



universidad
de león

Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias
Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

Programa de Doctorado de Ingeniería de Biosistemas

Tesis doctoral

**CONTROL BIOLÓGICO DEL GORGOJO DE LA
JUDÍA *Acanthoscelides obtectus* (Say)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE:
BRUCHINAE) EN LA REGIÓN DE CASTILLA Y
LEÓN - ESPAÑA**

Paulo Henrique da Silva

León, 2017



universidad
de
león

Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias
Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

CONTROL BIOLÓGICO DEL GORGOJO DE LA JUDÍA
***Acanthoscelides obtectus* (Say) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE:**
BRUCHINAE) EN LA REGIÓN DE CASTILLA Y LEÓN - ESPAÑA

Tesis doctoral

Memoria presentada para optar al título de
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Paulo Henrique da Silva

Director:

Dr. Pedro Antonio Casquero Luelmo



León, 2017

**“El éxito de la vida no si mide por lo que has
logrado, sino por los obstáculos que has superado
en el camino”**

Abraham Lincoln

OFREZCO

A mi madre María de Jesús Carlota da Silva;

**A mis padres de corazón Luiza Zacarias da Silva y José de Ribamar Mendes
Chagas;**

**A mis hermanos, José de Jesús, Marinalva da Silva, Guilherme Augusto, Rosalina
Carlota, Flavio José y Fernando Gentil;**

A mis hijos, Pablo Henrique da Silva y Pietro Daniel Maia da Silva.

DEDICO

A mi padre José Daniel da Silva, *in memoriam*.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a muchas personas, cuyos nombres no constarán aquí, que me apoyaron con su ánimo y amistad a lo largo **de los cuatro años vividos en España**. Estas personas contribuyeron a que la presente tesis fuera una oportunidad para construir un conocimiento con relevancia social. Así que MUCHAS GRACIAS a todas las personas que participaron en esa jornada que me hizo aprender y desarrollarme como persona.

Agradecer a Dios y a mi familia (madre y hermanos) en Brasil. A mis hijos Pablo y Pietro, por aguantar mis periodos de estrés y por no poderles dedicar más tiempo. Principalmente a Pietro, que ha sido mi compañero en estos años, y que me ha ayudado a superar los momentos de soledad.

Gracias a mi director de tesis, Pedro Casquero Luelmo por el aprendizaje de la investigación científica y la aceptación y/o desafío de dirigir esta tesis.

A mi hermana Marinalva da Silva y mi cuñado Alain Fernando Fernández Taranilla, por el todo el apoyo y ayuda en las horas que lo necesité aquí en España.

Al doctor Bonifacio Reinoso, a la hora de facilitarme todas las variedades de alubias utilizadas en esta tesis; A la doctora María Fe Marcos Fernández, por la realización de las fotos de los ensayos.

Al amigo Wilkison de Assis Silva, por el apoyo e incentivo con sus palabras de ánimo en los momentos que más lo necesité. Al amigo Carlos Fernández Robles, por sus orientaciones estadísticas y metodológicas.

A los compañeros de doctorado, laboratorio y demás amigos, entre los cuales destacaría a: Óscar González, Guzmán Carro, Víctor Suarez, Samuel Álvarez, Alejandra Porteous, Desiree Rodríguez, Julia García, Carla Escapa y Sergio Paniagua. Y un agradecimiento especial a **Álvaro Rodríguez y Sara Mayo**, por la ayuda incondicional, haciendo posible la conclusión de esta tesis.

A la gran familia del C.D. Sahagún Promesas, que transformaron mis sábados y/o domingos en jornadas mucho más felices acompañando a mi hijo Pietro a sus partidos de fútbol.

A todos los amigos, vecinos de Villacalabuey y Sahagún que me acogieron como si fuera uno de los suyos.

A CAPES (Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior) del Gobierno de Brasil, a través del “Programa Ciencia sin Fronteras”, fundación brasileña que fomenta la investigación y desarrollo científico y sin la cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

RESUMEN

El uso de insecticidas en la agricultura, a pesar del elevado coste y de las consecuencias negativas que produce al medio ambiente, aún es la forma más habitual para el control de los insectos y plagas en los cultivos, sobre todo en los países menos desarrollados.

Estudios recientes demuestran que es necesario, además de factible, utilizar otros métodos de control de insectos. Entre esos métodos está el control biológico, tema desarrollado en esta tesis y que se considera una alternativa más acorde con los principios de la ecología, aparte de ser económicamente más asequible.

