



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

005

Dirección de Investigación Subdirección de Programación y Evaluación

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología Agrícola
Tema estratégico (ANA/PEP):	Producción				
Línea de investigación:	Entomología				
Título del proyecto:	Alternativas biorracionales para el control del picudo de la guayaba (<i>Conotrachelus dimidiatus</i>)				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	<input checked="" type="checkbox"/>	Fondos concurrentes:	Jabaly1@yahoo.com
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Ernesto Cerna Chávez	3611	3563		
Colaborador:	Yisa María Ochoa Fuentes	3611	3948		
Colaborador:	Ernesto González Gaona	Externo	INIFAP		
Colaborador:	Juan Carlos Delgado Ortiz	Externo	CULTA		
Colaborador:	Héctor Antonio Barajas Gómez	Externo	ITEL		
Colaborador:	Julio S. Bernal	Externo	TEXAS A&M		
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Karla Vanessa De Lira Ramos	Maestría en Ciencias	61171506		
Programa Docente:	Posgrado en Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	DR. ERNESTO CERNA CHAVEZ Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Alternativas biorracionales para el control del picudo de la guayaba (<i>Conotrachelus dimidiatus</i>)	\$75,000
---	----------

2.- Introducción

El cultivo de la guayaba *Psidium guajava* L. es de gran importancia en México, este cultivo se encuentra distribuido en 18 entidades federativas ocupando una superficie de 21,834 hectáreas, pero las regiones productoras más importantes del país se localizan en los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, donde se cultivan 19,681 ha, que representan el 90% de la superficie total y aportan el 94% de la producción nacional (SIAP, 2016). En el municipio de Calvillo, Aguascalientes este frutal ocupa 6,269 ha, que representan el 30% de la superficie nacional plantada y se producen alrededor de 94 mil toneladas de guayaba que equivale al 32.3% de la producción nacional lo cual ubica a Aguascalientes como el segundo estado productor (SIAP, 2016). Entre los principales factores de producción que afectan a este cultivo se encuentran: escasez de agua, poco uso de fertilizantes y podas inadecuadas. Adicionalmente, el guayabo se ve afectado por diversos organismos plaga cuyas poblaciones dañan los frutos y ocasionan pérdidas en la producción (González *et al.*, 2002). El picudo de la guayaba (*Conotrachelus* sp.) es uno de los principales problemas de producción de la guayaba en México y si no se le controla ocasiona pérdidas de hasta el 60%. Esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en las principales zonas productoras. Para su combate se aplican de tres a veinticuatro veces aplicaciones de insecticidas calendarizadas a partir del inicio de lluvias sin tomar en cuenta la presencia de la plaga (De Lira *et al.*, 2015), esperando reducir daños menores al 10%; sin embargo, lo anterior conlleva a dos situaciones: la fuga de capital y la falla para determinar el momento preciso de aplicar los tratamientos contra la plaga (González *et al.*, 2008). El manejo orgánico-biológico se ha tratado de implementar mediante la aplicación de hongos entomopatógenos, así como la aplicación de extractos vegetales, pero no se han obtenido resultados satisfactorios debido a una aplicación incorrecta. En la actualidad, el estudio de productos biorracionales para el control de esta plaga se encuentra en desarrollo generando estrategias con productos alternativos a los insecticidas químicos. Por la problemática planteada, el uso inadecuado de insecticidas químicos y considerando la importancia que tiene *C. dimidiatus* por los daños que ocasiona al cultivo y el poco conocimiento que se tiene para su combate con especies vegetales y hongos entomopatógenos, el presente trabajo de investigación pretende explorar el potencial del uso de alternativas biorracionales para definir los tratamientos más eficientes en el manejo de esta plaga, y determinando la efectividad biológica de hongos entomopatógenos de cepas nativas de la región de Calvillo, Ags.

Objetivos

Objetivo general

Buscar alternativas biorracionales para controlar el picudo de la guayaba bajo condición de laboratorio.

Objetivos específicos

- Determinar la susceptibilidad del picudo de la guayaba a extractos vegetales con propiedades insecticidas, *in vitro*.
- Evaluar la efectividad biológica de cepas nativas de hongos entomopatógenos para el control del adulto del picudo de la guayaba, *in vitro*.
- Evaluar la compatibilidad de extractos vegetales con los hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba, *in vitro*.

Hipótesis

- Existen plantas que producen metabolitos secundarios que pueden ser empleados como insecticidas en el control de plagas de la guayaba.
- Existen hongos entomopatógenos nativos en las huertas de guayaba que pueden ser utilizados, mediante distintas formulaciones, para el control del picudo de la guayaba.

