinta de plástico para evitar la entrada de microorganismos indeseables y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente por 48 h en el Laboratorio de Biocontroladores. Este

proceso se repitió para cada una de los diferentes colores de las colonias observadas de los microorganismos presentes en el medio.

Una vez que se habían purificado los cultivos fueron trasladados a la cámara de microorganismos para su identificación. Bajo condiciones asépticas, se tomaron cinco portaobjetos, uno por cada hongo a identificar, con ayuda de una pinza se flamearon ambas superficies del portaobjetos para eliminar rastros de grasas, lípidos y partículas de la piel que interfieran con la observación. Se agregaron dos gotas de toluidina, una en cada lado del gotero y con un asa bacteriológica, previamente desinfectada, se tomó una pequeña muestra del cultivo fúngico en PDA y se colocó sobre una de las gotas de toluidina, se esparció suavemente, se le puso un cubre objetos a la muestra. Luego se flameó el asa y se efectuó el mismo procedimiento para montar la muestra del cultivo en V8. Con ayuda de un microscopio óptico en 10, 20, 40 y 100X se caracterizaron los cuerpos fructíferos de los hongos y se clasificaron según el manual de los hongos comunes que atacan en América Latina (Finch y Finch, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Colecta y crianza en dieta natural

Con las colectas realizadas en las diferentes zonas del país, se comenzó el establecimiento del pie de cría de *Spodoptera frugiperda* en las instalaciones del CIB. Inicialmente, se colectaron 28 larvas en Santiago de Paraíso, cuatro en Santa Eulalia de Atenas, siete en Ciudad Quesada, cinco en Nicoya y una en Cartago, iniciando la investigación con 45 larvas. Durante la colecta en campo se observó como esta plaga de acuerdo al nivel de incidencia en el cultivo puede causar daños leves (en Santa Eulalia) o daños muy severos (en Santiago), generando pérdidas económicas significativas que obligan al agricultor a tomar medidas inmediatas de control como lo es el uso de un insecticida sistémico o de contacto. En La Trinidad de Moravia se colectaron cuatro larvas más; sin embargo, estas se encontraban recién eclosionadas y murieron durante el traslado del campo hacia el laboratorio, probablemente por la mala manipulación con las pinzas entomológicas a la hora de recolectar ejemplares tan pequeños, de ahí que la recolección de insectos en estadios más avanzados asegura una mayor tasa de sobrevivencia durante la colecta en campo.

Inicialmente, se obtuvo una descendencia de 29 larvas a partir de los 45 ejemplares introducidos al laboratorio ya que solo estos llegaron a la etapa adulta, permitiendo así el establecimiento del pie de cría. En un estudio acerca del control biológico de *Spodoptera frugiperda* en maíz efectuado por Pérez (2000) reporta que a 25 °C, cada hembra pone en promedio alrededor de 944 huevos, por lo que la sobrevivencia inicial después de la colecta garantizaba la descendencia que nos permitiera el establecimiento del pie de cría con baja consanguinidad interspecífica por la procedencia de diferentes regiones del país del material colectado.

Durante esta etapa de crianza en dieta natural se obtuvo una alta tasa de mortalidad de los individuos en estudio. En el gráfico 1 se muestran los resultados porcentuales de la mortalidad, donde se observa que la tasa más alta corresponde a la primera generación, la cual fue disminuyendo a medida que avanzaban las nuevas etapas generacionales.

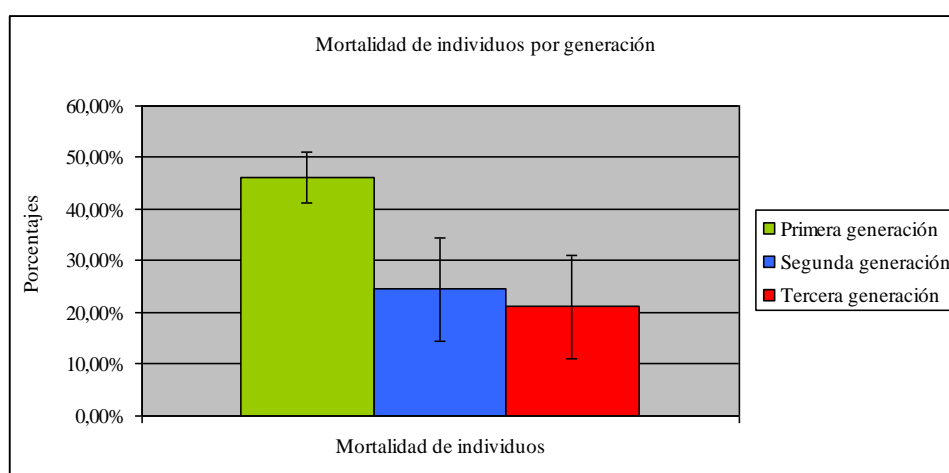


Gráfico 1. Porcentaje de mortalidad de los ejemplares de *S.frugiperda* criados en laboratorio.

En la primera etapa del ensayo la mortalidad alcanzó el 46,15 %. Durante este periodo se contabilizó la muerte de 14 larvas, una murió en la transición a pupa, otras cuatro en el estadio de crisálidas y cinco adultos que no dejaron descendencia, de un total de 52 individuos que conformaron esta primera generación. Una de las causas de la alta mortalidad fue el canibalismo practicado por las larvas, que aún en presencia de abundante alimento se comían unas a otras, por lo que fue imperante la necesidad de

individualizarlas sustituyendo la jaula de desarrollo larval (Figura 2) por pequeñas placas Petri plásticas color ámbar (Figura 3) con lo que se logró reducir los índices de mortalidad en la segunda generación reportándose un 24,53% a partir de 53 ejemplares bajo estudio.

