



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Trabajo de Diploma

**EFFECTO DE CUATRO DOSIS DE *Metarhizium anisopliae* L EN UN SUSTRATO
CON DIFERENTES CONTENIDOS DE HUMEDAD EN EL CONTROL DE
Aethina tumida MURRAY.**

AUTOR: Rangel Veloso Echemendía

Año: 2019



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS
José Martí Pérez

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Trabajo de Diploma

**EFFECTO DE CUATRO DOSIS DE *Metarhizium anisopliae* L EN UN SUSTRATO
CON DIFERENTES CONTENIDOS DE HUMEDAD EN EL CONTROL DE
Aethina tumida MURRAY.**

AUTOR: Rangel Veloso Echemendía

Tutor: MSc. Yander Fernández Cancio

Año, 2019

Resumen

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Agropecuaria III con insectos colectados de apiarios infectados de *A. tumida* perteneciente a la Empresa Agropecuaria Militar de Sancti Spíritus, con el objetivo de evaluar el efecto de un sustrato con *M. anisopliae* y tres contenidos de humedad en el control de larvas y pupas del insecto. Se empleó la cepa A34 con una concentración de $1,89 \times 10^8$ y realizaron evaluaciones cada 24 horas y determinaron los porcentajes de mortalidad de las larvas, infección de las pupas y la germinación de esporas por insectos. Para el análisis de medias de la interacción entre las dosis de *M. anisopliae* y los porcentajes de humedad del sustrato, se realizó un análisis factorial. Se obtuvo como resultados que el mayor porcentaje de mortalidad de larvas e infección de las pupas con *M. anisopliae* se alcanzó con las dosis de 20g y 24g con valores superiores al 60 % a los cinco días. El contenido de humedad en el sustrato influyó en la efectividad del hongo con los mejores porcentajes obtenidos con 25 % y 40 % hbss. La cantidad de esporas germinadas sobre los cuerpos del insecto fueron bajas independientemente de las concentraciones y el contenido de humedad durante la infección.

Summary

The present investigation was carried at the Agricultural Laboratory III with collected insects of beehives infected this *Aethina tumida* Murray belonging to the Military Agricultural Company, Sancti Spíritus and the objective of evaluating the effect that basis with *M. anisopliae* and three contents of humidity in the control of larve and infested of the insect and $1,89 \times 10^8$ concentration of strain A34. They were carried out evaluations every 24 hours and determined the percentages of mortality the larve, infection of the pustules and the germination of spores for insects. For the analysis of stockings of the interaction between the dose of *M. anisopliae* and the percentages of humidity of the basis and was carried out a factorial analysis. It was obtained as results that the biggest percentage of mortality of larve and infection of the pustules with *M. anisopliae* were reached with the dose of 20g and 24g with values superiors to 60% to the five days. The content of humidity in the basis influenced in the effectiveness of the mushroom with the best percentages obtained with 25% and 40% Hbss. The quantity of spores germinated on the bodies of the insect was low independently of the dose and the content of humidity during the infection.

Índice

Resumen	
Summary	
Introducción	1
Revisión bibliográfica	4
1. Generalidades de la producción de miel	4
1.1 Importancia de las abejas en la agricultura	5
1.2 Estructura y situación actual de la apicultura cubana	6
1.3 Principales Plagas y Enfermedades de los apiarios	7
1.4 Origen de <i>Aethina tumida</i> Murray e introducción en Cuba.	7
1.4.1 Clasificación Taxonómica según Murray (1876) de la especie <i>A. tumida</i> .	8
1.4.3 Incidencia de <i>Aethina tumida</i> Murray	10
1.4.4 Ecología de la <i>Aethina tumida</i> Murray	10
1.5 Medidas de prevención y control <i>Aethina tumida</i> Murray. Generalidades.	11
1.5.1 Control químico	12
1.5.2 Control Biológico	12
1.5.3 Potencialidades del hongo entomopatógeno (<i>M.anisopliae</i>) para el control de coleópteros.	13
2. Materiales y Métodos	14
2.1 Evaluación de la susceptibilidad de las larvas y pupas de <i>A. tumida</i> .	14
2.2 Determinación de la incidencia del porcentaje de humedad en la efectividad de <i>M. anisopliae</i>	15
3. Resultados y Discusión	17
3.1 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de infección de las pupas de <i>A. tumida</i>	17
3.2 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>A. tumida</i>	22
Conclusiones	31
Referencia Bibliográfica:	

Introducción

La miel es una sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* o por diferentes subespecies, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extra florales que las abejas liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales. Constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre aprovechó para nutrirse. Su composición es compleja y los carbohidratos representan la mayor proporción, dentro de los que destacan la fructosa y glucosa, pero contiene una gran variedad de sustancias menores dentro de los que destacan las enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales. Ulloa *et al.* (2010)

En el año 2015 China ocupó el primer lugar en cuanto a la producción de miel con una producción de 446.000 millones de toneladas seguido por Turquía, Argentina, Ucrania, Estados Unidos, Rusia, India, México, Irán y Etiopía. Portal de estadística español, (2015).

Según APICUBA (2017), en Cuba a finales de 2016 existían más de 2000 apicultores y más de 180 000 colmenas. La producción de miel fue de 9 120t, obteniendo como promedio 52 Kg de miel por colmena. La tendencia de la producción de miel en Cuba ha crecido notablemente en los últimos 5 años, contrario a lo que ocurre en el mundo, que disminuye tanto en el número de colmenas como en la productividad. Uno de los principales factores que intervienen en las mermas productivas son la incidencia de plagas y enfermedades lo cual conduce a un continuo debilitamiento en la población de la colmena o a su total disolución. Elzen *et al.* (2015).

Una de estas enfermedades es la Aethinosis, la cual es provocada por *A. tumida* Murray (Coleóptero, Nititulidae), oriundo del África subsahariana y reportado en los Estados Unidos de América en 1996, desde entonces se ha propagado a Canadá, así como a varios países de Sudamérica, Centroamérica, Egipto, Australia y Filipinas, además de reportes en el sur de Italia. Neumann y Ritter (2004)

Esta especie fue reportada en Cuba por primera vez en el 2012 por los Servicios Veterinarios. Milián, (2012). A partir de la identificación se asumieron métodos para el manejo integrado de la plaga como son el muestreo y destrucción de los restos de producción, aunque a nivel mundial se emplea el ácido bórico para su control. Grillo, (2017)

El insecto *A. tumida* es conocido popularmente como el pequeño escarabajo de las colmenas, produce pérdidas considerables en la producción de miel (hasta un 57 %). En su estado larval realiza galerías dentro de la colmena alimentándose a su paso de abejas en estados ninfales, de miel y polen; además al mezclarse sus excretas con la miel y las levaduras presentes en el panal, se produce una fermentación y la pérdida del valor comercial. Hood, (2004).

Se han utilizado diferentes métodos de control, que tienen como objetivo disminuir la población de estos insectos, que causan daño a las colonias de abejas. Se ha recurrido al uso de insecticidas dentro de las colmenas, como Check Mite–Coumaphos, para eliminar adultos; también Gard Star-Permetrina líquida al 40%, contra larvas. Ellis *et al.* (2007)

La utilización de productos químicos para el control de esta plaga puede provocar resultados no deseados por los apicultores como la contaminación de la miel y la cera, además se ha demostrado la susceptibilidad por las abejas. Schaefer *et al.* (2008)

A nivel mundial la tendencia de los consumidores es adquirir productos sanos, completamente naturales. Las exigencias de los clientes en el mercado son, no solo, en cuanto a tolerancias muy estrictas de residuos en las mieles, sino también, en cuanto al tipo de explotación apícola en que se produjeron. Por lo que existe una tendencia global a la obtención de productos orgánicos. Bahamonde *et al.* (2000).

