

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN RIEGOS

EVALUACIÓN DE TRES DOSIS DE *Metarhizium anisopliae* , EN LA COLONIZACIÓN DE LARVAS
DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp*) EN TRES ESTADÍOS LARVARIOS
TESIS DE GRADO

MARÍA DEL ROSARIO MEJÍA MORÁN

CARNET 20440-07

JUTIAPA, MARZO DE 2017
SEDE REGIONAL DE JUTIAPA

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN RIEGOS

EVALUACIÓN DE TRES DOSIS DE *Metarhizium anisopliae* , EN LA COLONIZACIÓN DE LARVAS DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp*) EN TRES ESTADÍOS LARVARIOS TESIS DE GRADO
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR
MARÍA DEL ROSARIO MEJÍA MORÁN

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA CON ÉNFASIS EN RIEGOS EN EL GRADO ACADÉMICO
DE LICENCIADA

JUTIAPA, MARZO DE 2017
SEDE REGIONAL DE JUTIAPA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: LIC. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR

VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO

VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS

SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

DECANO: DR. ADOLFO OTTONIEL MONTERROSO RIVAS

VICEDECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ

SECRETARIO: MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. JOSÉ MANUEL BENAVENTE MEJÍA

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

MGTR. JERSON ELIZARDO QUEVEDO CORADO

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

ING. LUIS FELIPE CALDERON BRAN

Guatemala, 16 de enero de 2017

Honorable Consejo de
La Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Presente.

Distinguidos Miembros del Consejo:

Por este medio hago contar que he procedido a revisar el Informe Final de Tesis del estudiante María del Rosario Mejía Moran, que se identifica con carné 2044007, titulado: **“EVALUACIÓN DE TRES DOSIS DE *Metarhizium anisopliae*, EN LA COLONIZACIÓN DE LARVAS DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp*) EN TRES ESTADÍOS LARVARIOS.”**, el cual considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad para ser aprobado, por lo que solicito sea revisado por la terna que designe el Honorable Consejo de la Facultad, previo a su autorización de impresión.

Atentamente,



Jerson Quevedo Corado
Código docente 18354



Universidad
Rafael Landívar
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
No. 06680-2017

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado de la estudiante MARÍA DEL ROSARIO MEJÍA MORÁN, Carnet 20440-07 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN RIEGOS, de la Sede de Jutiapa, que consta en el Acta No. 069-2017 de fecha 6 de marzo de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

EVALUACIÓN DE TRES DOSIS DE *Metarhizium anisopliae*, EN LA COLONIZACIÓN DE LARVAS DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp*) EN TRES ESTADÍOS LARVARIOS

Previo a conferírsele el título de INGENIERA AGRÓNOMA CON ÉNFASIS EN RIEGOS en el grado académico de LICENCIADA.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 22 días del mes de marzo del año 2017.



**MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA, SECRETARIO
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
Universidad Rafael Landívar**

DEDICATORIA

- A Dios Padre Creador:** Por su misericordia inconfundible en mi vida y su amor infinito
- A mis Padres:** Por darme el don de la vida, ser mí guía en todo momento y darme la mejor herencia, la educación
- A mi hermano y su esposa:** Por su cariño y apoyo incondicional
- A mi sobrinita Elisa:** Por iluminar mi vida de bellos momentos
- A mi Familia:** Por su apoyo moral y cariño
- A mis abuelos Q.E.P.D:** Por su cariño y sabios consejos
- A Yuvini Solares Q.E.P.D:** Por su amor y gran apoyo incondicional
- A mis amigos y amigas:** por los buenos momentos que pasamos juntos
- A mis catedráticos:** por formarme y ser parte fundamental en mi vida profesional

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme el Don de la vida y la oportunidad de superarme

La Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas por ser parte de mi formación y facilitarme el laboratorio para realizar pruebas necesarias

A mi asesor Ing. Agr. Jerson Quevedo Corado por su valiosa asesoría, revisión y corrección de la presente investigación.

A laboratorio "SUCSESO" por proporcionarme gratuitamente el producto *Metarhizium anisopliae* y permitirme realizar mi trabajo de investigación.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	2
	2.1. EL CONTROL BIOLÓGICO.....	2
	2.1.1 Concepto de control biológico.....	2
	2.1.2 Antecedentes del control biológico	3
	2.1.3 Ventajas y desventajas del control biológico.....	3
	2.2. GALLINA CIEGA.....	4
	2.2.1 Daños de la gallina ciega en los cultivos	4
	2.2.2 Niveles Críticos de la gallina ciega.....	5
	2.2.3 Ciclo de Vida y biología de la gallina ciega	6
	2.2.4 Clasificación de <i>Phyllophaga</i> en Guatemala.....	9
	2.2.5 Clasificación de la gallina ciega	9
	2.2.6 Tipos de control.....	10
	2.2.6 Clasificación taxonómica.....	11
	2.3. <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
	2.3.1 Estructura del hongo	12
	2.3.2 Mecanismo de infección del hongo	13
	2.4 EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA	15
	2.5 EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE	16
III.	JUSTIFICACIÓN.....	17
	3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	17
IV.	OBJETIVOS.....	19
	4.1 OBJETIVO GENERAL	19
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
V.	HIPÓTESIS	20
VI.	METODOLOGÍA	21
	6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO.....	21
	6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL.....	21
	6.3 FACTORES A ESTUDIAR	21

6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	22
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	23
6.6 MODELO ESTADÍSTICO	23
6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL	23
6.9 CROQUIS DEL EXPERIMENTO	24
6.10 MANEJO DEL EXPERIMENTO	25
6.10.1 Captura de adultos	25
6.10.2 Separación por sexo	25
6.10.3 Apareamiento	27
6.10.4 Preparación de los cajones	27
6.10.5 Producción de huevecillos	27
6.10.6 Días de aplicación	27
6.10.7 Intervalo de aplicación	27
6.10.8 Estadíos Larvarios	28
6.11 VARIABLES DE RESPUESTA	29
6.11.1 Conteo de larvas	29
6.12 ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	30
6.12.1 Análisis estadístico	30
6.12.2 Estimación de los costos de aplicación de los tratamientos	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 EFECTO DE LAS DOSIS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Phyllophaga spp.</i>	31
7.2 EFECTO DEL ESTADO LARVAL EN EL CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE <i>Phyllophaga spp.</i>	35
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. RECOMENDACIONES	39
IX. BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.....	22
Cuadro 2. Intervalo de aplicación de <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
Cuadro 3. Estadíos larvarios.....	28
Cuadro 4. Análisis de la varianza de los tratamientos evaluados.....	32
Cuadro 5. Prueba de Tukey para tratamientos sobre mortalidad de larvas.....	33
Cuadro 6. Costos en la aplicación de <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
Cuadro 7. Relación de costos en la aplicación de <i>Metarhizium</i> y producto químico...	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados de desarrollo de la gallina ciega.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Phyllophaga</i> spp.....	7
Figura 3. Larva de <i>Phyllophaga</i> infectada por <i>Metarhizium</i>	13
Figura 4. Genitales masculinos de <i>Phyllophaga</i> spp.....	26
Figura 5. Estadíos larvarios de <i>Phyllophaga</i> spp	29
Figura 6. Gráfico de interacciones entre el estado larvario y las dosis.....	34

EVALUACIÓN DE TRES DOSIS DE *Metarhizium anisopliae*, EN LA COLONIZACIÓN DE LARVAS DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga* spp) EN TRES ESTADIOS LARVARIOS.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, tuvo como objetivo determinar la mejor dosis del hongo *Metarhizium anisopliae* para la colonización de larvas de gallina ciega, esto debido a que las esporas del hongo penetran en la cutícula de la larva, y se utiliza como control biológico, esto generalmente produce la muerte. Para ello se aplicaron tres dosis de *Metarhizium anisopliae*, de 1g, 2g, y 3g; mediante tres aplicaciones, las cuales se realizaron a los 20, 45 y 100 días después de emergidas las larvas, comparado con una dosis de producto químico; la aplicación de los productos se realizó con drench. La metodología utilizada consistió en la recolección previa de información, acerca del daño que causa la larva de la gallina ciega a la raíz de la planta, utilizando cajones de madera de 1*1*0.5 m de profundidad, simulando las condiciones de vida de la larva. Se procedió a la captura de los insectos por medio de trampas luz y seguidamente a la separación por sexo. Se introdujeron en cubetas plásticas un macho con dos hembras, y después del apareamiento se eliminaron los machos y se trasladaron las hembras a los cajones preparados, después de 8 días se revisó que hubiera huevos en los cajones donde se había colocado a las hembras. Las variables evaluadas fueron: número de larvas colonizadas por el hongo y número de larvas muertas totales. De acuerdo con la prueba de media realizada, utilizando una confianza del 95%, la mejor dosis de *Metarhizium* para la colonización de larvas de gallina ciega fue la de 2 y 3 g en el estadio larvario 1 pues fue donde se mostró el mayor número de larvas colonizadas. La mejor relación beneficio costo es la utilización de 2 g en el estadio larvario 1 pues se obtiene el mismo resultado que la aplicación de 3 g de producto.

EVALUATION OF THREE DOSES OF *Metarhizium anisopliae*,
IN THE COLONIZATION OF THREE LARVAL STAGE OF *Phyllophaga* spp

SUMMARY

The objective of this study was to determine the best dose of *Metarhizium anisopliae* for the colonization of white grubs, because the fungus spores penetrate the grub cuticle, usually producing death, and that is why is used as a biological control. Three *Metarhizium anisopliae* doses was evaluated, 1g, 2g, and 3g; in three applications, at 20, 45 and 100 days after grubs emerge, compared to a chemical dose. The products application was done with drench. The methodology used consisted in the previous collection of information on the damage caused by the white grubs to the plant root, using wooden boxes of 1*1*0.5 m depth, simulating the living conditions. The insects were captured by means of light traps and then separated by gender. A male with two females was introduced into plastic buckets, and after mating the males were removed and the females were moved to the prepared drawers, after 8 days it was checked that there were eggs in the drawers where the females had been placed. The evaluated variables were: number of grubs colonized by the fungus and total dead grubs number. According to the average test performed, using a 95% confidence interval, the best *Metarhizium* dose for colonization of white grubs was 2 and 3 g in the larval stage 1, since it was the largest colonized grubs number. The best cost-benefit ratio is the use of 2 g in the larval stage 1 as the same result as the application of 3 g of product is obtained.

