



---

TRIBUNAL EXAMINADOR

---

Título:

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE YUCA CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA CONTRA EL CHINCHE *CYRTOMENUS BERGI* EN LA PROVINCIA DE COCLÉ Y HERRERA”.**

Por:

ANA ESTELA BETHANCOURT GONZÁLEZ  
8-789-284

\_\_\_\_\_

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

DR. RITO HERRERA  
Asesor principal

\_\_\_\_\_

M.Sc. FERMÍN MEJÍA  
Jurado

\_\_\_\_\_

Prof. MARTA CHAVES de VON CHONG  
Jurado

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE YUCA CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA CONTRA EL CHINCHE *CYRTOMENUS BERGI* EN LA PROVINCIA DE COCLÉ Y HERRERA”.**

PRESENTADO POR:

ANA ESTELA BETHANCOURT GONZÁLEZ

REQUISITO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE LICENCIADA EN  
BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PANAMÁ, REP. DE PANAMÁ

2021.

## **COMITÉ ASESOR:**

**PROFESOR: Dr. RITO HERRERA**

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA.

ESCUELA DE BIOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

**PROFESOR: Mgtr. FERMÍN MEJÍA**

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

**PROFESORA: MARTA CHAVES de VON CHONG**

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

## DEDICATORIA

El conocimiento se aprende por medio del estudio. La sabiduría por medio de la observación **(Arturo torres)**.

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida, y a toda mi familia por estar siempre presente, a mi madre y hermanos.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que me apoyó con su valioso tiempo y confiar en mí, abrireme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento IDIAP, laboratorio de Microbiología Aplicada (LAMEXA), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá y sede Penonomé.

De igual manera, mis agradecimientos al Mgtr. Fermín Mejía, por su apoyo y su conocimiento, de igual manera a la profesora Martha Chávez de Von Chong por su paciencia y enseñanza, quien con sus valiosos conocimientos contribuyó en mi crecimiento día con día como profesional, gracias a cada uno de ustedes por su dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Finalmente, quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. Rito Herrera, principal colaborador durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento, enseñanza y asistencia permitió el desarrollo de este trabajo.

Ana Estela B.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Humberto Cornejo, por facilitarnos el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela de Biología, de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá, donde se realizó parte de las pruebas experimentales.

De esta misma forma deseo dar mi agradecimiento al Dr. Rito Herrera por su tiempo y valiosos conocimientos, al Mgtr Fermín Mejía, por su apoyo y a la profesora Marta por su colaboración en el laboratorio. Sus aportes fueron de gran ayuda para la culminación de este trabajo.

Además, agradecer a personas que de una u otra forma estuvieron pendiente durante este trabajo. Al ingeniero José Causadías por su apoyo. Y un especial agradecimiento para el Sr. Silvino Sánchez por facilitarnos su finca agroecológica para llevar a cabo esta investigación.

De igual forma, al personal del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá **(IDIAP)** del área de Ocú, por su ardua tarea y apoyo incondicional al facilitarme el material para realizar este proyecto, al Ing. Ricardo Hernández por su ayuda y su tiempo, y a todos los involucrados quienes permitieron que se realizara para su debida culminación.

## INDICE

DEDICATORIA .....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	12
RESUMEN .....	14
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
1.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE YUCA .....	19
1.2. ANTECEDENTES DE CONTROL BIOLÓGICO EN YUCA CONTRA <i>C. Bergi</i> .....	21
1.3. GENERALIDADES DEL INSECTO <i>Cyrtomenus Bergi</i> .....	23
1.3.1. Clasificación taxonómica del insecto. ....	23
1.3.2. Ciclo de vida de <i>C. Bergi</i> . ....	24
1.4. MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA DE <i>C. Bergi</i> .....	25
1.4.1. Distribución geográfica de <i>C. Bergi</i> .....	26
1.4.2. Daños causados al cultivo de yuca por <i>C. Bergi (Manihot Esculenta)</i> .....	26
1.5. DESCRIPCIÓN DEL SUELO.....	27
1.6. ACTIVIDAD MICROBIANA.....	28
1.7. MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD MICROBIANA	
29	
1.7.1. Hongos Filamentosos .....	29
1.7.2. <i>Aspergillus spp</i> .....	30
1.7.3. <i>Penicillium spp</i> .....	30
<b>1.7.4. <i>Fusarium spp.</i> .....</b>	<b>31</b>
1.8. Hongos biocontroladores.....	32
1.8.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> ,.....	32
1.8.2. <i>Beauveria bassiana</i> .....	33
1.9. Preservación en glicerol y agua estéril.....	34

2.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	36
2.1.	MATERIALES	36
2.2.	Metodología	37
2.2.1.	Localización Geográfica	37
2.2.2.	Coordenadas de los sitios muestreados.	37
2.2.3	Toma de muestra	40
2.2.4	Recolección de la muestra:	40
2.2.5	Preparación de los medios de cultivos	40
3.	Respiración Microbiana.	40
4.	Actividad de la deshidrogenasa	42
5.	Aislamiento de los hongos.	43
5.1.	Técnica para micro cultivo en hongos	44
5.2.	El micro cultivo	44
5.3.	Caracterización de morfo tipos (micro cultivo).	45
5.4.	Aislamiento	46
5.5.	Tubos inclinados (preservación a corto plazo).	47
6.	Obtención del insecto	48
7.	Método de aplicación de los hongos contra el insecto	49
8.	Pruebas de actividad biológica con el chinche <i>C. Bergi</i> .	49
8.1.	Cámara Neubauer	50
9.	DESARROLLO DE ENSAYO DE PATOGENICIDAD	51
10.	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	53
10.1.	Preservación de microorganismos en Glicerol.	54
	CAPÍTULO III	55
11.	RESULTADOS	56
11.1.	Respiración microbiana en los suelos en los cultivos de yuca en dos fincas	56
11.2.	Actividad deshidrogenasa en suelos de dos fincas de yuca	56
11.3.	Conteo de esporas con la cámara Newbauer	62

CAPÍTULO IV	67
12. DISCUSIÓN	68
13. CONCLUSIÓN	72
Recomendaciones	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
Anexos	83

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Cyrtomenus Bergi*, también conocido como el chinche de la viruela.....

**Tabla 2.** Coordenadas de los sitios de muestreo en los distritos de Antón y Ocú.....

**Tabla 3.** Valores de Absorbancia (A485nm) de las muestras de suelo.....

**Tabla 4.** Hongos Filamentosos encontrados en las muestras de Yuca y el chinche *C. Bergi* por lugar de muestreo.....

**Tabla 5.** Descripción macroscópica de los Hongos Filamentosos encontrados en el Sistema Tradicional y en el Sistema Agroecológico.....

**Tabla 6.** Siglas utilizadas para describir los Hongos Filamentosos encontrados en los sitios de muestreos.....

**Tabla 7.** conteo con la cámara Newbauer de hongos aislados en el laboratorio.

**Tabla 8.** Se observa que el CH5 en la segunda lectura ya demostró tener más eficacia en comparación con los otros tratamientos.....

**Tabla 9** Porcentaje de eficacia en los tratamientos contra el chinche *C. Bergi*.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Localización geográfica del cultivo de yuca en Menchaca, el Pilon y los Llanos en Ocu, provincia de Herrera (Google. sites2019). .....
- Figura 2.** Localización geográfica de la finca experimental Nueva Esperanza en Cabuya, el área de las torres, Antón, provincia de Coclé (Google. sites2018) .....
- Figura 3.** Esquema utilizado para la dilución seriada de suelo. Fuente: Hernández, B.; Cornejo, H.; F. Mejía. 2016. Manual de laboratorio del Curso de microbiología ambiental de suelos .....
- Figura 4.** Esquema de preservación en tubos inclinados. Fuente: Rangel Osorio Hugo, 2014. Manual de técnicas y métodos de preservación.....
- Figura 5.** Valores de la Respiración en los suelos obtenidos de las diferentes fincas.....
- Figura 6.** Valores de la deshidrogenasa en los suelos obtenidos de las diferentes fincas.....
- Figura 7.** Valores de la respiración microbiana en los suelos obtenidos de las diferentes fincas.....
- Figura 8.** Observaciones microscópicas de *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, obtenidas de la técnica de micro cultivo (objetivo de 40x). Fuente. Cámara de Samsung J7.....
- FIGURA 9.** Cámara Newbauer utilizada para la observación de esporas en los hongos diluidos para su procedimiento.....
- Figura 10.** Ciclo biológico de C. Bergi en la yuca y los estadios de desarrollo de C. Bergi Huevo, ninfas de I a V, adultos hembra y macho.....
- Figura 11. a.** Esquema para realizar estudios de hongos filamentosos de forma macro y microscópica **b.** El micro cultivo es un procedimiento apropiado para mantener cepas de microorganismos guardados con poco espacio para posibles estudios.....

- Figura 12.** Lugar de recolecta de los chinches, forma de obtenerlos y colectarlos. Su preparación para utilizarlos para las pruebas.....
- Figura 13.** Recolecta de chinches, limpieza, conteo y preparación para llevarlos al laboratorio.....
- Figura 14.** Chinches en el laboratorio para su cuidados, alimentación y mantenimiento antes del ensayo.....
- Figura 15.** Preparación de material estéril, chinches recolectados para montaje del ensayo en el laboratorio. ....
- Figura 16.** Preparación de micro cultivos con los hongos obtenidos en el muestreo y el tweent-20 con uno de los hongos utilizados en el ensayo.....
- Figura 17.** Esquema de realización de ensayos en el laboratorio con el hongo seleccionado para el chinche.....
- Figura 18.** Conteo con la cámara Newbauer en donde se observa las esporas del hongo en la dilución.....
- Figura 19.** Vista de chinche infectado por las esporas del hongo CH5 en el laboratorio.....
- Figura 20.** Cuadro de datos estadísticos de los hongos utilizados para el ensayo en el laboratorio.....

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **A485nm**: Lectura de absorbancia a 485 nanómetros.
- **ADH**: deshidrogenasa.
- **Ac**: Ácido.
- **BaCl<sub>2</sub>**: Cloruro de bario anhidro.
- **CH2**: Chinche 2
- **CH5**: Chinche 5
- **CH6**: Chinche 6
- **CO<sub>2</sub>**: dióxido de carbono
- **CICE**: suma de bases + Al.
- **C mol<sup>+</sup>/Kg**: aluminio intercambiable (Ca, Mg, K, Na).
- **FMO**: Finca Menchaca-Ocú
- **FLT**: Finca Los Torres- Antón
- **HCl**: Ácido clorhídrico.
- **IDIAP**: Instituto de investigación agropecuaria de Panamá.
- **LAMEXA**: laboratorios de microbiología experimental aplicada
- **M.O**: materia orgánica.
- **M.s.n.m**: metros sobre el nivel del mar.
- **NaOH**: hidróxido de sodio.

- **SIMM:** Sitio de muestreo Menchaca.
  
- **SMLT:** Sitio de muestreo los torres, en Antón
  
- **PDA:** agar de papa y dextrosa.
  
- **Relación C/N:** relación carbono/Nitrógeno.
  
- **R1:** Raíz 1
  
- **R2:** Raíz 2
  
- **ST:** Sistema tradicional
  
- **SA:** Sistema agroecológico
  - **spp:** se utiliza generalmente para referirse a todas las especies individuales dentro de un género, en plural, en lugar del epíteto específico.
  - **ss:** gramos de suelo seco
  - **TFF:** trifenilformazan
  - **TTC:** Trifeniltetrazolio
  - **μ:** micra Sistema Internacional de Unidades, μl (microlitros), μg (microgramos).
  - **μm:** medida de longitud, que es la millonésima parte de un metro.

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en los laboratorios del Departamento de Microbiología y Parasitología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá LAMEXA y parte del ensayo en la sede de Penonomé entre abril del 2018 a junio del 2019, con el propósito de encontrar hongos entomopatógenos que afecten al chinche de la viruela en los suelos de cultivo de yuca en las provincias de Océ y Antón-Penonomé, para intentar minimizar y controlar el uso de compuestos químicos como pesticidas, fungicidas utilizados para el control de este chinche. Este patógeno es el agente causal de la lesión en la yuca, en donde esta plaga subterránea ataca por medio de su estilete, perfora la cutícula y corteza de la raíz. Se observan manchas oscuras alrededor de la yuca que es indicativo de que el chinche se alimentó de esa raíz. Estas manchas no se ven a simple vista, sino hasta que se cosecha la raíz, ya que este patógeno es muy común verlo en temporadas de lluvia, la humedad los atrae hasta la superficie, y es común encontrarlos en las hojas y en el tallo; mientras que en épocas de verano es más difícil encontrar lugares más húmedos, y terminan enterrándose en lo más profundo de las raíces de la yuca.

Se realizó diluciones seriadas de ( $10^{-1}$  a la  $10^{-7}$ ) para aislar la mayor cantidad posible de hongos, lográndose obtener principalmente los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* como los más prevalentes, además las diluciones que se tomaron en cuenta fueron de  $10^{-5}$  hasta la  $10^{-7}$ .

Se aislaron un total de 28 hongos en dos fincas de los cuales, 10 son de una finca con manejo convencional (Océ), estos fueron obtenidos de chinches infectados en el sitio de muestreo y los otros de una finca orgánica Nueva Esperanza de Los Torres (provincia de Coclé), en esta se aislaron un total de 18 hongos. Esta finca se caracteriza por no utilizar agroquímicos, ni abonos artificiales por más de 20 años (certificación Biolatina 2018) de esta finca se tomaron los hongos más prevalentes como *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Fusarium sp*. a partir de la raíz de la yuca. Los hongos aislados se identificaron a nivel de género, basándonos en las estructuras reproductivas y a nivel de morfoespecie.

Paralelamente, se realizaron pruebas bioquímicas de actividad enzimática (Deshidrogenasa y Respiración microbiana) en los suelos de las dos fincas en donde se determinó que hubo mayor actividad microbiana en la finca Los torres, (provincia de Coclé) mientras que, en la segunda finca, La Menchaca (Ocú), presentó menor absorbancia.

De acuerdo con los análisis obtenidos de la actividad biológica contra el chinche *Cyrtomenus bergi* se obtuvo una diferencia significativa en la muestra CH5 (Chinche de la muestra 5, *Aspergillus sp.*), hongo obtenido de chinches muertos infectados del suelo, en donde se observó en los ensayos que este hongo infectaba al patógeno, cubriéndolo con esporas hasta que este fallece. Este hongo representó mayor actividad biológica que los demás, ya que los chinches morían en menor tiempo.

## INTRODUCCIÓN

La yuca es uno de los cultivos más adaptados a las condiciones climáticas de Costa Rica y en diferentes regiones tropicales, donde la raíz de yuca es utilizada para el consumo humano y la alimentación animal. Una de las razones que impulsan la siembra de ese cultivo en Costa Rica y en otros países. Se ha venido utilizando desde hace siglos debido a sus altos beneficios nutricionales

(Aguila Brenes, *et al.*, 2017).

El cultivo de la yuca ayuda a la subsistencia de los agricultores de estas regiones tropicales del mundo, por lo que cabe destacar que las mismas son invadidas por plagas que comprenden un rango amplio de artrópodos. Por lo que, es necesario disminuir el uso de plaguicidas, introduciendo metodologías alternativas para el manejo de plagas y enfermedades (Araya Mejías, *et al.*, 2012).

Entre las principales plagas de la yuca se encuentran la chinche subterránea de la viruela (*Cyrtomenus Bergi*) hay otras plagas que podemos mencionar, pero en este caso solamente se hablará de este en específico. Es una plaga chupadora y cavadora polífaga.

El primer registro de esta plaga se presentó en Colombia en los años 1980; recientemente ha sido reportada causando daños en Panamá, Costa Rica y Venezuela (Riis, 1997).