Estudios recientes han demostrado la susceptibilidad que presentan larvas y pupas de *A. tumida* a controles biológicos, tales como nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema riobrave* Cabanillas,

igualmente sucede con la susceptibilidad que presenta el adulto de *A. tumida* a hongos entomopatógenos tales como *M. anisopliae*. Murrle *et al.* (2006)

Problema científico

No se conoce el efecto de 4 dosis de *M. anisopliae* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *A. tumida*.

Hipótesis

Si se emplean diferentes concentraciones *M. anisopliae* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad para el control de *A. tumida* Murray, se podría determinar la efectividad del hongo sobre el porcentaje de mortalidad de larvas y la infección de las pupas del insecto.

Objetivo general

Determinar el efecto de 4 dosis de *M. anisopliae* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *A. tumida*.

Objetivo específico

1. Evaluar la susceptibilidad de las larvas y pupas de *A. tumida* a cuatro concentraciones del entomopatógeno.
2. Determinar la efectividad del porcentaje de humedad del sustrato en el control de *A. tumida*.

Revisión bibliográfica

1. Generalidades de la producción de miel

La apicultura es la ciencia que se dedica al cultivo de abejas. Esta es una tradición milenaria que consiste en cuidar colonias de abejas dentro de las colmenas, obteniendo de ellas un excedente, la miel. También se obtienen otros productos naturales como propóleos, polen, jalea real y medicinas. Estrada, (2017)

La abeja *Apis mellifera* es la especie con mayor distribución en el mundo. Las abejas desarrollan una actividad fundamental para la alimentación del ser humano y los animales: la polinización; sin ésta labor, bajaría considerablemente la productividad de las cosechas y la flora silvestre. Además, aporta dos productos importantes para la humanidad: la cera y la miel. Estrada, (2017)

China es el mayor productor de miel de abeja a nivel mundial, produciendo en el año 2015 446 000 millones de toneladas. Por otra parte Turquía, Argentina, Ucrania, Estados Unidos, Rusia, India, México, Irán y Etiopía son otros países que tienen grandes resultados en cuanto a dicha producción. Irán y Brasil en los últimos 20 años han incrementado su producción de miel en un 233% y 104% respectivamente. Para lograr esto, el crecimiento interanual promedio de estos años fue de 10.3% para Irán y 3.7% para Brasil. Mercado Apícola Internacional, (2018)

Las exportaciones de miel a nivel mundial muestran una tendencia creciente, incrementándose aproximadamente en 334 mil toneladas en los últimos 17 años, a una tasa promedio anual de alrededor del 12%. Las cantidades exportadas desde 2009 tuvieron un crecimiento del 71% mientras que el volumen lo hizo en un 88%. El precio promedio creció en forma constante a partir de 2005 hasta 2014 y a partir de ese año hasta el 2017 disminuyó consecutivamente, totalizando un 10%. Mercado Apícola Internacional, (2018)

Según la Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola (2018), el comercio internacional de miel alcanzó en 2016 un volumen total de exportación de 659 mil toneladas por un valor de 2.000 millones de dólares. Los principales países exportadores de acuerdo al volumen exportado son: China con un 19% de las toneladas mundiales, seguido de Argentina (12%), Ucrania (8%), Vietnam (6%) e India (5%). A nivel de valor exportado los principales exportadores son China (13%), Nueva Zelandia (10%), Argentina (8%), Alemania (7%) y España (5%).

Del análisis de los precios promedio de exportación cabe destacar el caso excepcional de Nueva Zelandia que alcanza un valor promedio de 21.414 dólares por tonelada exportada. Destacan también Reino Unido con un precio por encima de los 8.000 USD/ton, Arabia Saudita y Australia 7.000 USD/ton, y Francia, Alemania, Austria, Portugal y Dinamarca con precios superiores a los 5.000 USD/ton. Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola, (2018)

1.1 Importancia de las abejas en la agricultura

Según estimaciones de la FAO y de la Unión Europea, el valor de la polinización de las abejas es de 20 a 30 veces superior el valor de la miel y del resto de productos apícolas. La abeja melífera es el principal insecto polinizador que existe en la naturaleza; su abundancia puede variar entre el 60 y el 95% de todos los polinizadores. Panadero, Díez y Fidalgo, (2003)

La comunidad científica mundial ha reconocido que la miel y el resto de productos procedentes del colmenar son insignificantes en comparación con el principal beneficio que reporta la apicultura: la polinización de cultivos y especies vegetales silvestres. Este hecho, muchas veces ignorado, es de importancia crucial en un contexto general de deterioro ambiental. Las abejas de miel y la polinización. FAO, (2018)

En un estudio reciente sobre la importancia de los polinizadores en la Comunidad Valenciana, se pone de manifiesto que el beneficio generado por los polinizadores supera los 600 millones de euros anuales, sólo en el sector agrario (el 30-40% de

la producción final agraria). Y la parte correspondiente a la abeja de la miel ronda los 480 millones de euros. Panadero, Diez, y Fidalgo, (2003).

1.2 Estructura y situación actual de la apicultura cubana

La apicultura cubana transita por un proceso de cambios profundos en su estructura productiva e industrial, con el propósito de desarrollar las producciones apícolas con el mayor valor agregado para sus productos, como única vía de lograr una cadena productiva equitativa en todos sus eslabones. Si la propiedad de las colmenas fue estatal en más de un 70 % en los años 70 y 80 del pasado siglo, en el siglo XXI más del 90 % de las colmenas son propiedad de apicultores privados que se encuentran vinculados a cooperativas de uno u otro tipo. APICUBA, (2017)

A fines de 2016 había más de 2000 apicultores y el número de colmenas era superior a 180 000). Los productores han logrado una elevada productividad que promedia un rendimiento superior a los 45 Kg por colmena al año y en 2016 el rendimiento promedio fue de 52 Kg por colmena en el país. La producción de miel al cierre de 2016 alcanzó las 9 120 t cifra que no se alcanzaba hace unos 25 años. APICUBA, (2017)

La tendencia de la producción de miel en Cuba tiende a crecer contrario a lo que ocurre en el mundo, que disminuye tanto el número de colmenas como su productividad. Se trabaja en el mejoramiento de las abejas seleccionando las colmenas que manifiestan una elevada productividad y hábitos higiénicos superiores al 80 % en 24 horas. APICUBA, (2017)

La capacidad industrial para el beneficio de miel se ha completado recientemente al concluir la construcción de la Planta de Beneficio de miel de Occidente, en la provincia de Artemisa. Con esa Planta de Beneficio, el país cuenta con tres Plantas y una capacidad de procesamiento a granel de aproximadamente 10 000 t de miel anuales y una Planta envasadora en frascos con capacidad para unas 600 t anuales. Hay acuerdos de colaboración productiva, con las industrias del azúcar,

la cosmética y la biofarmacéutica para la diversificación de la producción de la apicultura. APICUBA, (2017)

1.3 Principales Plagas y Enfermedades de los apiarios

Uno de los principales factores que afectan la producción apícola es el ataque de plagas y enfermedades, entre las más importantes se encuentra la Varroasis cuyo agente causal es el acaro *Varroa destructor* L, este arácnido se alimenta de la hemolinfa de las abejas, se fijan en los esternitos de las abejas adultas, perforan la cutícula y las debilitan afectando su comportamiento y provocando desorientación en el vuelo. De Guzmán *et al.* (2012)