La mortalidad en la tercera generación se redujo mediante la observación detallada y persistente del comportamiento de *S. frugiperda* en cada una de sus fases, lo que sirvió de base para implementar algunas medidas como la individualización de las larvas, con lo que se descartaba la pérdida de individuos por canibalismo, o evitar la fuga de adultos para garantizar la obtención de masas de huevos viables a través del suministro de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) óptimas y adecuadas que favorecieran la oviposición. En un estudio a nivel ecológico para esta especie, Álvarez (1991) reportó el canibalismo en campo, razón por la cual al eclosionar los huevos, las larvas se dispersan a plantas vecinas colgando de un fino hilo de seda que les permite ser acarreadas por el viento; de esta manera las larvas de *S. frugiperda* se pueden ubicar individualmente en cada planta que vayan atacando en campo, lo que fue corroborado durante el proceso de producción en el laboratorio.

Por otra parte, García y Clavijo (1989) en su trabajo sobre el efecto de la alimentación sobre la longevidad, fertilidad y fecundidad de *Spodoptera frugiperda* encontraron que al utilizar hojas del cogollo de maíz con más de 45 días en una población de 40 larvas criadas con ellas, se logró obtener 37 adultos, lo cual representa un índice de mortalidad bastante bajo; por el contrario estos autores reportan que al utilizar hojas de maíz recién germinado como el empleado en esta investigación sólo se obtuvieron 8 adultos a partir de la misma cantidad de larvas (40); sin embargo, el trabajo de estos investigadores no da un énfasis especial a este aspecto ya que a nivel estadístico no reportaron diferencias estadísticas significativas al aplicar una prueba de chi-cuadrado ($P \geq 0,05$), de ahí que su investigación se enfatizó en variables como: la fertilidad y fecundidad de las hembras adultas de *S. frugiperda*.

El uso de hojas de maíz como alimento para *S. frugiperda* favoreció la baja sobrevivencia de las mismas, debido a que las hojas se deshidrataban fácilmente y se dificultaba la ingesta de las mismas por parte de los insectos; por tal razón, éstas tenían que ser cambiadas a diario. En repetidas ocasiones cuando se colocaron las semillas de maíz en un envase de vidrio con agua para romper la latencia e iniciar el proceso de germinación, el embrión de los cariósides no era viable y el agua en lugar de imbibirlo creaba un ambiente anaeróbico que inducía el proceso de fermentación por lo que esas semillas debían ser desechadas escaseando la fuente de alimento para el pie de cría. Según Marengo (1988) en su trabajo

sobre los parasitoides de este insecto en maíz, cada larva del gusano cogollero consume 91 cm² de hojas de maíz, más 2 cm² que esclerotiza en sus estadíos iniciales; por lo que en este ensayo las plantas tiernas de maíz producidas y mantenidas en invernadero no generaban suficiente follaje como para alimentar a la creciente población de larvas en el laboratorio.

El ciclo biológico de este insecto se encuentra altamente influenciado por condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y el fotoperiodo. Considerando una temperatura promedio de 19,5 °C en el estante en donde se colocaban las microjaulas de desarrollo larval y con la dieta a base de hojas tiernas de maíz, los huevos de esta especie tardaron entre cinco y seis días en promedio para eclosionar, el desarrollo larval fue de 21,6 días en promedio, el periodo pupal ocupó alrededor de 20,3 días y la fase de adulto 18,4 días, por lo que el ciclo de vida promedio fue de 47,40 días (Cuadro 3).

Cuadro 3. Duración promedio (días ± error estándar) de cada etapa del ciclo de vida del cogollero del maíz (*S. frugiperda*) alimentados con hojas tiernas de maíz y con la dieta artificial bajo condiciones ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo) no controladas.

Estadio	Dieta Artificial	Dieta Natural	V	P
Huevo	3,00±0,00	5,50±0,17	225 ^{NR}	0,0000 ^{NR}
Larva	26,80±1,41	21,60±1,04	27,23 ^b	0,0001 ^c
Pupa	15,3±0,73	20,3±2,19	4,71 ^a	0,0437 ^a
Total	45,10±1,20	47,40±1,60	15,27^d	0,001^e

NR: no reportado.

Letras iguales no presentaron diferencias significativas.

Letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Según Marengo (1988) la metamorfosis de este insecto está sumamente influenciada por la temperatura, la humedad y la alimentación, al utilizar hojas tiernas de maíz junto con trozos de papa y otros tubérculos, los huevos eclosionaron en tres a cuatro días a 22°C, el desarrollo larval se completa entre los 12 y 24 días a 22°C, el período pupal dura de 15 a 31 días con una temperatura de 22°C y los adultos con movilidad parcial tienen una vida promedio de 21 días a 27°C, estos resultados coinciden con los reportados en el cuadro 2 a pesar de la diferencia de temperatura promedio (± 4 °C) bajo la cual se realizaron los ensayos.

Para finalizar y con base a la metodología utilizada bajo condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo no controladas podemos resumir que el proceso de crianza de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio y mantenidas con hojas de maíz tierno se muestra en el diagrama de la Figura 13.