En la presente tesis se analiza en profundidad el insecto *Acanthoscelides obtectus*, conocido como gorgojo de la alubia común (*Phaseolus vulgaris* L.), que es su principal hospedador, con el propósito de desarrollar alternativas biológicas al control químico de esa plaga.

Para lograr los objetivos propuestos se presenta una descripción detallada del dimorfismo sexual de *A. obtectus*, estudiando los parámetros de su biología (longevidad, fertilidad y fecundidad) sobre la variedad local Riñón menudo.

Se evalúa la acción fumigante de aceites esenciales sobre adultos, larvas y huevos de *A. obtectus*, estableciendo sus propiedades insecticidas. Complementariamente, se identifican variedades con potencial de resistencia al ataque de *A. obtectus*. Y finalmente, se evalúa la capacidad de control de los hongos entomopatógenos de *Trichoderma* spp. y *Beauveria bassiana* para el control de *A. obtectus*.

Se concluye que el pigidio (V segmento abdominal) permite diferenciar adultos de *A. obtectus* machos de hembras. Todos los aceites esenciales evaluados causan mortalidad en los adultos de *A. obtectus*, siendo el procedente de Canela el más eficaz para huevos. Los hongos *B. bassiana*, *T. harzianum* (T-019) y *T. citrinoviride* (T-008) muestra un buen control sobre los diferentes estadios del gorgojo.

RESUMO

O uso de inseticida na agricultura, apesar de ser alto e das consequências negativas ao meio ambiente, ainda é o método comumente mais utilizado para controlar insetos e pragas nas lavouras, especialmente nos países menos desenvolvidos.

Estudos atuais mostram que é necessário e possível utilizar outros métodos para controlar os insetos. Entre eles está o controle biológico, tema desta tese, considerado uma alternativa em consonância com os princípios ecológicos, além de ser mais acessível economicamente.

Nesta tese se analisa em profundidade o inseto *Acanthoscelides obtectus*, conhecido como gorgulho do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo este seu principal hospedeiro, com a finalidade de desenvolver alternativas biológicas ao controle químico desta praga.

Para atingir os objetivos propostos, se apresentou uma descrição detalhada do dimorfismo sexual do *A. obtectus*, através do estudo dos parâmetros da sua biologia (longevidade, fertilidade e fecundidade) sobre a variedade de feijão local Riñón menudo.

Avalia-se a ação de óleos essenciais pulverizados sobre adultos, larvas e ovos de *A. obtectus*, estabelecendo suas propriedades inseticidas. Complementarmente, identificam-se variedades com potencial de resistência ao ataque de *A. obtectus*. E finalmente, avalia-se a capacidade dos fungos entomopatogênicos *Trichoderma* spp. e *Beauveria bassiana* no controle de *A. obtectus*.

Concluiu-se que pigídio (V segmento abdominal) possibilita diferenciar fêmeas e machos adultos de *A. obtectus*. Que todos os óleos essenciais testados provocam a morte dos adultos de *A. obtectus*, sendo o óleo de Canela o mais eficaz na fase de ovo. Os fungos *B. bassiana*, *T. Harzianum* (T-019) e *T. citrinoviride* (T-008) apresentam um bom nível de controle sobre as várias fases do gorgulho.

ABSTRACT

The use of insecticides in agriculture, despite the high cost and negative consequences that causes to the environment, it stills the most common way to control insects and pests in crops, especially in countries less developed.

Recent studies show use of the other insect control methods is necessary, in addition to being feasible. One of these methods is biological control. The developed topic in this thesis is considered an alternative more aligned with the ecology principles and economically more affordable.

This thesis analyzes in-depth the insect *Acanthoscelides obtectus*, commonly known as bean beetle (*Phaseolus vulgaris* L.), where the bean is the main host. The purpose is developing biological alternatives to this pest chemical control.

To achieve the proposed objectives, a detailed description of the sexual dimorphism of *A. obtectus* is presented, the parameters of his biology (longevity, fertility and fecundity) with the local variety of Riñón menudo.

The fumigant action of essential oils on adults, larvae and eggs of *A. obtectus* has been evaluated, and it was established their insecticidal properties. Complementarily, the varieties with potential resistance to the *A. obtectus* attack were identified. Finally, the control capacity of the entomopathogenic fungi of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* was evaluated to control the *A. obtectus*.