También el *Paenibacillus larvae* White consigo grandes daños porque ataca las crías de las abejas observándose una sintomatología característica como es la de coloraciones parduscas crecientes y el aspecto pegajoso de las larvas situadas en el interior de las celdas, mostrando estas últimas los opérculos hundidos y porosos de aspecto grasoso o conteniendo restos reseco de larvas. De Guzmán *et al.* (2012)

La polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella* L. es otra de las que mayor afectación provoca a los apiarios, esta devora los panales buscando el polen del cual se nutren en mayor medida, ataca las colmenas débiles y sobre todo los cuadros almacenados. Infesta la cría, el polen y la cera de las abejas. Elzen *et al.* (2015)

Hood (2004), plantea que la Aethinosis provocada por *A. tumida* es de las plagas más peligrosas porque las larvas de este insecto se alimentan de las crías de las abejas, de la miel y del polen, además al mezclarse sus deyecciones con la miel provoca que esta se fermente y pierda su valor comercial.

1.4 Origen de *Aethina tumida* Murray e introducción en Cuba.

La *Aethina tumida* es un pequeño escarabajo clasificado como un coleóptero de la familia Nitidulidae oriundo del África Subsahariana. El mismo evolucionó en colonias de abejas africanas como *Apis mellifera capensis*. Chihu y Chihu (2012).

Según Hayes *et al.* (2015), su distribución natural se encuentra por diversos países de África, entre ellos: Sudáfrica, Botsuana, Namibia, Zimbabue, Angola, Zambia, Tanzania y República Democrática del Congo. En dichos países esta plaga no se considera de gran importancia en el ámbito económico, pues solo afecta a las colonias que se encuentran débiles o enfermas. Fuera del territorio de origen se comporta como un escarabajo patógeno para las abejas.

Autores como Neumann y Ritter (2004) afirman la presencia de esta plaga en Estados Unidos de América en 1996 y desde entonces, se ha propagado a Canadá y a varios países de Sudamérica y de Centroamérica, Egipto, Australia y Filipinas, además de casos en el sur de Italia.

1.4.1 Clasificación Taxonómica según Murray (1876) de la especie *A. tumida*.

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleóptera

Familia: Nitidulidae

Género: *Aethina*

Especie: *A. tumida*

1.4.2 Descripción y características de *Aethina tumida*

El pequeño escarabajo de la colmena, puede vivir y alimentarse de frutas frescas o podridas y secas, jugos de plantas, hongos, abejas muertas e inclusive de algunas flores. Los huevos del PEC son de color blanco cremoso. Tienen 1.4 mm de largo por 0.26 mm de ancho, son, más pequeños que los de abeja. El huevo eclosiona de 3 a 6 días, saliendo la larva. La temperatura ideal para su reproducción es de entre 28°C a 32°C y más de 50% de humedad ambiente para eclosionar. Habeck *et al.* (2002)

Estos son depositados en rendijas y hendiduras de la colmena o dentro de las celdas operculadas sobre las pupas de abejas, pero siempre fuera de la vista de las abejas obreras porque serían fácilmente removidos por éstas. Se pueden

encontrar agrupados en racimos típicos y el límite máximo puede llegar hasta 2000 huevos depositados con un período de incubación que oscila entre uno y seis días, aunque el período más frecuente es de dos a cuatro días. Hood, (2004).

Las larvas son amarillo crema, tienen 10 a 11 mm de largo por 3 mm de ancho; son parecidas a la larva de la polilla pequeña de la cera pero se distinguen de ésta por tener 3 pares de patas cerca de la cabeza y desarrollan un par de espinas en cada segmento de su cuerpo y dos pares de espinas más grandes en el extremo posterior. Saldaña *et al*, (2014)

En este período este insecto cava galerías alimentándose a su paso de las crías de las abejas, de la miel y del polen; pero al mezclarse sus eyecciones con la miel y las levaduras presentes en el medio trae consigo la fermentación de la misma, provocando la pérdida de su calidad comercial. Este proceso oxidativo despide un olor similar a naranja en descomposición. Saldaña *et al*, (2014)

Cuando la larva localiza un suelo que le favorezca, cava de 2 a 10 cm de profundidad y forma una cámara de pupación con suelo y excretas. Las pupas son blanco aperladas cuando son jóvenes, tornándose oscuras conforme maduran. Duran de 15 a 74 días en el suelo, pero si las condiciones no le son favorables (humedad y temperatura) pueden esperar hasta 100 días para emerger. Saldaña *et al*, (2014)

El adulto presenta un color marrón amarillento haciéndose marrón oscuro y finalmente negro cuando alcanzan la madurez; estos cambios también se efectúan durante la metamorfosis, y pueden verse emergiendo del suelo adultos marrones o negros. Durante el primer, segundo o tercer día, después de emergidos los jóvenes escarabajos son muy activos, vuelan con facilidad y se orientan hacia la luz. Elzen *et al*. (2015)

El tamaño de un adulto es aproximadamente la tercera parte de una abeja obrera en estado de adultez. En esta etapa al igual que la fase larval cavan túneles dentro del panal para alimentarse de polen y de miel. Durante el transcurso de la

adulterez se vuelven menos activos y se trasladan hacia las partes menos luminosas del panal. Elzen *et al.* (2015).

1.4.3 Incidencia de *Aethina tumida* Murray

El escarabajo casi nunca supone un problema grave en el África subsahariana. Se desconocen aún las razones de que el impacto que ocasiona sea distinto en colonias de su ámbito nativo originario y en las de los nuevos ámbitos en los que actúa. Existen diferencias cuantitativas entre el comportamiento de las subespecies de la abeja melífera africana y el de las subespecies de la abeja melífera europea, así como las diferencias entre las diferentes técnicas de apicultura utilizadas, las diferencias climáticas y/o la evitación de enemigos naturales, entre otras posibles hipótesis. Ellis y Hepburn, (2006).

Las pérdidas económicas también se pueden asociar a la infestación por escarabajos en la sala de extracción de miel. Las condiciones ambientales generalmente asociadas a las salas de extracción, como temperaturas y humedades altas, proporcionan unas condiciones óptimas para el desarrollo de los escarabajos. La reproducción oculta y de bajo nivel también puede realizarse en los despojos o debajo de los cuadros de la colmena sin que se observen signos del daño causado a la colonia. Spiewok y Neumann (2006)

1.4.4 Ecología de la *Aethina tumida* Murray

Este insecto ha mostrado gran capacidad de adaptarse a distintos ambientes, desde climas tropicales a climas fríos. Este puede retrasar su desarrollo de acuerdo con las condiciones del medio y alimentos disponibles. Un Sistema de Información es necesario para integrarlo a la información geográfica y estadística existente sobre las variables ambientales correspondientes al clima y humedad en el suelo, para saber cómo influyen significativamente en el ciclo de vida del Pequeño Escarabajo de la Colmena y determinar la temporada de mayor reproducción. Saldaña *et al.* (2014)

Cuando la larva sale de la colmena para pupar, el tipo y la humedad del suelo también son factores que afectan su desarrollo. Un suelo encharcado provocará la

muerte por ahogamiento, en un suelo seco y duro no entrará, pero en cualquier suelo que pueda penetrar hasta dos centímetros o más y tenga las condiciones de humedad y temperatura se va a desarrollar la pupa. Saldaña *et al.* (2014)