3.-Revisión de Literatura

Los principales insectos plaga que afectan la productividad de las huertas de guayabo son: picudo de la guayaba (complejo de especies del género *Conotrachelus* spp), mosca de la fruta (*Anastrepha striata*) y temolillo (*Cyclocephala lunulata*) (González y Perales 1993).

El picudo de la guayaba (*Conotrachelus* spp.) es considerado como la principal plaga del cultivo en la región Calvillo-Cañones, ya que llega a infestar hasta el 70% de la superficie (Villaseñor, 1977; González *et al.*, 2002), y si no se le controla ocasiona pérdidas de hasta 60% de la producción (Velázquez, 1975; González *et al.*, 2002).

Para su combate se realizan de tres a diez aplicaciones de insecticidas calendarizadas a partir del inicio del temporal de lluvias sin tomar en cuenta la presencia de la plaga, esperando reducir daños menores al 10%; sin embargo, lo anterior conlleva dos situaciones: la fuga de capital y la falla para determinar el momento preciso de aplicar los tratamientos contra la plaga.

En la región guayabera de Calvillo, Aguascalientes y Cañón del Juchipila, Zacatecas (Calvillo-Cañones), se han realizado varios estudios tendientes a determinar las especies de picudos asociados a guayaba, detectándose a *Pandeleiteius* sp., *Pantomorus* (sinónimo = *Naupactus*) *cervinus* Boheman, *Pantomorus albosignatus* Boheman, *Conotrachelus dimidiatus* Champion y varias especies de *Conotrachelus* sin determinar; Velázquez (1975) menciona tres diferentes especies, mientras que González (1994) menciona nueve. Aunque *Pandeleiteius* sp. y *Pantomorus* spp., son muy abundantes en las huertas de guayabo, no dañan a los frutos (González, 1989; Tafoya *et al.*, 2007). De las especies de *Conotrachelus* detectadas en la región Calvillo-Cañones solo dos están atacando frutos de guayaba: una es *Conotrachelus dimidiatus* conocido como el picudo de la guayaba que es la especie predominante y la que causa más daños. Su ciclo de vida tiene una duración de un año. Durante el 2014 el periodo de vuelo inició el 27 de mayo y finalizó el 13 de septiembre, presentándose la mayor actividad de vuelo en los meses de junio, julio y agosto, a pesar de que no se observó dicha actividad en octubre y por el desarrollo de las larvas, se sospecha que los adultos se encuentran activos hasta el mes de octubre (Argón *et al.*, 2015).

González *et al.*, (2008) en una prueba de control de adultos con extractos de plantas en "El Rescoldo", Apozol, Zacatecas, se presentó una gran presión de la plaga ya que cuando no se aplicaron medidas de control se observaron niveles de daño del 84.5%, mientras que en donde se aplicó el insecticida Karate® se observaron daños del orden del 45.3% lo cual es considerado alto. En orden de eficacia le siguieron la infusión con ajo + gobernadora y ajo + barbasco con 47.1 y 48.3 % que son muy similares al obtenido con el químico y estadísticamente diferentes al testigo, de los tratamientos que no mostraron disminución en los daños fueron: piretrinas, azufre, ajo + semillas de papaya, ajo + quasia y ajo + tabaco.

En "El Imperio" Calvillo, Aguascalientes la infestación de picudo de la guayaba no fue tan severa ya que se observaron daños en el testigo del 28% seguido por los tratamientos jícama + barbasco y ajo + barbasco con 21 y 19% respectivamente, que son estadísticamente diferentes de los insecticidas Sevin, Decis, Tracer y Calypso con 1.45, 2.14, 2.28 y 2.51% de fruta dañada respectivamente y aunque fueron inferiores a los daños en el Malatión y ajo + jícama (7.25 y 6.98% fruta dañada) no fueron estadísticamente diferentes.

Respecto a control biológico del picudo, se han detectado varias cepas de hongos entomopatógenos que afectan en forma natural a larvas invernantes y adultos de picudo, mismas que se encuentran en fase de evaluación en campo (González *et al.*, 2002).