En el cultivo de la yuca, el daño causado por el chinche se detecta al momento de la cosecha, y solo al pelar las raíces se observan las lesiones de pudrición que aparecen como puntos negros y marrones en el parénquima de la raíz. Este daño es causado tanto por ninfas como por adultos, al introducir su estilete en la epidermis y corteza de la raíz del tubérculo, permitiendo indirectamente la entrada de microorganismos del suelo (Araya Mejías, *et al.*, 2012).

Las lesiones no son detectadas en el momento sino después que las raíces son cosechadas y peladas, los productores pueden perder su inversión en el cultivo, el tiempo y uso de la tierra.

*C. Bergi* tiene cinco estadios ninfales; ninfas y adultos pueden vivir más de un año alimentándose de las raíces de las yucas (Bellotti, 1980).

Una opción viable consiste en la incorporación al sistema productivo de controles biológicos. La agricultura cubana cuenta con un programa consolidado a lo largo de los años de la implementación de los bio-controladores en el manejo de plagas. La Escuela de Ingeniería en Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, ubicada en la sede regional de San Carlos, se dio la tarea de identificar los cultivos y plagas predominantes en las explotaciones agropecuarias de la región mencionada y determinar la efectividad de cinco bio-controladores (*Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis*), procedentes de Cuba (Araya Mejías, et al., 2012).

Como alternativa al control químico utilizado en los cultivos, el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), desarrolla a partir del 2015 un proyecto nacional con un enfoque hacia el control biológico, sobre todo en los 10 rubros que forman parte de la cadena agroalimentaria que contempla el Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA).

En Panamá el uso de estos organismos, como agentes de control biológico de enfermedades radiculares, es de gran interés en la actualidad, por lo que se requiere realizar análisis para posibles procedimientos que permitan controlar estas plagas. (MIDA, 2012).

Este trabajo tuvo como finalidad determinar la presencia de hongos entomopatógenos en contra del chinche *C. Bergi* en suelos de cultivos de yuca en las provincias de Coclé y Herrera. Se espera ir generando una colección de microorganismos con capacidades de control o resistencia, para posteriores ensayos en el campo, que permitan estudios de actividad biológica para este chinche.

# CAPÍTULO I

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE YUCA

La yuca (*Manihot Esculenta Crantz*) es considerada como una de las principales fuentes de energía. Es un cultivo tropical con excelente adaptación a las condiciones climáticas de Costa Rica. Su siembra se realiza en numerosas unidades productivas de asentamientos campesinos de pequeños productores (Aguila Brenes, et al., 2017) . Se cultiva fundamentalmente en los trópicos y en terrenos considerados marginales, infértiles, ácidos y con largos períodos de sequía (Mederos *et al.*, 2011).

La yuca pertenece a la familia Euphorbiaceae, constituidas por unas 7 200 especies que se caracterizan por su notable desarrollo de los vasos laticíferos, compuestos por células secretoras llamadas galactocitos. Esto es lo que produce la secreción lechosa que caracteriza a las plantas de esta familia. Un género muy importante de esta familia es *Manihot*, al que pertenece la yuca. Naturalmente, solo se encuentran especies del género *Manihot* en las Américas (Ceballos *et al.*, 2002).

La siembra se realiza en cualquier época del año, pero comúnmente al inicio de la estación lluviosa. En el transcurso del crecimiento, el terreno es limpiado periódicamente, arrimando el rastrojo al pie de la planta, para evitar la insolación. El cultivo de la yuca presenta diversas ventajas para la alimentación en zonas tropicales: cultivo fácil, resistencia a enfermedades y parásitos, rendimiento relativamente asegurado, posibilidades de conservación en el suelo y disponibilidad durante todo el año (López et al., 2001).

Los diez países con mayor producción obtenida de yuca a nivel mundial durante 2017 en toneladas, con información publicada, están: Nigeria 20.2%, República Democrática del Congo 10.7%, Tailandia 10.5%. Indonesia 6.5%, Brasil 6.4%, Ghana 6.3%, Angola 4.0%, Camboya 3.6%, Vietnam 3.5%, Mozambique 3.0%. siendo Nigeria el mayor productor de yuca con 59 485 947 toneladas de producción y capacidad de hectáreas producidas (FAOSTAT, 2017).

Fundamentalmente, con el empleo de prácticas agronómicas, el control biológico, la resistencia de la planta hospedante y el uso de plaguicidas. Un programa exitoso de manejo integrado de plagas debe evitar el deterioro ambiental, la posible contaminación de los alimentos en el futuro y estar disponible a un bajo costo para los agricultores de países en desarrollo. El manejo integrado de plagas (MIP) en la yuca está relacionado (Bellotti *et al.*, 2002).

El hecho de mantener los insectos perjudiciales a niveles de baja importancia económica significa que no siempre la presencia y el daño de un insecto incidirán en la reducción de la producción del cultivo; la planta de yuca tiene la capacidad para soportar cierto daño causado por los insectos y tiene habilidad para recuperarse. Por lo que la yuca es un cultivo de ciclo largo, el uso continuo de pesticidas es costoso y antieconómico en relación con su rentabilidad; por ello, este cultivo es ideal para programas de control biológico, especialmente en áreas donde se cultiva sin interrupción y en grandes extensiones (Melo *et al.*, 2009).

Si se considerara el cultivo de la yuca como un producto estratégico y base para el desarrollo de numerosas industrias, y se le diera el tratamiento correspondiente en cuanto a inversiones, esta raíz, seguramente podría favorecer el desarrollo del sector agroalimentario e industrial de los países en desarrollo, contribuyendo a la generación de riqueza y de empleo rural y urbano. Sin embargo, para hacer viable su consolidación se deben desarrollar sistemas de producción rentables y sostenibles, por lo cual, es cada vez más urgente la adaptación, desagregación o generación de tecnologías que, una vez incorporadas, fortalezcan la cadena productiva y sus derivados industriales.

La cría de *C. Bergi*, es la vía para la búsqueda de sistemas de biocontrol como es el caso de la *Galleria mellonella*, la cual es utilizada para las pruebas de infección y producción masiva de organismos como los entomonematodos que son utilizados para el control biológico de plagas terrestres como es en este caso del *C. Bergi*; ellos minimizan los impactos generados por plagas en cultivos como el de yuca, de gran importancia para el desarrollo económico de un país y la alimentación enriquecida en proteínas para la humanidad (COTES RINCÓN, 2012).

En Panamá la mayor parte de la yuca es producida por pequeños agricultores en suelos marginales e infértiles y con un nivel tecnológico bajo. Una de las áreas de mayor producción es Ocú, con suelos ultisoles en su mayoría (Aguilar, 1991).

## 1.2. ANTECEDENTES DE CONTROL BIOLÓGICO EN YUCA CONTRA *C. Bergi*.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, con el objetivo de observar y registrar a nivel de laboratorio los diferentes comportamientos de los individuos del chinche de la viruela (*Cyrtomenus bergi*) durante un período de 4 meses, partiendo de un esquema alimenticio; diseñó una metodología como la de confinar a los individuos de forma singular o por parejas, para medir su capacidad de oviposición y longevidad. Los factores temperatura y suelo, fueron debidamente controlados para evitar alteraciones en la muestra. Para el desarrollo de la cría de *C. Bergi* se tuvo en cuenta la estandarización de un número de manipulaciones de la muestra de la colonia (evaluaciones de tres veces por semana), para evitar futuros procesos de infestación que pudiesen llegar a alterar los resultados de la investigación (COTES RINCÓN, 2012).

Las chinches excavadoras son únicas entre las chinches verdaderas, reconocidas por las adaptaciones morfológicas para excavar, e incluyen varias especies de importancia económica por causar daños en las raíces y las vainas molidas. Los registros de daños han estado creciendo en las últimas dos décadas en el Neotrópico (Caicedo, A.M et al.,2011).

La humedad del suelo actuó como una guía importante para el movimiento, y los insectos fueron atraídos por el suelo húmedo. la mayoría de los insectos permanecieron a niveles de humedad del suelo, muy superiores a la capacidad del campo, pero emigraron a niveles de humedad por debajo del punto de marchitez (Riss et al.,1998).

Para estudios de control biológico, en insectos, se utilizan en algunos casos hongos entomopatógenos que son un amplio grupo de macroorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre esos está la capacidad de

regular las plagas para mantenerlas en niveles adecuados. La determinada presencia de estos presenta mayor utilización para el control biológico de plagas, el mecanismo de acción de estos sobre su hospedero, así como investigaciones realizadas sobre el comportamiento *in vitro* e *in situ* de los hongos de mayor utilización para el control de ciertos insectos. De igual manera, se describe las formulaciones que se utilizan para el desarrollo de esta biotecnología en campo. En el desarrollo de bioplaguicidas, los hongos entomopatógenos son una opción viable para disminuir el detrimento del medio ambiente (Motta- Delgado.P.A., *et al.*, 2011).

### 1.3. GENERALIDADES DEL INSECTO *Cyrtomenus Bergi*

La producción de este rubro (yuca) se concentra mayormente en las provincias de Darién, Chiriquí, Veraguas y Colón.

El comportamiento histórico de este rubro alcanzó su mayor producción en el agrícola 2013-14 con 573 151 quintales y en el año 2014-15, su más baja producción con 248 456 quintales. En este quinquenio a partir del año 2014-15 se incrementó la actividad, no obstante, comparando los dos últimos años, se redujo en 90 280 Q. que representa el 12%, lo que obedece a los problemas planteados que influyeron en los rendimientos promedio ((MIDA), 2016-2017).

El control biológico, como un método artificial 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.

El control de esta plaga por medios químicos no es muy eficiente debido a sus hábitos de adaptación al suelo. El uso del control biológico es una alternativa, el uso de nematodos, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora* y del hongo *Metarhizium anisopliae* han dado buenos resultados (Ceballos *et al.*, 2006).

#### 1.3.1. Clasificación taxonómica del insecto.

Los insectos subterráneos como las chinches excavadoras (Hemíptera: Cydnidae), presentan amplia distribución mundial y polifagia, se alimentan de raíces y frutos presentes en el suelo, convirtiéndose en plagas muy destructivas de los cultivos tropicales (Marrero, *et al.*, 2012).

**Tabla # 1 Clasificación taxonómica de *Cyrtomenus Bergi*.**

Nombre científico <i>Cyrtomenus bergi</i> Froeschner	
<b>Reino:</b>	Animalia
<b>Filo:</b>	Artrópoda
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden:</b>	Hemíptera
<b>Familia:</b>	Cydnidae
<b>Género:</b>	Cyrtomenus

### 1.3.2. Ciclo de vida de *C. Bergi*.

Posee 7 estadios de desarrollo de huevo a adulto, pasando por 5 instares ninfales, se diferencian del adulto por ser el único volador. Todos estos se desarrollan en el suelo, incluyendo cópula y oviposición (Melo et al., 2009).

En estudios de laboratorio se observó que *C. Bergi* pasa por huevo, cinco instares ninfales y adulto. Cuando se alimentó con raíces con bajo contenido de cianuro (HCN) el período de incubación (Bellotti, 2000).

Huevos: son ovalados de aproximadamente 1.35 mm de longitud y 0.9 mm de ancho la superficie es lisa, de color blanco cristalino. Tiene una duración de 11 a 18 días.

Las ninfas: tienen abdomen de color blanco-crema con tintes rosado a café. Presentan 5 estadios ninfales con duración total promedio de 112.2 días.

Adultos: son de color café oscuro a negro brillante y las alas exteriores son coriáceas que no cubren totalmente el abdomen, dejando ver parte de las alas

internas transparentes que sobrepasan el abdomen. Los adultos viven un promedio de 293.4 días, para un ciclo de vida total de 418.2 días en promedio.

Tiene un ciclo de vida más corto y una tasa de oviposición más alta cuando se alimenta de brotes de maíz. Esto indica que *C. Bergi* puede vivir más de un año alimentándose de raíces de yuca (Bellotti, 2000).

En estudios de laboratorio, cuando se alimenta al insecto con raíces de yuca con bajo contenido de cianuro (HCN) el período de incubación promedio de huevo es de 13,5 días, los estados ninfales ocurren en 111,3 días y el promedio de vida del adulto es de 293,4 días. Esto indica que *C. Bergi* puede vivir más de un año alimentándose de estas raíces (Bellotti, 1980).

#### 1.4. MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA DE *C. Bergi*

Es una plaga subterránea que ataca a las raíces por medio de su estilete, con el que perfora la cutícula y la corteza de la raíz, llega hasta el parénquima radical en cuya superficie se pueden observar manchas que corresponden a los sitios donde el insecto se ha alimentado (Herrera, et al., 2001). En las raíces, entre 12 a 24 horas después de alimentarse, resultando en reducción del porcentaje de almidón y serias pérdidas del valor comercial del producto fresco.

Los adultos presentan una coloración negra, miden aproximadamente siete milímetros de longitud, las antenas son filiformes, presentan un par de ojos rojizos y las tibias de las patas están provistas de espinas. Son de movimientos muy rápidos y simulan estar muertos cuando se les molesta. Las ninfas de esta especie son de color blanco cremoso. (Bellotti, 2000).

#### 1.4.1. Distribución geográfica de *C. Bergi*

El chinche fue registrado por primera vez causando daños en la yuca a mediados de 1980 en Caicedonia, al norte del Valle del Cauca y hoy se encuentra en la mayoría de las regiones yuqueras de Colombia.

Su distribución geográfica aún no está bien determinada, habiéndosele encontrado únicamente en países como Cuba, Surinam, Ecuador, Panamá, Colombia, Brasil y Costa Rica (Clavijo 1981; Lacerda 1983; Carballo y Saunders 1990a; Riis 1990; Aguilar et al., 1991).

El movimiento de las plagas dentro de las Américas ha sido extenso, debido a que la yuca se cultiva en casi todos los países tropicales y subtropicales y a que el intercambio de germoplasma entre agricultores ha sido, y continúa siendo una práctica importante de intercambio (Bellotti *et al.*, 1996).

Ensayos hechos en Panamá, localidad de La Asunción, corregimiento de Los Llanos, distrito de Ocú, provincia de Herrera, al evaluar diversos germoplasmas mostraron en toda susceptibilidad el ataque del chinche (Melo *et al.*, 2009).

Por su amplia distribución, presenta daños que implican hasta el 100% de la producción de muchos cultivos, no siendo siempre identificado como el causante de estos males por encontrarse camuflado en el suelo (Bellotti *et al.*, 1996).

#### 1.4.2. Daños causados al cultivo de yuca por *C. Bergi* (*Manihot Esculenta*)

Al inicio, las lesiones presentan tonalidades entre crema y verde amarillento, pero según se desarrollan se tornan pardas, con los bordes oscuros, y pueden medir entre 1-10 mm de longitud por 1-3 mm de ancho. Cuando se funden varias manchas llegan a alcanzar hasta 20 mm de longitud y profundizan entre 5 -7 mm.

Asociados al daño provocado por este chinche, se encuentran algunas especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Diplodia* y *Fusarium*.

El daño lo causan las ninfas y adultos al introducir su estilete en la epidermis y corteza de la raíz, permitiendo la entrada de microorganismos del suelo como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Genicularia*, *Pytium*, *Phytophthora* y *Diplodia* (Treitz, et al., 1979-1980), solo se detecta cuando las raíces son cosechadas y peladas.

La cría de *C. Bergi*, es la vía para la búsqueda de sistemas de biocontrol como es el caso de la *Galleria mellonella*, la cual es utilizada para las pruebas de infección y producción masiva de organismos, como los entomonematodos, que son utilizados para el control biológico de plagas terrestres, como lo es en el caso del *C. Bergi*. Ellos minimizan los impactos generados por plagas en cultivos como el de la yuca, mismos que son de gran importancia para el desarrollo económico de un país y la alimentación enriquecida en proteínas para la humanidad. (COTES RINCÓN, 2012)

## 1.5. DESCRIPCIÓN DEL SUELO

El suelo es un sistema vivo, heterogéneo y dinámico que incluye componentes físicos, químicos, biológicos y sus interacciones. Por lo tanto, para evaluar su calidad resulta necesario la medición y descripción de sus propiedades (Luters. A., et al, 1999).