Así, el PEC puede reproducirse a pequeña escala mientras una colonia está fuerte, pero esperando el momento en que la colonia sufra de estrés para colonizarla. Es posible que en las capas de desperdicios (que se forman en el piso de la cámara de cría o en las trampas de polen que no son limpiadas por abejas que son poco higiénicas) el PEC se alimente, reproduzca y pupa, logrando completar su ciclo de vida, sin ser visto por el apicultor. Saldaña *et al.* (2014)

La alimentación durante el desarrollo es también definitiva, pues escarabajos que se han alimentado con muchas proteínas (huevos, larvas, pupas y polen) tendrán más descendencia y vivirán menos, mientras que aquellos que consumieron azúcares de fruta y miel viven más pero casi no tienen descendencia. Por tanto, los panales de polen y de cría que no están bien protegidos y los desechos que se producen durante la cosecha de miel son muy atractivos para el escarabajo. El escarabajo puede vivir sin alimento de tres a siete días. Saldaña *et al.* (2014)

1.5 Medidas de prevención y control *Aethina tumida* Murray. Generalidades.

La prevención y control de esta plaga es necesario mantener limpio el apiario y los alrededores del lugar de extracción de la miel, no se deben dejar panales llenos de miel durante mucho tiempo antes de la extracción porque los escarabajos pueden acumularse rápidamente en miel guardada, especialmente cuando están lejos de abejas protectoras, es necesario mantener una limpieza escrupulosa alrededor de los núcleos o colmenas susceptibles. IICA, (2009).

Otras medidas consisten en atrapar las larvas del escarabajo cuando intentan llegar al suelo para pupar, mover periódicamente las colmenas, evitar tener apiarios en lugares arenosos porque son suelos muy favorables para el desarrollo de la fase de pupa, diseñar trampas para interrumpir la pupa, aplicar medios biológicos a base de nemátodos y hongos entomopatógenos en el suelo y por

último eliminar la colmena en caso de una infestación para evitar su expansión. IICA, (2009).

1.5.1 Control químico

Se han probado y utilizado diferentes métodos de control, que tienen como objetivo principal, disminuir la población de estos insectos que causan daño a las colonias de abejas. Como referencia, en Estados Unidos, se ha recurrido al uso de insecticidas dentro de las colmenas, así como se han utilizado en diversos países, productos químicos (insecticidas) con resultados altamente significativos.

El control químico significa un fuerte riesgo de contaminación de la miel, pudiendo convertirla en un producto no apto para consumo humano, se recomienda utilizar únicamente productos registrados y seguir las especificaciones técnicas de uso IICA, (2009).

La utilización de productos químicos para el control de esta plaga puede traer resultados no deseados por los apicultores como son la contaminación de la miel, la cera y las concebidas implicaciones de la contaminación ambiental, además se ha demostrado la susceptibilidad de las abejas a algunos productos químicos utilizados para el control de esta plaga. Schaefer *et al.* (2008).

1.5.2 Control Biológico

Una alternativa a los productos químicos es el uso de biopesticidas, a base de hongos entomopatógenos, los cuales eventualmente pueden establecerse en forma permanente en el suelo, debido a su capacidad de renovar inóculo sobre los insectos muertos, no inducen la aparición de resistencia y son efectivos agentes de control de plagas. France *et al.* (2000).

Varios estudios han demostrado la susceptibilidad que presentan larvas y pupas de *A. tumida* a controles biológicos, tales como nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis* y *Steinernema riobrave* Cabanillas, igualmente sucede con la susceptibilidad que presenta el adulto de *A. tumida* a hongos entomopatógenos

tales como *Metarhizium anisopliae*, para el control del pequeño escarabajo de la colmena. Ellis *et al.* (2010)

1.5.3 Potencialidades del hongo entomopatógeno (*M.anisopliae*) para el control de coleópteros.

La evidencia de la acción de *M. anisopliae* sobre insectos, en condiciones naturales, ha sido descrita como "muscardina verde" en más de 200 especies de insectos exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante. Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento. LEGER, (2018)

Las esporas de *M. anisopliae* cultivadas en arroz, al cabo de 18 ó 20 días de incubación se encuentran en óptimas condiciones para su utilización como agente de control se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C. LEGER, (2018)

En un estudio realizado por Hernández *et al.* (2007) variando las condiciones de exposición de los hongos entomopatógenos un aislamiento de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* en insectos adultos, obtuvo como tendencia general que, los insectos fueron susceptibles a los entomopatógenos en condiciones controladas; a HR alta (85±10%) y se observó mayor porcentaje de mortalidad (47%), en comparación con el bioensayo en condiciones ambientales de laboratorio, donde la mortalidad solo fue de 23%.

2. Materiales y Métodos

El experimento se desarrolló en el laboratorio de agropecuaria III de la UNISS en el periodo de febrero a marzo del 2019, con el objetivo de determinar la susceptibilidad de *A. tumida* a 4 dosis de *M. anisopliae* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad. Se utilizó la cepa A34 a una concentración de $1,89 \times 10^8$ y se obtuvo de la producción de inóculos del laboratorio provincial de Sanidad Vegetal para los Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), sobre cabecillas de arroz.

2.1 Evaluación de la susceptibilidad de las larvas y pupas de *A. tumida*.

Para la determinación de la susceptibilidad se realizó un experimento y se utilizaron macetas (6,2cm de alto x15,5cm de diámetro) con 500g de sustrato compuesto por 400g de suelo pardo sialítico sin carbonato y 100g de aserrín. Todas las componentes del sustrato se pesaron en una balanza digital modelo SARTORIUS.

Las 4 dosis del hongo fueron evaluadas en tres contenidos de humedad con tres réplicas por tratamiento; se utilizaron en total 36 macetas.

Se colocaron en cada recipiente 10 larvas de *A. tumida* en estado larval L5, previamente desinfectadas con Hipoclorito de sodio al 2%, el método utilizado fue la inmersión de los insectos en esta solución y a continuación se le realizaron dos lavados en agua destilada. Las larvas de *A. tumida* fueron colectadas en la Empresa Agropecuaria Militar de Sancti Spíritus ubicada en la carretera de Yaguajay km 2 en municipio de Sancti Spíritus en apiarios infectados.

Para evitar la contaminación con otros organismos los materiales de laboratorio fueron esterilizados en la autoclave Raypa a una temperatura de 120°C y una presión de 1 atmósfera durante 20 minutos y para de pesar, mezclar y sellar de los recipientes se utilizó el método del flameo.

Las dosis utilizadas fueron:

D1- *M. anisopliae* A34: 12g+ (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D 2- *M. anisopliae* A34: 16g+ (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D 3- *M. anisopliae* A34: 20g+ (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D 4-*M. anisopliae* A34: 24g+ (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

Los indicadores evaluados fueron:

Porcentajes de mortalidad de las larvas: Se realizaron evaluaciones cada 24 horas y se colectaron los insectos muertos y colocaron en cámaras húmedas para realizar el conteo de esporas germinadas por larvas/dosis

Porcentajes de Infección de las pupas: Se observaron cada 24 horas y moviendo los primeros 3cm del sustrato y colectando el 100 % de las pupas con color pardo o negro oscuro y se colocaron en cámaras húmedas para determinar en número de esporas germinadas por pupa/dosis.