It is concluded that the pigidio (V abdominal segment) allows differentiating adults of male *A. obtectus* from females. The evaluated essential oils cause mortality in the adults of *A. obtectus*, being the Canela the most effective for eggs. The fungi *B. bassiana*, *T. harzianum* (T-019) and *T. citrinoviride* (T-008) show a good control over different stages of the weevil.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	19
1. GENERAL	19
2. ESPECÍFICOS	19
INTRODUCCIÓN	23
1. ALUBIA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	23
1.1. Situación actual del cultivo	24
1.2. Características botánicas de la alubia	28
1.3. Conservación de las semillas de alubia.....	30
2. GORGOJO DE LA ALUBIA (<i>Acanthoscelides obtectus</i>)	30
2.1. Ciclo de vida de <i>A. obtectus</i>	31
2.2. Dimorfismo sexual de <i>A. obtectus</i>	33
2.3. Daños provocados por <i>A. obtectus</i>	35
2.4. Métodos de control	36
3. MÉTODOS DE CONTROL BIOLÓGICO DE <i>A. obtectus</i>	37
3.1. Aceites esenciales (plantas bioactivas)	37
3.1.1. Acción fumigante de aceites de plantas bioactivas sobre <i>A. obtectus</i>	38
3.2. Variedades resistentes de alubias al gorgojo <i>A. obtectus</i>	39
3.3. Agentes de biocontrol empleados con <i>A. obtectus</i>	40
4. <i>Trichoderma</i> spp. PERSON, FRIES	41
4.1. Taxonomía y morfología de <i>Trichoderma</i> spp.	41

MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. CONDICIONES DE DESARROLLO DE <i>A. obtectus</i>.....	47
2. DIMORFISMO SEXUAL DE <i>A. obtectus</i>	47
3. TABLA DE VIDA <i>A. obtectus</i>	48
3.1. Insectos	48
4. BIOENSAYO.....	48
5. ACCIÓN FUMIGANTE DE ACEITES ESENCIALES SOBRE <i>A. obtectus</i> ..	50
5.1. Insectos y cría en laboratorio	50
5.2. Aceites esenciales	50
5.3. Diseño de los experimentos.	50
5.4. Ensayo frente a adultos de <i>A. obtectus</i>	52
5.5. Ensayo frente a larvas de <i>A. obtectus</i>	52
5.6. Ensayo frente a huevos de <i>A. obtectus</i>	53
6. VARIEDADES RESISTENTES.....	55
6.1. Ensayo con libre elección.	55
6.2. Ensayo sin libre elección.	57
7. POTENCIAL DE <i>Trichoderma</i> spp. PARA EL CONTROL DE <i>A. obtectus</i> ..	60
7.1. Colección de hongos	60
7.2. Crecimiento de los hongos.....	60
7.3. Diseño de los experimentos (Torre Potter)	62
7.4. Aplicación en semilla pildorada.....	63

8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	63
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
1.	DIMORFISMO SEXUAL DE <i>A. obtectus</i>	67
1.1.	Tamaño del insecto	67
1.2.	Forma del último segmento ventral	68
1.3.	Color del pigidio y velloidad abdominal.....	68
1.4.	Genitalia del macho	68
1.5.	Genitalia de la hembra	69
2.	TABLA DE VIDA DE <i>A. obtectus</i>	70
2.1.	Fertilidad.....	71
2.2.	Proporción de sexos (♀-♂)	72
2.3.	Mortalidad.....	72
2.4.	Ciclo de vida del insecto.....	72
2.5.	Duración fase de huevo.....	73
2.6.	Duración periodo larva-pupa.	74
2.7.	Duración de la fase de huevo hasta la emergencia del adulto.....	74
2.8.	Duración total del ciclo: huevo hasta muerte del adulto.....	75
2.9.	Longevidad de los adultos (♀-♂)	75
3.	ACCIÓN FUMIGANTE DE ACEITES ESENCIALES SOBRE <i>A. obtectus</i> 76	
3.1.	Acción fumigante de aceites esenciales sobre adultos de <i>A. obtectus</i>	76
3.2.	Acción fumigante de aceites esenciales sobre larvas de <i>A. obtectus</i>	83
3.3.	Acción fumigante de aceites esenciales sobre huevos de <i>A. obtectus</i>	90
4.	VARIEDADES RESISTENTES A <i>A. obtectus</i>.....	96
4.1.	Ensayo con libre elección	96
4.2.	Ensayo sin libre elección	103

5. POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *A. obtectus* 115

5.1. Uso de alubia pildorada con *Trichoderma* spp. para el control de larvas de *A. obtectus* 115

5.2. Comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para la inhibición de huevos de *A. obtectus*. 120

5.3. Comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para el control de adultos de *A. obtectus*. 122

CONCLUSIONES..... 127

BIBLIOGRAFÍA..... 131

TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de la superficie y de la producción a nivel mundial en el año 2014 (FAO, 2016).....	28
Tabla 2: Características de las alubias utilizadas en el ensayo con libre elección.....	56
Tabla 3: Características de las variedades utilizadas en el ensayo sin libre elección.	58
Tabla 4: Lista de aislados fúngicos utilizados en este ensayo.	60
Tabla 5: Parámetros biológicos de <i>A. obtectus</i> estudiados (media de días \pm error).....	70
Tabla 6: Tiempo medio de desarrollo de <i>A. obtectus</i> sobre alubia de la variedad local Riñón menudo.....	73
Tabla 7: Comparación de medias en el periodo de desarrollo (Media \pm Error) de <i>A. obtectus</i> en diferentes variedades de alubia en el ensayo sin libre elección.	103
Tabla 8: Comparación de medias en el porcentaje de pérdida de peso (Media \pm Error) en las distintas variedades de alubias tras ser atacadas por <i>A. obtectus</i>	105
Tabla 9: Comparación de medias de huevos puestos (Media \pm Error) por hembras de <i>A. obtectus</i> en diferentes variedades de alubias evaluadas.....	1066
Tabla 10: Comparación de medias en el porcentaje de alubias dañadas (Media \pm Error) en las distintas variedades de alubias tras ser atacadas por <i>A. obtectus</i>	1098
Tabla 11: Comparación de medias en el peso de los insectos emergidos (Media \pm Error) en diferentes variedades de alubia evaluadas.	1110
Tabla 12: Comparación de medias en el número de insectos emergidos (Media \pm Error) en diferentes variedades de alubia evaluadas.	1132

FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de la superficie y de la producción a nivel mundial en el año 2014 (FAO, 2016).....	25
Figura 2: Superficie y producción de España distribuidas por Comunidades Autónomas (Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2016).....	26
Figura 3: Planta y semillas de la alubia.	29
Figura 4: Larvas de <i>A. obtectus</i> a) sobre una semilla de alubia; b) penetrando en la semilla de alubia.	32
Figura 5: Vista dorsal macho izquierda y vista dorsal hembra derecha.	33
Figura 6: Vista ventral de último segmento abdominal y posición del pigidio. (Izquierda macho; Derecha hembra) comparación con Nahdy (1994).	34
Figura 7: Vista lateral de último segmento abdominal y posición del pigidio. (Izquierda macho; Derecha hembra) en comparación con Nahdy (1994).....	34
Figura 9: Órgano sexual (Izquierda hembra; Derecha macho).....	35
Figura 8: Patrón de coloración del pigidio, vista dorsal (Izquierda macho; Derecha hembra) (Nahdy 1994)	35
Figura 11: a) Semillas afectadas por <i>A. obtectus</i> ; b) Bote de cría; c y d) Limpieza de insectos.....	48
Figura 12: a) Placas Petri con parejas de insectos y sustratos de ovoposición (3 alubias); b) Detalle de una pareja de <i>A. obtectus</i> en placa Petri con alubias de la variedad Riñón.	49
Figura 13: Huevos viables de <i>A. obtectus</i>	49
Figura 14: Aceites esenciales utilizados en los ensayos.	50
Figura 15: Aplicación de los aceites: a) micropipeta; b) pipeteando el aceite; c) aplicación en el trozo de algodón.	51
Figura 16: a) Componentes de la cámara de fumigación; b) montaje de la cámara; c) cámara fumigación.	51
Figura 17: a) Transferencia de insectos para la cámara de fumigación; b) insectos en cámara después de la aplicación de los aceites.	52