4.- Procedimiento Experimental

Para dar continuación al proyecto en el año 2018, se tomarán los resultados obtenidos en la etapa anterior (año 2017). Una vez obtenida la secuenciación de los hongos entomopatógenos se seguirá el protocolo descrito a continuación:

1. Hongos entomopatógenos

1.1. Suspensión de esporas

Una vez identificadas las cepas nativas de los hongos entomopatógenos a nivel de especie, se preparará una suspensión de esporas, agregando a cada tubo 10 ml de solución salina (0,85%) con 0,1% de Tween 80 (Polisorbato 80), este último para prevenir la aglomeración y la rápida precipitación de las esporas (Merkulow y Ludwing, 1999; Wyatt y Parish, 1995). Las esporas serán desprendidas del micelio con una varilla de vidrio estéril. La suspensión obtenida se transferirá a otro tubo de ensayo estéril y se determinará su concentración, la cual se ajustará a 1×10^6 UFC/ml con solución salina (Wyatt y Parish, 1995; López-Malo *et al.*, 1995).

1.2. Obtención de filtrado de cepas nativas

Por otro lado, se hará un fermentado líquido de las cepas identificadas de los hongos entomopatógenos, se utilizará la

metodología descrita por Nico *et al.*, (2003), la cual consiste en lo siguiente:

De cada cultivo monosporico de ocho días de crecimiento en PDA, se obtendrá un disco de micelio de 5 mm de diámetro y se depositará en matraces de 250 mL de capacidad con medio de cultivo caldo de papa dextrosa (CPD), para su desarrollo durante 15 días a 28 °C. Después de este tiempo, el CPD se filtrará con gasas estériles, luego se tomaron 50 mL del líquido sobrenadante y se filtrarán a través de papel Whatman No. 1 para luego centrifugarse a 3600 rpm durante diez minutos. Por último, el sobrenadante se filtra a través de un filtro Microporo de 0,45 µm. Los filtrados se almacenarán en refrigeración durante cinco días a 6 °C para su empleo en evaluaciones contra *C. dimidiatus*.

2. Bioensayos para la determinación de actividad insecticida

Tanto los extractos, como los exudados de los hongos serán evaluados individualmente mediante la técnica del vial del vidrio (Plapp *et al.*, 1987; Cahill y Hackett, 1992), para determinar la actividad insecticida de cada uno.

Se prepararán siete concentraciones con tres repeticiones más un testigo absoluto para cada extracto vegetal y para cada hongo obtenido. Se introducirá treinta insectos adultos en viales de centelleo de vidrio de 20 ml cuyas cápsulas se modificarán para permitir la respiración de los organismos y se invertirán los tubos para asegurar un contacto continuo entre los insectos y los productos.

Después de 24 horas se harán observaciones para determinar el porcentaje de mortalidad de los adultos, considerando como afectado o muerto a cualquier individuo inmóvil o que tenga movilidad anormal. Los bioensayos se realizarán a temperatura ambiente, entre 22.5 y 28.5°C, y humedad relativa entre 55% y 65%.

2.1. Bioensayos para la determinación de las CL₅₀

Se seleccionarán los insectos más activos, eliminando aquellos con movilidad anormal. Los insectos se alimentarán hasta los 4 días de edad con una dieta de guayaba fresca, antes de ser utilizados para los bioensayos con la técnica del vial de vidrio, anteriormente descrita.

Se prepararán siete concentraciones con tres repeticiones y un testigo absoluto para cada ingrediente activo de cada principio activo de los extractos vegetales, así como de cada filtrado de las cepas de los hongos entomopatógenos. Después de 24 horas se harán observaciones para evaluar la mortalidad, considerando como afectado o muerto a cualquier individuo que este inmóvil o que tenga movilidad anormal. Los bioensayos se realizarán a temperatura ambiente, entre 22.5 y 28.5°C, y humedad relativa entre 55% y 65%.

Las líneas de respuesta dosis-mortalidad para cada producto se obtendrán mediante regresiones lineales (FINNEY) y análisis estadístico SAS (Institute 1997) para determinar las CL₅₀.

3. Compatibilidad de los extractos vegetales con los hongos entomopatógenos

3.1. Método de dilución en placa

Una vez determinadas las CL₅₀ de cada principio, se evaluará la compatibilidad con los hongos entomopatógenos, utilizando la concentración de la suspensión de esporas, y se seguirá la metodología propuesta por Baños *et al.*, (2004).

En placas de petri con 20 mL de medio PDA estéril y solidificado se agregarán 200 µL de cada extracto por placa, se distribuye por toda la placa con ayuda de un asa de Digralsky y se agregaron 100 µL de una suspensión de esporas (1×10^8 UFC/mL), los cuales se esparcen por toda la placa, se incubará a una temperatura de 27 °C hasta que el micelio comience su crecimiento.

Se hará un arreglo factorial con diseño completamente al azar, para determinar las combinaciones posibles con tres repeticiones.