Cantidad de esporas emergidas por larvas y pupas: Las larvas y pupas muertas en cámara húmeda transcurridos 18 días se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada y Tween, para separar las esporas y con la cámara de New Beager se contó bajo el microscopio óptico NLCD-307B.

2.2 Determinación de la incidencia del porcentaje de humedad en la efectividad de *M. anisopliae*

El efecto de la humedad en la efectividad del hongo sobre la mortalidad de las larvas y pupas, se realizó variando el contenido de agua en el sustrato, mediante el método gravimétrico. El suelo utilizado para elaborar el sustrato fue Pardo sialítico sin carbonato (Hernández, 1999) y se obtuvo de la Empresa Agropecuaria Militar de Sancti Spíritus ubicada en la carretera de Yaguajay km 2 del mismo lugar de procedencia que las larvas.

El suelo se pesó antes y después de secar durante 8 horas a 105 °C y por diferencia se determinó el contenido de agua presente (25 %), mediante la fórmula: $Psh - Pss = a$, donde (Psh)-peso del suelo húmedo, (Pss)-peso del suelo seco y (a)-agua.

El porcentaje de humedad se expresó en base a suelo seco (% Hbss):

$$\%Hbss = \frac{a}{pss} \cdot 100$$

Teniendo en cuenta que 1 litro de agua es equivalente a 1000g se variaron los volúmenes de agua hasta alcanzar el 40 % y 80 % de Hbss para ese tipo de suelo empleado. Los tres porcentajes de humedad se utilizaron para las cuatro dosis y se evaluó el porcentaje de mortalidad de las larvas y la infección de las pupas en función del agua. Los volúmenes de agua por tratamiento fueron:

- 25 % Hbss: Humedad natural del suelo (12,5 ml de agua)
- 40 % Hbss: Humedad natural del suelo+20ml de agua
- 80 % Hbss: Humedad natural del suelo+40ml de agua

Análisis estadístico

En el caso del porcentaje de mortalidad de las larvas y la infección de las pupas se realizó un análisis factorial, donde se estableció una comparación entre las medias de la interacción entre las dosis de *M. anisopliae* y los porcentajes de humedad del sustrato, donde los valores obtenidos se transformaron por $2 \arcsen \sqrt{p}/100$ para que se ajusten a la curva normal de probabilidad. En el análisis estadístico se tuvo en cuenta que se cumpliera el supuesto de normalidad por Kolmogorov Smirnov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene, estos análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows.

3. Resultados y Discusión

3.1 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de infección de las pupas de *A. tumida*.

La tabla 1 muestra el resultado de la infección de las pupas del insecto a las 72 horas de exponerlas al sustrato mezclado con las esporas del hongo, donde se observa que no hubo diferencias significativas entre la medias del porcentaje de infección en los suelos con un 25% y 40 % de humedad (30,93 % y 28,75 % respectivamente), pero significativamente superior al tratamiento de 80 % que alcanzó un 21,18 %. Las dosis empleadas difirieron estadísticamente entre ellas, y la mezcla con 24g alcanzo el mejor valor con 36 % y la variante de 12g del entomopatógeno resultó la más baja con solo 20,37%.

En las primeras 72 horas no hubo diferencias estadísticas en las dosis de 20g y 40g en los suelos de 25 % y 40% de humedad con los mayores porcentajes de mortalidad superiores al resto, como muestra el análisis multifactorial de interacción de las variables (Tabla 1). Se muestra además que la menor infección fue la variante de 12g del hongo en el suelo con 80 % de humedad.

Este efecto de la humedad sobre el control del hongo se atribuye a lo planteado por Doberski (2017), quien afirma que la manifestación epizoótica de los hongos entomopatógenos depende de los factores bióticos y abióticos. Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y la del medio.

Estos resultados no coinciden con lo planteado por Angel-Sahagún *et al.* (2011), que afirman que la susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos y es por eso que los hongos entomopatógenos controlan mejor la fase larval y no la pupa.

Tabla 1. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 72 horas

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> 72h						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	21,4 C	24,3 BC	38,7 A	39,4 A	28,75 a	
40 % Hbss	24,2 BC	26,6 B	38,2 A	41,3 A	30,93 a	
80 % Hbss	16,9 D	20,4 C	21,3 C	29,7 B	21,18 b	
Media Dosis	20,37 c	23,48 c	30,31 b	36,03 a		0,014
Error Típico			0,009		0,033	
CV (%)						8,82

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Pasado las 96 horas de exposición de las pupas de *A. tumida* a la acción de *M. anisopliae* en diferentes contenidos de agua en el sustrato no sobrepasan el 40 % de infección (Tabla 2). La tabla muestra que los tratamientos con 25 % y 40 % Hbss no difieren entre ellos y con valores significativamente superiores a la variante con 80% Hbss. El resultado del efecto independiente de las dosis sobre las pupas del insecto se comportó igual que la observación de las 72 horas, donde el tratamiento con 24g del hongo con 43,70% de infección fue superior al resto con diferencias entre ellos y el de menor porcentaje se obtuvo con 12g con un 25,66 %.

A diferencia de la evaluación de las 72 horas en la tabla 2 se observa, que cuando transcurre 96 horas de iniciado el ensayo existe una interacción entre las dosis y el porcentaje de humedad, donde los mejores resultados los alcanzó la mezcla de

24g en los sustratos con 25 % y 40 %Hbss, sin diferencias entre ellos. Cuando se utilizó 20g con estos mismos porcentajes no difirieron del tratamiento de 24g del entomopatógeno en un medio con 25 % Hbss Los valores alcanzados fueron bajos con porcentajes inferiores al 40%.

Resultados similares fueron obtenidos por Angel-Sahagún *et al.* (2011), quienes en un estudio de la sensibilidad de huevos, pupas y adultos de coleópteros en tres aislados de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroserus*, hallaron que todos los estadios son susceptibles a la acción de este hongo, con una mortalidad entre 50 y 71,3 % en pupas y 90 % en adultos luego de las 96 horas de exposición del insecto.

Tabla 2. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 96 horas

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> 96h						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	28,6 D	32,5	44,1 B	47,0		
		CD		AB	36,61 a	
40 % Hbss	30,4 D	34,2 C	45,5 B	50,8 A	38,53 a	
80 % Hbss	20,4 E	24,5 E	30,7 D	35,7 C	26,59 b	
Media Dosis	25,66 d	29,75 c	38,84 b	43,70 a		0,023
Error Típico		0,024			0,010	
CV (%)						11,63

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

A los cinco días de exposición de fases del insecto a la esporas del hongo se obtienen para todas las interacción de humedad con 24g valores por encima del 50 % de infección de las pupas (Tabla 3). La mejor combinación fue 24g a 40 % difiriendo estadísticas con el resto de las variantes evaluadas. Estos resultados corroboran los alcanzado por Angel-Sahagún *et al.* (2011), con valores similares utilizando la cepa A34. El valor medio en el porciento de infección de pupas más alto lo obtuvo el sustrato con 40% significativamente superior al resto.