La calidad del suelo es definida, simplemente, como la “capacidad de funcionar de un específico tipo de suelo”. En general, es evaluada midiendo un grupo mínimo de datos de propiedades del suelo para estimar la capacidad de este, en realizar funciones básicas (por ej. mantener la productividad, regular y separar agua y flujo de solutos, filtrar y tamponar contra contaminantes, y almacenar y reciclar nutrientes). (Luters. A., et al, 1999)

El suelo es muy importante para el ser humano, en cuanto a efectos de la producción agropecuaria, pues su estado determina las actividades por realizar y las acciones correctivas para alcanzar los niveles deseados de rendimiento. Los suelos que se desarrollan bajo una vegetación natural funcionan como sistemas en equilibrio, activos y estables, que además brindan servicios ambientales. (Uribe-Gómez, et al., 2016).

Un manejo adecuado del suelo implica la utilización y preservación de la microflora asociada y de la materia orgánica (MO) que en él se encuentra, con el fin de no deteriorar su capacidad para regular la disponibilidad de micronutrientes (Peirano et al., 1992; Stevenson y Cole, 1999).

Una de las áreas de mayor producción es Ocú, con suelos ultisoles, en su mayoría. No muestran presencia de saturación hídrica; estos presentan vegetación arbórea.

## 1.6. ACTIVIDAD MICROBIANA

La actividad microbiana es importante para mantener la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas. Los microorganismos del suelo conducen la biodegradación de la materia orgánica y constituyen un importante reservorio lábil de C, N y P. (Carballas, et al., 1993).

El interés agronómico en la actividad microbiana se debe a su potencial para reciclar los nutrientes, mejorar la nutrición de las plantas y disminuir o sustituir la aplicación de fertilizantes de origen industrial (Alarcón et al., 2002; Velasco et al., 2001).

La actividad microbiana es regulada por las características físicas y químicas del suelo, por la composición de los materiales orgánicos y por la naturaleza de la comunidad microbiana (Alexander, 1980; Álvarez-Solís y León-Martínez, 1997). Estos factores varían con los cambios en el uso de la tierra (Palm et al., 1996) y con la fertilidad del suelo (Verstraete y Voets, 1977).

Se utilizan algunas técnicas para reflejar la actividad de individuos o grupos de organismos específicos, mientras que otras se refieren a la actividad total de la biota del suelo. Entre las primeras técnicas se encuentra la medición de la actividad de diferentes enzimas en el suelo. La actividad total de la población microbiana del suelo puede determinarse utilizando la técnica de respiración. (Uribe, 1999).

## 1.7. MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD MICROBIANA

El microbiota del suelo desempeña una serie de funciones claves, medioambientales y económicas, que resultan fundamentales para la vida, dentro de las cuales pueden mencionarse: producción, ambiente biótico, almacenamiento de nutrientes y materias primas, control de residuos entre otras. (Van der Heijden *et al.*, 2008., Carme Quezada Tenezaca, 2011).

Los microorganismos interactúan mutuamente con las plantas de manera beneficiosa para la solubilización de nutrientes, fijación del nitrógeno, sustancias generadoras del crecimiento vegetal, son interesantes ejemplos, la misma puede ser neutra o perjudicial. En el último caso, algunos hongos son perjudiciales produciendo enfermedades y la muerte del vegetal (Rodríguez-Echeverría, 2009).

La absorción puede ser directa, a través de las raíces; o indirecta, a través de los microorganismos que forman simbiosis con las raíces (hongos formadores de micorrizas). Estos organismos cohabitan con microorganismos patógenos que atacan a las plantas reduciendo su productividad (Rodríguez-Echeverría, 2009).

### 1.7.1. Hongos Filamentosos

Son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos, que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente (Vargas y Villamizar, 2005). Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por tanto, no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse a partir de la materia orgánica ya elaborada (Arenas, 1993). Asimismo, tienen una pared celular formada por quitina el cual es un compuesto (polisacárido) fuertemente rígido. Por lo anterior, este tipo de microorganismos debe absorber los nutrientes simples y solubles, al contrario de fagocitar los alimentos.

Las esporas son cuerpos resistentes que forman los hongos en estado latente o de reposo, que se producen de dos maneras diferentes; sexual y asexualmente. (Moreno, 2000).

### 1.7.2. *Aspergillus spp*

El género *Aspergillus*, representa un grupo diverso de hongos que se encuentran entre los más abundantes del mundo. Puede reproducirse tanto asexualmente como sexualmente. Para ello se producen conidióforos y ascocarpos que forman conidios y ascosporas, respectivamente. Los *Aspergillus* se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas e incoloras, estructura conidial desarrollada como pedicelos y cabezuelas, cuyo origen son células hifales especializadas de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula del pie (Bonifaz Trujillo, 2012).

El éxito de *Aspergillus*, también se explica por su eficaz dispersión. Las esporas de este género se encuentran entre las estructuras fúngicas más dominantes en el aire y se dispersan en distancias cortas y largas (Bennett 2010).

### 1.7.3. *Penicillium spp*

*Penicillium*, está ampliamente distribuido en la naturaleza y se halla en la vegetación caída, el aire y el suelo. El género *Penicillium* pertenece a la división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales y familia Trichocomaceae.

Macroscópicamente las colonias son normalmente de crecimiento rápido; al principio de color blanco y con el tiempo adquieren color azul, azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados, con reverso amarillo cremoso. La textura puede ser plana, filamentosa, aterciopelada o algodonosa dependiendo de la especie; además puede presentar gotas de exudado.

Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas

sin ramificar de esporas o conidios, formando el penacho o pincel característico del género. (Pitt, 1988; Cepeda, 2010).

#### **1.7.4. *Fusarium spp.***

Comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos hifomicétidos (subdivisión Deuteromicetos, división Eumicota (Navarro, 2013). Pertenece a la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae.

Crece dando una colonia blanca, la cual produce un pigmento de colores que pueden presentar tonalidades rojo, vino, rosados que gradualmente difunde en el medio. El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macro conidios falciformes, con varios septos en los que exhiben una especie de muesca en forma de célula pie, dicha muesca se encuentra en el extremo que se implanta en el esporóforo. Se observan también clamidosporas y micro conidios (Bonifaz Trujillo, 2012).

La taxonomía clásica continúa vigente, aunque requiere de la experiencia del observador. Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macro conidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y a los animales. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, solo 12 de ellas pueden considerarse patógenas para el humano; entre ellas destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*, en orden decreciente de frecuencia.

## 1.8. Hongos biocontroladores

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos.

Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez et al. 2000).

### 1.8.1. *Metarhizium anisopliae*,

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con este se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas posinoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas posinoculación (Vicentini y Magalhaes, 1996).

En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula.

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-

hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextrinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003).

### 1.8.2. *Beauveria bassiana*

Los hongos como *Beauveria bassiana* que pueden causar enfermedades en los insectos, son llamados entomopatógenos. Viven naturalmente en el ambiente, suelos o en agua, como también alojados en los mismos cuerpos de los insectos, causando su muerte en un plazo aproximado de cinco a siete días; con la posibilidad de propagar la enfermedad a otros insectos bajo condiciones favorables de temperatura y humedad. (Chiriboga P. *et al.*, 2015).

Es un hongo deuteromicetes que en medio de cultivo específico (PDA), crece formando una estructura algodonosa y polvosa de color blanco, conocida como muscardina blanca. Cuando la colonia va envejeciendo se vuelve crema amarillenta.

El revés es de color rojizo en el centro cuando está en crecimiento y amarillo alrededor (Chiriboga P. *et al.*, 2015).

### 1.9. Preservación en glicerol y agua estéril

Los hongos se almacenaron en glicerol al 30%. Se realizó una suspensión para cada hongo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de esporas, (suficientes para contarlas).

Se colocaron en un plato Petri los aislamientos hasta que se cubriera en su totalidad el recipiente. Luego se le añadió 2 ml de agua estéril y se procedió a frotar la superficie del plato para levantar la mayor cantidad de esporas.

Para cada aislamiento se tomaron dos crio viales, en uno se añadió 10  $\mu$ l de la suspensión de esporas + 990  $\mu$ l de agua estéril para efectuar una dilución 1/100 y realizar el procedimiento, sobre el cual se colocó el conteo de esporas. En otro crio vial se agregó 700  $\mu$ l de la suspensión de esporas + 300  $\mu$ l de glicerol, y se agitó por 1 min, para luego almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## CAPÍTULO II

## 2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 2.1. MATERIALES

#### ➤ **Equipo de laboratorio**

- Balanza analítica.
- Refrigeradora
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar.
- Autoclave

#### ➤ **Cristalería**

- Frascos de vidrio (500 ml).
- Pipetas (1y 10 ml)
- Propipetas
- Probetas (100 ml)
- Erlenmeyer (125 ml)
- Platos Petri (25ml).
- Cubre y porta objetos.
- Viales (20 ml)
- Bureta (50 ml)
- Frasco de vidrio de boca ancha con cierre hermético.
- Tubos pequeños con tapa rosca.

#### ➤ **Reactivos**

- Ácido clorhídrico (HCl 0.01M)
- Cloruro de bario Anhidro (BaCl<sub>2</sub> 20%).
- Azul Bromotimol 1%
- Glicerol al 100%
- Metanol
- 2, 3,5-trifeniltetrazolium (TTC)
- Alcohol al 95%
- Solución de Hidróxido de sodio (0.01M).
- Azul de lactofenol.

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Localización Geográfica

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada (LAMEXA), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, entre los meses de abril de 2018 a junio de 2019.

Las muestras utilizadas fueron colectadas de la raíz de la yuca (*Manihot Esculenta*), en dos fincas la primera es La Menchaca – Ocú, la segunda, una finca totalmente Agroecológica certificada orgánica (Los Torres de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé). Se tomaron muestras de la yuca específicamente de la lesión donde el chinche introduce su estilete en la epidermis y corteza de la raíz.

Las raíces se recolectaron en los meses de abril y mayo, estas fueron colectadas en bolsas plásticas estériles transportadas al Laboratorio de Microbiología Aplicada (LAMEXA) de la Universidad de Panamá.

### 2.2.2. Coordenadas de los sitios muestreados.

**Tabla 2.** Coordenadas de los sitios de muestreo en los distritos de Antón y Ocú.

N° de muestra	Lugar de muestreo	Latitud	longitud
R1	Menchaca – Ocú,	7.86667	-80.7667
R2 Antón	Cabuya (Los torres)	8.56667	-80.3667

- **Menchaca** es un corregimiento del distrito de Ocú en la provincia de Herrera, República de Panamá. Herrera tiene una extensión de 2.340,7 km<sup>2</sup>, que equivale al 3% del territorio panameño, por lo que es la provincia más pequeña del país. Se localiza en la parte norte de la península de Azuero. Con coordenadas geográficas 7°57'39" N 80°25'46" O

El clima, con parte de la serranía de Azuero en la zona occidental de la provincia. La provincia se sitúa a sotavento de los vientos alisios, por lo que el clima en la provincia es tropical, seco o de sabana, que en la clasificación climática de Köppen se identifica como Awi. Así, en la zona oriental, que forma parte de las llanuras litorales del golfo de Panamá, se encuentra bosque seco premontano, bosque húmedo premontano y bosque seco tropical. En las tierras elevadas del oeste hay microclimas con otro entorno ambiental, como en el caso de la reserva forestal del Montuoso en los límites con Quebró.

La temporada seca se da entre finales de noviembre e inicios de mayo, y la temporada lluviosa se extiende el resto del año. Al estar localizada en la zona tropical, la diferenciación entre estaciones puede ser incierta, con temperaturas que varían entre los 23 °C y los 32 °C.

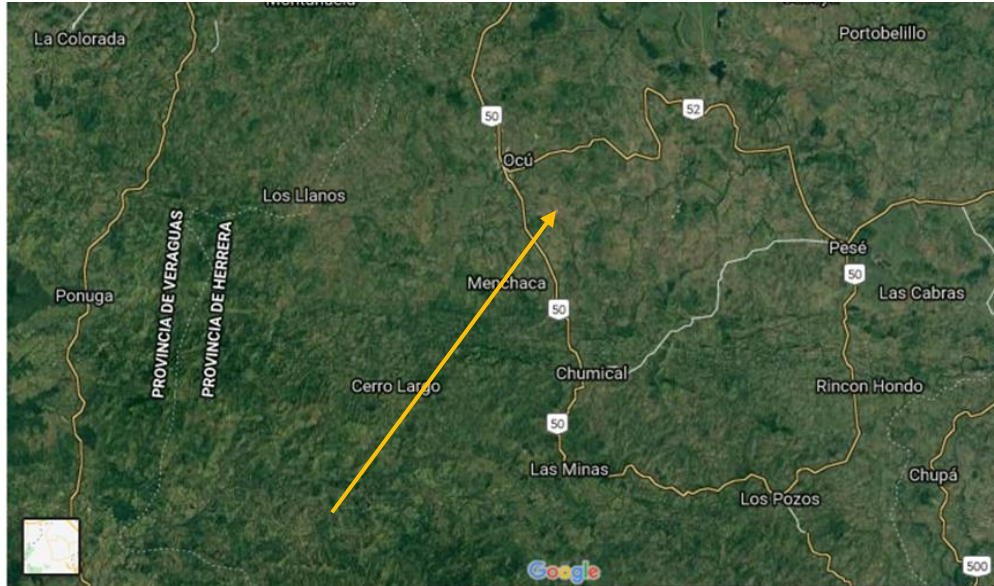
- **El distrito de Antón Cabuya, Los Torres.**

Esta finca se caracteriza por no utilizar agroquímicos, ni abonos artificiales por más de 20 años (certificación Biolatina 2018).

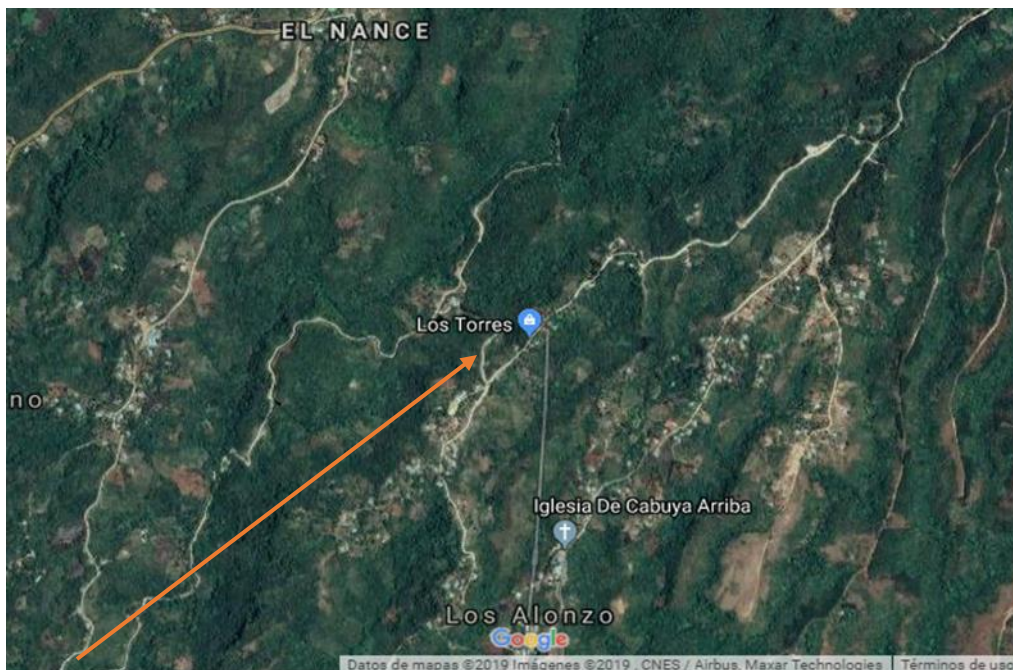
El distrito de Antón está ubicado a 87 m. sobre el nivel del mar, a 150 km de la ciudad de Panamá, la capital de la república y sus coordenadas geográficas son: 8° 31' 18" N y 80° 21' 33" W. La finca Los Torres (lugar de muestreo), está ubicada a una latitud de 8.56667 y longitud de -80.3667

El clima que presenta corresponde al clima tropical de Sabana, sujeto a sistemas atmosféricos predominantes para la vertiente central de Panamá y las condiciones climáticas regionales que moldean los regímenes pluviales de la zona. Las temperaturas oscilan entre los 25 a 27 °C, la precipitación media anual es de 3,000-2,000 mm (Contraloría de la República de Panamá, 2012).