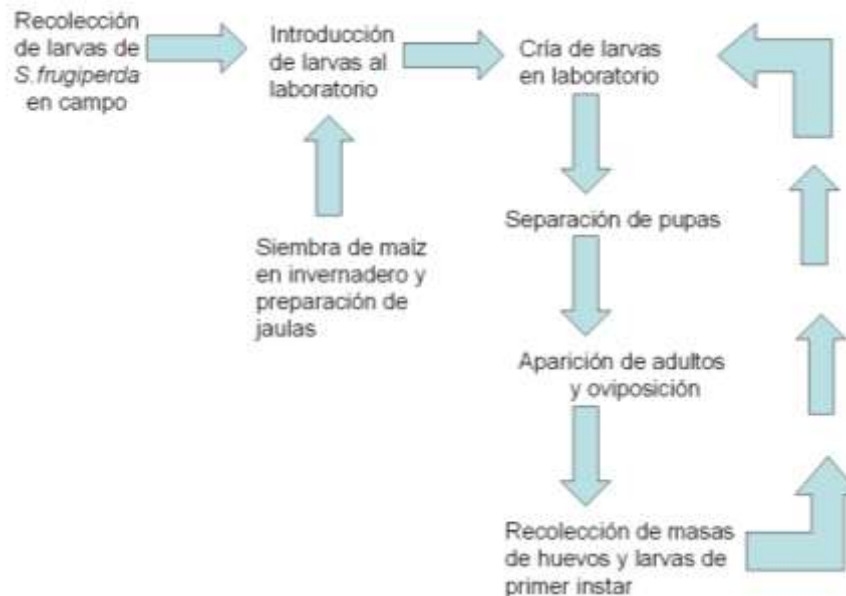


Figura 13. Esquema de la metodología utilizada para la cría de *Spodoptera frugiperda* en laboratorio basada en una dieta natural de hojas tiernas de maíz.

2.- Crianza en dieta artificial

Se dio inicio al establecimiento de la población de *Spodoptera frugiperda* con la dieta artificial BIO-MIX H-89 modificada (Navarro y Doreste 1995) de las larvas provenientes del pie de cría bajo condiciones naturales. Al aplicar la dieta artificial y con experiencia en el manejo de cada estadio del ciclo de vida de *S. frugiperda* se logró disminuir la mortalidad a un 21,11% (Gráfico 1), en donde se registraron 19 muertes durante el periodo larval, dos de ellas producto de la aparición del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y alrededor de cinco ejemplares en la transición a pupa, a partir de un total de 90 ejemplares en estudio con los que se inició la cría bajo la metodología de la dieta artificial.

Según Navarro y Doreste (1995) en su investigación sobre el desarrollo de *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) sobre dietas natural y artificial reportaron que a una temperatura de $24,8 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de $81 \pm 14\%$ y las larvas alimentadas bajo la dieta artificial BIO-MIX H-89 modificada se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 93%, un 10% más que al emplear una dieta natural basada en hojas tiernas de maíz (83%). En el caso de las pupas la mortalidad fue un 2% menor al aplicar la dieta artificial (96%) que al utilizar la dieta natural (94%), la reducción de la diferencia existente en el porcentaje de sobrevivencia de las crisálidas se debió a que las pupas no ingirieron alimento por lo que no se ven afectadas por la alimentación. Es evidente y así también lo demostramos en esta evaluación que el desarrollo óptimo de la crianza de *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones controladas esta seriamente correlacionada con el tipo de alimentación que reciben los insectos durante su desarrollo biológico y la temperatura promedio diaria bajo la cual se desarrolla el pie de cría; por lo tanto, el ciclo de vida de esta especie se acorta cuando la temperatura promedio es de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ y se alarga cuando esta disminuye y oscila en $\pm 21^{\circ}\text{C}$. Heinrichs y colaboradores (2000) también concluyeron que el desarrollo embrionario de la especie puede tardar 6 días a 20°C y 2 días a 30°C debido a que las bajas temperaturas favorecen la disminución de la actividad enzimática de los procesos fisiológicos de los organismos vivos, mientras que al incrementar la temperatura se favorece la actividad metabólica de los insectos y por ende se reduce su ciclo de vida, siempre que se encuentre bien alimentado.

Para fomentar la cría masiva de *S. frugiperda* se elaboró una dieta artificial rica en carbohidratos y nutricionalmente superior al tratamiento basado en hojas de maíz, la primera vez que se preparó no se utilizaron preservantes porque el fin primordial era determinar si las larvas toleraban el cambio de dieta, de ahí que se observó la aparición de hongos saprofitos en la misma (Figura 14). Por lo tanto, para solventar este problemas se adicionaron: ácido ascórbico, formaldehído al 40%, metil-p-hidroxibenzoato y ácido sórbico a partir de la segunda preparación del alimento porque la vitamina C es esencial para muchos fitófagos ya que actúa como estimulante alimenticio, en la esclerotización de la cutícula, en otras reacciones defensivas y como antioxidante (Cohen, 2004). Los antioxidantes como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos y flavonoides cumplen un papel de protección contra microbios, compuestos tóxicos de la dieta y contra los radicales libres inducidos por el estrés ambiental al que son sometidos los insectos criados bajo condiciones de laboratorio (Jonson & Felton, 2001).

Los preservantes como el ácido sórbico, el metil-p-hidroxibenzoato y el formaldehido se agregan a las dietas artificiales para prevenir la contaminación microbiana, la oxidación y otras formas de destrucción

de los nutrientes. Muchas de estas sustancias son tóxicas para muchos insectos, por lo que deben ser empleadas a bajas concentraciones (Jonson & Felton, 2001). Además, la textura de las dietas puede ser modificada con el uso de sustancias como la celulosa en varias formas, en polvo o en trozos y agentes gelificantes como el agar. El agente gelificante mejora las condiciones de la dieta manteniendo un alto contenido de agua en la mezcla nutritiva semisólida en donde los insectos se alojan y alimentan, además evita el colapso de las galerías creadas en la dieta por los insectos debido a la firmeza que esta presenta evitando que los componentes más densos precipiten o que los menos densos floten, manteniendo así las condiciones adecuadas para prevenir las reacciones que pueden darse entre los ingredientes y algunos gelificantes como: proteínas, pectinas y otros carbohidratos que son nutrientes que pueden ser utilizados por muchos investigadores (Chaudhury & Alvarez, 1999).