El tratamiento con 24g de la cabecilla de arroz con *M. anisopliae* cepa A34 alcanzó porcentajes de infección superiores al 60% y estadísticamente diferente del resto en apenas cinco días de evaluaciones, coincidiendo con los obtenidos por Tanzini *et al.* (2017) en un ensayo de laboratorio de susceptibilidad de insectos del orden coleóptera a diferentes cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

Tabla 3. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 5 días

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> a las 5 días						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	30,5 F	38,6 E	46,0 D	60,3 B	41,23 b	
40 % Hbss	34,6 EF	40,8 E	52,0 C	66,1 A	45,57 a	
80 % Hbss	22,0 G	30,5 F	34,3 EF	52,3 C	31,61 c	
Media Dosis	27,99 d	36,05 c	42,78 b	59,01 a		0,018
Error Típico		0,036			0,008	
CV (%)						17,31

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

La evaluación de los diez días arrojó como resultado más relevante que con dosis superiores a 16g del entomopatógeno se obtiene un porcentaje de infección de las pupas superior al 40 % como lo muestra la tabla 4. Para los medios biológicos, como los hongos, los valores alcanzados en condiciones semi-controladas expresan su potencial para el control de insectos. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de infección de las pupas en la evaluación de los diez días, donde la mejor interacción de los indicadores evaluados lo alcanzó 24g y 40 % hbss, similar a la evaluación de los cinco días. Se observa además que la humedad del sustrato tuvo diferencias estadísticas entre ellos siendo el mejor la variante con 40 % Hbss.

De la misma forma que a los cinco días se mantiene la diferencia estadística entre todas la medias del porcentaje de infección para las diferentes dosis estudiadas, siendo la mejor 24g y con diferencia estadística del resto y entre todos los tratamientos. Esto corrobora lo planteado por Tanzini *et al.* (2017), quienes afirma que el éxito de un bioplaguicida con *M. anisopliae* radica en una buena formulación, que depende de las características del microorganismo, su relación con los componentes de la formulación y el ambiente de almacenamiento incluyendo la humedad y temperatura, aunque para Cortez-Madrugal, (2016) la estabilidad, viabilidad y persistencia en campo de los entomopatógenos es en gran medida determinada por el medio donde interactúa con el hospedero.

Tabla 4. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 10 días

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> a las 10 días						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	36,5 G	44,2 F	60,7 D	78,3 B	50,46 b	
40 % Hbss	40,3 FG	48,6 E	65,1 C	84,6 A	55,11 a	
80 % Hbss	38,3 G	42,0 F	47,3 E	60,4 D	45,65 c	
Media Dosis	38,30 d	44,76 c	56,62 b	72,90 a		0,032
Error Típico			0,018		0,011	
CV (%)						19,72

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

3.2 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de mortalidad de las larvas de *A. tumida*

La tabla 5 muestra el resultado de la mortalidad de larvas del insecto a las 72 horas de exponerlas al sustrato, donde se observa que no hubo diferencias significativas entre la medias en los suelos con un 25% y 40 % de humedad con valores de 25,57 % y 26,19 % de larvas muertas, pero significativamente superior al tratamiento de 80 % que alcanzó un 28,01 %. Las dosis empleadas difirieron estadísticamente entre ellas, y la mezcla con 24g alcanzo el mejor valor con 28,01 % y la variante de 12g del entomopatógeno resultó la más baja con solo 12,07%.

En las primeras 72 horas no hubo diferencias estadísticas en las dosis de 20g y 24g en los suelos de 25 % y 40% de humedad con los mayores porcentajes de

mortalidad superiores al resto, como muestra el análisis multifactorial de interacción de las variables (Tabla 1). Se muestra además que la menor infección fue la variante de 12g del hongo en el suelo con 80 % de humedad.

Esto reafirma lo mostrado por Carballo (2014), quien demostró que los materiales utilizados para la formulación ejercen actividad biológica y afectan la actividad del hongo, aunque deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas que permita la mezcla de los conidios, facilitar la aplicación del producto y que sean económicamente rentables.

Esto coincide con lo descrito por Vélez *et al.* (2017), quienes definen como sustrato idóneo para la formulación de *M. anisopliae* el arroz, trigo y medios líquidos, alcanzando un porcentaje de mortalidad de larvas y adultos entre un 30 % y 43 % en las primeras 48 a 72 horas en condiciones de campo, en un bioensayo para el control de *H. hampei*.

Tabla 5. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 72 horas

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> 72h						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	19,3 C	24,6 B	30,6 AB	32,0 A	25,57 a	
40 % Hbss	18,6 C	25,8 B	32,4 A	34,1 A	26,19 a	
80 % Hbss	7,0 E	12,7 D	14,3 D	21,5 BC	11,83 b	
Media Dosis	12,07 c	18,96bc	22,47 b	28,01 a		0,025
Error Típico			0,022		0,042	
CV (%)						10,61

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Pasado las 96 horas de exposición de las larvas de *A. tumida* a la acción de *M. anisopliae* en diferentes contenidos de agua en el sustrato sobrepasaron el 40 % de mortalidad con la dosis de 24g y para la combinación de 20g y 40 % de humedad (Tabla 6). La tabla muestra que los tratamientos con 25 % y 40 % de humedad no difieren entre ellos y con valores significativamente superiores a la variante con 80 %. El resultado del efecto independiente de las concentraciones sobre las pupas del insecto se comportó igual que la observación de las 72 horas, donde el tratamiento con 24g del hongo con 43,70 % fue superior al resto con diferencias entre ellos y el de menor porcentaje se obtuvo con 12g con un 25,66 %.

A diferencia de la evaluación de las 72 horas en la tabla 2 se observa, que cuando transcurre 96 horas de iniciado el ensayo existe una interacción entre las dosis y el porcentaje de humedad, donde los mejores resultados los alcanzó la mezcla de 24g en los sustratos con 25 % y 40 % Hbss, no se existen diferencias entre ellos. Cuando se utilizó 20g con estos mismos porcentajes no difirieron del tratamiento de 24g del entomopatógeno en un medio con 25 % Hbss. Los valores alcanzados fueron bajos con porcentajes inferiores al 40%.

De acuerdo con Monzón, (2018) el suelo ejerce un efecto desfavorable sobre los hongos entomopatógenos, ocasionando un bajo nivel de germinación debido a los compuestos fungistáticos producidos por los actinomiceto y bacterias, que viven saprofiticamente en el suelo.

Este efecto de la humedad en la transferencia de las esporas radica fundamentalmente en lo descrito por Charnely, (2018), quienes plantea que los factores que determinan la interacción hongo-artrópodo son las condiciones del medio si se logra producir una infección exitosa con la especificidad en la adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del insecto y la evasión exitosa de las defensas del hospedador.

Esto corrobora lo obtenido por James *et al.* (2015), quien demostró que la adhesión del conidio a la cutícula puede involucrar mecanismos específicos receptor-ligando y/o mecanismos inespecíficos.

Tabla 6. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 96 horas

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> 96h						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	24,0 D	31,1 C	34,5 BC	47,6 A	32,30 b	
40 % Hbss	28,3 CD	35,9 BC	40,6 B	52,3 A	37,40 a	
80 % Hbss	19,0 E	22,4 D	28,8 CD	32,3 C	24,54 c	
Media Dosis	23,14 c	28,66bc	33,96 b	42,20 a		0,018
Error Típico			0,011		0,027	
CV (%)						12,36

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

La tabla 7 muestra el resultado de la mortalidad de larvas transcurrido cinco días del experimento, donde se observa que la combinación de 24g con un 40 % Hbss alcanzó el mayor porcentaje con 82 % con diferencias estadísticas con los demás tratamientos, los que estadísticamente difirieron entre ellos. El porcentaje más bajo lo obtuvo cuando se interrelacionaron la variable de 12g y 80 % Hbss con solo un 25 % de mortalidad.