I. INTRODUCCIÓN

Diversidad de cultivos se ven afectados por *Phyllophaga spp* debido a que es una de las plagas más comunes del suelo, y de gran importancia económica que causa daño a los cultivos agrícolas, tales como: granos básicos, caña de azúcar y algunos cultivos hortícolas, principalmente en la raíz; no solo en Guatemala, sino también en diversas regiones del mundo, (Morón, 1986).

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA), Identificó *Phyllophaga spp* como una de las especies más dañinas ya que se ha dificultado su control debido a su hábito subterráneo, estacionalidad y patrón de ataque en parches (King y Saunders, 1984) y en la mayoría de los casos, la detección se da cuando el daño al cultivo ya ha ocurrido.

Para manejar esta plaga se han generado productos químicos con los cuales se reduce la población de las mismas, pero se incurre en la contaminación del ambiente y en la acumulación de residuos químicos principalmente en el hombre, el suelo y en los productos de cosecha. Es por ello que hoy en día el control biológico de plagas y enfermedades ha adquirido una gran importancia relevante como una alternativa para el manejo integrado de plagas y enfermedades.

En ese sentido, los mejores métodos de control de la plaga de gallina ciega es el control estrategia de no depender exclusivamente del control químico. Las dosis más utilizadas de este hongo para el control de gallina ciega varían entre uno y dos gramos de esporas en presentación polvo esparcible por metro cuadrado. Esta investigación por lo tanto, evaluó el efecto de tres dosis de *Metarhizium anisopliae*, en la colonización de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), bajo condiciones controladas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 EL CONTROL BIOLÓGICO

De acuerdo con Poprawski y Yule (1991), los hongos entomopatógenos han mostrado gran potencial de control, La utilización de todas las medidas posibles, no químicas, para proteger a los cultivos y manejar bio racionalmente a los insectos plaga constituyen el control alternativo. Entre estos se encuentran los hongos, virus, bacterias y nematodos que junto con depredadores y parasitoides conforman el control biológico. El cual se encuentra siempre presente en la naturaleza y que el hombre aísla, reproduce y regresa a ella con el objetivo de bajar las poblaciones de insectos-plaga. El control microbiano necesita de condiciones climáticas favorables para su mejor actividad, puesto que los entomopatógenos son afectados por la temperatura, humedad y radiación principalmente (Shannon, 1993).

2.1.1 Concepto de control biológico

El concepto de control biológico hay que diferenciarlo del control natural, que es el control que sucede en las poblaciones de organismos sin intervención del hombre y que incluye además de enemigos naturales la acción de los factores abióticos del medio. Por ello hay que entender el control biológico como un método artificial de control que presenta limitaciones especialmente en cuanto al conocimiento de los organismos afectados, lo que trae consigo una serie de ventajas e inconvenientes en su aplicación, sobre todo si se relaciona con los métodos químicos de control (ECURED 1992).

En general cuando hablamos de control biológico, hacemos referencia a la utilización de microorganismos benéficos para reducir los efectos indeseables de los patógenos de plantas. Existen naturalmente y pueden ser seleccionados y replicados en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan acción

antagónica. También pueden ser potenciados las poblaciones naturales de microorganismos benéficos mediante un apropiado manejo de cultivos.

2.1.2 Antecedentes del control biológico

El control biológico fue originalmente difundido como la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia (De Bach, 1976).

Como tal el control biológico se distingue de otras formas de control de plagas por actuar de una manera densamente dependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan y destruyen una gran porción de la población cuando la densidad de esta población se incrementa (De Bach y Rosen, 1991).

Este fenómeno natural de regulación de plagas manejado por el ser humano a través del realce de la intervención de agentes de control biológico, plantas y herbívoros provisto de bases ecológicas se dio a conocer en la década de los 70, como Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Van des Bosch et al 1982).

En el caso del control microbiológico de plagas de la familia Scarabaeidae fue propuesto desde hace más de 100 años. Los nematodos entomopatógenos, las bacterias, hongos y virus patógenos actualmente han sido utilizados con éxito en el control biológico, sin embargo en los escarabajos aun es limitado (Jackson, 1993).

2.1.3 Ventajas y desventajas del control biológico

El control biológico cuando funciona posee muchas ventajas (Tejada, 1982; Summy and French, 1988) entre las que se pueden destacar:

- Poco efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluidos el hombre.
- La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
- El control biológico con frecuencia es a largo término pero permanente.
- El tratamiento con insecticidas es eliminado de forma sustancial.

- Evita plagas secundarias.
- No existen problemas con intoxicaciones.

Entre las limitaciones que tiene el control biológico se pueden citar (Tejada, 1982; Summy and French, 1988)

- Ignorancia sobre los principios del método.
- Falta de apoyo económico.
- Falta de personal especializado.
- No está disponible en la gran mayoría de los casos.
- Problemas con umbrales económicos bajos
- Enemigos naturales más susceptibles a los plaguicidas que las plagas.
- Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata.

2.2 GALLINA CIEGA

La gallina ciega es una denominación general que abarca un complejo de especies de escarabajos del género *Phyllophaga spp*, distribuidas en dos familias: *Melolonthidae* y *Scarabaeidae*. Las gallinas ciegas son ubicadas exclusivamente dentro de la familia *Scarabaeidae* con aproximadamente 20,000 especies descritas en todo el mundo, las cuales causan importantes daños económicos. Esto debido a que los adultos destruyen el follaje de las plantas para alimentarse y en estado de larva afecta al sistema radicular (Morón, 1983).

2.2.1 Daños de la gallina ciega en los cultivos

Las larvas se alimentan de las raíces de las plantas, debilitándolas y causando un pobre desarrollo. Las plantas pueden también presentar síntomas de deficiencia de agua y nutrientes, son susceptibles al acame, no rinden bien y pueden morir. Por lo general estos ataques son realizados en manchones y pueden eliminar una siembra o parte de ella (ANACAFE, 2011).

Los adultos son por lo general atraídos hacia los árboles de yuca, madreño y piñón sobre los cuales se alimentan (ANACAFE, 2007)

2.2.2 Niveles críticos de la gallina ciega

El nivel crítico que se recomienda es general para todos los cultivos, puede variar dependiendo del valor del cultivo. Actualmente se toma un promedio de 0.25 larvas grandes ó 0.05 pequeñas por muestra (Bayer 2009).

Las gallinas ciegas pasan por cuatro estados biológicos: el huevo, la larva o gusano, la pupa y el adulto. Los adultos, conocidos como ronrones de mayo, malines o abejones, aparecen al inicio del período lluvioso en grandes cantidades para poder reproducir la especie. Se alimentan de hojas y frutas de arbustos y árboles a los cuales dañan. Luego, las hembras se entierran y depositan en el suelo más de 50 huevos por hembra (Figura 1).



Figura 1. Los estados de desarrollo de la plaga conocida como Gallina Ciega (CATIE, 1998).

2.2.2 Ciclo de Vida y biología de la gallina ciega

De acuerdo con Bayer (2009), el ciclo de vida de las gallinas ciegas es el siguiente:

a) Huevo

Son puestos en suelos húmedos a unos pocos centímetros de profundidad, cerca de las raíces, la incubación dura aproximadamente 8 días (BAYER, 2009).

b) Larva

Pasan por tres instares, los dos primeros se alimentan de materia orgánica y raíces tiernas durante 45 días; el tercer instar dura de 45 a 60 días y durante este período es cuando causan mayores daños a la planta al alimentarse de raíces. Después de la cosecha y cuando las temperaturas descienden, las larvas se internan más profundamente en el suelo donde la pre pupa forma una celda (BAYER, 2009).

c) Pupa

Están protegidas con una cámara pupal elaborada con tierra y excretas, construida mediante la compactación que la larva hace con movimientos circulares; se localiza en profundidades entre 70 cm y un metro. La pupa tiene una duración entre 40 y 60 días (BAYER, 2009).

d) Adulto

Los adultos pueden permanecer en las celdas hasta que existen las condiciones de humedad que desbaratan las celdas y permitan emerger a los mayates, lo cual ocurre durante mayo y junio. Los adultos son activos durante la noche y es cuando realizan la cópula y la ovoposición. En el caso de especies de gallinas ciegas de ciclo de vida de dos años, su biología es similar pero al terminar su segundo instar, la larva entra en fase de latencia en una celda en el suelo y hasta que inician las lluvias de nuevo, muda y en el tercer instar se alimenta de las raíces, lo que ocurre en todo el ciclo de lluvias y al terminar esto, se inicia el período pupal y los adultos emergen a la superficie hasta mayo o junio (BAYER, 2009).

Los mayores daños los causa esta plaga en los meses de agosto-septiembre y octubre. La larva de este insecto en su tercer estadio es cuando es más voraz. Tiene 2 tipos de hábitos:

—Rizófagos: Comen raíces

—Saprófagos: Comen materia orgánica en descomposición.

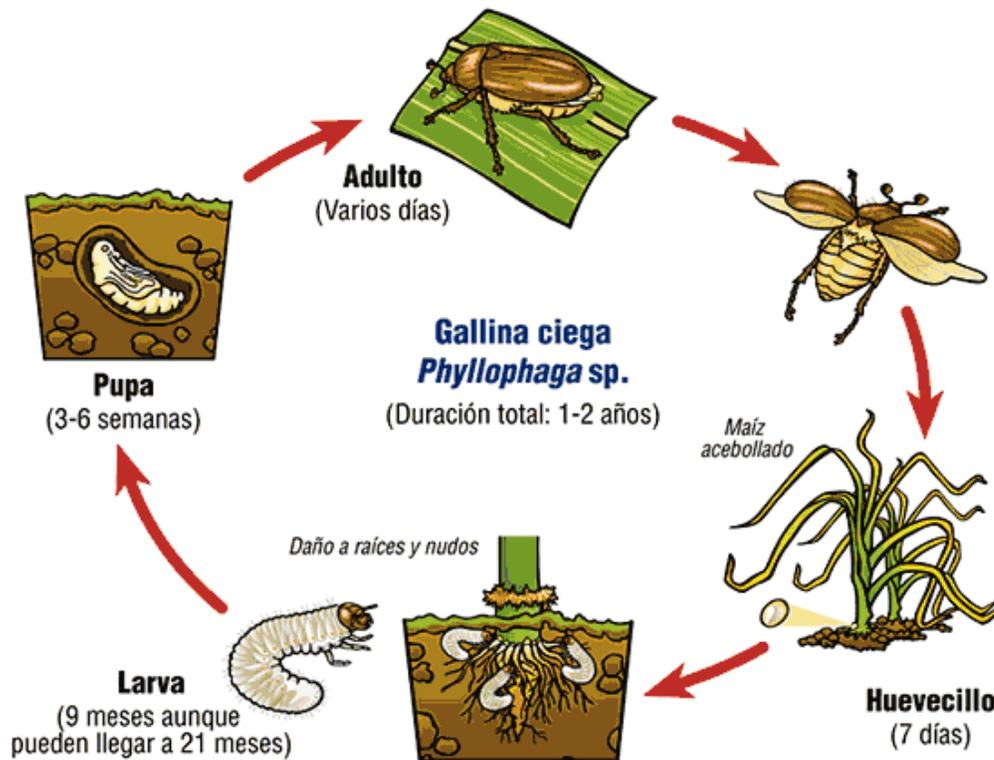


Figura 2. Ciclo de vida de la gallina ciega *Phyllophaga spp* (Bayer)

Duración del ciclo de vida de un año

Los escarabajos se pueden separar en especies con un año de ciclo de vida y especies de dos años de ciclo de vida. Especies que tienen ciclo de vida de un año. Los adultos emergen del suelo cuando inician las lluvias. Se alimentan del follaje de arbustos, árboles y ciertas plantas anuales; copulan en estas plantas durante las primeras horas de la noche. Los adultos regresan al suelo durante el día en donde las hembras oviposita. Las larvas eclosionan del huevo blancuzco en unas 2

semanas. Los primeros dos instares se alimentan de materia orgánica y raíces tiernas por unas 4 a 6 semanas.