Figura 18: Ensayo de control de gorgojo con aceites esenciales en la cámara de cultivo.	52
Figura 19: Obtención de las larvas: a) semilla en el material tamizado; b) larvas en la semilla.....	53
Figura 20: a) Sustrato para ovoposición (<i>A. obtectus</i> + alubias); b) Huevos recién puestos.	54
Figura 21: a) Huevos en cámara de fumigación; b) Tras 24 horas de exposición al aceite, de nuevo transferencia para placas Petri.....	54
Figura 22: Estructura de tipo olfactómetro (Izquierda cerrada; derecha abierta).	56
Figura 23: Variedades de <i>P. vulgaris</i> utilizadas en el ensayo: a) De arroz; b) Canaria; c) Bocheta; d) Riñón; e) De Ibeas; f) Manto marrón; g) Habichuela. (Imágenes tomadas del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF)).....	57
Figura 24: Variedades de <i>P. vulgaris</i> utilizadas en el ensayo: 1) De arroz; 2) Canaria; 3) Bocheta; 4) Haba del Bierzo; 5) Judía blanca pinta negra; 6) Canela; 7) Judía tío Anselmo; 8) De Ibeas; 9) Judía blanca; 10) Manto marrón; 11) Habichuela; 12) Riñón menudo; 13) Judía roja; 14) Canela IGP; 15) Judía marrón; 16) Colorado sin palo; 17) Judía de oro; 18) Palmeña manto marrón; 19) Verdina; 20) Amarilla; 21) Judía negra; 22) Alubia gorda; 23) Pinta pil 2-1; 24) Manto amarillo; 25) Mocha colorada; 26) Judía blanca redonda; 27) Riñón IGP; 28) Bajoca de la manteca; 29) Pinta IGP; 30) Palmeña marrón; 31) Judía Plancheta; 32) Judía marrón pequeña. (Imagen tomada del CRF).	59
Figura 25: Preparación de solución de esporas de <i>Trichoderma</i> a partir del crecimiento del aislamiento en medio patata-dextrosa-agar (PDA).	61
Figura 26: Alubias que han sido pildoradas con esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a) Alubias pildoradas en las placas Petri; b) Detalle de una alubia pildorada de la variedad local Riñón menudo con esporas de <i>Trichoderma</i> spp.; c) Larvas de <i>A. obtectus</i> sobre la superficie de alubia de la variedad local Riñón menudo.....	63
Figura 27: Dimorfismo sexual. a) Macho y hembra del mismo tamaño; b) Macho mayor que la hembra; c) Macho menor que la hembra; d) Hembra mayor que el macho.....	67
Figura 28: Patrón de coloración del pigidio, vista dorsal (Izquierda macho; Derecha hembra)	68

Figura 29: Edeago del macho de <i>A. obtectus</i> : a) órgano sexual macho; b) lóbulos laterales; c) lóbulo medio	69
Figura 30: Órgano sexual de la hembra de <i>A. obtectus</i>	69
Figura 31: Cópula de <i>A. obtectus</i>	70
Figura 32: Ciclo de vida de <i>A. obtectus</i> sobre alubia de la variedad local Riñón menudo.	73
Figura 33: Fase larval de <i>A. obtectus</i>	74
Figura 34: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (<i>Geranium</i> sp.) sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	76
Figura 35: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial Verbena (<i>Verbena</i> sp.) sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	77
Figura 36: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	78
Figura 37: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	79
Figura 38: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 24 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	80
Figura 39: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 48 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite	

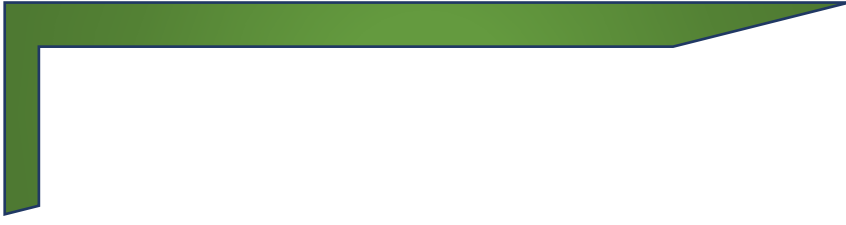
esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	81
Figura 40: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre adultos de <i>A. obtectus</i> tras 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	82
Figura 41: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (<i>Geranium</i> sp.) sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	83
Figura 42: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Verbena (<i>Verbena</i> sp.) sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	84
Figura 43: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	85
Figura 44: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	86
Figura 45: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 3 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre aceites para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	87
Figura 46: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 6 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite	

esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	88
Figura 47: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre larvas de <i>A. obtectus</i> tras 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	89
Figura 48: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (<i>Geranium</i> sp.) sobre huevos de <i>A. obtectus</i> tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).	90
Figura 49: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Verbena (<i>Verbena</i> sp.) sobre huevos de <i>A. obtectus</i> tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	91
Figura 50: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) sobre huevos de <i>A. obtectus</i> tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).	91
Figura 51: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) sobre huevos de <i>A. obtectus</i> tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).	92
Figura 52: Comparación de aceites esenciales de Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.) en similares dosis sobre huevos de <i>A. obtectus</i> tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indica diferencias significativas entre aceites para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).....	93
Figura 53: Huevos de <i>A. obtectus</i> sometidos a los distintos aceites esenciales [Geranio (<i>Geranium</i> sp.), Verbena (<i>Verbena</i> sp.), Canela (<i>Cinnamomum</i> sp.) y Romero (<i>Rosmarinus</i> sp.)] respecto al control observados en el día 0, día 4 y día 7.	95