Por su parte en un análisis de las medias del contenido de humedad se observaron diferencias estadísticas entre todas las medias y con un valor de 67,87 % de mortalidad el sustrato con 40 %Hbss fue superior al resto (Tabla 7). Esta

tabla muestra además que no hubo diferencias entre las dosis de 20g y 24g, donde el mejor valor fue de 69,41 % de mortalidad alcanzado por la dosis de 24g. El menor porcentaje lo obtuvo la dosis con 12g de 39,98 %

En ensayos de laboratorio Samuels *et al.*, (2018), evaluaron cepas y mezclas de *M. anisopliae* y alcanzaron porcentajes de mortalidad similares, entre el 61,3% y el 74,1% en cinco días y las aplicaciones en campo causaron diferencias en los niveles de infestación con valores inferiores, lo cual demostró que la eficiencia de cepas en laboratorio no siempre son las más eficientes en campo.

Tabla 7. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 5 días

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> a las 5 días						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	54,6 D	58,9 D	64,3 C	77,6 B	62,76 b	
40 % Hbss	58,2 D	65,4 C	69,9 C	82,3 A	67,87 a	
80 % Hbss	25,3 G	38,4 F	46,8 E	55,0 D	38,05 c	
Media Dosis	39,98 c	51,44 b	58,56ab	69,41 a		0,022
Error Típico			0,028			0,032
CV (%)						14,32

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

El porcentaje de mortalidad de las larvas a los diez días de iniciado la investigación como se muestra en la tabla 8, se observó que en la medida que se incrementó el tiempo de acción del hongo disminuye la diferencias entre los tratamientos evaluados, donde las interacciones de 16g, 20g y 24g en el sustrato con 25 % y 40 % Hbss no difirieron entre ellos con valores superiores al 80% de mortalidad. Este análisis corrobora la interpretación que se hace a las media de la Humedad del sustrato ya que con 25 % y 40 % no se obtienen valores diferentes estadísticamente entre ellos, pero si con el de 80 %Hbss, que solo alcanzó el 49,35 % de mortalidad.

En las interacciones se muestra además (Tabla 8) que el porcentaje más bajo lo obtuvo el sustrato con 80 % Hbss y 12g del hongo de 41,1 %. En esta misma tabla se observa que las medias de las dosis la de 20g y 24g no se difirieron estadísticamente entre ellos pero si con las demás dosis evaluadas. El mejor porcentaje se alcanzó con 24g (80 %) y el valor más bajo la dosis de 12g (57,12 %)

Vera *et al.* (2011) corroboraron que la mezcla de cepas *M. anisolpliae* ocasionaba en condiciones de laboratorio las mayores mortalidades siendo estas superiores al 90%; pero hasta el momento, no se había evaluado el efecto de una cepa adicional, adaptada a condiciones del suelo.

Esto es similar a lo obtenido en esta investigación, ya que los resultados mostraron que la mortalidad de la mezcla de *M. anisolpliae* sobre la broca, se mantuvo con valores inferiores a los alcanzados en laboratorio y que era necesario variar las condiciones de campo.

Tabla 8. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 10 días

Dosis	12g	16g	20g	24g		
Mortalidad de pupas de <i>A. tumida</i> a las 10 días						
Humedad/sustrato					Media	Error
					H/S	Típico
25 % Hbss	69,4 BC	78,3 B	84,1 AB	92,2 A	80,13 a	
40 % Hbss	72,6 BC	82,0 AB	91,1 A	95,3 A	84,31 a	
80 % Hbss	41,1 E	46,5 E	51,7 D	63,0 C	49,35 b	
Media Dosis	57,12 bc	64,55 b	71,07 ab	80,61 a		0,009
Error Típico			0,006		0,030	
CV (%)						19,35

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de la humedad difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

3.3. Determinación del número de esporas del hongo germinadas sobre larvas y pupas de *A. tumida*

La tabla 9 muestra el número de esporas germinado sobre las pupas del insecto, donde se resalta que la mayor cantidad de esporas se produjo sobre las pupas expuestas a las dosis de 24g del hongo en los contenidos de 25 % y 80 % Hbss del sustrato en el momento de coleccionar el insecto. Esto demuestra que el contenido de Hbss del sustrato no interfirió sobre este indicador evaluado. Esto se debe a lo descrito por Butt *et al.* (2017) quienes afirman que las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores

para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero.

Por su parte los valores más bajos se alcanzaron con las dosis inferiores del entomopatógenos (12g y 16g), los cuales solo obtuvieron entre $0,09 \times 10^9$ y $0,16 \times 10^9$ de esporas. En este indicador solo se evaluó el efecto de las dosis y no el de la humedad del sustrato, teniendo en cuenta que según Butt *et al.* (2017), el factor más importante en la fase germinativa del hongo es factor de exposición del hospedante (Insecto-hongo).

Tabla 9. Cantidad de esporas totales de *M. anisopliae* emergidas de las pupas por tratamiento

Humedad/sustrato	Dosis			
	12g	16g	20g	24g
25 % Hbss	0,12x10 ⁹ de	0,16x10 ⁹ cd	0,23x10 ⁹ b	0,41x10 ⁹ a
40 % Hbss	0,14x10 ⁹ d	0,14x10 ⁹ cd	0,18x10 ⁹ c	0,25x10 ⁹ b
80 % Hbss	0,09x10 ⁹ e	0,10x10 ⁹ d	0,18x10 ⁹ c	0,45x10 ⁹ a
EE (±)	0.07			
CV (%)	12.20			

Letras desiguales para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

En la tabla 10 se observa que el número de esporas germinadas sobre las pupas es muy superior. Esto se debe a que los hongos entomopatógenos tienen un mecanismo de acción general en el cual las esporas en contacto con la superficie del insecto, penetran el exoesqueleto por acción física y enzimática degradando la cutícula; la caracterización molecular del tipo de enzimas que producen estos hongos, muestra que en *M. anisopliae* existe una gran cantidad de proteasas diferentes a las reportadas en *B. bassiana* según lo planteado por (Leger *et al.* 2000; Gao *et al.* 2011)

En las dosis de 16g, 20g, y 24g se alcanzaron valores por encima de $1,2 \times 10^9$ esporas y el mejor resultado se obtuvo con la de 24g con diferencias estadísticas con el resto y el menor valor lo mostró la dosis de 12g con $0,08 \times 10^9$ (Tabla 10). Este resultado corrobora además lo obtenido por autores como Leger *et al.*, (2000) y Gao *et al.* (2011)

Tabla 10. Cantidad de esporas totales de *M. anisopliae* emergidas de las larvas por tratamiento

Humedad/sustrato	Dosis			
	12g	16g	20g	24g
25 % Hbss	$1,12 \times 10^9$ d	$1,23 \times 10^9$ cd	$1,30 \times 10^9$ c	$2,02 \times 10^9$ a
40 % Hbss	$0,14 \times 10^9$ d	$1,20 \times 10^9$ cd	$1,20 \times 10^9$ cd	$1,89 \times 10^9$ b
80 % Hbss	$0,08 \times 10^9$ d	$1,21 \times 10^9$ cd	$1,24 \times 10^9$ cd	$1,25 \times 10^9$ cd
EE (\pm)		0,03		
CV (%)		4.34		

Letras desiguales para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Conclusiones

1. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas e infección de las pupas con *M. anisopliae* se alcanzó con las concentraciones de 20g y 24g con valores superiores al 60 % a los cinco días.
2. El contenido de humedad en el sustrato influyó en la efectividad del hongo con los mejores porcentajes obtenidos con 25 % Hbss y 40 % Hbss del sustrato.
3. La mayor cantidad de esporas germinadas sobre los cuerpos del insecto fueron alcanzados sobre las larvas de $2,02 \times 10^9$ con la dosis de 24g.