El tercer instar dura 6 a 8 semanas y es durante este período (a finales de junio hasta octubre) que ocasionan los mayores daños, alimentándose vorazmente de las raíces. El pre pupa forma una celda en el suelo a una profundidad de 6-20 cm, donde permanece hasta diciembre o enero (BAYER, 2009).

El período pupal tarda unas 2 ó 3 semanas. Los adultos que se forman en enero o febrero permanecen en la celda hasta que las lluvias de mayo-junio penetran en el suelo y deshacen la celda de tierra que los envuelve (BAYER, 2009).

Especies con ciclo de vida de dos años

El ciclo inicial es similar, pero al terminar su segundo instar, la larva entra en una fase de latencia en una celda en el suelo. Al iniciar las lluvias de nuevo, la larva muda y en el tercer instar, se alimenta de las raíces, entre mayo y septiembre. El período pupal termina en febrero o marzo. Las especies de ciclo de vida de dos años son más comunes en el norte de Centroamérica y en áreas con largos períodos de sequía que pueden ser de 4 a 6 meses (BAYER, 2009).

Los adultos aparecen después de las primeras lluvias, emergen del suelo al atardecer y poco después inician su actividad, pues levantan vuelo para aparearse, lo cual dura aproximadamente entre 15 y 20 minutos. La ovoposición ocurre a los 8 o 10 días del apareamiento y continua durante las 3 semanas siguientes; la hembra oviposita alrededor de 50 huevecillos en forma separada cubiertos por tierra. Las larvas emergen entre una y cuatro semanas después de la ovoposición. Tienen tres estadios larvales al completar el tercero las larvas construyen su celda y experimentan un prolongado letargo o hibernación antes de pupar (Gaylor y Franke, 1979).

2.2.3 Clasificación de *Phyllophaga* en Guatemala

En Guatemala existe diversidad de especies de *Phyllophaga* pero las especies que más afectan las principales zonas de cultivos se describen de la siguiente forma según las claves de A.B.S.King:

Phyllophaga menetriesi: tiene un largo de 16-22 mm, ancho de 9-11 mm poronoto con aspecto mate, con puntación y cubiertos de pelos cortos, finos y pálidos.

Phyllophaga obsoleta: LARGO DE 14-18 mm poronoto de color café brillante; élitros de color amarillo dorado brillante sin pelos.

Phyllophaga elenans: largo de 16-25 mm ancho de 9-12 mm poronoto de color castaño, élitros de color amarillo café castaño pálido ligeramente brillantes y con capa cerosa recién eclosionados, hembra tiene pelos largos en porción apical, y la genitala del macho se caracteriza por la presencia de una estructura negra de forma de diente sobre edego.

Phyllophaga parvisetis: largo de 19-22 mm ancho de 9-12 mm poronoto y la parte de los élitros de color castaño y el resto de color amarillo. Hembra tiene pelos largos en la porción apical, el macho puede distinguirse la genital por la presencia de un grupo grande de espinas más o menos con forma de X (Extracto de King A.B.S.)

2.2.5 Clasificación de la gallina ciega

Existen tres grupos de larvas de gallina ciega de acuerdo a su hábito de alimentación: en raíces (gallinas ciegas rizófagas estrictas); en materia orgánica (gallinas ciegas saprófagas estrictas); y las que se alimentan de raíces o de diversidad de materia orgánica (gallinas ciegas facultativas). La presencia de poblaciones de gallina ciega en plantaciones de café depende de varios factores importantes: el tipo de suelo, el contenido de materia orgánica de la población de depredadores y el porcentaje de sombra (BAYER, 2009).

En Guatemala se conocen más de 15 especies diferentes de gallina ciega, que atacan a diferentes cultivos como los granos básicos, la caña de azúcar, café,

algunos cultivos de tipo hortícola y maleza, es por ello que se le ha denominado el Complejo de Gallina Ciega del género *Phyllophaga* spp (ANACAFE, 2011).

Las especies existentes en el país fueron identificadas por King (1984). Técnicos del ICTA en 1990 realizaron un muestreo en la zona de Jutiapa identificando especies, pérdidas y cultivos afectados.

En la región de Santa Rosa la principal especie que afecta es *Phyllophaga obsoleta*, sus daños son difíciles de observar y son irreversibles. Una planta dañada por esta plaga manifiesta síntomas de amarilla miento, poco desarrollo y una merma en la producción, el proceso de deterioro del sistema radicular de la planta, puede ocasionar la muerte de la planta, situación que puede ocurrir con menor o mayor severidad, dependiendo del número de larvas presentes en la raíz del cultivo de café (ANACAFE 2010).

Los daños directos que causa esta plaga son el descortezado y la mutilación de raicillas del café, los cuales son irreversibles. Además, favorecen la penetración de hongos, bacterias y otros patógenos que pudren las raíces, ocasionando severas lesiones que pueden originar, incluso, la muerte de la planta (ANACAFE, 2007).

2.2.6 Tipos de control

Control cultural

Existen prácticas de manejo, conocidas como control cultural, como la preparación de suelos o rotación de cultivos que ha sido utilizada como alternativa para reducir plagas, aunque en condiciones tropicales su efecto no ha sido muy significativo, de la misma manera solarización con los plástico transparente, como método no químico, ha demostrado ser significativo, de la misma manera, ha demostrado ser efectivo en el combate de hongos, maleza y nematodos y cierta acción no cuantificada sobre plagas del suelo. Aunque algunos microorganismos sobreviven este proceso (Pullman, 1981).

Control biológico

Se están utilizando patógenos como *Metarhizium* para el control de larvas y bacterias como *Bacillus popilliae* y *Bacillus thuringiensis* variedad `buibui` este último se reporta eficaz contra larvas de algunos scarabeidae pero no contra larvas del género *Phyllophaga*. También hemos empezado a evaluar algunos nemátodos y ectoparásitos himenópteros de las familias *Tiphiidae* y *Scoliidae* (por ejemplo *Campsomeris tolteca*) que atacan las larvas (BAYER, 2009).

Control Físico-Mecánico

En la época del vuelo de los adultos, la colocación de trampas de luz blanca o negra en cafetales resulta en la recolección de miles de adultos por noche. La rentabilidad de esta práctica debe ser estudiada. Es posible usar los adultos atrapados para alimentar peces o gallinas. Los agricultores de pocos recursos matan las larvas manualmente con machete o cuma (BAYER, 2009).

Control químico

Es el más usado para el control de larvas y por lo general se han usado productos granulados al suelo, ya sea aplicado antes de la siembra o en banda después de la siembra. Actualmente se están usando insecticidas aplicados a la semilla con una mejor eficacia. Los insecticidas sistémicos han dado mejor respuesta que los de contacto (BAYER, 2009).

2.2.6 Clasificación taxonómica

Cuatro son las especies de mayor importancia: *P. menetriesi*, *P. vicina*, *P. elenans* y *P. parvisetis*. En Guatemala se han reportado algunos géneros de la familia Scarabaeidae, subfamilia *Melolonthidae*, como: *Phyllophaga*, *Anómala*, *Cyclocephalay Lygirus* (King, 1994).

Existen variaciones en los hábitos alimenticios, clasificándose en rizófagos (raíces), saprófagos (materia orgánica muerta) o facultativa (raíces y materia orgánica muerta). Los adultos se alimentan de hojas y brotes tiernos, néctar y los botones de las flores (King, 1984)

Dependiendo de la especie de gallina ciega, el ciclo de vida varía entre 8 y 16 meses; sin embargo, en algunos casos puede llegar hasta 24. Las larvas permanecen en el suelo, especialmente en los primeros 30 cm de profundidad, alimentándose de las raíces. El daño se manifiesta con mayor intensidad en los meses de agosto a octubre, cuando las larvas se encuentran en el tercer estadio, que es el más voraz. Los adultos emergen de sus cápsulas en el suelo y aparecen en los campos de cultivo en el período de abril a junio, que coincide con el establecimiento de la época lluviosa (Macz, 2000).

2.3. *Metarhizium anisopliae*

Los hongos se han reproducido para su uso como agentes biológicos de plagas desde hace 100 años, para lo cual se ha utilizado diferentes métodos de reproducción (Saunders 1998).

Metarhizium anisopliae es un hongo que infecta a insectos, principalmente larvas de escarabajos. Ha sido aprobado como un ingrediente activo de plaguicida microbiano uso no alimentario de los invernaderos y viveros, y en sitios al aire libre, no limitado cerca de cuerpos de agua. Muchas cepas de *Metarhizium anisopliae* se han aislado en todo el mundo de los insectos, nematodos, el suelo, los sedimentos del río, y materia orgánica en descomposición (CIAT, 1982).

2.3.1 Estructura del hongo

Metarhizium anisopliae presenta un micelio septado, con conidióforos característicos, sobre los que surgen los conidios en columnas compactas, cuya adherencia al hospedero varía con la raza del hongo. Los conidios son generalmente uninucleados y cilíndricos de dimensiones variables (Alves, 1986).