Figura 54: Detalle del número de adultos de <i>A. obtectus</i> extraídos de distintas variedades de alubia.....	96
Figura 55: Comparación de medias de hembras atraídas por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	96
Figura 56: Comparación de medias de machos atraídos por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	97
Figura 57: Comparación de medias del total de insectos atraídos por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	98
Figura 58: Comparación de medias de las hembras emergidas en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes para la emergencia de hembras en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).	99
Figura 59: Comparación de medias de los machos emergidos en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes para la emergencia de machos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).	100
Figura 60: Comparación de medias del total de insectos emergidos en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes en la emergencia del total de insectos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).....	101
Figura 60: Peso de las alubias y peso de los restos de las mismas.	106
Figura 61: a) Alubias afectadas por <i>A. obtectus</i> ; b) Restos de excrementos y alubia tras estar infectadas por <i>A. obtectus</i>	106
Figura 63: a y b) Huevos puestos por las hembras de <i>A. obtectus</i> sobre las semillas de alubia, c) Detalle de una larva de <i>A. obtectus</i> entrando en la semilla de alubia.	108

Figura 64: Algunas variedades de alubia dañadas por <i>A. obtectus</i>	110
Figura 65: Detalle de las distintas variedades de alubia, así como algunos adultos de <i>A. obtectus</i> emergidos recientemente.	112
Figura 66: Adultos de <i>A. obtectus</i> emergidos de la semillas de alubia según su variedad.	114
Figura 67: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de <i>A. obtectus</i> tras una exposición de 4 días a alubias pildoradas con diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).....	115
Figura 68: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de <i>A. obtectus</i> tras una exposición de 7 días a alubias pildoradas con diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).....	116
Figura 69: Larvas de <i>A. obtectus</i> muertas y sobre las cuales se desarrollan aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	116
Figura 70: Comparación de medias para la mortalidad acumulada de larvas de <i>A. obtectus</i> tras la exposición a alubias pildoradas con distintos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).....	117
Figura 71: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de <i>A. obtectus</i> en el interior de alubias que previamente habían sido pildoradas con distintos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).....	118
Figura 72: Comprobación de la presencia de <i>Trichoderma</i> spp. en las larvas de <i>A. obtectus</i> muertas sembradas en medio PDA. a) T-005; b) T-008; c) T-013; d) T-019; e) Control.	119
Figura 73: Comparación de medias para el porcentaje de huevos de <i>A. obtectus</i> inhibidos 15 días después de la aplicación de distintos aislados fúngicos. Letras diferentes en los índices muestran diferencias significativas entre los distintos aislados fúngicos para un mismo día de conteo ($P \leq 0,05$, test DMS).....	120

Figura 74: Efecto de las esporas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre huevos de <i>A. obtectus</i> a los 3, 5 y 7 días.	121
Figura 75: Comparación de medias para el porcentaje de adultos de <i>A. obtectus</i> muertos días después de la aplicación de distintos aislados fúngicos. Letras diferentes en los índices muestran diferencias significativas entre los distintos aislados fúngicos ($P \leq 0,05$, test DMS).....	122
Figura 76: Comprobación de la presencia de <i>Trichoderma</i> spp. en los adultos de <i>A. obtectus</i> muertos sembrados en medio PDA. a) T-005; b) T-008; c) T-013; d) T-019; e) Control.	123



Justificación

y

Objetivos



JUSTIFICACIÓN

Las mayores pérdidas ocurren durante el almacenamiento y son ocasionadas por enfermedades y plagas, como por ejemplo el gorgojo de la judía *Acanthoscelides obtectus* (Nava *et al.* 2010). *A. obtectus* es una especie de brúchido que ataca las semillas de varias leguminosas, siendo su principal hospedero la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Debido a ello, hay una necesidad de desarrollar alternativas que tengan el potencial de reemplazar a los fumigantes químicos. El control químico es el método más tradicional contra *A. obtectus*. Los más usados son fosforo de aluminio y fosforo de magnesio, los cuales penetran al interior de los granos matando los insectos en cualquier estado de desarrollo (Fauguenbaum 2003).

Por lo tanto, la necesidad de alternativas al control químico para suprimir esa plaga y la creciente demanda de la sociedad por métodos menos perjudiciales para el medio ambiente, justifican la búsqueda de otros métodos como el control biológico, incluido el uso de insecticidas vegetales, hongos y variedades resistentes. Estos métodos juegan un papel crítico en la viabilidad cualitativa y cuantitativa de una agricultura ecológica y sostenible.