Referencia Bibliográfica:

Angel-Sahagún, C. A.; Lezama-Gutiérrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; López-Edwards, M.; Rebolledo-Domínguez, O. et al (2005). Susceptibility of biological stages of the horn fly *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 50, 8p. Disponible en: <<http://www.insectscience.org/5.50>> .Acceso: junio 2011.

Apicuba 2017. Informe cierre año 2016. Ministerio de la Agricultura, La Habana. Cuba.

Bahamonde, A. y Alvero J, L. (2000). *Instructivo de manejo Ecológico, Certificación y Comercialización de miles Ecológicas*. Cuba: Centro de Investigaciones Apícolas.

Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. Fungi as biological control agent: progress, problems and potencial. In: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. (Eds.). *Fungias biocontrol agents*. Wallingford: CABI International, 2016. p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0001>

Carballo, M (2014). Formulación de hongos entomopatógenos. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*, v. 47, p. 1-4,

Carruthers, I. R.; Hural, K (2014). Fungi as natural occurring entomopathogens. In: Baker, R. R.; Dunn, P. E. (Eds.). *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Nueva York: Liss, 2014. p. 115-138.

Charnley, A. K.; Collins, S. A (2018). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek, C. P.; Druzhinina, I. S. (Eds.). 2. ed. The Mycota. Heidelberg: Springer-Verlag. vol. IV: environmental and microbial relationships.

Chihu, L. y Chihu, D. 2012. El pequeño escarabajo de la colmena *Aethina tumida*: una especie invasiva de la abeja melífera. Alemania: Académica Española (Coccinelidae) to four entomopatogenous fungi. *Enviromental Entomology*, v. 23, p. 190-192, 2015.

Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola (2018). *Sector Apícola: Estadísticas de Comercio Exterior*. Uruguay. Disponible en <https://sectorapicola.com/comercioexterior/uruguay>

Cortez-Madrugal, H. (2016). Efecto de coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su virulencia hacia *Toxopteraaurantii*Boyer. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 24, p. 59-64.

De Guzman, L I; Frake, A M; Rinderer, T E (2012) Marking small hive beetles with thoracic notching: effects on longevity, flight ability and fecundity. *Apidologie* 43: 425-431. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0107-8>

Doberski, J. W. (2017). Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm barkbeetle *Scolytuscolitus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*.

Ellis J.D. y Hepburn H.R.(2006). An ecological digest of the small hive beetle (*Aethina tumida*), a symbiont in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 53, 8–19.

Ellis, M. A; Ellis, J.D.A y C.A. Hodges 2007. Small Hive Beetle *Aethina tumida* Murray: Nitidulidae: Coleoptera. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Department of Entomology, North Carolina State. Publication number: 0018. Publication Date: January 2007

Elzen, P J; Baxter, J R; Westervelt, D; Randall, C; Delaplane, K S; Cutts, L; Wilson, W T (2015) Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), attacking European honey bees in the Western Hemisphere. *Apidologie* 30: 361-366. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19990501>

Estrada, Elena. (2017). La montaña, la abeja y nuestros hermanos: un proceso autóctono y autosuficiente, Chiapas, México.

FAO - Estadísticas FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. 2018.

France, A., M. Gerding, G y A. Sandoval. (2000). Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynony chuscervinus* y *Otiorhyn chussulcatus*. *Agric. Téc. (Chile)* 60:205-215. Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biological control*, v. 23, n. 3, p. 269-273, 2018. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1009>

Grillo, H (2017) Comunicación personal. Laboratorio de Taxonomía. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de las Villas.

Habeck D.H. (2002). Nitidulidae, in: Arnett R.H., Thomas M.C., Skelley P.E., Frank J.H. (Eds.), *American Beetles*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, pp. 311–315.

Hayes, R., Rice, S., Amos, B. y Leemon, D. (2015). Increased attractiveness of honey bee hive product volatiles to adult small hive beetle, *Aethina tumida*,

resulting from small hive beetle larval infestation. *Entomol. Exp. Appl.* 155: 240-248. doi: 10.1111/eea.12304

Hernández, G.; Hernández, R.; Sánchez, A. y Alatorre. R.(2007).Inefectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *ENTOMOTROPICA*. México. Vol. 22(1): 27-36.. ISSN 1317-5262.

Hood, M.W. (2004). The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World*, 85, 51–59.

Invertebrate Pathology, v. 37, n. 2, p. 195-200, 2017.disponible: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90075-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(81)90075-6)

James, R. R.; Lighthart, B.(2015) Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomopatogenous fungi. *Environmental Entomology*, v. 23, p. 190-192.

IICA, SAG Tegucigalpa: IICA, 2009

Milián J.L. (2012). Reporte de notificación de *Aethina tumida* a la OIE. Dirección del Instituto de Medicina Veterinaria, Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba.

Monzón, A. (2018). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. Manejo Integrado de Plagas*, v. 63, p. 95-103.

Muerrle, T. M., J. F. Dames, 4 H. R. Hepburn, 1 and M. P. Hill. P. Neumann (2006).Susceptibility of Adult *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) to

Entomopathogenic Fungi. Apiculture and Social Insects. J. Econ. Entomol. 99(1):1-6

Murray, A (1867) List of Coleoptera received from Old Calabar, on the west coast of Africa. The Annals and Magazine of Natural History 19: 167.

Neumann, P; Ritter, W (2004) A scientific note on the association of *Cychramus luteus* (Coleoptera: Nitidulidae) with honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 35:665-666. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:20040>

Portal de Estadística Español (2015). Ranking de los principales países productores de miel a nivel mundial en 2015 (en millones de toneladas). España. Consultado en <https://es.statista.com/sectores/1167/agricultura-y-ganaderia/>

Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. (2016). Fungi as biocontrol agents. Wallingford: CABI International, p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0001>

Saldaña, L; Lara, L; Dorantes, J. (2014) Manual: Nuevos manejos en la Apicultura para el control del pequeño escarabajo de las colmena *Aethina tumida* Murray, 2da Edición, p.13. México.

Samuels, R. I.; Coracini, D. L. A.; Martins Dos Santos, C. A.; Gava, C. A. T. (2018) Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Biological control, v. 23, n. 3, p. 269-273. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1009>

Sánchez, C.; Castignani, H. & Rabaglio, M. (2018). El Mercado Apícola Internacional. Informe realizado como parte de las actividades del Proyecto Específico Gestión de la innovación como Aporte para el Desarrollo Territorial, julio 2018.

Schaefer M., Pettis J.S., Ritter W., Neumann P. (2008). A simple method for quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in

Tanzini, M. R.; Batista, S.; Setten, A.; Toschi, N. (2017). Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica, n. 59, p. 15 - 18.

Ulloa. A.; Mondragon. J.; Rodríguez. P.; Resendiz. R. y Rosas,(2010) J. La miel de abeja y su importancia. Repositorio Institucional Aramara. Editorial: Revista Fuente. México.

Vélez, P. A.; Posada, F. J.; Marin, P.; Gonzalez, M. T.; Osorio, E.; Bustillo, A. (2017) Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná: Centro Nacional de Investigaciones de café. p. 37.

Wraight, S. P.; Jackson, M. A.; Kock, S. L. (2016). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. (Eds.).Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential. Wallingford: Publishing. p. 253-288. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0253>