Figura 14. Aparición de hongos en la dieta artificial sin preservantes.

Con la dieta artificial se observó un crecimiento adecuado de las larvas ya que les permitió completar su ciclo de vida hasta dejar una numerosa descendencia fértil (Cuadro 3), cuando se realizó el ANOVA se determinó que existían diferencias significativas para el estadio larval. En promedio las larvas con la dieta natural tardaron $21,60 \pm 1,04$ días; mientras que con la dieta artificial tardaron $26,80 \pm 1,41$ días. Esto

resulta favorable si se desea probar el potencial controlador de algún insecto sobre *S. frugiperda*, ya que el estado larval es uno de los estadios preferidos por algunos enemigos naturales como ciertas moscas Tachinidae o Hymenopteras, Braconidos, entre otros (Badii y Abreu 2006).

Los insectos adultos de *S. frugiperda* se alimentaron con una solución de miel al 10% impregnada en un trozo de algodón que le permitía suministrar los azúcares necesarios para la alimentación de estos, por lo que se mantuvieron en jaulas de copulación con movilidad limitada (Figura 5). En nuestro caso, el uso de la miel fue bastante efectivo, aunque al no tener preservantes el algodón debía ser cambiado diariamente producto de la rápida proliferación de microorganismos fúngicos y bacterianos que contaminaban la solución y dificultaban la ingesta de alimento de las palomillas; aunque esto no afectó la copulación entre los adultos. Este tipo de alimentación con base en agua/miel fue reportada por Marengo (1988) como efectiva y de bajo costo porque se alimentaron adultos de *S. frugiperda* con una solución de miel al 4% en un ambiente con movilidad parcial, obteniendo una vida promedio de 21 días en este estadio a 27,0 °C; sin embargo, no se menciona si presentaron problemas de contaminación y por consiguiente ningún mecanismo para contrarrestarla.

Al efectuar el ANOVA se puede afirmar que el ciclo de desarrollo completo de *S. frugiperda* es significativamente menor con la dieta artificial (tarda 45,10 días), lo cual resulta favorable si se desea realizar otro tipo de pruebas y/o experimentación con posibles controladores biológicos, ya que provee un menor lapso para trabajar con estos insectos (Cuadro 3); sin embargo, el tiempo promedio que dura el desarrollo larval con esta dieta es cinco días más largo que el lapso aproximado de este mismo periodo utilizando la dieta a base de hojas tiernas de maíz, esto es ventajoso porque la mayoría de microorganismos con actividad entomopatógena o entomófaga interrumpen la metamorfosis de los lepidópteros durante el estadio larval. En un estudio sobre el gusano cogollero del maíz efectuado por Banegas (1989) se reportó que al alimentar las larvas de esta especie con una dieta artificial, la eclosión de los huevos ocurre entre dos a cuatro días con temperaturas que oscilan entre 22-30 °C, el estado larval pasa por un total de 6 estadios por lo que puede variar entre 14 y 19 días a temperaturas entre 24-28 °C, las pupas tardan alrededor de siete a ocho días si se encuentran entre 22-30°C, mientras que los adultos tienen una longevidad promedio de 7 días a 25°C.

La utilización de la dieta artificial sobre individuos adaptados previamente al manejo dentro del laboratorio ha favorecido el establecimiento de un pie de cría lo suficientemente grande como para evaluar

la duración de cada etapa del ciclo de vida de los ejemplares reproducidos en laboratorio; sin embargo, la dieta de maíz permitió culminar toda la metamorfosis del insecto, aunque al emplearla se prolongó el ciclo de vida del mismo, disminuyó la sobrevivencia de larvas y pupas aún en condiciones ambientales similares a las que se tenían al efectuar el tratamiento con la dieta artificial. Por lo tanto, se ha establecido un promedio preliminar en días de la duración de cada fase del ciclo de vida del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) a una temperatura promedio de 19,5 °C para ambas fuentes de nutrimentos según el sexo de los individuos estudiados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Duración promedio (días) del ciclo de vida según el sexo del cogollero del maíz (*S. frugiperda*) alimentados con hojas tiernas de maíz y con la dieta artificial bajo condiciones ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo) no controladas.

Alimentación				
	Hojas de Maíz		BIO-MIX H-89 Modificada	
N	Macho	Hembra	Macho	Hembra
50	58,8	54,9	45,8	53,6

Si bien es cierto que no se encontró diferencia significativa en el tiempo de desarrollo entre machos y hembras ($V= 0,89$; $gl= 1$; $p= 0,3531$) es relevante el hecho de que los machos fueron más longevos al ser alimentados con la dieta natural, pero las hembras vivieron más tiempo que los machos al utilizar la dieta artificial durante el periodo larval (Cuadro 4). La importancia de este tipo de observaciones radica en que al establecer una metodología de crianza en laboratorio para *S. frugiperda* en el que se tiene control del ambiente sobre el que se desarrollan los ejemplares, obtendremos que, dependiendo de la alimentación que se le proporcione a las larvas, bien sea natural o artificial podría llegar a favorecer el predominio de un sexo o del otro lo que permitiría controlar factores de tipo reproductivo como la oviposición de las hembras.