Así se han realizado estudios con aceites esenciales de especies vegetales con el propósito de establecer sus propiedades insecticidas, hongos del genero *Trichoderma* para evaluar su efecto entomopatogénico y la resistencia de algunas variedades de judía del banco de germoplasma, frente al gorgojo de la judía *A. obtectus*.

En el presente trabajo se plantea que los aceites esenciales poseen efectos insecticidas, los hongos del genero *Trichoderma* pueden actuar como entomopatógenos y algunas variedades pueden ser más tolerantes que otras al ataque del gorgojo.

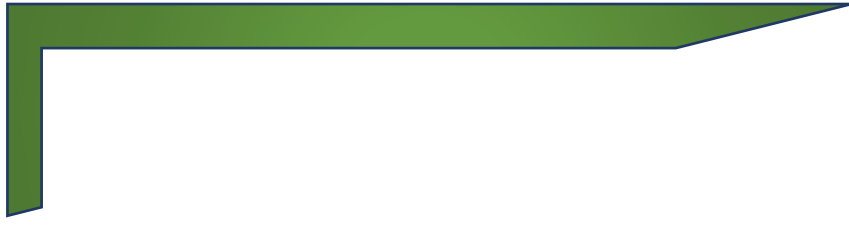
OBJETIVOS

1. GENERAL

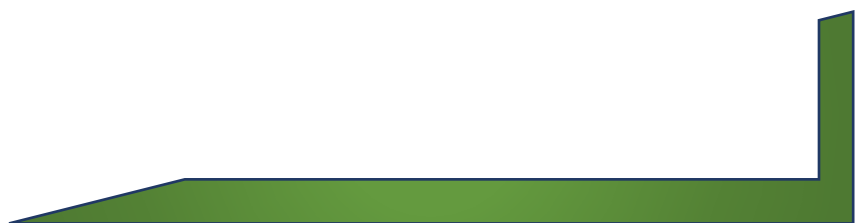
Analizar alternativas de control biológico del gorgojo *A. obtectus* frente a los productos químicos utilizados en métodos tradicionales.

2. ESPECÍFICOS

1. Sugerir una metodología que facilite una identificación más segura del dimorfismo sexual de *A. obtectus*. cuando se necesite trabajar con parejas de estos insectos.
2. Analizar los parámetros de la biología (longevidad, fertilidad y fecundidad) del *A. obtectus* sobre la variedad local Riñón menudo.
3. Comprobar la acción fumigante de aceites esenciales sobre adultos, larvas y huevos de *A. obtectus*.
4. Identificar variedades con potencial de resistencia al ataque del gorgojo *A. obtectus*.
5. Comprobar acción entomopatogénica de *Trichoderma* spp. en el control de *A. obtectus*.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ALUBIA (*Phaseolus vulgaris*)

El género *Phaseolus* fue domesticado hace 7.000 años en dos centros de origen, uno andino y otro en mesoamericano. Está formado por más de 55 especies, sin embargo, solamente cinco de ellas son las más cultivadas: la alubia común (*Phaseolus vulgaris* y *P. polyanthus*), la alubia Lima (*P. lunatus*); la alubia ayocote (*P. coccineus*) y la judía terapi (*P. acutifolius*) (Lioi y Piergiovanni 2013; de Ron *et al.* 2004).

Su introducción en España y su posterior comercialización a los demás países de Europa, fue consecuencia de las expediciones ocurridas a principios del siglo XVI (Lioi y Piergiovanni 2013)

Pero no fue hasta 1753 cuando Linnaeus escoge el nombre de *Phaseolus* para determinar su especie y nombrándola *Phaseolus vulgaris* L. (Lioi y Piergiovanni 2013) y definiendo su taxonomía como:

- Reino: Plantae
 - División: Magnoliophyta
 - Clase: Magnoliopsida
 - Subclase: Rosidae
 - Orden: Fabales
 - Familia: Fabaceae
 - Subfamilia: Faboideae
 - Tribu: Phaseoleae
 - Subtribu: Phaseolinae
 - Género: *Phaseolus*
 - Especie: *P. vulgaris* L

1.1. Situación actual del cultivo

La alubia (*P. vulgaris* L.) es la leguminosa grano, dedicada al consumo humano, más importante, ya que su cultivo se extiende por todos los continentes y es fuente de proteínas, vitaminas, minerales, fibra y otros compuestos como pueden ser polifenoles que podrían prevenir enfermedades cardiovasculares u obesidad. Estos beneficios para la salud y el medio ambiente, gracias a su asociación con otros microorganismos beneficiosos, han llevado a un renovado interés por su cultivo en países desarrollados, donde consumidores exigentes obligan a los cultivadores a considerar los rasgos culinarios y el valor sensorial, así como buenas prácticas ambientales en el cultivo de las plantas (Rivera *et al.* 2016).