Se caracteriza por tener filias cilíndricas, sosteniendo cadenas de conidios cilíndricos que se adhieren lateralmente formando columnas conidiales, posee fialides clavadas con cadenas no adherentes de color blanco o café de forma ovoide o elipsoide, puede permanecer en un área tratada sobre la materia orgánica y en los cadáveres de insectos, esto puede provocar epizootias anuales en áreas no tratadas, el hábitat principal del hongo es el suelo (Alves, 1986).

2.3.2 Mecanismo de infección del hongo

La mayoría de los hongos entomopatógenos utilizan un mecanismo de infección similar, por lo general se producen conidias en grandes cantidades como propágulos infectivos; dichos propágulos son diseminados y entran en contacto sobre su hospedero y se inicia la infección (Anderson, 1979).

La principal vía de penetración de *M. anisopliae* es el integumento de los insectos. En contacto con la cutícula, los conidios producen hifas que penetran en el organismo favorecidos por la producción de enzimas, (figura 3), que van rompiendo las diferentes capas del integumento del insecto (ANACAFÉ, 2007).



Figura 3. Larva de *Phyllophaga* spp. Infectada por el hongo *Metarhizium anisopliae* (ANACAFÉ, 2007).

Las áreas más comunes de penetración del hongo son el aparato bucal, regiones intersegmentales y tarsos del insecto; en el área de penetración o alrededor se presenta una histólisis descomposición de tejidos por acción enzimática (ANACAFÉ, 2007).

Después de la muerte del insecto, el hongo crece en el cadáver y en todos los tejidos internos donde ha penetrado más no ocurre desintegración del insecto porque el patógeno secreta sustancias antibacterianas. El tiempo de colonización puede variar de 76 a 120 horas dependiendo del insecto y de las condiciones ambientales. Esta presenta la secuencia: sistema digestivo y tubos de Malpighi, sistema nervioso, músculos y tráqueas (Doria y Mandoca s.f.).

En primer lugar por efecto de parasitismo, que permite la penetración del hongo al interior del insecto, donde se ramifica afectando a los órganos vitales, produciendo micotoxinas con propiedades disuasoras de la alimentación en varias especies, se clasifican como depsipeptidos cíclicos. Se ha identificado a la fecha más de 14 destruxinas, las cuales matan a los insectos mediante interacción con sus receptores celulares. Y cuando el insecto ingiere las toxinas al ser aplicado el producto estas causan una parálisis del tracto digestivo y un efecto de derribe, pierden su movilidad. Se nota la decoloración de la cutícula e hinchazón en el abdomen. Las larvas y adultos que sobreviven los primeros días no causan más daño al cultivo pues no pueden alimentarse. Estas larvas aparecen enanas y son vulnerables a otros controles naturales. Algunas de estas larvas logran empuparse, pero son pequeñas y los adultos que emergen son estériles. La formulación de granulado para aplicación en seco es especialmente apropiada para controlar plagas superficiales y subterráneas del suelo (Agrícola El Sol).

Los adultos y las ninfas inicialmente presentan crecimiento micelial blanco sobre el cuerpo seguido por esporulación verde abundante (Guagliumi, 1986).

La actividad de los hongos entomopatógenos en el suelo denominada micro conidiación o formación de propágulos en micro ciclos, ha sido registrada y ocurre posiblemente debido a la acumulación de esporas infectivas producidas sobre los

insectos atacados previamente que provoca nuevas infecciones sobre posteriores ataques de broca y que permite la permanencia del hongo en este hábitat (Bernal & Bustillo, 1997).

Metarhizium anisopliae cepa F52 es un hongo que infecta a insectos, principalmente larvas del escarabajo del genero *phyllophaga* spp. Ha sido aprobado como un ingrediente activo de plaguicida microbiano uso no alimentario de los invernaderos y viveros, y en sitios al aire libre, no limitado cerca de cuerpos de agua. Muchas cepas de *Metarhizium anisopliae* se han aislado en todo el mundo de los insectos, nematodos, el suelo, los sedimentos del río, y materia orgánica en descomposición. No se espera daño a los seres humanos o el medio ambiente cuando los productos plaguicidas que contienen *Metarhizium anisopliae* cepa F52 se utilizan de acuerdo a instrucciones de la etiqueta (Agrícola El Sol, 2011).

El hongo *Metarhizium anisopliae* infecta a los insectos que entran en contacto con él. Una vez que las esporas del hongo se adhieren a la superficie externa del insecto, germinan y comienzan a crecer. Después de penetrar el esqueleto externo de los insectos, que crecen rápidamente dentro del insecto, causando que el insecto muere. Los insectos que entran en contacto con los insectos infectados también se infectan. *Metarhizium anisopliae* cepa F52 puede infectar las larvas y adultos de muchos insectos, pero puede infectar solamente las larvas del escarabajo, porque los adultos tienen un esqueleto externo fuerte (Agrícola El Sol, 2011).

2.4 EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA

No se espera daño a los seres humanos de la exposición al hongo *Metarhizium anisopliae* por ingestión, inhalación, o contacto con productos que contengan este ingrediente activo. No hay toxicidad o efectos adversos se observaron cuando el ingrediente activo se ha probado en animales de laboratorio (Agrícola El Sol, 2011).

2.5 EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE

Agrícola El Sol ha realizado una evaluación del riesgo ambiental y determinó que los usos propuestos del hongo *Metarhizium anisopliae* como insecticida no tendrá efectos adversos sobre las aves, mamíferos o especies de plantas terrestres y acuáticos. A la luz de los estudios de laboratorio de informes de toxicidad y la patogenicidad para los vertebrados acuáticos inmaduros y especies de invertebrados (Agrícola El Sol, 2011).

El crecimiento vegetativo del hongo produce bloqueo mecánico del aparato digestivo y otros daños físicos por el crecimiento acelerado del micelio. Las hifas salen del interior del insecto al exterior para iniciar en seguida el proceso de esporulación. El ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días, siendo 3 a 4 días para la germinación y penetración; y 2 a 3 días para el período de colonización, dependiendo de las condiciones ambientales como temperatura, humedad y radiación ultravioleta (ANACAFÉ, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

De acuerdo con estudios realizados de producción de varios cultivos, tanto a nivel nacional como en otros países, la producción agrícola se ve afectada actualmente por la presencia de larvas del escarabajo del género *Phyllophaga* spp, las cuales provoca serios daños en la raíz, disminuyen el crecimiento de las plántulas y retardan la producción. Las pérdidas económicas ocasionadas por esta plaga pueden oscilar entre el 10% hasta el 100%, dependiendo de la localidad. Esta situación ha inducido a la utilización de diversos tipos de control especialmente el químico, el cual en su mayoría son productos de la familia de los organofosforados, como Volatón y Phoxim que tiene la característica de ser residuales tanto en el suelo como en los tejidos de las plantas especialmente en los frutos, que según el Ministerio de Salud de Guatemala indica que estos productos se encuentran entre los más tóxicos y sugieren que son responsables de los casos más severos de envenenamiento de campesinos.

En Guatemala, los daños de *Phyllophaga* spp. Se han dado principalmente para cultivos hortícolas, granos básicos y café (ICTA). Los daños se caracterizan principalmente por la muerte de plantas pequeñas, crecimiento raquítico de las plantas sobrevivientes y derribo de las plantas por el viento provocado por la pérdida de raíces de anclaje. Esto afecta los rendimientos de los cultivos y disminuye la rentabilidad derivada de los gastos en que se incurre para el control de esta plaga, ocasionando pérdidas a los productores.

Para el control de esta plaga, tradicionalmente se ha utilizado el control químico, ocasionando otros problemas a los cultivos y al medio ambiente. Ante esta situación, es necesario analizar los enemigos naturales de esta plaga los cuales pueden ser utilizados para el control de la misma. Entre dichos enemigos naturales se encuentra *Metarhizium anisopliae*. Este es un hongo que coloniza las larvas de esta plaga

causándole perturbación es en su sistema digestivo y disminuyendo su efecto sobre el sistema radicular de los cultivos. Sin embargo, Es necesario realizar más estudios para determinar otros factores de control y colonización en diferentes estadios larvales de *Phyllophaga spp.*

En esta investigación se evaluó el efecto de tres dosis de *Metarhizium anisopliae* en la colonización de larvas de *Phyllophaga spp* en tres estadios larvales, para determinar el estadio larvario más susceptible al hongo, para un control efectivo y con base a esto dar recomendaciones para obtener los mejores resultados, evitando el uso de productos organofosforados que tienen efectos severos en el medio ambiente.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Metarhizium anisopliae* en la colonización de diferentes estadios larvales de *Phyllophaga* spp.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto de tres dosis *Metarhizium anisopliae* sobre la colonización de larvas de *Phyllophaga* spp.
- Determinar el estadio larvario de *Phyllophaga* spp más susceptible de colonización por el hongo *Metarhizium anisopliae*.
- Cuantificar poblaciones de *Phyllophaga* spp en tres estadios larvarios, colonizadas bajo el efecto de cada dosis de *Metarhizium anisopliae* evaluada.

V. HIPÓTESIS

Por lo menos una dosis de *Metarhizium anisopliae* mostrará diferencia significativa en la colonización de larvas de *Phyllophaga spp.*

Al menos uno de los estadios larvarios mostrará susceptibilidad a la colonización del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Por lo menos un tratamiento mostrará diferencia significativa en la colonización y muerte de larvas de *Phyllophaga spp* en diferentes estadios.

VI. METODOLOGÍA

6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO

La investigación se realizó bajo condiciones controladas (invernadero o umbráculo), en la Aldea El Teocinte, Santa Cruz Naranjo, departamento de Santa Rosa, ubicada a 75 km de la capital de Guatemala, y 1170 msnm, latitud norte 14° 24' 29", latitud oeste 90° 22' 29".

6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

El material experimental consistió en la utilización de META SCC (*Metarhizium anisopliae* 1X10¹² UFC por gramo) un tratamiento químico con Thimet 15 G ingrediente activo Terbufos y un testigo absoluto. Para el caso de *Metarhizium anisopliae* el tratamiento 1 (T1) consistió en la aplicación de 1 g/m², el tratamiento 2 (T2) 2 g/m² y el tratamiento 3 (T3) 3 g/m².

Todos los tratamientos (los tres tratamientos de *Metarhizium anisopliae*), Thimet 15 G ingrediente activo Terbufos 150 g de I.A. por Kg y testigo absoluto fueron aplicados en tres estados larvarios: estado larvario fase 1 (L1), estado larvario fase 2 (L2) y estado larvario fase 3 (L3).