3.2. Clasificación de la toxicidad de los extractos vegetales para los hongos entomopatógenos.

Para clasificar la compatibilidad del producto con los entomopatógenos, se utilizará el modelo T (Alves *et al.* 1998), desarrollado para caracterizar la compatibilidad de hongos entomopatógenos con productos insecticidas en estudios *in vitro*, en medio de cultivo sólido. Para ello, se calcularán los valores porcentuales promedio de esporulación y crecimiento vegetativo de las colonias de los hongos con relación al testigo (100%), aplicándose enseguida, para cada concentración del producto, la siguiente fórmula:

$$T = [20(CV) + 80(ESP)]/100$$

Donde:

T = valor corregido del crecimiento vegetativo y esporulación para clasificación del producto;

CV = porcentaje de crecimiento vegetativo relativo al testigo;

ESP = porcentaje de esporulación relativo al testigo;

Los experimentos serán dispuestos en diseño completamente al azar; posteriormente, los resultados se analizarán por regresión polinomial, para obtener las ecuaciones de mejor respuesta.

4. Bioensayos para la evaluación de bioformulados

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de compatibilidad de extractos con los hongos entomopatógenos, se realizará una evaluación de la mezcla de los éstos más los filtrados de las cepas nativas mediante la técnica del vial de vidrio mencionada anteriormente.

Se utilizará un diseño completamente al azar con siete concentraciones más un testigo absoluto, tres repeticiones por concentración y se seleccionaran 30 adultos por repetición.

Las líneas de respuesta dosis-mortalidad para el bioformulado se obtendrán mediante regresión lineal (FINNEY) y análisis estadístico SAS (Institute 1997) para determinar las CL₅₀ del bioformulado.

5. Análisis químico de los extractos vegetales y de los filtrados de las cepas nativas mediante HPLC

Los productos que muestren mayor porcentaje de mortalidad, serán considerados para el análisis químico para la determinación y cuantificación de los metabolitos secundarios.

La separación del ingrediente activo se realizará por HPLC, se programará a 254,4 y 280,4 nm; se empleará como fase móvil un sistema binario en gradiente de acetonitrilo y agua, comenzando con un 30% de agua, aumentando hasta el 70% en 10 minutos, al 90% a los 12 minutos y el 100% de agua en 15 min. Las muestras se inyectaron a 2 µL y el flujo fue de 0.4 mL/min (Scott *et al.*, 2005). Se utilizará una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de tamaño 4,6 x 150 mm y 5 µm.

Los extractos de masas se tomarán, siguiendo el método propuesto por Scott *et al.*, (2005), en el que se realizará una ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo positivo operado con las siguientes condiciones: Rango de masas 100 a 370 m/z, tamaño de paso 0.1, temperatura de ionización de 300 a 350° y de vaporización 400 a 500°C, tensión capilar 3000 V.

Para optimizar la detección y cuantificación de los compuestos, algunos parámetros como flujo, temperatura del horno podrán ser flexibilizadas en función a los resultados obtenidos.

Compartimentación de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Bioensayo de Determinación de CL ₅₀ de extractos vegetales				X	X	X	X	X				
Bioensayo para determinar la actividad insecticida de hongos entomopatógenos				X	X	X	X	X				
Comparación de hongos entomopatógenos con los extractos vegetales	X	X	X									
Análisis químico de los extractos vegetales									X	X		
Bioensayo para reevaluación de un bioformulado					X	X	X	X				
Análisis de los resultados									X	X	X	X
Artículo Científico							X	X	X	X	X	X

Compartimentación de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Bioensayo de Determinación de CL ₅₀ de extractos vegetales												
Bioensayo para determinar la actividad insecticida de hongos entomopatógenos												

Compatibilidad de hongos entomopatógenos con los extractos vegetales	10%								
Análisis químico de los extractos vegetales							20%		
Bioensayos para la evaluación de un bioformulado						15%			
Análisis de los resultados							5%		
Artículo científico							20%		

Duración total del proyecto

Año de inicio	2017	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5- Resultados Esperados

Artículo enviado a revista científica, asistencia a 1 congreso nacional/internacional

6- Literatura Citada

Alves, S.B., Alvares Jr., A.; Almeida, JEM. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Alves, SB. ed. Controle biológico de insetos. 2 ed. Piracicaba: FEALQ. p. 217-238.

Amador-García, E., C. Pérez T., D. A. Vera C., R. Trejo V., e H. B. Mota N. 2015. Hábitos reproductivos del Picudo de la Guayaba *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae) en Calvillo, Aguascalientes. Entomología Mexicana Vol. 2: 613-618.