Ilustración 1 Ubicación Geográfica de los sitios de muestreo.



**Figura 1.** Lugar de toma de muestras del cultivo de yuca en Menchaca, Ocú en Herrera (Google. sites2019).



**Figura 2.** Lugar de toma de muestras del cultivo de yuca en Cabuya el área, de Los Torres, Antón. Localización geográfica de la finca experimental Nueva Esperanza (provincia de Coclé). (Google. sites2018)

### 2.2.3 Toma de muestra

### 2.2.4 Recolección de la muestra:

Se tomaron aleatoriamente, dos muestras de yuca (*Manihot Esculenta*), las mismas son de dos fincas diferentes. Las muestras utilizadas, fueron colectadas de la raíz de la yuca, la primera es de la finca La Menchaca – Ocú y la segunda es de una finca totalmente agroecológica certificada orgánica (Los Torres de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé).

### 2.2.5 Preparación de los medios de cultivos

Se utilizó el medio de cultivo, PDA agar papa dextrosa (hongos), preparándose según las instrucciones del fabricante (ALPHA biosciences, Inc.).

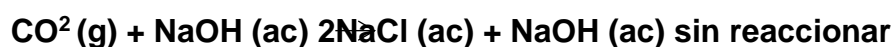
De las muestras obtenidas recolectadas de la lesión de la yuca, se tomó aproximadamente 25 g de la yuca, la misma se diluyó en 50 ml de agua peptonada, por lo que se procedió a realizar diluciones seriadas, tomando así, las últimas diluciones. Se sembró en platos de PDA (medio para hongos) para así obtener los hongos que se procedieron a utilizar para este ensayo.

## 3. Respiración Microbiana.

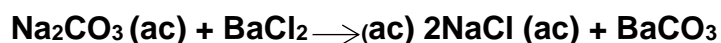
Para esta prueba se determinará, mediante el método de Anderson (1982), la muestra de suelo que debe estar seca a temperatura ambiente y pulverizada, evitando que tenga residuos ajenos a esta. Se hará el montaje de cada una de las muestras, el cual consiste en utilizar frascos de vidrio con boca ancha y cierre hermético. En estos se introducirá 25g de suelo. En un envase plástico más pequeño, se colocará 10ml de NaOH 0.1M y en otro envase 10 ml de agua destilada. Estos se pondrán dentro del frasco de vidrio que contiene el suelo y este se humedecerá con ayuda de un gotero. De la misma manera se montará en otro frasco de vidrio con NaOH, pero sin suelo (blanco). Todas incubadas en la oscuridad.

Posteriormente los días 1º, 2º, 4º, 7º, y 10º de la incubación, se procederá a titular, se tomará 2ml de cada tratamiento de NaOH 0.1M del frasco de vidrio y se agregará agua destilada (1-2ml aproximadamente), 1ml de BaCl<sub>2</sub> al 20% y azul de timol al 1% como indicador, titulando con HCl 0.1 M presente en una bureta hasta que cambie de color, se procederá a anotar. Lo mismo se hará con el tratamiento control.

La solución a la cual estuvo expuesta el suelo se le valoró la concentración de CO<sub>2</sub> capturado. Se procedió a tomar 2ml de cada tratamiento, agregándole agua destilada (1-2 ml aproximadamente) continuando con la siguiente reacción:



Previo a la titulación, se le añadió 6 ml de BaCl<sub>2</sub> al 20%, para que los carbonatos que se formaron se precipitaran en forma de BaCO<sub>3</sub> como muestra la siguiente reacción:



Esta técnica implicó calcular la cantidad de NaOH que queda, sin reaccionar en el proceso de respiración (exceso), valorándolo con HCl 0.1 Ml en una bureta, utilizando, además, azul de timol 1% como indicador, el CO<sub>2</sub> emitido por el suelo, se calculó la diferencia entre el valor de titulación de un blanco sin suelo (NaOH) y el de cada muestra expuesta a la actividad microbiana (NaOH+ CO<sub>2</sub> (suelo)).

La cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido de la mineralización se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CO}_2 = (\text{B}-\text{M}) \times \text{NHCL} \times \text{Peq} \times \text{A} \times 100 / [25(\text{ss}/\text{sh})]$$

Donde:

- ✓ CO<sub>2</sub>= mg CO<sub>2</sub>. 100g-l de suelo seco a 105°C
- ✓ B= volumen de HCl consumido por el blanco.
- ✓ M= volumen de HCL consumido por la muestra.
- ✓ NHCl = concentración o normalidad exacta del ácido clorhídrico.
- ✓ Peq = peso equivalente de CO<sub>2</sub> emitido (44/2).

- ✓ A= Alícuota de la muestra expuesta al suelo (10/2).
- ✓ Ss/sh=relación de suelo seco a 105°C y suelo húmedo (en gramos).

La determinación de la “cinética de la mineralización del carbono” se realizó a través de la velocidad a la que se redujo la proporción del carbono residual durante los 10 días de incubación; la cual sigue, una cinética de primer orden. De la misma manera, se calculó el coeficiente de mineralización, que es la proporción estimada de CO<sub>2</sub> en función del C- total del suelo (%), y el cociente metabólico o índice de CO<sub>2</sub> (µg. mg-1 h-1), o la cantidad de la actividad respiratoria en el suelo por hora (µg C- CO<sub>2</sub>. h-1) relativa al C - biomasa microbiana presente (mg C- biomasa).

#### 4. Actividad de la deshidrogenasa

La determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH) en los suelos, está relacionada con el contenido de materia orgánica (MO) y puede ser usado como indicador biológico, índice de Actividad Microbiológica (IAM).

Se utilizó el método de Casida (1964) en donde paralelamente de los suelos procedentes de cada una de las muestras tomadas de la raíz de la yuca, se realizará la actividad enzimática de la deshidrogenasa con el objetivo de determinar la actividad microbiana.

Se colocarán 6 g. de cada muestra de suelo húmedo en tubos de ensayo al cual se le agregará alrededor de 50 mg. de glucosa a cada uno, para acelerar el proceso de activación de los microorganismos, luego se añadirá 2 ml de agua destilada más 1 ml de 2, 3,5- trifeniltetrazolium cloruro (TTC) al 3% (Casida., *et al*, 1964).

La mezcla se homogenizará con ayuda del vórtex, hasta tener una consistencia lodosa. Los tubos serán cubiertos con papel aluminio e incubados en la oscuridad a 28°C por 8 días.

Después de 8 días de incubación, a cada tubo se le agregará 25 ml de metanol, se homogenizará la muestra y se dejará reposar hasta que se precipite el suelo.

Posteriormente se filtrará el sobrenadante con el sistema de filtrado al vacío; el filtrado se colocará en un matraz volumétrico de 50ml hasta obtener un volumen de 25ml.

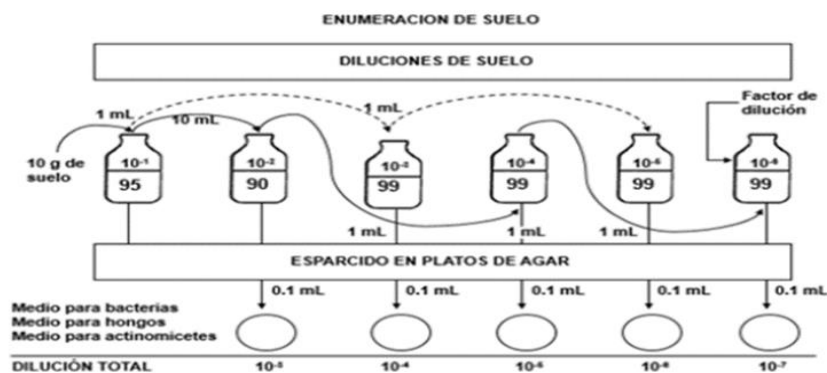
Para calibrar el espectrofotómetro se utilizará un blanco, el cual contendrá 2ml de agua, 1ml. de TTC y 25 ml de etanol. Se concluirá con la lectura de la absorbancia de cada una de las muestras a (A485 nm. y 100 % de transmisión).

## 5. Aislamiento de los hongos.

Una vez recolectadas las muestras de yuca, se procedió a extraer la parte lesionada de la raíz. Para este proceso se pesaron 25 gramos (g) de cada una de las muestras, luego se diluyó en 50ml de agua peptonada, y se agitó vigorosamente.

Posteriormente se realizó una dilución seriada de la cual se tomó 1 ml de la muestra del tubo madre y se procedió a diluir en tubos de ensayo con 9ml. de agua peptonada a cada uno. Se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ). Luego se tomaron 30 $\mu$ L de cada una de las diluciones, se sembraron en medio PDA y luego se incubaron a temperatura ambiente por cinco días.

Después de los cinco días se procedió a verificar el crecimiento del hongo, su uniformidad, color, entre otros; para su identificación.



**Figura 3.** Esquema utilizado para la dilución seriada de suelo. Fuente: Hernández, B.; Cornejo, H.; F. Mejía. 2016. Manual de laboratorio del Curso de Microbiología Ambiental de suelos (Bio. 439).

## 5.1. Técnica para micro cultivo en hongos

### 5.2. El micro cultivo

Procedimiento que permite la observación e identificación de las estructuras microscópicas de hongos filamentosos, que se distinguen con facilidad sin distorsión, alteración o rompimiento de estas. Esto pasa cuando el hongo se desarrolla directamente bajo el portaobjeto.

Este proceso forma parte de las pruebas para identificar el género y la especie de los hongos, permiten hacer el seguimiento del desarrollo de estos.

A los hongos escogidos al azar, que utilizaron para el ensayo, se les realizó la prueba del micro cultivo. Esta consiste en cortar en cuadros pequeños el medio utilizado para el hongo, en este caso fue PDA en 0.5 cm. Con la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos. Luego se sembró el hongo con la espátula en las cuatro esquinas y en el centro del bloque de agar. Colocándose el cubreobjetos sobre el bloque de agar PDA. Se generó una cámara húmeda dentro del plato Petri con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo, y se incubó a 28 °C. Después de 7 días se desprendió el portaobjeto y se le colocó una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio (40X y 100X) para observación de estructuras reproductivas (Casa, 1989; Arenas, 2003).

#### Tinción de azul de lactofenol

Es una tinción simple (un solo colorante) y como tal está basada en la afinidad de colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas. El azul de lactofenol tiene tres características que lo hacen especial para observar dichas estructuras en los hongos del tipo moho obtenidos en los cultivos por aislamiento.

### 5.3. Caracterización de morfo tipos (micro cultivo).

De acuerdo con Arenas, 1993, el método de micro cultivo es el más preciso ya que permite observar las estructuras *in situ*.

Esta técnica se utiliza para detectar el tipo de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. También se describirán las características de las hifas. (Grant, & Long, 2017).

1. Se tomaron seis hongos aislados a los cuales se les realizó la prueba de micro cultivo.
2. Se utilizó un plato Petri con PDA estéril (medio utilizado para crecimiento de hongos filamentosos), los mismos fueron cortados con una hoja de bisturí en cuadrados de agar de 0,5 cm .
3. Sobre un segundo plato Petri estéril, se colocó un papel de filtro y dos palitos cortados de un tamaño tal, como para encajar en el plato Petri y sobre los mismos se colocó un portaobjetos estéril.
4. Con ayuda de un gancho o pinza estéril, se colocó el bloque de agar en la superficie del portaobjeto.
5. Con el gancho estéril se removieron porciones pequeñas de la colonia de hongos que se desea estudiar y se inoculan los cuadrantes del bloque de agar.
6. Luego de la inoculación, se colocó un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar y papel filtro estéril en el período de incubación.
7. Se generó una cámara húmeda dentro del plato Petri, con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo, y se incubó a 28 °C .
8. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjetos. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado.
9. Después de 7 días se desprendió el portaobjeto y se le colocó una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio (40X y 100X) para observación de estructuras reproductivas (Casa, 1989; Arenas, 2003).

#### 5.4. Aislamiento

Para el aislamiento de los hongos es necesario tomar en cuenta varios puntos para su correcto proceso.

- Aislar el hongo
- La toma de la muestra
- Manipulación
- Transporte
- Procesamiento y siembra para el estudio microbiológico del mismo.

El aislamiento de los patógenos, de cualquier tejido vegetal enfermo que se encuentre en contacto con el suelo, presenta una serie de problemas adicionales que ocasionan numerosos organismos saprófitos que invaden el tejido después de que ha sido destruido por el patógeno.

Para aislar los microorganismos han de ser diluidos, debido al gran número en que normalmente están presentes. La dilución se realiza, normalmente, por uno de los siguientes sistemas:

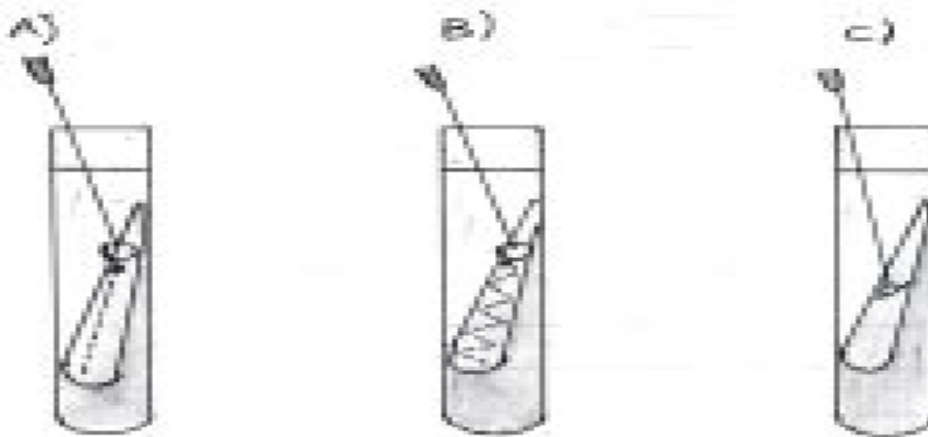
La suspensión concentrada de microorganismos que es realizada por medio de diluciones seriadas. Este método permite que el microorganismo a estudiar sea diluido de una concentración mayor a una menor, para obtener por medio de estriado, en el plato Petri, un cultivo puro de un microorganismo que se desea estudiar. se debe inocular o introducir, en un medio sólido previamente esterilizado; en este caso el hongo, para luego ser identificado.

Una vez obtenido el hongo, se debe aislar en tubos estériles con su medio, en este caso el medio utilizado es Agar de Dextrosa y Papa (PDA).

### 5.5. Tubos inclinados (preservación a corto plazo).

Al iniciar en el hongo que ha sido aislado y purificado, es necesario guardarlo para su posterior uso. Para ello, existen varios métodos de preservación que dependen del número de cultivos a guardar, y del tiempo.

La preservación de hongos tiene como objetivos fundamentales: mantener el cultivo puro (pureza), que esté vivo (viabilidad) y genéticamente estable (estabilidad).