6.3 FACTORES A ESTUDIAR

En esta investigación se utilizaron dos factores: el factor A consistió en la evaluación del hongo *Metarhizium anisopliae* (material biológico) y el factor B relacionado fue el estadio larvario de *Phyllophaga* spp.

6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Los tratamientos consistieron en la interacción de los niveles del factor “A” con el factor “B” generando así un total de 15 tratamientos, tal y como se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos, dosis y estadíos larvarios

No. Tratamientos	Nivel a= Dosis	Nivel b= estadíos Larvarios	Tratamientos A x b
1	1 g(1 X10 ¹² UFC)/m ²	b1 = L1	a1 x b1
2		b2 = L2	a1 x b2
3		b3 = L3	a1 x b3
4	2 g(2 X10 ¹² UFC) /m ²	b1 = L1	a2 x b1
5		b2 = L2	a2 x b2
6		b3 = L3	a2 x b3
7	3g(3 X10 ¹² UFC) /m ²	b1 = L1	a3 x b1
8		b2 = L2	a3 x b2
9		b3 = L3	a3 x b3
10	Químico 1.5 g I.A.	L1	Q x L1
11	Químico 1.5 g I.A.	L2	Q x L2
12	Químico 1.5 g I.A.	L3	Q x L3
13	Control total (Testigo)	L1	Sin aplicación
		L2	Sin aplicación
14	Control total	L3	Sin aplicación
15	Control total		

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado consistió en un arreglo bifactorial sobre la base de un diseño completamente al azar.

6.6 MODELO ESTADÍSTICO

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + L_j + T_iL_j + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Efecto del i-ésimo tratamiento del j-ésimo estado larval en la k-ésima repetición. μ = Media general del modelo

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

L_j = Efecto del j-ésimo estado larval

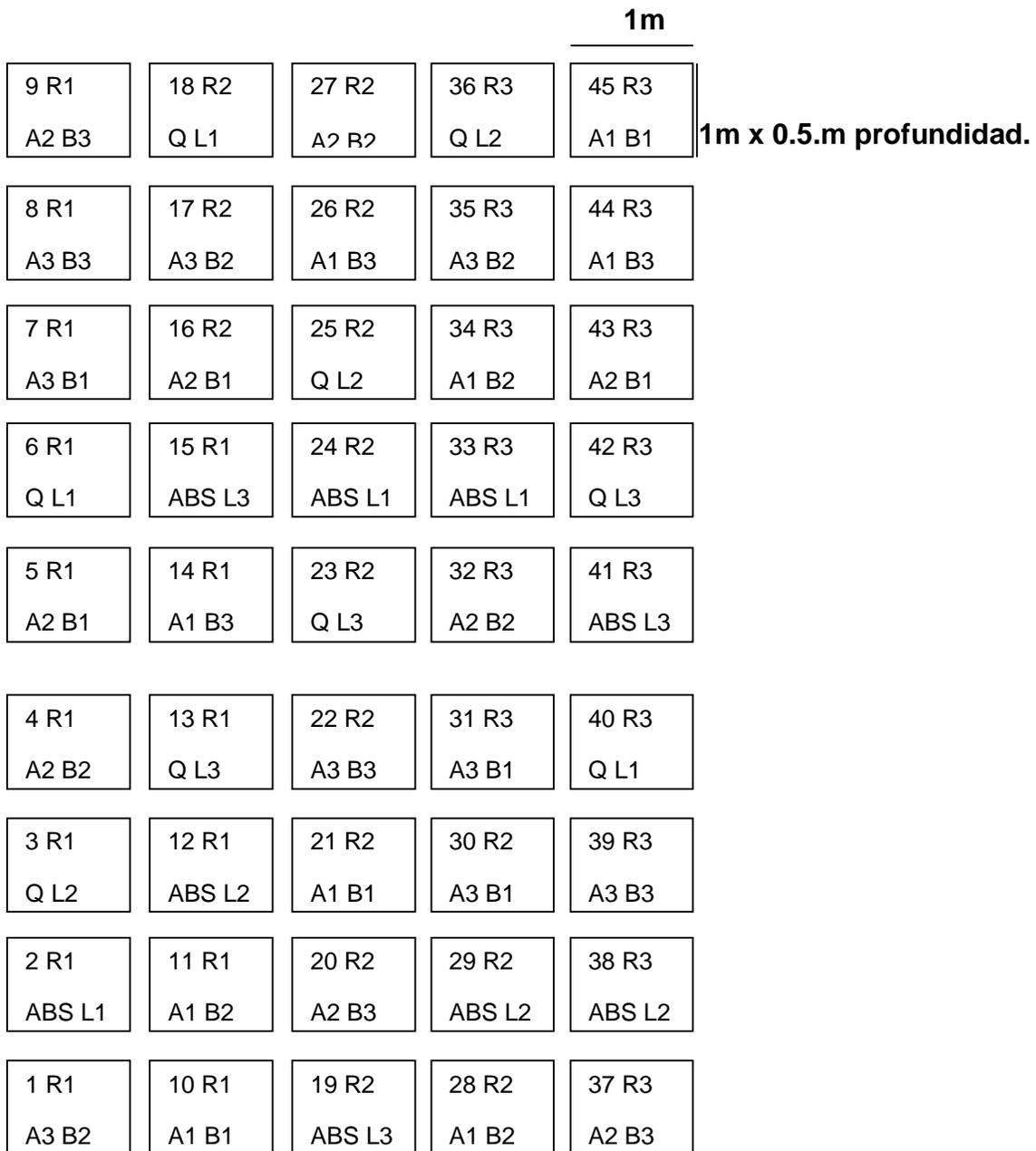
T_iL_j = Efecto de la interacción entre la dosis de *Metarhizium anisopliae* y estadio larval

E_{ijk} = Error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima, independiente distribuido normalmente con esperanza cero y varianza σ^2 .

6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental consistió en cajones de madera 1m ancho x 1m largo x 0.5m profundidad donde se simularon las condiciones de hábitat de gallinas ciegas, debido a que estas se mueven aproximadamente en los 20 y 50 cm del área radicular.

6.9 CROQUIS DEL EXPERIMENTO



15 X 3 = 45 unidades experimentales

R=Repetición

AxB= tratamiento

6.10 MANEJO DEL EXPERIMENTO

Inoculación de larvas

Para realizar el experimento fue necesario llevar a cabo los siguientes pasos:

6.10.1 Captura de adultos

Para llegar a obtener las larvas fue necesario la captura y el apareamiento de los adultos; se capturaron 90 hembras y 45 machos, por medio de trampas de luz por las noches, durante la última semana de abril, esto debido a que esta semana cayeron las primeras lluvias. La trampa consistió en una barra de luz negra en posición vertical de 15 watts provista de cuatro láminas de plástico transparente y un depósito de aluminio, en el cual se recibieron los insectos que al sentirse atraídos por la luz chocaron con las láminas y cayeron dentro de estas.

6.10.2 Separación por sexo

Después de recolectarlas se colocaron en un bote plástico con perforaciones y se separaron, hembras y machos, de acuerdo con las claves generadas por (King 1984), (figura 5) en las que se toma en cuenta el genital masculino, también características morfológicas de la especie como la forma de las uñas mesotarsales masculinas (Morón, 1986).

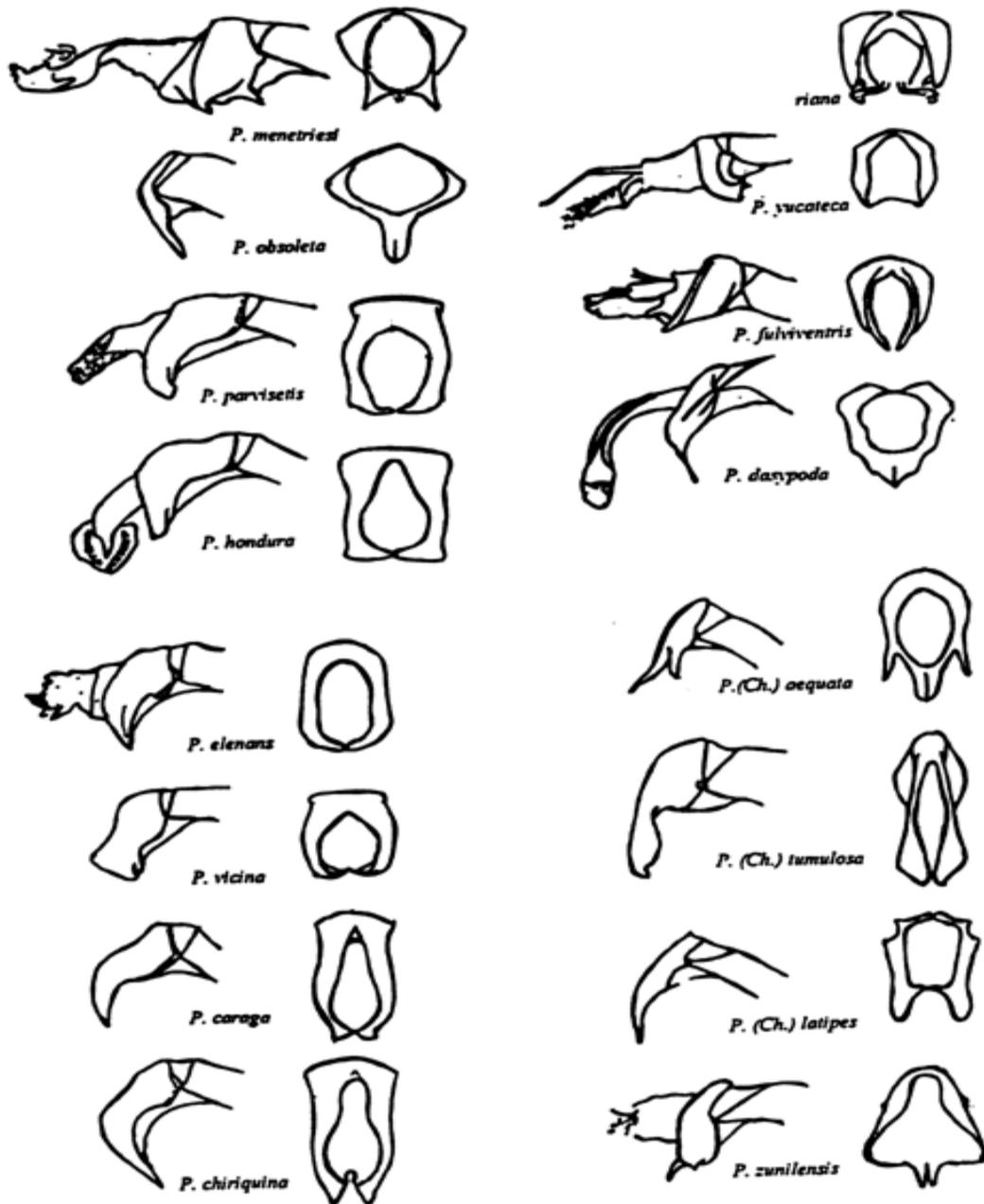


Figura 4. Genitales masculinos de especies importantes de *Phyllophaga* en centro América (King, 1984).