En resumen en la figura 15 se muestra el diagrama que ilustra la metodología utilizada para la producción masiva de *S. frugiperda* sobre la dieta artificial BIO-MIX H-89 MODIFICADA bajo condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo no controladas en laboratorio.



Figura 15. Esquema de la metodología para la cría de *Spodoptera frugiperda* en laboratorio bajo la dieta artificial BIO-MIX H-89 MODIFICADA.

3.- Identificación de posibles organismos biocontroladores

Tres semanas después de haber efectuado los primeros aislamientos, se observó que en los primeros predominaba la presencia de cinco tipos de micelio según su color (verde, blanco algodonoso, blanco lechoso, gris y gris oscuro) por lo que fue necesario subcultivar esas colonias para su posterior identificación (Figura 16).

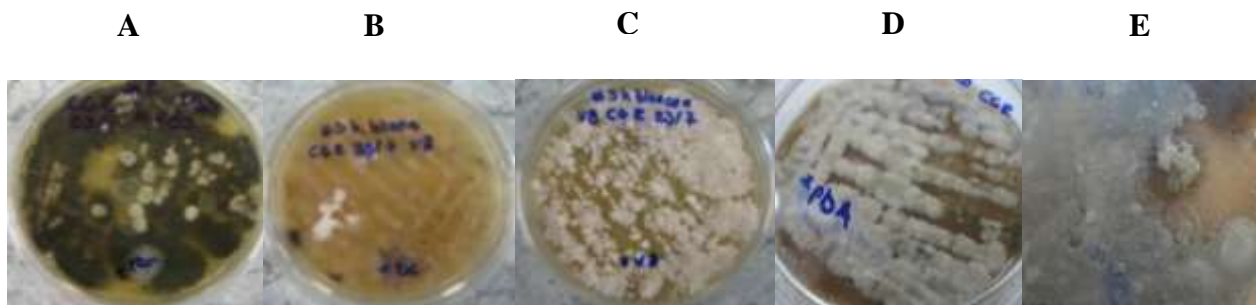


Figura 16. Placas Petri con cinco tipos de hongos con posible capacidad biocontroladora. A- *Penicillium* sp., B- *Beauveria bassiana*, C- *Aspergillus* sp., D- *Aspergillus* sp., E- *Aspergillus* sp.

Se dio la aparición de un díptero (Figura 17) y algunos hongos (Figura 18) que se han podido vincular con la muerte de algunas larvas durante el proceso de esta investigación (Figura 19); sin embargo, en el caso del díptero no se ha comprobado su poder o acción controladora, debido a su inestable presencia, por lo que estos no fueron identificados a nivel de género. En un trabajo sobre la determinación del porcentaje de parasitismo natural que se presentó en larvas de *S. frugiperda* en maíz por Álvarez (1991) se encontró que este insecto es parasitado en forma natural por dos parásitos importantes, los dípteros *Archytas* sp. y *Lespesia archippivora*, no obstante, ninguna de las especies reportadas por este autor se corresponde al díptero encontrado.



Figura 17. Insecto encontrado en las jaulas de cría de *S. frugiperda*.

El aislamiento de un hongo que colonizó varias larvas en nuestra investigación implica la aparición de un organismo con actividad entomopatógena con posible capacidad de combatir plagas tanto en campo como en laboratorio (Figura 18) en el proceso de identificación se determinó que era *Beauveria bassiana*, una especie con actividad biocontroladora conocida. En general los hongos entomopatógenos afectan todos los estadios del insecto, principalmente adultos y estados inmaduros (ninfas, larvas); sin embargo, el estado de pupa y huevo no son afectados por la acción del entomopatógeno. La especificidad de este entomopatógeno es variada, ya que algunos de ellos son muy específicos para una sola especie de insectos, mientras que otros tienen un amplio espectro de acción, por lo que no se descarta la posibilidad

de que los hongos aislados conserven su actividad biocontroladora frente a otros lepidópteros y demás grupos de insectos (Herrera, 2005).

Según Polanczyk y Alves (2005) en un estudio sobre la interacción entre *B. thuringiensis* y otros entomopatógenos en el control de *S. frugiperda* se reportó que individualmente la bacteria *Bacillus thuringiensis* y que los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Nomuraea rileyi* son controladores biológicos activos de este lepidóptero.

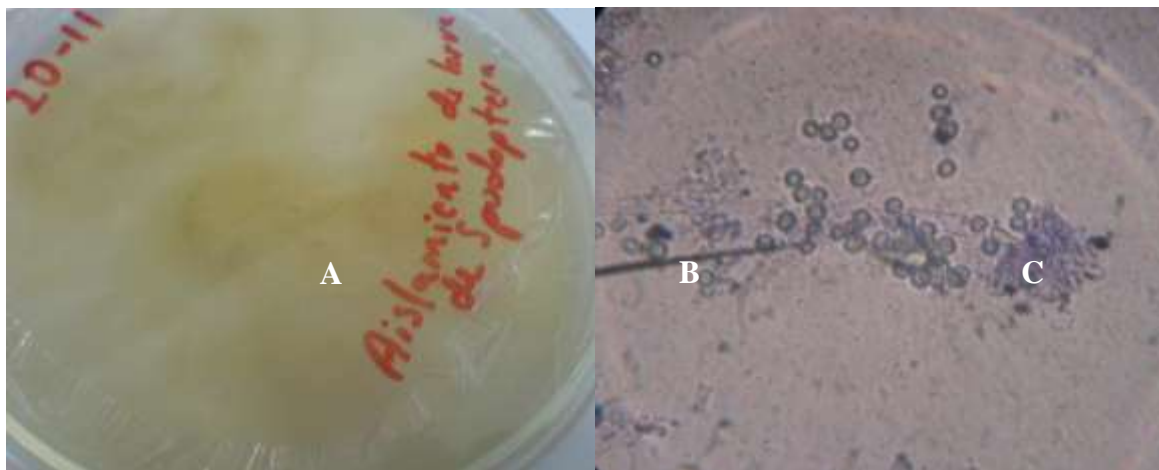


Figura 18. Hongo encontrado en larvas muertas de *S. frugiperda*. A- Placa Petri con un cultivo de *Beauveria bassiana* en medio PDA. B- Esporas de *B.bassiana* a 100 X teñidas con toluidina.