**Figura 4. Esquema de preservación de bacterias en tubos inclinados.**

Fuente: Rangel Osorio Hugo, 2014. Manual de técnicas y métodos de preservación

Este esquema es utilizado para bacterias, pero tiene la misma función para hongos, por lo que se necesitó obtener una muestra pura del hongo a estudiar por medio de varios pases, ya obtenido este, se tomó una pequeña muestra del centro de este, dónde se sembró, se hace una leve inclinación para colocar la muestra en el tubo y se flamea o esteriliza el mismo para cerrar el tubo. Este proceso se utiliza para preservar hongos por un lapso más largo, si más adelante se desea obtener más estudios.

## 6. Obtención del insecto

El chinche *C. Bergi* es una plaga chupadora y cavadora polífaga, que ha sido reportada haciendo daño en cultivos de yuca.

Este se obtiene con más facilidad en épocas de lluvia, se encuentra en la raíz de la yuca, sobre las hojas, e incluso, alrededor de la planta, ya que el suelo húmedo proporciona las condiciones favorables para el mismo, esto hace que el chinche se mantenga en la superficie.

En temporada seca es más difícil capturarlo, ya que se interna en lugares más húmedos por lo que se encuentra a profundidades más distantes de la raíz, y obtenerlo se hace complicado. En este ensayo se utilizó el chinche *C. Bergi* en estadio adulto.

Se debe crear las condiciones necesarias en el laboratorio a fin reproducir el ambiente esencial de vida de este insecto, para poder realizar, posteriormente, las pruebas de actividad biológica, utilizando hongos extraídos de la fuente suministrada, en este caso, la yuca.

## 7. Método de aplicación de los hongos contra el insecto

Se procedió a colocar los chinches en una caja con ventilación (mallas de ventilación), con suelo procedente de la zona de su aislamiento (manteniendo su humedad), este sustrato está estéril y se le agregó restos de yuca como alimento para el insecto, de manera que mantenga su viabilidad y no se vea interrumpido su ciclo biológico.

El método de aplicación de los hongos consiste en la aspersión, que es la dilución de los hongos obtenidos de la yuca y el tveent a -20% al 0.05 µl diluido en 50 ml de agua destilada cada uno en platos Petri, se toma al chinche que está con su sustrato (suelo estéril), se agarró con una pinza estéril, y se sumergió de manera rápida, para luego colocarlos en platos con sustratos estériles, debidamente rotulados. A estos se les colocaron mallas para evitar que se salgan de los recipientes, antes mencionados.

Se realizaron observaciones periódicas por día, para verificar la viabilidad de los chinches y la capacidad entomopatógena de los aislamientos fúngicos.

## 8. Pruebas de actividad biológica con el chinche *C. Bergi*.

Estas pruebas son utilizadas para control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

En este caso se busca minimizar el impacto que produce el chinche de la viruela a la yuca, por lo que se realizó este experimento que lleva a corroborar, si uno de los hongos aislados puede dar positivo a esta prueba, lo que indicó que se puede, a futuro, realizar experimentos que busquen mejorar el rendimiento económico y el estado físico de la raíz.

## 8.1. Cámara Neubauer

Hematímetro o hemo citómetro, es un instrumento de laboratorio que consiste en una placa de vidrio especial grueso. Esta cámara sirve para realizar recuentos de algunos tipos celulares como hematíes, glóbulos blancos y plaquetas, aunque puede ser usado para recuento de esporas, parásitos, etc.

La cámara Neubauer fue utilizada para el conteo de esporas, en este caso, el de los hongos aislados de la yuca lesionada por el chinche *C. Bergi*, las mismas son contadas por cuadrantes con una medición de 0.1 mm de profundidad y cinco cuadrantes medios que corresponden a 0.2 mm . Para realizar el conteo se toman las esporas más definidas, o solas de cada cuadrante, este a su vez se divide por 0.02 mm que es la multiplicación de la profundidad por los cuadrantes, y el valor obtenido es la cantidad de esporas por 20 µl de la dilución, nos da la cantidad de esporas obtenidas de cada hongo aislado.

En este proceso, las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido.

La preparación de la muestra a medir se realizó por medio de un raspado del hongo obtenido, ya aislado a una concentración apta para su recuento, la fórmula utilizada es:

### Fórmula de valoración (válida universalmente)

$$\text{partículas por } \mu\text{l volumen} = \frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}$$

## 9. DESARROLLO DE ENSAYO DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. Por lo que es necesario establecer la causalidad del hongo, como responsable de la micosis, en el tejido de la planta. (Grant y Long, 2017).

1. Se localizó la lesión en la raíz de la yuca, luego se aisló la parte afectada para corroborar afectación a la misma, por lo que se confirmó la lesión o enfermedad, si esta se produjo sola, o si hay un agente causal que permite que la planta presente irregularidades en su estructura.
2. El microorganismo estudiado en este ensayo fue la lesión en la yuca, generada por la entrada del estilete del chinche *Cyrtomenus Bergi*, por lo que se tomó una muestra de este, se diluyó por el **método de dilución seriada**, para luego ser aislado y obtener un cultivo puro.
3. Al obtener el cultivo puro, se procedió a identificar el hongo por medio de pruebas de micro cultivo. Esta técnica es utilizada para detectar el tipo de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, y la tinción con lactofenol que es empleada para identificar hongos. Los componentes de este tinte buscan estructuras definidas, en este caso, las fúngicas.
4. Después de ser identificado cada hongo aislado, se procedió a realizar las pruebas de actividad biológica.
5. La prueba de actividad biológica consiste en permitir una evaluación más centrada y focalizada del riesgo a tratar, y combatir la plaga de este, buscando alternativas que mejoren e inhiban el crecimiento del patógeno en la planta.

6. Una vez realizada la prueba de actividad biológica que consistió en sumergir al chinche en una solución Tween -20% a 0.05  $\mu$ l diluido en 50 ml de agua destilada, con el hongo seleccionado y diluido por medio de raspado.
7. Luego de haber pasado los chinches por las diluciones, estos fueron colocados en platos estériles con su sustrato (suelo), y así estos fueron monitoreados por día y verificados para confirmar la presencia de hongos entomopatógenos contra el chinche *C. Bergi*.

## 10. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los hongos entomopatógenos (HEP) constituyen actualmente una alternativa para el control de insectos transmisores de enfermedades, frente al uso indiscriminado de insecticidas (Pucheta et al. 2006).

Para la identificación del hongo, hay muchas claves disponibles y diferentes, utilizadas para clasificarlos, según Arenas (2014), se utilizan criterios morfológicos y características como las estructuras fúngicas, que constan de un complejo llamado talo o macelo que, a su vez, está constituido por múltiples filamentos o hifas. Otra característica, son las esporas que se producen de dos estructuras reproductivas, sexuales y asexuales, sin necesidad de tener en cuenta aspectos bioquímicos y fisiológicos, excepto en levaduras, donde sí son importante. Actualmente las técnicas moleculares han permitido mejorar la clasificación de los hongos y las relaciones filogenéticas.

Varios métodos de control son utilizados para minimizar las pérdidas ocasionadas por acción de la plaga, como el control cultural, por medio de la rotación de cultivos y de la siembra de variedades resistentes; además de estos, la actividad biológica utilizando hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. (Zúñiga Oviedo, et al., 2016).

La necesidad de adoptar nuevas tecnologías para el control de plagas ha orientado las investigaciones hacia el uso de bioinsecticidas que, actuando de manera similar a los plaguicidas convencionales, no ocasionan problemas como la resurgencia de plagas, la inducción de nuevas plagas y la contaminación del medio ambiente, entre otras. (CABRERA & PINEDO, 1994; ESTRADA et al., 2004; BADII et al., 2006; CRANSHAW, 2014).

En este proyecto se tomaron cinco hongos, entre ellos, dos son de las fincas muestreadas, y los tres restantes son de los chinches infectados por hongos en el sitio del muestreo. Se obtuvo una diferencia significativa en la muestra CH5 (Chinche de la muestra 5), hongo obtenido de chinches muertos infectados de hongos del suelo, por lo que se observó en los ensayos que este hongo infectaba

al patógeno, cubriéndolo con esporas hasta que este fallece. Este hongo representó mayor actividad biológica que los demás, ya que, los chinches morían en menor tiempo. *Estos resultados pueden tomarse en cuenta* para utilizarlo a futuro como prueba para métodos de control ecológico u orgánico, como la actividad biológica, mediante trabajos de investigación.

Estos hongos utilizados en este ensayo, encontrados en las muestras, son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, de los cuales fueron identificados por su morfología, por lo que se necesitó consultar con claves, para describirlos.

#### 10.1. Preservación de microorganismos en Glicerol.

En cuanto a los hongos puros que permanecían en tubos inclinados, se pusieron a crecer en platos Petri, de los pequeños, por ocho días. En un tubo esterilizado previamente, se le agregó 300 µl de glicerol estéril con ayuda de una micropipeta. Al plato Petri, donde se encontraba el hongo, se le agregó 1400 µL de agua estéril. Luego se tomó 700 µl de la suspensión de esporas de esta muestra y se añadió al tubo que contenía los 300 µl de glicerol, para homogenizarlo un minuto en el vórtex, luego fue congelado a temperatura de -80°C

## CAPÍTULO III

## 11. RESULTADOS

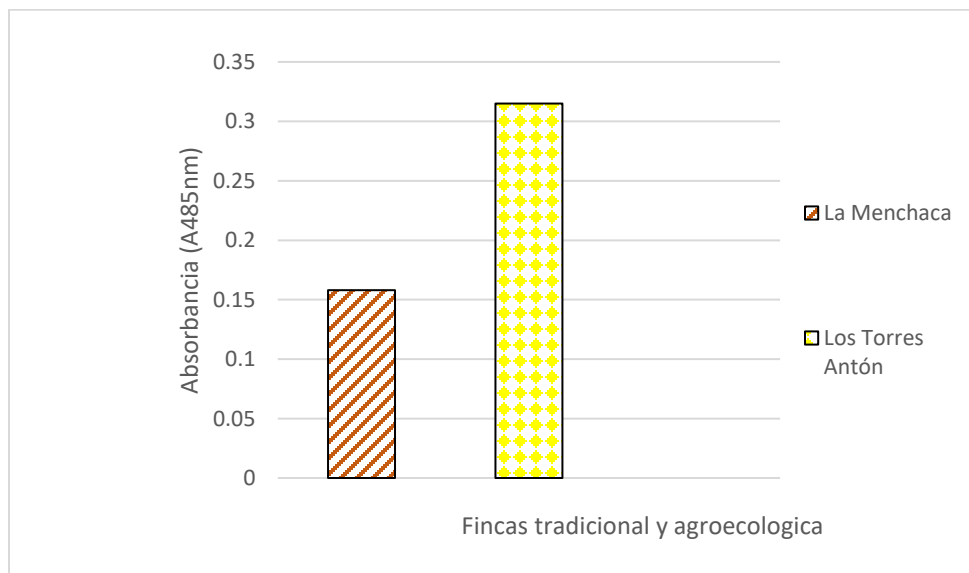
- 11.1. Respiración microbiana en los suelos en los cultivos de yuca en dos fincas
- 11.2. Actividad deshidrogenasa en suelos de dos fincas de yuca

El ensayo realizado, para evaluar el efecto de la actividad de la enzima deshidrogenasa en las muestras de suelo de cada una de las fincas de yuca, dio como resultado:

**Tabla 3. Valores de Absorbancia (A485nm) de las muestras de suelo.**

Sitio	Absorbancia (A485nm)	X= $\mu\text{g ml}^{-1}$ TPF
La Menchaca	0.158	3.69
Los Torres Antón	0.315	7.44

Según resultados, Los Torres en Antón, finca agroecológica es la que muestra que presentó mayor valor de absorbancia, y La Menchaca la de menor absorbancia, con respecto a las muestras evaluadas.




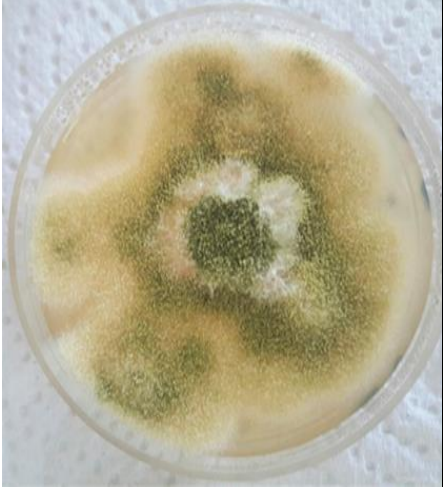

**Figura 5.** Valores de la actividad deshidrogenasa en los suelos de los cultivos de la yuca en dos fincas, La Menchaca y Los torres.


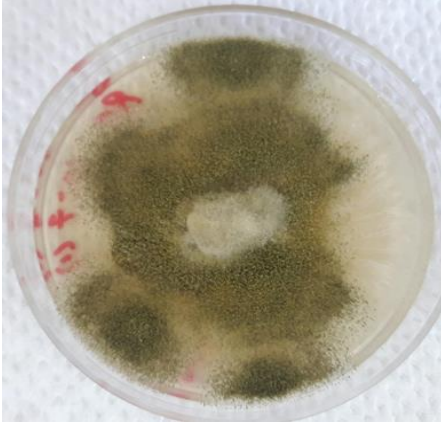
## Características macroscópicas

El examen macroscópico se realiza a partir de una “macro colonia”, obtenida por sembrado de la especie fúngica, en estudio en la parte central de una placa con medio de cultivo. Esta permite observar forma, textura, color, pigmentación, entre otros; que permiten obtener más información del hongo (Grant y Long,2017).

SIGLAS	Hongos filamentosos	Lugar de muestreos
R1	<i>Penicillium sp.</i>	FMO
R2	<i>Aspergillus sp.</i>	FLT
CH2	<i>Fusarium sp.</i>	FMO
CH5	<i>Aspergillus sp.</i>	FMO
CH6	<i>Aspergillus sp.</i>	FMO.

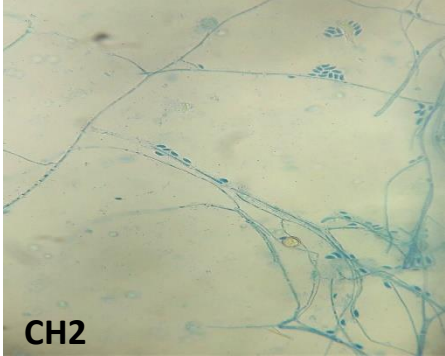
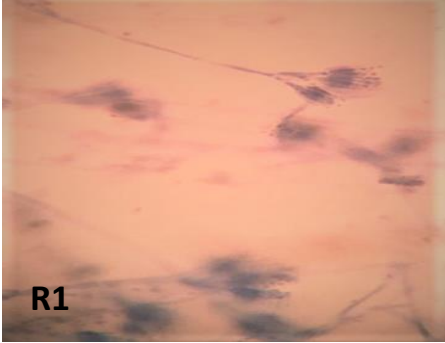
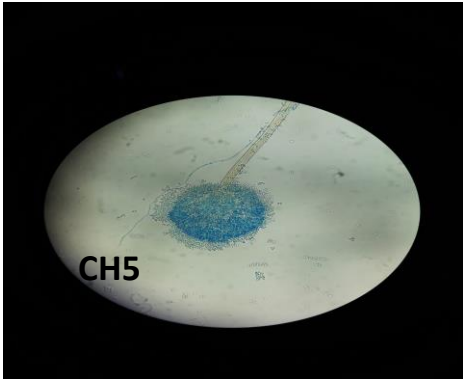

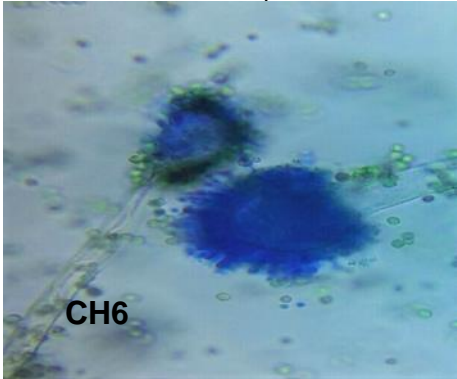
**Tabla # 4.** Hongos Filamentosos encontrados en las muestras de Yuca y el chinche *C. Bergi* por lugar de muestreo (finca tradicional La Menchaca – Ocú (FMO), y finca agroecológica, Los Torres-Antón (FLT)).