6.10.3 Apareamiento

Se colocó un macho por cada dos hembras de adultos en cubetas plásticas de aproximadamente 20 litros. Cada cubeta tenía perforaciones en la tapa y una capa de suelo de 15 cm de suelo con un porcentaje de humedad del 22% (Goonawardene, 1985). Después del apareamiento se trasladaron las hembras a los cajones preparados con las condiciones simuladas.

6.10.4 Preparación de los cajones

Aproximadamente 20 días antes de introducir las hembras a los cajones se sembró 20 plantas de maíz por cajón a una distancia de 15 x 10cm, esto con el objetivo de brindar alimento a la larva, además de agregó materia orgánica, palitos, hojas, y se utilizó suelo franco.

6.10.5 Producción de huevecillos

Se introdujeron 2 hembras en cada cajón ya apareadas, y se obtuvo 20 huevecillos por hembra, es decir en cada cajón hubo 20 larvas, a los 8 días de haber colocado las hembras.

6.10.6 Días de aplicación

La primera aplicación de *Metarhizium anisopliae* se realizó, a los veinte días después de que emergen las larvas, la segunda aplicación a los cuarenta y cinco días y la tercera a los 100 días.

6.10.7 Intervalo de aplicación

La primera aplicación de la dosis se realizó a los veinte días después de que emergieron las larvas, la segunda aplicación de la dosis se realizó veinticinco días

después de la primera aplicación, y la tercera dosis a los 55 días después de la segunda aplicación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Intervalo de aplicación de *Metarhizium anisopliae* a larvas de *Phyllophaga* spp.

Aplicación	Días
1	20
2	25
3	55

6.10.8 Estadíos Larvarios

Según investigaciones realizadas por el comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México el ciclo de la larva se tomó de la siguiente manera el estadio larvario uno (L1) a los 20 días después de la eclosión de la larva, luego a los 25 días después del L1 se tomó el estadio larvario dos (L2) y a los 55 días después del L2 se tomó e estadio larvario tres (L3) (Cuadro 3), (figura 5).

Cuadro 3. Estadios larvarios de *Phyllophaga* spp

Estadio larval	Días
L1	20 después de emergidas las larvas
L2	45 días de vida de la larva
L3	100 Días de vida de la larva



Figura 5. Estadios larvarios de *Phyllophaga* spp (Informaciones agronómicas, 2016)

6.11 VARIABLES DE RESPUESTA

La variable de respuesta fueron número de larvas muertas totales y larvas colonizadas por el hongo *Metarhizium anisopliae*. Estas fueron contabilizadas a los tres días después de haber aplicado los tratamientos en cada estadio larval (tres días es el tiempo en que se da la colonización) considerando el número de larvas muertas en cada estadio después de la aplicación de las diferentes dosis.

6.11.1 Conteo de larvas

Para el conteo de larvas en cada unidad experimental se removió la planta de maíz que había en cada unidad experimental luego se sacó la tierra de cada cajón y con una pequeña pala se contabilizaron las larvas; esto se hizo en cada tratamiento aplicado.

6.12 ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

6.12.1 Análisis estadístico

Para la realización del análisis de varianza y la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, así como para la prueba de medias, se utilizó el Software Infostat, el cual permite la realización de análisis estadístico de aplicación general. Cubre tanto las necesidades elementales para la obtención de estadísticas descriptivas y gráficos para el análisis exploratorio, como métodos avanzados de modelación estadística y análisis multivariado. Para todo el análisis estadístico se utilizó una confianza del 95%.

6.12.2 Estimación de los costos de aplicación de los tratamientos

Para determinar los costos de aplicación de los tratamientos en los diferentes estadíos larvarios de gallina ciega, se realizó una estimación de los costos utilizando una relación en los precios de productos aplicados para determinar el tratamiento más conveniente a aplicar para el control de gallina ciega.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de este apartado, es importante mencionar que antes se realizó el análisis de los supuestos del análisis de varianzas, cuyas pruebas se presentan en el anexo 2.

7.1 EFECTO DE LAS DOSIS DE *Metarhizium anisopliae* EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Phyllophaga* spp.

De acuerdo con el análisis de varianza y con una confianza del 95% se determinó que hubo diferencia significativa entre las dosis de *Metarhizium anisopliae* y la dosis del químico sobre el control de las larvas de gallina ciega¹ ($P < 0.0001$). De acuerdo con la prueba de Tukey para el factor dosis se evidencia que los tratamientos que ejercen un mayor control sobre las larvas de gallina ciega corresponden al químico, *Metarhizium anisopliae* 2 g y *Metarhizium anisopliae* 3 g (grupo C de la prueba de Tukey).

En ese sentido, dado que el *Metarhizium anisopliae* (2 g) es un producto biológico y que genera beneficios para el ambiente y dado que no existe diferencia significativa en comparación con el químico, se puede recomendar su uso para el control de las larvas de *Phyllophaga* spp, en focos

Con relación al factor “Estadío larvario” de acuerdo con Tukey con una confianza del 95% se determinó que el estadio larvario más susceptible a la colonización por el hongo *Metarhizium anisopliae* es el estadio de 1 a 4 semanas.

¹ Número total de larvas muertas, incluye las varvas muertas como efecto de los tratamientos y debido a factores ambientales

Cuadro 4. Análisis de la varianza para los tratamientos evaluados

	F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Estadio larval	480.84	2	240.42	140.51		<0.0001
Dosis	223.56	4	55.89	32.66		<0.0001
Estadio larval*Dosis	144.04	8	18.01	10.52		<0.0001
Error	51.33	30	1.71			
Total	899.78	44				

Dado que existe interacción entre el factor dosis y el factor estado larvario ($p < 0.0001$) (Cuadro 4) se realizó una prueba de Tukey para determinar el mejor tratamiento que ejerce el mejor control sobre las larvas de *Phyllophaga* spp (Cuadro 5), de acuerdo con Tukey se evidencia que el mejor tratamiento biológico lo ejerció *Metarhizium* (3 g) con un estadio larvario de 1 a 4 semanas, debido a que *Metarhizium* actúa por contacto por efecto de parasitismo y permite la penetración en el interior de la larva ocasionando su destrucción viva y luego causándole la muerte.

Así mismo se realizó un gráfico (Figura 6) para observar la forma en que interactúan ambos factores evaluados (estado larvario vs dosis). De acuerdo con la Figura 8, se observa que las dosis 2 g y 3 g de *Metarhizium anisopliae* son las que ejercen un mejor control en los estadios larvales tempranos de gallina ciega, es decir en el estado larval 1 (entre 0 y 4 semanas).

Cuadro 5. Prueba de Tukey para los tratamientos sobre la mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp.

Estadio larval	Dosis	Medias	n	E.E.									
3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (1 g)	2.33	3	0.76	A								
2 (4 a 8 sem)	TESTIGO	3.33	3	0.76	A	B							
3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (3g)	3.33	3	0.76	A	B							
3 (9 a 16 sem)	TESTIGO	3.33	3	0.76	A	B							
3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (2g)	4.00	3	0.76	A	B	C						
1 (1 a 4 sem)	TESTIGO	5.00	3	0.76	A	B	C	D					
2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (1 g)	6.33	3	0.76		B	C	D	E				
2 (4 a 8 sem)	QUIMICO (Terbufos)	7.67	3	0.76			C	D	E				
2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (2g)	8.00	3	0.76				D	E	F			
2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (3g)	8.33	3	0.76				D	E	F			
3 (9 a 16 sem)	QUIMICO (Terbufos)	9.00	3	0.76					E	F			
1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (1 g)	11.67	3	0.76						F	G		
1 (1 a 4 sem)	QUIMICO (Terbufos)	13.33	3	0.76							G	H	
1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (2g)	14.33	3	0.76								G	H
1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (3g)	16.67	3	0.76									H

Esta situación obedece a que la larva es estrictamente rizófaga, esto significa que en esta etapa la larva se alimenta en pequeñas cantidades sin causar un daño severo a la planta y es en este estadio donde la larva se encuentra más susceptible a hongos entomopatógenos, es decir que la cepa invade el aparato digestivo ocasionando su destrucción (colonización), evitando que la larva se siga alimentando y muera.

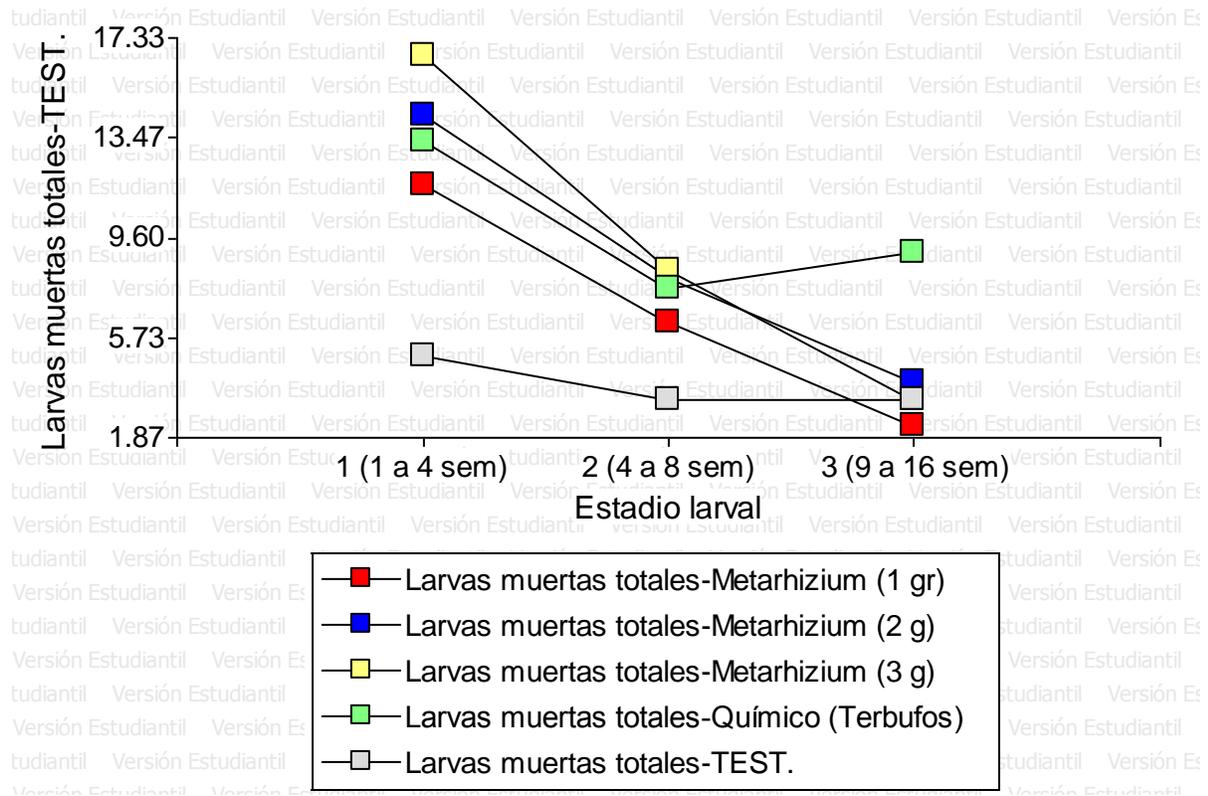


Figura 6. Gráfico de interacciones entre el estado larval y las dosis de *Metarhizium anisopliae*, la dosis del químico y el testigo absoluto