Echeverría (2006) ha reportado que *Beauveria bassiana* presenta la habilidad de vivir de manera parasítica y saprófita, lo que le permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos hospedantes. En presencia de un insecto hospedante, el conidio de este hongo germina y una vez dentro del hemocele, pasa a formar una red de hifas, que una vez colonizado todo el campo del insecto da origen a las blastósporas, que tienen una forma similar a la de las levaduras.

El ataque de este hongo sobre el insecto se realiza en diferentes etapas a saber: adherencia, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi, 2001). El primer paso se produce cuando el conidio se adhiere a la cutícula. Para ello es necesario el reconocimiento y compatibilidad de las enzimas y glicoproteínas entre el conidio y las células del tegumento del insecto que se ve influenciada por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, y otra activa, en la cual se secretan mucílagos que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana generando un ambiente favorable para la secreción de enzimas lisogénicas que finalmente causan la muerte del insecto hospedante (Wong, 2003).

También es posible que ocurra una invasión y proliferación de las hifas en el tracto digestivo, este paso ocurre luego de la muerte del insecto, ocasionado por daño mecánico, desnutrición y toxicidad, porque las hifas secretan un antibiótico (oosporina), que ataca las bacterias del intestino y suprime las barreras inmunes del insecto, el hongo invade el tracto digestivo, se alimenta de su interior y lo momifica (Figura 18) (Kouassi, 2001).



Figura 19. Larva de *S. frugiperda* colonizada y momificada por el entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

El hongo con micelio verde aislado correspondió al género *Penicillium* sp (Figura 20); y los cultivos que presentaron colonias fúngicas gris claro y oscuro se trataban de hongos del género *Aspergillus* sp. (Figura 21), si bien es cierto, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., no posee actividad biocontroladora, Viaud *et al*

(1998), reportaron que existe recombinación parasexual en el género *Beauveria* sp, así como en *Aspergillus* sp., que podrían conferirle algún tipo de actividad entomopatogena.

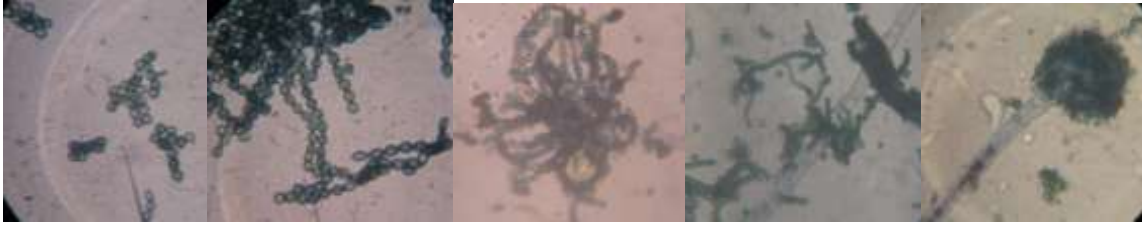


Figura 20. Estructuras vegetativas de *Penicillium* sp. a 100 X teñidas con toluidina.



Figura 21. Cuerpos fructíferos de *Aspergillus* sp. a 100 X teñidos con toluidina.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✚ El uso de la dieta artificial BIO-MIX H-89 modificada fue la más efectiva para criar en laboratorio al gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* ya que se reduce significativamente el ciclo de vida completo para la especie y se amplía en cinco días el estadio larval lo cual contribuye con el aislamiento y la identificación de organismos biocontroladores de interés agrícola.

- ✚ Se efectuaron colectas en Santa Eulalia de Atenas, Santiago de Paraíso, La Trinidad de Moravia, Cartago, Ciudad Quesada y Nicoya donde se observaron sobre plantas de maíz daños desde muy leves hasta muy severos recolectándose un total de 45 larvas con las que se dio inicio al pie de cría de *Spodoptera frugiperda*.

- ✚ La dieta artificial nutricionalmente superior estaba enriquecida con varias fuentes de carbohidratos (frijoles blancos, germen de trigo), y fue necesario el uso de preservantes y antioxidantes (ácido sórbico, metil-p-hidroxibenzoato, formaldehído 40% y ácido ascórbico) para evitar la proliferación de microorganismos patógenos; permitiendo así el desarrollo desde huevo hasta la fase de pupa de *Spodoptera frugiperda*.

- ✚ Utilizando la dieta natural a base de hojas tiernas de maíz la metamorfosis de *S. frugiperda* tardó 47 días aproximadamente; entre cinco y seis días en eclosionar los huevos, 21 días en cumplir el estadio larval y 20 días como pupa. Con la dieta artificial, el ciclo de vida de esta especie se acortó a 45 días, aunque el periodo larval se extendió a 27 días aproximadamente; la eclosión de los huevos se redujo a tres días y la fase de crisálida se acortó a 15 días.

- ✚ Como posibles parasitoides de los ejemplares colectados se observó la aparición de un díptero que no fue identificado, así como la aparición de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, el cual ejerció su actividad biocontroladora durante el estadio larval de *Spodoptera frugiperda*.