Tabla 5. Descripción macroscópica de los Hongos Filamentosos SISTEMA TRADICIONAL FINCAS DE OCÚ			
N° DE PLATO	HONGO FILAMENTOSO	GÉNERO	CARACTERÍSTICAS ACROSCÓPICAS (ANVERSO)
1.  CH2		<i>Fusarium sp.</i>	Colonia con crecimiento rápido, de color blanco alrededor, hacia el centro una textura rugosa de color amarilla. Forma y textura algodonosa densa.
2  CH6			Colonias de bordes redondeados suave, superficie aterciopelada, de color blanco con el centro ligeramente de color verde con blanco. De crecimiento rápido.
3  CH5		<i>Aspergillus sp.</i>	Colonias de bordes irregulares suave, superficie de color amarillento con los bordes ligeramente de color blanco. De crecimiento rápido. Pulverulento.

SISTEMA AGROECOLÓGICO			
N° DE PLATO	HONGO FILAMENTOSO	GÉNERO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS (ANVERSO)
4.  RI		<i>Penicillium sp.</i>	Colonia de margen redondeado suave, borde blanco con un aro de color verde claro, presenta hacia el centro un color blanco con verde, con moderado crecimiento y textura un poco algodonosa.
5.  R2		<i>Aspergillus sp.</i>	Colonias con crecimiento rápido de 3 a 4 días, son de color verde, blanco, amarillo alrededor, con bordes irregulares granulados y pulverulenta.

## **Características microscópicas**

En esta técnica se hicieron placas de cada aislamiento para la observación de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. y se le aplicó la técnica de tinción con azul de lactofenol. Algunas cepas mostraron un escaso crecimiento.

Técnica de micro cultivos	
 <p>CH2 <i>Fusarium sp.</i></p>	 <p>R1 <i>Penicillium sp.</i></p>
 <p>CH5 <i>Aspergillus sp.</i></p>	 <p>R2 <i>Aspergillus sp.</i></p>
 <p>CH6 <i>Aspergillus sp.</i></p>	

**Figura 7.** Observaciones microscópicas de *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, obtenida de la técnica de micro cultivo (objetivo de 40x).

Fuente. Cámara de Samsung J7.

### 11.3. Conteo de esporas con la cámara Neubauer

Al observar la tabla 7 se muestran diferencias en cuanto a las cantidades de esporas encontradas y contadas en la cámara, siendo los géneros más prevalentes *Aspergillus Penicillium* y *Fusarium*. Los resultados obtenidos indican que el género con mayor cantidad de esporas es *Penicillium* con 823 000 esporas / 20 µl obtenido en La Menchaca-Ocú, de la raíz de la yuca, seguido de *Aspergillus* con 561,000 esporas / 20 µl de La Menchaca-Ocú, este fue obtenido de los chinches infectados del suelo. Siendo este último hongo el que dio mayor actividad biológica contra el chinche *Cyrtomenus Bergi*.

Hongos aislados	Conteo con la cámara neubauer	Fincas
<i>Fusarium sp</i>	285 000 esporas/20 µl	Menchaca-Ocú
<i>Aspergillus sp</i>	561 000 esporas / 20 µl	Menchaca-Ocú
<i>Aspergillus sp</i>	465 000 esporas / 20 µl	Menchaca-Ocú
<i>Penicillium sp</i>	823 000 esporas / 20 µl	Menchaca-Ocú
<i>Aspergillus sp</i>	123 980 esporas / 20 µl	Los Torres-Antón.

**Tabla 7** conteo de esporas de la cámara Neubauer de los hongos aislados.

La cantidad de esporas por 20 µl de la dilución nos dio el valor obtenido en la cantidad de estas, cada hongo aislado. Este método microscópico fue de gran ventaja ya que, puede brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados en este ensayo. Se observó por cuadrantes en la cámara Neubauer, al microscopio, las esporas de forma circular, tomando en cuenta que estas estuvieran separadas. De esta forma se visualizaron con más claridad, no se tomó en cuenta aquellas esporas que estaban en racimos, ya que era más difícil contarlas o estimarlas.

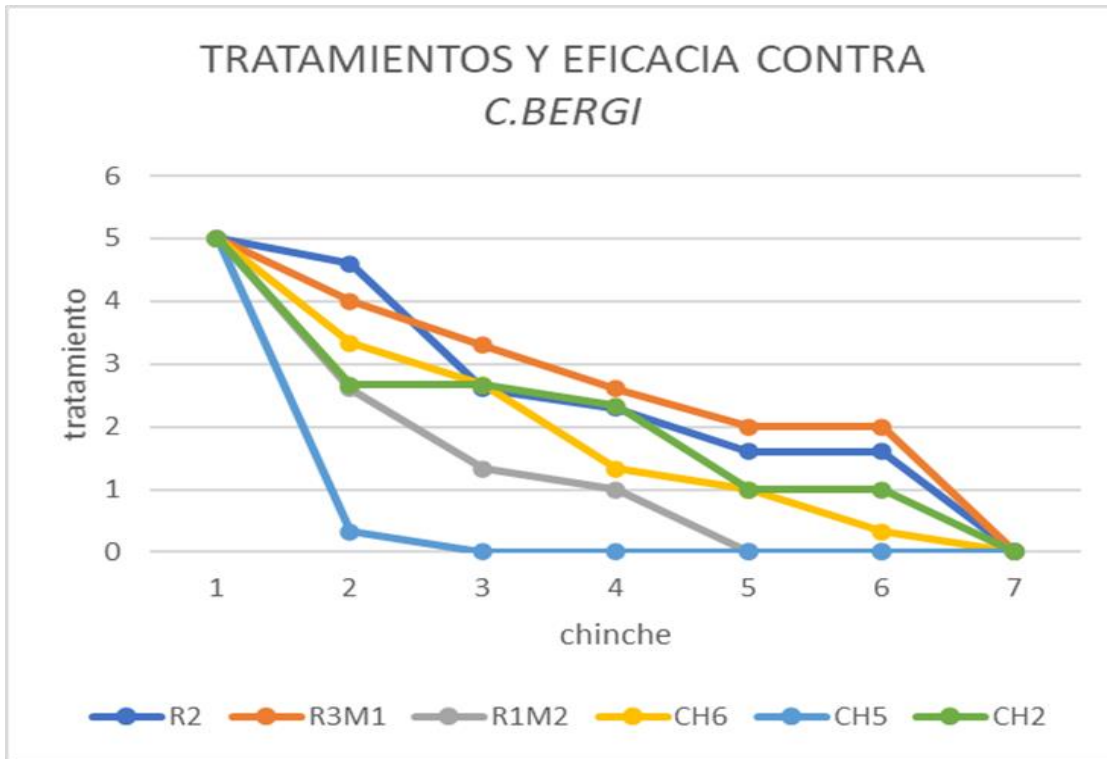


**FIGURA 8** Cámara Neubauer utilizada para observar las esporas de los hongos diluidos y su procedimiento.



**Cuadro # 8 conteo en la cámara Newbauer de los hongos aislados en el laboratorio.**

1. CH2 <i>Fusarium sp.</i>	49		53	$49+53+65+58+60 = 285 / 0.02 = 14,250$ $14,250 \times 20 \mu\text{l} = 285,000$ esporas/20 $\mu\text{l}$
		65		
	58		60	
2. CH5 <i>Aspergillus sp.</i>	92		112	$92+112+108+120+129=561/0.02 =28,050$ $28,050 \times 20 \mu\text{l} = 561,000$ esporas / 20 $\mu\text{l}$
		108		
	120		129	
3. CH6 <i>Aspergillus sp.</i>	48		72	$48+72+63+57+78 = 465 / 0.02 = 23,250$ $23,250 / 20 \mu\text{l} = 465,000$ esporas / 20 $\mu\text{l}$
		63		
	57		78	
4. R1 <i>Penicillium sp.</i>	163		156	$163+156+142+182+180 = 823/ 0.02 = 41,150$ $41,150 / 20 \mu\text{l} = 823,000$ esporas / 20 $\mu\text{l}$
		142		
	182		180	
5. R2 <i>Aspergillus sp.</i>	108		111	$108+111+128+102+115 = 564 / 0.02 = 6,199$ $6,199 / 20 \mu\text{l} = 123,980$ esporas / 20 $\mu\text{l}$
		128		
	102		115	



**Tabla # 8.** Tratamientos utilizados contra el chinche *Cyrtomenus Bergi*

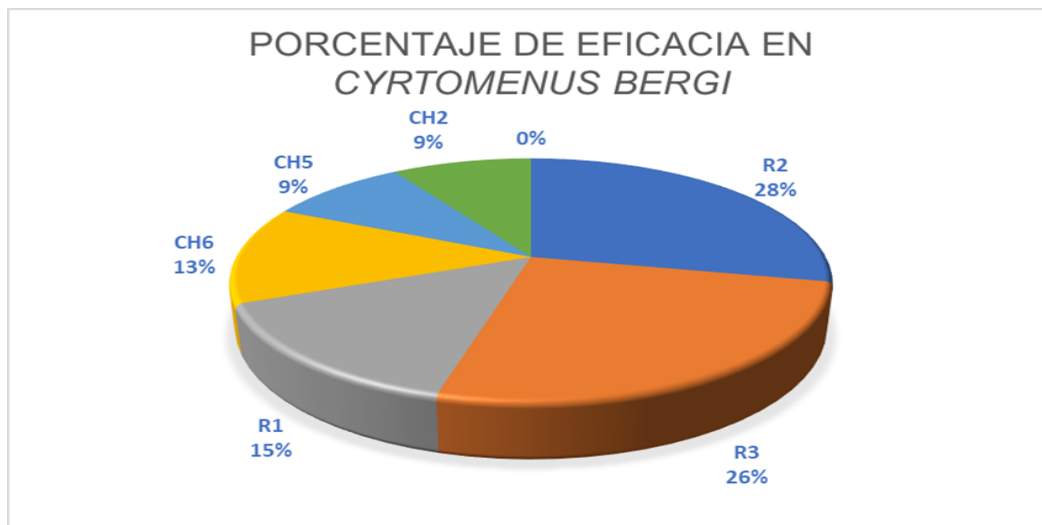
La prueba de actividad biológica contra *Cyrtomenus Bergi*, como se explicó en la metodología anteriormente, en la que se toman 6 hongos posteriormente identificados por técnicas de micro cultivo, los mismos son utilizados en este ensayo para corroborar, si estos, pueden combatir esta plaga, buscando alternativas que mejoren e inhiban el crecimiento del patógeno en la planta.

Según lo observado en los tratamientos colocados a los chinches se pudo verificar que el hongo *Aspergillus* aislado de chinches infectados *del suelo*, encontrados en la finca (La Menchaca – Ocú) tuvo una diferencia significativa contra el chinche, mientras que el *Penicillium* de la finca Los Torres de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, no presentó diferencias contra este, en el ensayo.

El empleo de microorganismos con capacidad biocontroladora, es una alternativa que nace a raíz del manejo desmesurado de agentes químicos para el control de plagas

y enfermedades en cultivos agrícolas. Hongos como: *Trichoderma inhamatum* (cepa bol - 12 qd) y *Beauveria bastiana* (cepa bol 2 - qc), han demostrado tener una buena capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos y plagas (Vallejos Sirpa, et al., 2014).

En este ensayo, no se obtuvo estos bio-controladores, pero se observó una diferencia significativa en una de las muestras encontradas en los chinches infectados por el hongo *Aspergillus sp*, en la muestra llamada CH5. Permitiendo infectar al chinche hasta morir en menos tiempo.



**Figura # 9** Porcentaje de eficacia en los tratamientos contra el chinche *C. Bergi*

El excesivo e inadecuado uso de los productos químicos en la agricultura, genera una elevada contaminación de los componentes del ambiente, los cuales son el aire, agua y suelo. Es por ello, por lo que la opción amigable con el ambiente es el uso de hongos entomopatógenos que actúan como controladores biológicos, y no son contaminantes.

## CAPÍTULO IV

## 12. DISCUSIÓN

El suelo constituye uno de los recursos más importantes para la vida en el planeta, ya que es la base fundamental para la explotación agropecuaria y forestal. La producción de alimentos depende, en un alto porcentaje, del uso que se les dé a los suelos (Martin y Adad, 2006).

La calidad del suelo abarca los componentes físicos, químicos, biológicos y sus interacciones. Por esto, para captar la naturaleza holística de la calidad o salud del suelo, deberán ser medidos todos los parámetros. Sin embargo, no todos tienen la misma relevancia para todos los suelos o situaciones. (Escudero, et al., 1999).

En este trabajo se efectuaron estudios bioquímicos del suelo, como es el caso de respiración microbiana y producción total de CO<sub>2</sub> del suelo y la actividad de la enzima deshidrogenasa.

Los suelos panameños son pocos apropiados para el cultivo. Algunos son arables. Existen muchos suelos no arables, porque están afectados por la erosión, inundaciones, salinidad, humedad, etc. En la región de Azuero se encuentran los suelos más áridos, los cuales van muy relacionados con la escasez de lluvias.

La determinación de la actividad de la deshidrogenasa (ADH) es un reflejo de las actividades oxidativas de la microflora del suelo (Ladd, 1978; Skujins, 1978). Esta enzima intracelular está asociada a los microorganismos proliferantes, y no es estabilizada por los coloides inorgánicos (arcillas) y orgánicos (sustancias húmicas) del suelo (Rossel et al., 1997). Esta enzima es la encargada de la oxidación biológica de los compuestos orgánicos mediante el proceso de deshidrogenación.

En cuanto a las pruebas realizadas para medir el efecto de la actividad de la enzima deshidrogenasa, se observó que la localidad de El Pílon de Ocú presentó mayor valor de absorbancia 0.820 (A485nm), seguido de Los Torres, Antón 0.315 (A485nm), y La Menchaca 0.158 (A485nm), con menor absorbancia con respecto a las demás muestras evaluadas.

La M.O. del suelo contiene cerca del 5% de N total, pero también contiene otros elementos esenciales para las plantas, tales como P, Mg, Ca, S y otros micronutrientes (Bello-Amez, 2006). Las propiedades físicas que pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo, son aquellas que reflejan la manera en que este recurso acepta; con la respiración se puede medir la tasa de intercambio gaseoso, entre la comunidad microbiana existente en el suelo, además de que con este parámetro se logra obtener una relación indirecta entre el número de poblaciones de microorganismos y la biomasa microbiana. También, la respiración está relacionada con los parámetros fisicoquímicos como el pH y la materia orgánica (Roblero, 2011).