Tal y como se mencionó anteriormente, de acuerdo con Tukey los mejores tratamientos son *Metarhizium anisopliae* 3 g y 2 g. De acuerdo con estas pruebas no existen diferencias significativas entre el T (3 g) y el T (2 g).

Se realizaron contrastes ortogonales para comparar los diferentes tratamientos aplicados. Con el objeto de comparar las dosis de *Metarhizium* con el producto químico y el testigo. Los contrastes analizados fueron:

- Contraste (Todos vs Químico)
- Contraste (*Metarhizium* Vs Químico)
- Contraste (*Metarhizium* 1g vs *Metarhizium* 2g)
- Contraste (*Metarhizium* 2g vs *Metarhizium* 3g)

En este análisis se aplicó *Metarhizium* 2 y 3 g y se constató que efectivamente no existe diferencia estadística entre ellos según ($p= 0.2883$). Para el resto de los contrastes se evidenció que existen diferencias significativas (anexo 4).

7.2 EFECTO DEL ESTADO LARVAL EN EL CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE *Phyllophaga* spp

Los resultados obtenidos de la aplicación de las dosis de *Metarhizium* y del producto químico empleado para el control de la gallina ciega se presenta en el anexo 1. De acuerdo con el análisis de varianza realizado, se evidenció que el estado larval interacciona con la dosis en el control de larvas de gallina ciega ($p<0.0001$) (anexo 4). En general, se evidenció que el estado larval 1 (1 a 4 semanas), es el que interacciona de mejor manera con los tratamientos aplicados para el control de la gallina ciega (Figura 7). Así se determinó que en la medida que las larvas cambian de estadio, disminuye el efecto de los tratamientos en el control de dichas larvas.

Para este caso los mejores resultados se dieron en la aplicación del *Metarhizium* (3 g) y el estado larval (1-4 semanas), con promedios de larvas muertas que ascendieron a 12 larvas muertas². Esta situación se dio de manera similar para *Metarhizium* (2 g) en donde el número de larvas muertas totales ascendió a 11 larvas muertas (Figura 6).

Con relación al estado larval de 4 a 8 semanas se evidenció que dicho estado larval influye de manera similar en todas las dosis de *Metarhizium* empleada y el químico. En el estado larval 3 se evidenció que el efecto del *Metarhizium* fue bajo en comparación con los otros estadios larvales con valores entre 11 y 12 larvas muertas. Para este estadio larval se constató que si hubo un efecto del producto químico sobre el número de larvas muertas totales.

²El número de larvas muertas incluye el número de larvas colonizadas por el *Metarhizium anisopliae* y las larvas muertas por efectos ambientales.

Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por ANACAFE (2010) donde se determinó que el estado larval 1 y 2 influyó de manera positiva en la mortalidad de larvas de gallina ciega tras la aplicación de 3 g de *Metarhizium anisopliae*.

Con el objeto de determinar las diferencias significativas entre las dosis de *Metarhizium*, el químico y el testigo se realizaron contrastes ortogonales con un nivel de significancia del 5%. Los resultados muestran que existe diferencia significativa entre el testigo y el resto ($p=0.2394$), entre el químico y las dosis de *Metarhizium* ($p=0.0001$) y entre el *Metarhizium* (1 g) vs (2g y 3 g) ($p=0.05$). No se encontraron diferencias entre el 2 y 3 g.

Según el gráfico de interacción el estadio larvario 1 es más susceptible a los controles biológicos, porque el mecanismo de defensa de la larva de *Phyllophaga* no está completamente desarrollado, lo hace más susceptible al deterioro por la fragilidad de su estructura ya que en esta etapa no ocasionan daño alguno a la planta debido a que son estrictamente rizófagas y se logra la colonización de estas poblaciones, evitando que causen daños.

Estimación de los costos de aplicación de los tratamientos

De acuerdo con resultados obtenidos en la aplicación de *Metarhizium anisopliae* en la colonización de larvas de gallina ciega en los diversos estadios larvales, en el siguiente cuadro se pueden apreciar las diferencias económicas para cada uno de los tratamientos. Se determinó que no existe diferencia significativa en aplicar 2 g y 3 g de producto por m^2 por lo tanto, en una producción agrícola orgánica o cuando se quiera implementar una agricultura más sostenible, se recomienda la aplicación de 2 g de *Metarhizium anisopliae*, para fines de obtener rentabilidad es importante no hacer la aplicación en área total si no en focos donde existe daño de las larvas a los cultivos.

Cuadro 6. Costos en la aplicación de 2 y 3 g de *Metarhizium anisopliae*

Costo unitario por gramo	Dosis producto/m ²	Costo por hectárea
\$US 0.03	2 g/m ²	\$US 600.00
\$ US 0.03	3 g/m ²	\$ US 900.00

Económicamente la aplicación de productos químicos es más rentable, pues su costo en el mercado es más bajo; debido a la competencia de marcas que actualmente existe, pero se debe tomar en cuenta el impacto severo que ocasionan los productos de origen organofosforados en el medio ambiente y la salud humana, se debe considerar que no existe diferencia significativa de control en la colonización de larvas en estadios tempranos entre 2, 3 g de *Metarhizium* y el producto químico.

Cuadro 7. Relación económica en la aplicación de diferentes dosis de *Metarhizium* y producto químico

Producto	Costo Unitario por g	Costo por Hectárea
<i>Metarhizium</i> 2 g	\$ 0.03	\$ 600
<i>Metarhizium</i> 3 g	\$ 0.03	\$ 900
Químico	\$0.018	\$ 54

VIII. CONCLUSIONES

Existió diferencia significativa en los tratamientos *Metarhizium* 3g en relación a *Metarhizium* 1g, 2g y el tratamiento químico, tomando en cuenta que su aplicación en un área total tiene un costo elevado debido al precio del producto, se debe considerar aplicarlo por focos a fin de obtener un efectivo control y reducir los costos del tratamiento.

La utilización de hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de larvas de *Phyllophaga* spp, es más efectivo en el primer estadio larval (1 a 4 semanas), dado que las larvas no han desarrollado completamente su sistema digestivo y su alimentación no es estrictamente rizófaga.

Se cuantificaron poblaciones de larvas de *Phyllophaga* spp. En cada unidad experimental con cada una de las dosis aplicadas, determinando que la mayor mortalidad de larvas se da bajo el efecto de la dosis de 3g en el primer estadio larvario.

IX. RECOMENDACIONES

Se sugiere encaminar evaluaciones utilizando *Metarhizium anisopliae* en estadios larvales tempranos, pues aquí la larva no ha desarrollado todos los mecanismos de defensa.

Se recomienda validar a nivel de campo la concentración de 3×10^{12} UFC, por m^2 para la colonización de larvas de *Phyllophaga spp*, como alternativa al uso de productos organofosforados, realizando la aplicación por focos,

Se recomienda investigar el uso de *Metarhizium anisopliae* en la colonización de larvas de *Phyllophaga spp* en cultivos como café y maíz dulce, que son fuertemente afectados por esta plaga

X. BIBLIOGRAFÍA

Agrícola El Sol (2011) Productos para el Control Biológico y Manejo Integrado de Plagas – GUATEMALA (en línea) disponible en www.agricolaelsol.com.

Alves S. B. (1986) Producao de fungos entomopatogénicos en controle microbiano de insectos_(1ª Ed) p. 409.

Anderson, (1979). Biochemistry of insect cuticle._Annu Rev. Entomology 24 – 29 p.

ANACAFE (2007), Asociación Nacional del Café, Gallina Ciega *Phyllophaga spp.* El Cafetal, La revista del caficultor Octubre 2007, Guatemala pág. 10 – 11.

ANACAFE (2011), Asociación Nacional del Café. Daños del *Phyllophaga* a la raíz del café, (EN LINEA) revista El Cafetal, la revista del caficultor, disponible en portal.anacafe.org/.../Revista%201%20EI%20Cafetal%20Anacafe.pdf

BAYER CROPS SCIENCE (2009). Ciclo de vida *Phyllophaga spp* (en línea). Guatemala Disponible en www.bayercropscience.com.mx/bayer/...nsf/id/GallinaPests_BCS.

Bosh y Messenger (1973), Biological control. Text Educational publisher New York and London. 180p.

CATIE, (1988), *Metarhizium anisopliae* (en línea) consultado en orton.catie.ac.cr/repdoc/A0748e/A0748e.pdf, octubre 2011.

CIAT, (1982) Coto y Saunders, 2004. Uso de *Metarhizium anisopliae* como control biológico (en línea). Disponible en orton.catie.ac.cr/repdoc/A0748e/A0748e.pdf

Converse V. y Grewal P. S. (1998). Virulence of Entomopathogenic Nematodes to the western masked chafed Cyclocephalahrto (coleopteran Scarabaeidae) Journal Economic Entomology 91 428 – 432p.

De Bach, P. (1968). De Bach (ed) Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Éxitos, tendencias y posibilidades futuras.. In: P. CECSA, México. Pp 789-831.