- ✚ Se recomienda para efectos de una investigación posterior estudiar la viabilidad de la producción a escala de los hongos obtenidos y su eficacia en el biocontrol de organismos plaga y no solo en *S. frugiperda*.
- ✚ Se propone buscar optimizar el ciclo biológico de esta especie para que sea posible utilizarla como un hospedante masivo para la producción de organismos biocontroladores.

APORTES Y ALCANCES

Gracias al desarrollo del proyecto se logro alcanzar una serie de aportas de los cuales surgieron múltiples beneficiarios uno de estos es el ITCR, ya que se este tipo de investigaciones son muy poco frecuentes en esta institución e innovadora dentro de la escuela de Biología y la carrera de Ingeniería en Biotecnología, por lo que abrió una puerta para que investigaciones posteriores se realicen, en esta área tan importante y tan pobremente explotada en nuestra formación académica.

Entre otros aportes se encuentran:

- Se genero conocimiento que al alcance de toda la comunidad del ITCR y del país en general y además se impulso la investigación como herramienta primordial para el desarrollo del país.
- Los estudiantes involucrados en esta investigación logramos poner en práctica los conocimientos adquiridos en los cursos recibidos durante el período universitario y en otros casos se obtuvieron nuevos conocimientos, tanto teóricos como prácticos, no conocidos hasta ahora, los cuales nos permitirán desenvolvemos mejor como profesional en un futuro no muy lejano.
- Se fortaleció el desarrollo de nuevas líneas de investigación adscritas al Centro de Investigación en Biotecnología y además apoyaríamos con el conocimiento generado al curso “Manejo Biotecnológico de Cultivos” impartido como curso electivo en la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela de Biología.
- Este proyecto estudiantil beneficio el área de manejo integrado de plagas dentro del ámbito institucional, ya que reforzó la seria iniciativa del desarrollo de un área de investigación y extensión de proyectos enfocados en el manejo de invertebrados para el control biológico de plagas.
- Al consolidarse esta propuesta, la comunidad de estudiantes de ingeniería en biotecnología y carreras afines, tienen la posibilidad de manejar una herramienta para la caracterización de la especie, a través de la estandarización de métodos de manipulación y cría de insectos bajo condiciones controladas.
- Además se considera que el desarrollo del proyecto fortaleció la formación profesional dirigida a la especialización en el manejo de insectos y recursos biológicos, área de particular interés de los involucrados en la investigación, lo que representaría un plus en la formación profesional de los responsables de la ejecución del proyecto.

■ Esta investigación busca servir de base para el posterior desarrollo de investigaciones más específicas y enfocadas a la producción de productos comerciales de bajo impacto ambiental, destinados al manejo integrado de plagas y a la evaluación de nuevos Biocontroladores de plagas con un pie de cría del hospedante de fácil manipulación en laboratorio.

■ Los aportes tecnológicos obtenidos de la investigación, pueden ser aplicados en la metodología de proyectos afines, los cuales tomen como referencia los protocolos de manipulación y cría en dieta artificial que deriven del uso de la Biotecnología que se pueda generar de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

- Alarcón, R. 1982. Análisis de información en ciencias forestales en el CATIE, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp. 152-155
- Álvarez R. 1991. Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. pp. 12-14.
- Andrews K, Quezada J. 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: Estado actual y futuro. Ediciones Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 623 p
- Aparicio, V y Manzanares, C. 2007. Producción Integrada. Horticultura. Tarragona, España. 25(3). pp. 8-13
- Badii, M. y Abreu, J. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. International Journal of Good Conscience. 1(1). pp. 82-89.
- Banegas, J. 1989. Tabla de vida del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) en dos sistemas de cultivo y prueba de dos hipótesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. pp. 23-32
- Barrera, J. 2000. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. Memorias de XI Curso Nacional de Control Biológico. Guanajuato, México. 244 p.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo del maíz. Turrialba, Costa Rica. 88 p.
- Chambers D. 1977. Quality control in mass rearing. Annual Review of Entomology. 22 (1). pp. 289-308.
- Chaudhury, M y Alvarez, L. 1999. A new starch-grefted gelling agent for screwworm (Diptera: Calliphoridae) larval diet. *Journal of Entomology*. 92:1138-1141.
- Cohen, A. 2004. Insect Diet: Science and Technology. Florida, Estados Unidos de América. CRC Press. 324 p.
- Contreras, J. 2004. Utilización de Insectos en el Control de Plagas Hortícolas. Feria de Calidad Ambiental y Ecoeficiencia 2004. Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, España. Pp. 131-139
- Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad Ruperto Carola. Heidelberg, Alemania. 111 p.
- Echeverría, F. 2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. pp. 11-16