En Colombia, a mediados de 1980, se presentó un nuevo insecto en el cultivo de yuca, *Cyrtomenus Bergi*, atacando la raíz de la yuca. En CIAT, se han realizado investigaciones hacia un manejo integrado, evaluando la resistencia varietal, control microbiológico y control botánico. Su amplia distribución y diseminación se deben al incremento de las áreas sembradas en yuca y otros cultivos como maní, cebolla larga, arroz, maíz, entre otros. Evaluaciones en laboratorio y campo mostraron la preferencia de *C. Bergi* a variedades con bajo contenido de HCN (< 100 ppm.). De 33 variedades con un potencial variable de HCN, 15 mostraron un nivel de resistencia / tolerancia a *C. Bergi*. Las últimas investigaciones se han dirigido hacia el control microbiológico, encontrándose en forma nativa, hongos y nematodos sobre esta plaga. Un *Heterorhabditis* sp., especie nativa, resultó en un parasitismo de 84% en todos los instares larvales. Aislamientos de *Metarrhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* sp. se han obtenido de *C. Bergi* en campo. En estudios de laboratorio, la mortalidad fue superior durante el quinto instar (61%), por encima del aproximado de mortalidad de 33%. En campo se ha determinado el efecto de la *Crotalaria juncea* sobre *C. Bergi*, bajando ataques de 61% a 4% sobre las raíces en forma de cultivo asociado con yuca. Sin embargo, los rendimientos de yuca intercalada se redujeron en 22%; y como la *Crotalaria* tiene poco valor comercial, los productores no adoptan esta tecnología. El extracto de semilla de

*Crotalaria* tiene características de insecticida, y esto lo coloca como un producto potencial para el control de *C. Bergi*. (A. C. Bellotti et al, 2001).

En este ensayo se logró obtener, principalmente los géneros *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* como los más prevalentes. Además, se encontró en menor proporción y también aislado, *Fusarium sp*.

Los hongos del suelo de regiones áridas, semiáridas, hasta en regiones tropicales, no han sido estudiados ampliamente (Christensen 1969, Flanagan 1981, Domsch et al. 1980). En zonas áridas, son característicos los hongos de los géneros *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. (Flanagan 1981).

El hongo *Penicillium sp*. es abundante en temperaturas y climas fríos, mientras *Aspergillus*, predomina en climas templados. Sin embargo, todos los hongos son regulados por la cantidad y calidad del sustrato (Paul 2007). En Panamá la mayor parte de la yuca es producida por pequeños agricultores en suelos marginales e infértiles y con un nivel tecnológico bajo. Una de las áreas de mayor producción es Ocú, con suelos Ultisoles, en su mayoría (Aguilar, J.A.1991).

Los resultados obtenidos coinciden con referencias bibliográficas, que destacan que, a pesar de que muchos de los géneros aislados actúan como saprófitos, algunas especies son fitopatógenas, bajo ciertas condiciones, pero en zonas de sabana tropical, como las estudiadas en este trabajo, son similares a las zonas semi áridas o áridas, donde existen hongos característicos, como *Aspergillus* y *Penicillium* (Mayea et al., 1991).

En los primeros ensayos preliminares con el chinche se utilizaron platos Petri esterilizados, sin el sustrato (suelo), y la aspersion del hongo en el insecto, dando como resultado la mortalidad total de los chinches en estadio adulto al siguiente día de su revisión. Esto me indica que es necesario que el insecto tenga su sustrato para movilidad y subsistencia en el medio. Por lo que se procedió a realizar nuevamente ensayos con los chinches, la aspersion y su sustrato. Este proceso se repitió y se incluyó el sustrato en los platos Petri. Adicional, se le colocó una maya

que serviría de barrera, impidiendo que el chinche se moviera del sitio, pudiendo evidenciar el crecimiento del hongo en el insecto dentro del plato.

En este ensayo se utilizó la cámara NeuBauer para el conteo de esporas de los hongos utilizados para esta prueba, tomando las esporas más definidas o solas de cada cuadrante, este a su vez se divide por 0.02 mm que es la multiplicación de la profundidad por los cuadrantes y el valor obtenido de la cantidad de esporas por 20  $\mu$ l de la dilución, nos da la cantidad de esporas obtenidas de cada hongo aislado, dando como resultados que el hongo CH5 obtenido de chinches infectados tuviera una cantidad de 561 000 esporas / 20  $\mu$ l en el sistema tradicional, mientras que del sistema agroecológico la muestra R1M2 obtuvo 823 000 esporas / 20  $\mu$ l de lo cual el hongo CH5 *Aspergillus*, tuvo mayor efecto para la prueba.

## 13. CONCLUSIÓN

1. En la prueba de respiración microbiana de las fincas muestreadas, resultó con mayor actividad, el suelo de La Menchaca, Ocú, seguido del suelo de Los Torres, Antón.
2. En la actividad enzimática de la deshidrogenasa, la obtuvo los Torres, con el mayor valor de absorbancia (mayor actividad de la enzima), con un porcentaje de humedad de (12.16 %), seguido de La Menchaca con menor absorbancia, este suelo tenía el menor porcentaje de humedad (7.74%).
3. De los seis aislamientos obtenidos, uno presentó mayor actividad biológica, siendo este el de la finca La Menchaca y los cinco restantes obtuvieron poca actividad biológica, tres de estos de la finca Los Torres, Antón.
4. La finca totalmente agroecológica certificada orgánica (Los Torres de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé). No presentó incidencia de lesión por el chinche *Cyrtomenus Bergi*, ya que en este lugar no hay reportes de su presencia en los cultivos de yuca.
5. No se encontró en los suelos de la finca agroecológica certificada orgánica (Los Torres de Cabuya), ni en los suelos de la finca La Menchaca, presencia de hongos Entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
6. Los aislamientos de hongos obtenidos, se basaron en géneros, características morfológicas y microscópicas entre ellos los más prevalentes en ambas fincas (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp* y *Fusarium spp.*).
7. Se utilizó en el ensayo, el estadio de adulto en el chinche *Cyrtomenus Bergi* , ya que era menos complicado su manejo en el laboratorio.

## Recomendaciones

- 1- Se sugiere realizar estudios con más muestras de este tubérculo en diferentes estaciones para verificar, si hay mayor abundancia de microorganismos en el mismo y en el suelo.
  
- 2- Se recomienda realizar pruebas de identificación a todas las cepas aisladas, ya que algunas de estas, podrían ser importantes para otros estudios en este campo.
  
- 3- Realizar pruebas moleculares con resultados positivos para poder determinar el nivel de especie de los hongos identificados.
  
- 4- Se recomienda hacer pruebas de campo con los organismos que resultaron positivo para determinar, si en estas condiciones tienen un comportamiento distinto al del laboratorio con el patógeno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Bibliografías

Águila Brenes, E. y otros, 2017. MANUAL DEL CULTIVO DE YUCA *Manihot esculenta* Crantz. Sector agro alimentario- Inta Costa Rica , pp. 9-17;27-34.

Álvarez, E. y otros, 2002. *Guía práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca*. Cali, Colombia : CIAT, apartado aéreo 6713..

Anon.,2014.<http://www.scribd.com/doc/116441296/>.

Anon., s.f. <http://www.monografias.com/trabajos69/aislamiento-in-vitro-hongos-fitopatogenos>.

ARIAS CIFUENTES , E. L. & PIÑEROS ESPINOSA, P. A., 2008.  *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MUESTRAS DE SUELOS DE LOS PÁRAMOS DE GUASCA Y CRUZ VERDE*, BOGOTÁ,D.C: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.

Arisмени, L. G., 2001 . El cultivo de la yuca. *Revista UDO Agrícola 1(1):* , pp. 1-10..

Bellotti, , A. C. y otros, 2009. *CONTROL DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE LA YUCA: ÁCAROS Y MOSCA BLANCA*. Cali, Colombia: CIAT,Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Bellotti, A. . C. y otros, s.f. *CONTROL DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE LA YUCA;* Cali Colombia : CIAT.

Bellotti, A. C., 2000. *Manejo integrado de las plagas principalmente en el cultivo de yuca*, Cali, Colombia : [ciat-library.ciat.cgiar.org](http://ciat-library.ciat.cgiar.org), CIAT- A.A.

Bellotti, A. C., Arias , B., Herrera , C. J. & Holguín, C. M., 2007. *Manejo integrado de moscas blancas asociadas al cultivo de yuca*. Cali, Colombia: CIAT.

Bellotti, A. C. y otros, 1988-1996. INSECTOS Y ÁCAROS DAÑINOS A LA YUCA Y SU CONTROL. *Yuca en el tercer Milenio*, pp. Cap 10:pag 160-164.

Cali, Colombia: CIAT; Resúmenes Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen) XXXIII Congreso, Manizales,.

Carballas, T., Acea, M. J. & Diaz-Naviña, M., 1993. Microbial biomass and its contribution to nutrients concentrations in fores soils.. *Soil Biol. Biochem.*, pp. 25: 25-31. p.

Castellanos Castellanos, P. A. & Castrillón Arias, C., 1999. *MANEJO INTEGRADO DEL CHINCHE SUBTERRÁNEA *Cyrtomenus Bergi* Froeschner en cultivos de cebolla de rama *Allium fistulosum* L, PARA EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA.*, Colombia: Corpoica (Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria)..

Ceballos , H. & De la Cruz A., G. A., 2002. *Taxonomía y Morfología de la Yuca*, Cali, Colombia.: CIAT.

Cock, J. H., 1997. *La Yuca nuevo potrencil para un cultivo tradicional*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT..

CORDERO , J. E., 2013. *MANUAL DE AISLAMIENTOS DE HONGOS*, PERÚ: UNIVERSIDAD CONTINENTAL.

COTES RINCÓN, L., 2012. *METODOLOGÍA PARA OPTIMIZAR LA CRÍA EN LABORATORIO*, SANTIAGO DE CALI: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE, FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AMBIENTALES.

Dávila Medina, M. . D. y otros, 2013. Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola, Antagonistic actinomycetes against phytopathogenicfungi of agricultural importance. *Revista Mexicana de Ciencias Agropecuarias* , Vol 4(Núm 8), pp. 1187-1196.

ELO M., E. L. M. y otros, Jan./June 2006. Evaluación de dos cepas comerciales de entomonematodos como agentes de control de *Cyrtomenus Bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Rev. Colomb. Entomol. 1 Bogotá*, p. vol.32 no.

Escudero, L., de la Fuente, J. C., Luters, A. & Salazar Lea Plaza, J. C., 1999. *Guía para la evaluacion de la calidad y salud del suelo.*, s.l.: s.n.

Estrada Garro , I. F., 2013. INVENTARIO TECNOLOGÍAS YUCA-REGIÓN HUETAR NORTE & ATLÁNTICA, MARCO DEL PROYECTO REGIONAL PRESICA”. *Presica*, pp. 4-9.

Estrada Salazar, G. I. & Ramírez Galeano, M. C., 2019. MICOLOGÍA GENERAL. En: Manizales - Caldas Colombia: Centro Editorial UCM , pp. 72-101-110.

FAOSTAT, 2017. *Estadísticas Agrícolas de Yuca* , s.l.: s.n.

Fernández-Ojeda, P. R., David Cristóbal Acevedo, D. C., Villanueva-Morales, A. & Uribe-Gómez, M., New York, NY, USA. 2016. Ecology and management of forest soils.. *John Wiley and Sons inc*, p. 490 p.

Gärcia, V., s.f. INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA. En: s.l.:EUNED Editorial Universidad Estatal a Distancia, pp. 86-106.

Grant, , W. D. & Long, P., 2017. MICOLOGÍA . En: *MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL*. s.l.: ACRIBIA, pp. 6-10.

Herrera F, C. J. & Bellotti, A. C., 2006. *AVANCE EN EL MANEJO INTEGRADO DE Cyrtomenus Bergi FROESCHNER (HEMIPTERA: CYDNIDAE), CHINCHES SUBTERRÁNEO DE LA VIRUELA, EN EL CULTIVO DE YUCA EN COLOMBIA\**,

Herrera., C., Caicedo , A. & Bellotti , A., 2001. *Avances en el Manejo Integrado de Cyrtomenus bergi Cyrtomenus Bergi*, Cali, Colombia.: CIAT,.

Herrera, . C., Caicedo , A. & Bellotti , A., 2001. *Avances en el Manejo Integrado de Avances en el Manejo Integrado de Cyrtomenus Bergi*, Cali, Colombia.: Unidad de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades-Proyecto Yuca. CIAT.

Hurtado Luna, , L., Núñez Mansito,, A., Quintana Vara,, G. & Rodríguez Morero, Y., ene.-mar., 2006. Actividad de los enemigos naturales de plagas en barreras. *Centro Agrícola* , pp. año 33, no. 1.

JICA, 2007, ECUADOR. *Guía del Manejo Integrado de Plagas (MIP) para técnicos y productores*.

Luters, A. & Salazar L, J. C., 1999. *Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo*, Buenos Aires: United States [ Links ]: Department of Agriculture, CRN-CNIA-INTA. 88 p..

Marrero, L. y otros, 2012. Chinchas subterráneas (Hemiptera: Cydnidae) asociadas a hospedantes de interés económico en la provincia de Matanzas. *Protección Veg.*, pp. Vol. 27 No. 3 : 194-196.

Martí Solé, M. d. C., Alonso Espadalé , R. M. & Constans Aubert , A., 1998. *NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos*. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

MELO M, E. . L. y otros, June 2006. Evaluación de dos cepas comerciales de entomonematodos como agentes de control de *Cyrtomenus Bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Revista Colombiana de Entomología* , vol.32 (no.1 ).

MIDA, M. d. D. A., 2011. "HACIA UN SECTOR AGROPECUARIO SOSTENIBLE E INTEGRADO". Panamá, s.n.

MIDA, M. d. D. A., Abril 2014. *APORTES PARA EL DESARROLLO DEL SECTOR AGROPECUARIO Y RURAL DE PANAMÁ DESDE UNA POLÍTICA DE ESTADO DE MEDIANO Y LARGO PLAZO*, PANAMÁ: s.n.

(MIDA), M. D. D. A., 2016-2017. *CUADRO CONSOLIDADO, CULTIVOS DESARROLLADOS CON DIVERSAS TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN.*, Panamá.: Técnicos regionales / Dirección de Agricultura.

(MIDA), M. D. D. A., 2018-2019. *Resumen Ejecutivo según grupos cultivos con diferentes tecnologías de producción. Año agrícola* , PANAMÁ: DIRECCIÓN DE AGRICULTURA, UNIDAD DE PLANIFICACIÓN.

Mondino, D. P., 2012. *Aislamiento de hongos y bacterias*. s.l.:FACULTAD DE AGRONOMÍA,UNIDAD DE FITOPATOLOGÍA.

MONTOYA, J. O., 2004. *EVALUACIÓN DE TRES PLANTAS REPELENTES ASOCIADAS AL CULTIVO DE MAÍZ PARA EL MANEJO DEL CHINCHE (Cyrtomenus bergi) Froeschner*, Costa Rica.: UNIVERSIDAD DE CALDAS,

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, PROGRAMA DE AGRONOMÍA  
MANIZALES.

MORA MORENO, R. E., SOTO, J. . C. & LÓPEZ, C., (2016). IDENTIFICACIÓN DE  
QTLs ASOCIADOS A CARACTERES DE ARQUITECTURA VEGETAL EN YUCA  
(*Manihot esculenta*). *Acta Biológica Colombiana*, , pp. Vol. 21, Núm. 1 .

Orozco Montoya, J., Soto Giraldo, . A. & de Sousa, A. H., 2006. Efecto de repelencia  
de *Crotalaria juncea*, *Galactia striata* y *Cymbopogon nardus* para el manejo de  
*Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae). *REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA  
TERRA*, pp. 179-184.

Ospina, B. & caballos , H., 2002. La yuca en el tercer milenio :Sistemas modernos  
de producción,procesamiento,utilización y comercialización.. En: Cali,Colombia:  
CIAT.

Pacasa Quisbert , F. y otros, 2017. Comunidad de hongos filamentosos en suelos  
del Agroecosistema de Kiphak' iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *J. Selva  
Andina Res. Soc. La Paz*, vol.8 (no.1), pp. 1-5.

Perez, N. & Vazquez, L. L., 2004. MANEJO ECOLÓGICO DE PLAGAS.  
*researchgate.net*.

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, . A., Rodríguez Navarro, . S. & de la Torre, M.,  
2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. En: Interciencia, ed.  
*MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. Caracas,  
Venezuela: Asociación Interciencia, pp. 856,857,858.

Ramón, I. V. A. & Rodas, B. F., 2007. *EI CONTROL ORGÁNICO DE PLAGAS Y  
ENFERMEDADES*, Perú, Ecuador: Naturaleza & cultura Internacional.