Doria y Mandoca, (1991). Abundancia de especies de Gallina Ciega, en los altos de México Jalisco. Tesis Ing. Primitivo Díaz Maderos

Extracto de King ABS. Biology and identification of white grubs (phyllophaga) of economic importance in central America._Traducido por R.Ochoa D coto y PJ Shanon con colaboracion de ABS King.

FAO (2002). Tratado Internacional sobre Recursos Genéticos de las Plantas; Sala de Prensa. Disponible en www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0v.htm

Gaylor M.J., y Frank G.W Agricultura Técnica de México; aparecimiento de los escarabajos. Enviramental Entomology pág. 91.

Goonewardene H. F. (1985) *Popillia japonica*. En Handbook of insect rearing. Singh P Y R.F. Moore Ed. Elsevier, New York 269 – 278 p.

Jackson (1993). Developing microbial controls for sacrab pests. En diversidad y Manejo de plagas subterráneas M.A. Morón. Instituto de Ecología Jalapa ver. México 183 – 192 p.

King A.B.S. (1984). Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. UK, TDRI-CATIE/ODA. P.90-93 consultado en Hoja Técnica de MIP no. 60 2001, Costa Rica 36 – 50 p.

King A.B.S. Saunders J.L. (1979) El control de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) en maíz con insecticidas aplicados con métodos sencillos. Turrialba 29: 17 – 19p.

Monroing, F. Daños de Gallina Ciega, (EN LINEA) consultado agosto 2011 a través de <http://www.website-hit-counters.com>

Morón, M.A. (1986). El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supra específica (Insecta: Coleóptera). México, D.F. Instituto de Ecología. Publ. No. 19.344 p.

Morón, (1983) Introducción a la biosistemática y ecología de los coleópteros Melolonthidae edíficalas de México. II Mesa redonda sobre plagas del suelo SME pp. C1 – C -40.

Poprawski TJ; Yule, WN, (1991). Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col:Scarabaeidae) in southern Quebec. Journal of Applied Entomology 109:414-422.

Pullman, (1981). Soil solarization and thermal death a logarithmic relationship between time and temperature for four soilborne plant pathogens. Phytopathology 7: 959-964p.

Rodríguez, A. (1995). *Control Biológico de enfermedades de plantas*. Montevideo, Uruguay: Fagro.

Saunders, J.L.; Coto, T. D., King, A.B.S. (1998). Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. 2 ed. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Programa de investigación. Serie técnica. Manual técnico/CATIE; No. 29.

Secretaría de Agricultura y Ganadería/PRONAGRO. Biología de la larva de gallina ciega. Pronagro.sad.gob.hn

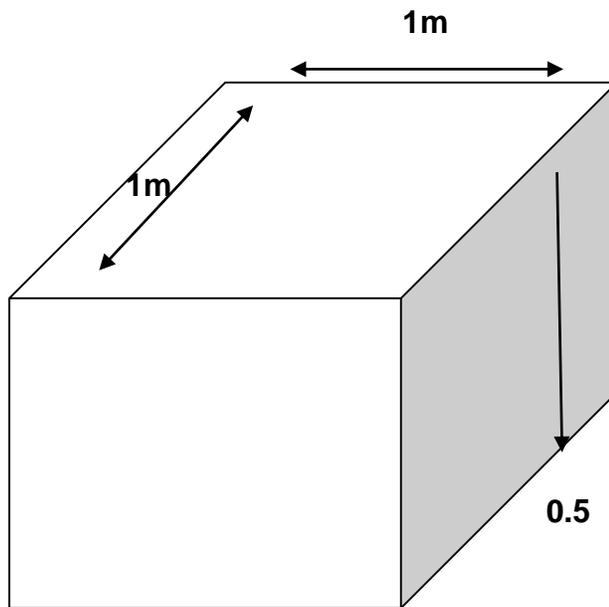
Shannon P.J.; CARBALLO, M. Eds. (1993). Seminario-taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga* spp. Turrialba, Costa Rica. Biología y Control de *Phyllophaga* spp. Memoria. CATIE: PRIAG-ALA 88/23. 1996. Serie técnica. Informe técnico/CATIE. No. 27

Summy, K.R. and J.V. French. (1988). Biological control of agricultural pest: concepts every producer should understand, J. Rio Grande Valley Hort. Soc, 41: 119-133

Tejada L.O. (1982), Abundancia y distribución de Gallina Ciega en los Altos de México, Jalisco. Apuntes de control biológico. ITESM. Tesis Ing. Primitivo Díaz Maderos.

Villalobos (1993). Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e instituto de ecología. Xalapa Ver. México 235 – 253p.

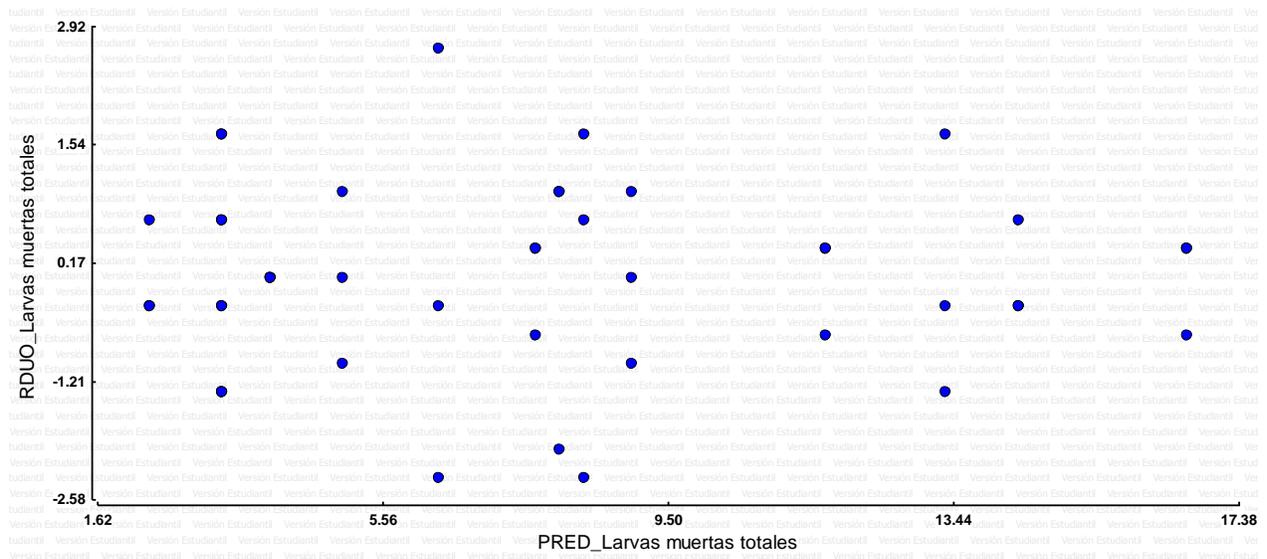
ANEXOS



Anexo 1. Cajón de madera, unidad experimental de colonización de larvas de gallina ciega con *Metarhizium anisopliae*.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_Larvas muertas totales	45	0	1.08	0.97	0.655

Anexo 2. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilks



Anexo 3. Q-Q plot (normal) obtenido a partir de los residuos de la variable de respuesta (número de larvas muertas).

Estadio larval*Dosis	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1 Todos vs TESTIGO	58.33	5.8	170.1	1	170.	99.43	<0.0001
Contraste 2 Metarhizium vs Químico	-15	4.53	18.75	1	18.75	10.96	0.0024
Contraste 3 Metarhizium 1g vs Metarhizium 2 y 3 g	14	3.2	32.67	1	32.67	19.09	0.0001
Contraste 4 Metarhizium 2g vs Metarhizium 3g	-2	1.85	2	1	2	1.17	0.2883
Total			223.56	4	55.89	32.66	<0.0001

Anexo 4. Contrastes ortogonales entre dosis y estadíos larvarios.

Repetición	Estadio larval	Dosis	# de larvas muertas	# de larvas vivas	# de larvas colonizadas	Larvas muertas totales
1	1 (1 a 4 sem)	TEST.	5	15	0	5
1	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (2 g)	4	5	11	15
1	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (3 g)	5	3	12	17
1	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (1 g)	5	8	7	12
2	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (2 g)	4	6	10	14
2	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (1 g)	6	8	6	12
2	1 (1 a 4 sem)	TEST.	4	16	0	4
2	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (3 g)	5	3	12	17
3	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (3 g)	4	4	12	16
3	1 (1 a 4 sem)	TEST.	6	14	0	6
3	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (2 g)	6	6	8	14
3	1 (1 a 4 sem)	Metarhizium (1 g)	6	9	5	11
1	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (3 g)	4	8	6	10
1	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (2 g)	5	11	4	9

Repetición	Estadio larval	Dosis	# de larvas muertas	# de larvas vivas	# de larvas colonizadas	Larvas muertas totales
1	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (1 g)	5	11	4	9
1	2 (4 a 8 sem)	TEST.	3	17	0	3
2	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (3 g)	3	11	6	9
2	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (2 g)	4	11	5	9
2	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (1 g)	3	14	3	6
2	2 (4 a 8 sem)	TEST.	2	18	0	2
3	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (2 g)	3	14	3	6
3	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (1 g)	2	16	2	4
3	2 (4 a 8 sem)	Metarhizium (3 g)	2	14	4	6
3	2 (4 a 8 sem)	TEST.	5	15	0	5
1	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (3 g)	4	16	0	4
1	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (2 g)	4	16	0	4
1	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (1 g)	3	17	0	3
1	3 (9 a 16 sem)	TEST.	5	15	0	5

Repetición	Estadio larval	Dosis	# de larvas muertas	# de larvas vivas	# de larvas colonizadas	Larvas muertas totales
2	3 (9 a 16 sem)	TEST.	3	17	0	3
2	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (2 g)	4	16	0	4
2	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (3 g)	3	16	1	4
2	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (1 g)	2	18	0	2
3	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (2 g)	4	16	0	4
3	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (3 g)	0	18	2	2
3	3 (9 a 16 sem)	TEST.	2	18	0	2
3	3 (9 a 16 sem)	Metarhizium (1 g)	2	18	0	2

Anexo 5. Datos obtenidos de conteo realizado en las unidades experimentales.

Anexo 6. Preparación de las diferentes dosis de *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio de Universidad Rafael Landívar, campus central



Anexo 7. Unidad experimental con plantas de maíz para alimentación de la larva



Anexo 8. Toma de datos en unidades experimentales con larvas de *Phyllophaga* spp



Anexo 9. Larvas de *Phyllophaga* spp en unidades experimentales