- Fernández, J. 2001. Ecología y elementos para el control biológico y cultural de insectos plagas del maíz en cuatro municipios de la provincia Granma, Cuba. Tesis Doctoral, Universidad Central de Las Villas Cuba. 198 p.
- Fernández, J. L. 2002. Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz. *Prod. Prot. Veg.* 17 (3). pp. 200-202
- Finch, H y Finch, A. 1990. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. México, D.F. Editorial Trillas. 187 p.
- García, J.L y Clavijo, S. 1989. Efecto de la alimentación sobre la longevidad, fertilidad y fecundidad de *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Entomología.* 5 (6). pp. 47-53
- Heinrichs E, Foster J, Rice M y Molina J. 2000. Insectos Plaga del Maíz en Norteamérica. Universidad de Minnesota. Minnesota, Estados Unidos. pp. 340-341
- Herrera, J. 2005. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de dos especies de mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha obliqua*) bajo condiciones de laboratorio. Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. pp. 45-50
- IOBC (Internacional Organisation for BIological and Integraated Control of Noxious Animals and Plants). 2004. Integrated Production; Principles and Technical Guidelines. *Bulletin OILB srop.* 27(2). pp. 3-4
- Jassic, J y Reinés, M. 1974. Estudio experimental de la influencia de la temperatura en la palomilla del maíz. *Ciencias (Sec.4).* 44 (1). pp. 1-19.
- Jonson, K y Felton, G. 2001. Plant phenolics as dietary antioxidants for hervivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *J. Chem. Ecol.* 27. pp. 2579-2597.
- Kouassi, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Consultado 27 noviembre 2007. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html. Universidad de Québec. Montreal, Canada.
- Llanos, M. 1994. El maíz: su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 127-142
- Madrigal, A. 2001. Fundamentos del control biológico de plagas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 453 p.
- Marengo, R. 1988. Parasitoides del gusano cogollero *S. frugiperda* (Smith) en maíz, en la zona atlántica de Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. pp. 2-9
- Moreira M, Bejarano A, Segovia V.1989. Control del Cogollero del Maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith) utilizando insecticidas sistémicos y granulados bajo diferentes formas de aplicación. *Agronomía Tropical.* 39(4-6). pp. 281-287
- Nacional Academy of Sciences. 1978. Control de plagas de plantas y animales: manejo y control de plagas de insectos. Editorial LIMUSA. 3 (1). México D.F, México. 522 p.
- Navarro, R y Doreste, E. 1995. Desarrollo de *Heliothis zea* (Lepidoptera: Nocyuidae) sobre dieta natural y artificial. *Revista Agronomía Tropical.* 32 (1-6). pp. 81-101.
- Pedigo, L y Rice, M. 2006. *Entomology and Pest Management*. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Nueva Jersey, Estados Unidos. pp. 126-129
- Pérez, N. 1995. Prototipo de sistema experto sobre prácticas culturales en el cultivo de maíz *Zea mays* L., en la región Pacífico Sur de Costa Rica. Tesis para optar por el grado de *Magíster Scientiae* en Ciencias Agrícolas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. pp. 33-40

- Pérez, E. 2000. Control Biológico de *Spodoptera Frugiperda* Smith en Maiz. Departamento de Manejo de Plagas, INISAV. Consultado en: <<http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/SPODOPTTE.htm>>. Visitado el 14 de abril de 2008. Playa Ciudad de la Habana, Cuba.
- Piedra, F. 1974. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lep:Noctuidae). Cuban. J.Agric.Sci.8 (1). pp. 99-103.
- Polanczyk, R y Alves, S. 2005. Interacción entre *Bacillus thuringiensis* y otros entomopatógenos en el control biológico de *Spodoptera frugiperda*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 74:1. San José, Costa Rica. pp. 24-33
- Portilla, M y Streett, D. 2006. Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. Revista Colombiana de Entomología. CENICAFE. Chinchina, Caldas, Colombia. 57(1). pp. 31-50.
- Valerio, A. 2006. Evaluación de la incorporación de diferentes funguicidas y dosis en dietas artificiales para la reproducción de la broca del café con miras a la multiplicación masiva de sus parasitoides bajo condiciones controladas. Tesis para optar por el grado de bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 88 p.
- Van Driesche, R; Hoddle, M y Center, T. 2007. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET). pp. 3-7
- Viaud, M; Counteaudier, Y; Riba, G. 1998. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. Applied and Environmental Microbiology. 64 (1). pp. 88-93.
- Villa, M.2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera Frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. Folia Entomológica Mexicana. 43 (1). pp. 307-312
- Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformtaion. Tesis de Doctorado. Universidad Ruperto-Carola. Heidelberg, Alemania.147 p.

ANEXO 1

El protocolo de producción con dieta artificial bajo condiciones de laboratorio se detalla a continuación:

Ingredientes de la dieta:

- 167 g de frijoles blancos.
- 40 g de levadura.
- 100 g de germen de trigo.
- 4,33 g de ácido ascórbico.
- 1,67 g de ácido sórbico.
- 2,67 g de metil-p-hidroxibenzoato
- 3 ml de formaldehído al 40%.
- 20 g de agar-agar.
- Aforar a 1,00 l con agua destilada.

Preparación de la dieta:

- Se cocinaron los 167 g de frijoles blancos con suficiente agua, una vez fríos, se maceraron y se filtraron en un pascón con el fin de utilizar sólo la fase líquida de la mezcla, esta solución se trasvasó a un beacker de 1000 ml, el cual fue colocado en una plantilla con calor moderado y en constante agitación manual con una espátula metálica, seguidamente, se colocaron 200 ml de agua destilada en un beacker plástico de 500 ml, se calentó en un microondas y se agregaron los 40 g de levadura, la cual se agitó vigorosamente con una espátula, esta solución se dejó fermentar por 10 min aproximadamente y luego se trasvasó cuantitativamente al beacker de 1000 ml, una vez disuelta la disolución se agregaron los 100 g de germen de trigo; 4,33 g de ácido ascórbico; 1,67 g de ácido sórbico; 2,67 g de metil-p-hidroxibenzoato y 3,00 ml de formaldehído 40%, uno a uno hasta que el reactivo anterior estuviera totalmente disuelto en el medio, por último, se aforó el beacker a un litro con agua destilada y se adicionaron los 20 g de agar. Al alcanzar el punto de ebullición, el

medio se vertió en placas Petri de vidrio previamente rotuladas y se almacenó a 5,0 °C en el refrigerador del Laboratorio de Docencia de Cultivo de Tejidos del CIB.