Banos-Gonzalez, P. E., Zavaleta Mejía, E., M., Colinas León, M.T., Luna Romero, I. y Gutiérrez Alonso, J. G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Rev. Mex. Fitopatol, vol. 22, pp. 198-205.

Cable, P. y Powell, J. 1992. Insecticidal activity and expression of pyrethroid resistance in *Bemisia tabaci* using a glass vial bioassay. Brazilian Crop Protection Conference Pest and Diseases. 3C-15: 251-256.

De la Cruz R. V., E. González, G., J. S. Padilla, R., V. M. Rodríguez, M., R. Sánchez, L. y C. Serrano, G. 2015. Estado actual del conocimiento de los Productores Sobre el Control del Picudo de la Guayaba. In: Resúmenes 16° Simposio Nacional de Investigación. Aguascalientes, México.

González, G., J. S. Padilla R., L. Reyes M., M. A. Perales de la C. y F. Esquivel V. 2002. Guayaba, su cultivo en México. Libro Técnico Hum. 1. INIFAP. Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, México. 182 p.

González, G. E. 1999. Distribución e incidencia del picudo de la guayaba en la región Calvillo – Cañones. Informe final de Investigación, SARH- INIFAP- CIFAP- ZAC. Campo Exp. de los Cañones. México 23p.

González, G. E. 1994. Picudos del género *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae) asociados a guayaba (*Psidium guajava* L.) y su importancia en el Cañón del Juchipila, Zac. Tesis de Maestría en Ciencias. UAAAN, Aguascalientes, Batallas, Coahuila, México. 77 p.

González, G. E., J. Lozano S., M. A. Perales De la C., J. S. Padilla R. y M. P España, L. 2008. Control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champ.) con productos alternativos a los plaguicidas. In memorias del 16° Congr. Nac. De Control Biológico Zacatecas, Zac. 4p.

González, G. E. y M. A. Perales de la C. 1993. Panorámica de la región Calvillo – Cañón del Juchipila. Dcto. de Investigación interna. SARH- INIFAP- CIFAP- ZAC- Campo Exp. de los Cañones, México 15 p.

López-Sánchez, M., Izanora SM, Arauz A. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in a modified agar system. Food Microbiol 1995; 12:213-219.

Martens, M., Ludwig, L. High pressure inactivation kinetics of moulds. Universität Heidelberg, Institut für Lebensmitteltechnologie und Biopharmazie, 1999.

Nico, A. C., Chirionero, G.D., Ego y H. Almirá. 2003. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la colonización patológica de *Rhizoctonia solani*: Test de Patogenicidad y actividad Biológica de Metabolitos volátiles y toxinas. Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina. p: 173-191.

Plumb FW, Barthel GB, Van WB. 1967. Monitoring for pyrethroid resistance in tobacco budworm. In Proc. Beltway Cotton Pest. Res. Conferences. National Cotton Council. Memphis, TN, USA. pp. 324-326.

Schell, J., Naranjo E., Jones H., Chesney J., Poveda L., Sanchez P., Durst T., Arnason J. 2005. Analysis of Piperaceae secondary amides by HPLC-ESI/MS: A method for isolating and identifying unsaturated Amides from *Piper* spp. Journal of Agricultural and food chemistry. 53: 1907-1913.

SINPRO (Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Anuario estadístico de la producción agrícola. Cierre del ciclo de producción agrícola por cultivo. Disponible en: <http://sinpro.sic.gob.mx/AvanceNacionalSinPrograma.do> (Consultada: 11/01/2017)

- 06/03/2017).
- Tafolla R., E. González G y C. Perales S. 2001. Picudo del género *Conotrachelus* (Coleoptera:Curculionidae) de la guayaba *Psidium guajava* L. en Calvillo, Aguascalientes. *Entomología Mexicana*. 6(1):648-650.
- Velázquez L. J. 1975. Apariencia, biología y hábitos del picudo de la guayaba *Conotrachelus* spp. en la región de Calvillo, Ags. y Jalpa, Zac. Subproyecto de inv. SARH-INIA-CIANOC AGS. CAEPAB, Méx. 6 p.
- Villaseñor G. 1977. Perspectivas del mercadeo de la guayaba (*Psidium* sp.) en México (Estudio de caso en Calvillo, Ags.). Tesis de Licenciatura. UACH, Chapingo, México.p 16-18.
- Wyatt M., Walsh M.E. Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. *Food Microbiol* 1995; 12: 237-243