Rendon, M., 2001. *Control Biológico del Chinche Subterráneo de la yuca  
(Cyrtomenus bergi) con hongos Entomopatogenos Hyphomycetes*, Medellín: s.n.

Riis, L., Bellotti, A. C., Bonierbale, M. & O'brien, G. M., 2003. Cyanogenic Potential  
in Cassava and Its Influence on a Generalist Insect Herbivore *Cyrtomenus bergi*  
(Hemiptera: Cydnidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(6), pp. 1905–1914,.

Riss, L. & Esbjerg, P., 1998. Movimiento, distribución y supervivencia de *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) dentro del perfil del suelo en gradientes horizontales y verticales de agua del suelo simulados experimentalmente. *Environmental Entomology*, 27(5), p. 1175–1181.

R, L. y otros, 1981. *Problemas en el cultivo de la yuca*. Cali, Colombia : CIAT.

Rojas Gutiérrez , R. L., Loza Murguía, . M., VINO NINA , L. & Serrano Canaviri , T., 2017. *Capacidad biocontroladora de Beauveria brongniartii (Sacc.) y Metarhizium anisopliae*. Bolivia , Selva Andina Research Society.

Suárez Guerra, I. & Mederos Vega , V. R., 2011. APUNTES SOBRE EL CULTIVO DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) TENDENCIAS ACTUALES. *Cultivos Tropicales INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas)*, pp. vol. 32, no. 3, p. 27-35.

TORRES P, M. S., 2013. *DIAGNÓSTICO DE LAS PRINCIPALES PLAGAS (COCHINILLA Y CUERO SAPO) QUE AFECTA LA PRODUCCIÓN DE YUCA, COSTA RICA: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA.*

TORRES P, . S., 2012.. *DIAGNÓSTICO DE LAS PRINCIPALES PLAGAS (COCHINILLA Y CUERO SAPO) QUE AFECTA LA PRODUCCIÓN DE YUCA, Huetar Norte, Costa Rica.: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA.*

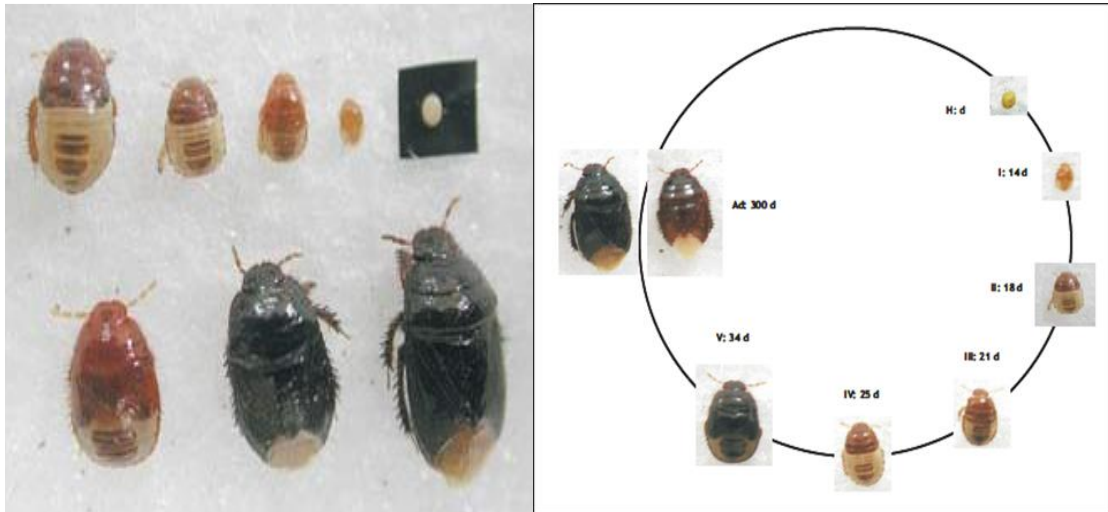
Treitz, D. W., Pino , J. A. & Miembros 1979-1980, 1979-1980. *Informe CIAT 1980*, Cali, Colombia.: Centro internacional de agricultura tropical .

Uribe-Gómez, M., Villanueva-Morales, A., Acevedo, D. C. & Fernández-Ojeda, P. . R., 2016. Estado de los elementos químicos esenciales en suelos de los sistemas natural, agroforestal y monocultivo. *Revista mexicana de ciencias forestales versión impresa ISSN 2007-1132*, p. 490 p.

Vallejos Sirpa, J. G., Espinal Churata, C., Mollinedo, P. & Terrazas Siles, E., 2014. *EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA Y QUITINOLÍTICA DE TRICHODERMA INHAMATUM Y BEAUVERIA BASSIANA EN LA MOSCA DE LA FRUTA DROSOPHILA MELANOGASTER*, La Paz -Bolivia: Revista Boliviana de Química.

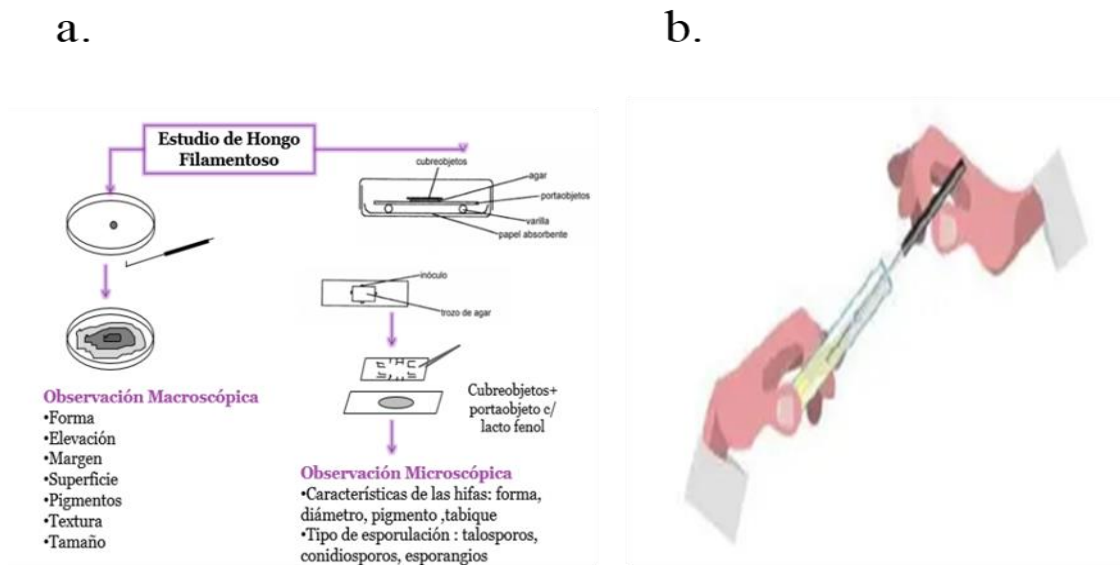
Zúñiga Oviedo, M. . A., Soto Giraldo, A. & Cruz Cerón, G., 2016. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HONGOS Y BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS SOBRE *Diatraea Saccharalis* Fabricius (LEPIDOPTERA CRAMBIDE). En: bol.cient.mus.hist.nat., ed. Colombia: Boletín Científico Centro de Museos, Museo de Historia Natural, pp. 82-86.

## Anexos



**Figura 9.** Ciclo biológico de *C. Bergi* en la yuca y los estadios de desarrollo de *C. Bergi*, huevo, ninfas de I a V, adultos hembra y macho.

**Figura 10.**



a. Esquema para realizar Estudios de Hongos Filamentosos de forma macro y microscópica. B. Micro cultivo es un procedimiento apropiado para mantener cepas de microorganismos guardados con poco espacio para posibles estudios.



**Figura 11.** Lugar de recolecta de los chinches, forma de obtenerlos y coleccionarlos. Su preparación para utilizarlos para las pruebas.



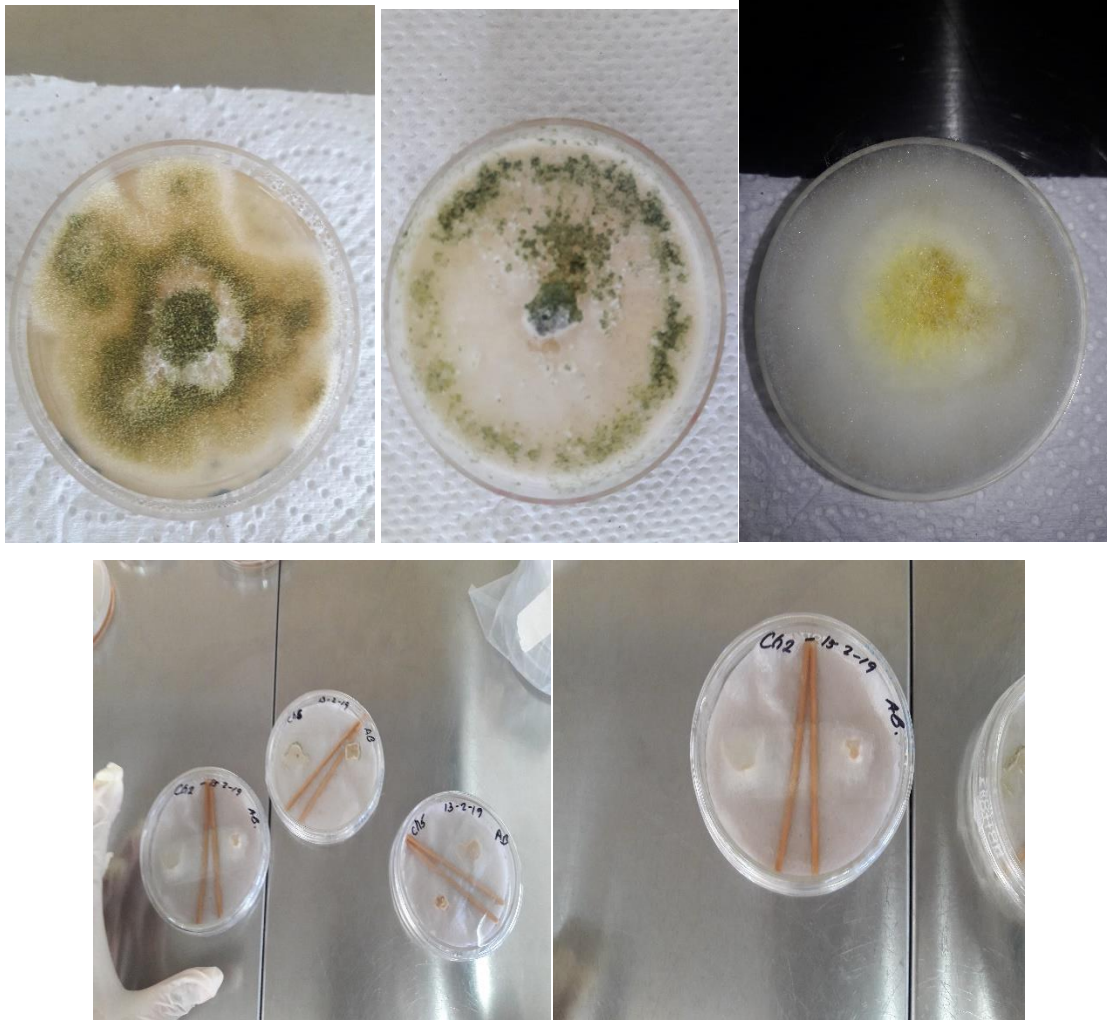
**Figura 12.** Recolecta de chinches, limpieza, conteo y preparación para llevarlos al laboratorio.



**Figura 13.** Chinchas en el laboratorio para sus cuidados, alimentación y mantenimiento, antes del ensayo.



**Figura 14.** Preparación de material estéril, chinches recolectados para montaje del ensayo en el laboratorio.

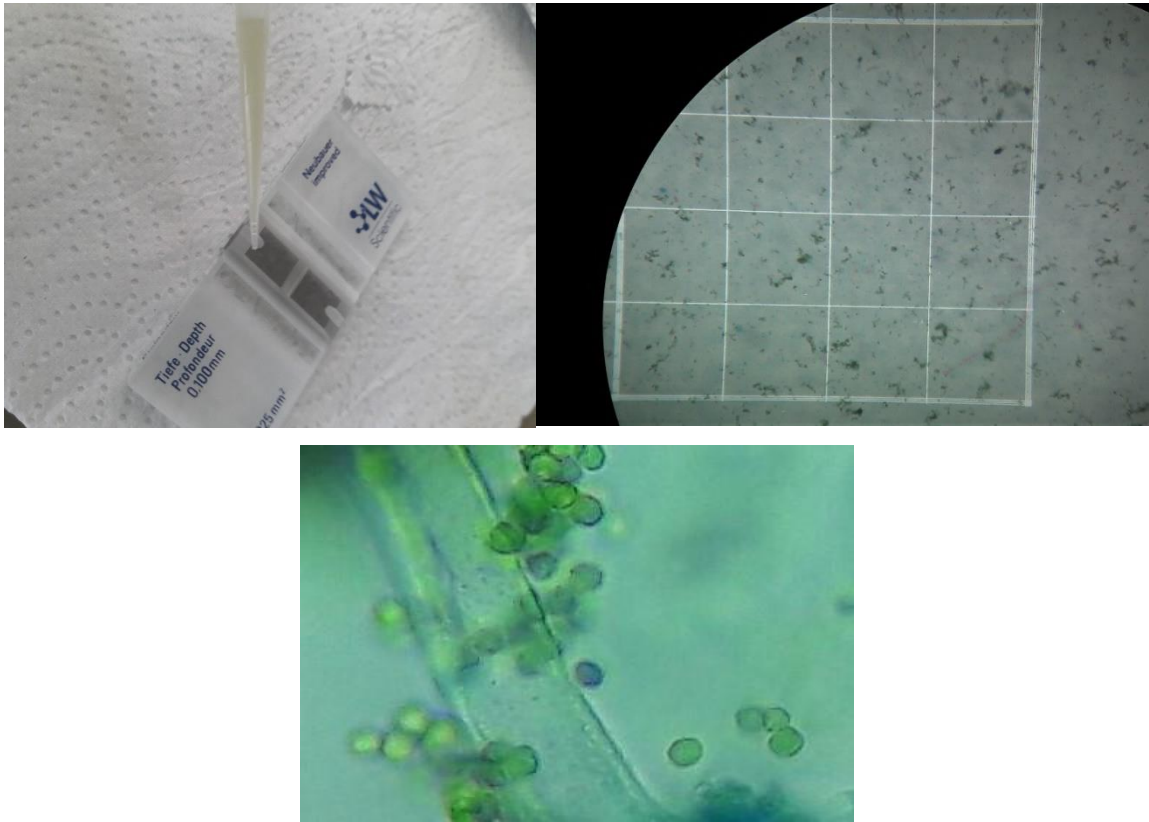


**Figura 15.** Preparación de micro cultivos con los hongos obtenidos en el muestreo y el tweent-20 con uno de los hongos utilizados en el ensayo.





**Figura 16.** Esquema de realización de ensayos en el laboratorio con el hongo seleccionado para el chinche.



**Figura 17.** Conteo con la cámara Newbauer, en donde se observa las esporas del hongo en la dilución.



**Figura 18.** vista de chinche infectado por las esporas del hongo CH5 en el laboratorio.

	R2	R3M1	R1M2	CH6	CH5	CH2
1	5	5	5	5	5	5
2	4.6	4	2.6	3.33	0.33	2.66
3	2.6	3.3	1.33	2.66	0	2.66
4	2.3	2.6	1	1.33	0	2.33
5	1.6	2	0	1	0	1
6	1.6	2	0	0.33	0	1
7	0	0	0	0	0	0

**Figura 19.** Cuadro de datos estadísticos de los hongos utilizados para el ensayo en el laboratorio.