A nivel mundial se produjeron 26.529.581 t en el año 2014 con una superficie de 30.612.841 ha. Los países con mayor superficie (Figura 1) dedicada a este cultivo en ese mismo año fueron India (10.000.000 ha lo que supone el 32,67 % de la superficie mundial de este cultivo), Brasil (3.185.745 ha, 10,41 %), Myanmar (3.017.250 ha, 9,86 %), Méjico (1.680.897 ha, 5,49 %) y Republica Unida de Tanzania (1.134.394 ha, 3,71 %). En cuanto a la producción de la alubia en 2014 (Figura 1), los países que tuvieron una mayor cantidad fueron Myanmar (4.651.094 t siendo el 17,53 % de la producción mundial), India (4.110.000 t, 15,49 %), Brasil (3.294.586 t, 12,42 %), Estados Unidos de América (1.311.340 t, 4,94 %) y Méjico (1.273.957 t, 4,80 %). El rendimiento de la alubia a nivel mundial en 2014 obtuvo como valor medio 1.500 kg/ha, aunque varía entre valores de 6.069 kg/ha en el caso de Irlanda y los 43,6 kg/ha en Eritrea (FAO 2016).

En Brasil, la alubia es un cultivo importante en la alimentación de la población brasileña, ya que es una importante fuente de proteínas y calorías (Mesquita *et al.* 2007). Pero, debido a la susceptibilidad a plagas y enfermedades, y uso de semillas de baja calidad física y fisiológica, es considerada un cultivo de gran riesgo (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento 2017). Brasil es considerado uno de los cinco mayores productores de alubia, lo cual tiene un valor económico y social de suma importancia en el país. Por un lado, proporciona una parte de las necesidades alimenticias de la población. Además, posibilita trabajo y renta a muchos pequeños y medianos agricultores que viven de la siembra de este cultivo.

España y Portugal se cultiva alubia en pequeñas superficies en asociación con otros cultivos para consumo propio y venta en el mercado local (de Ron *et al.* 2004).

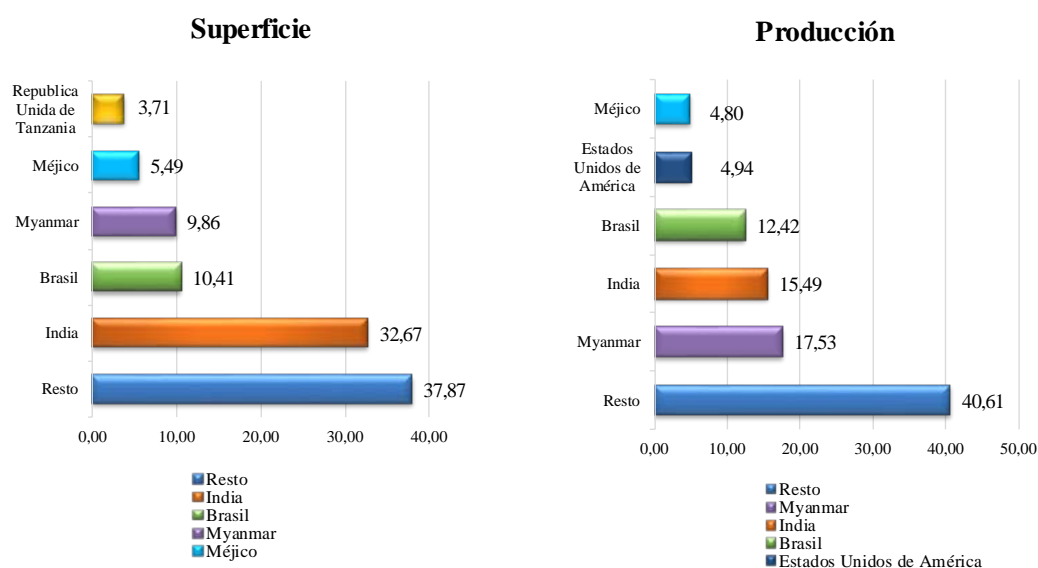


Figura 1: Porcentaje de la superficie y de la producción a nivel mundial en el año 2014 (FAO, 2016).

En el continente europeo en el 2014, se sembraron 311.014 ha que produjeron unas 701.576 t, siendo Bielorrusia, Ucrania, Rumanía, Lituania y Polonia los cinco países con mayor superficie dedicada a la alubia y Bielorrusia, Lituania, Ucrania, Polonia y Albania los que mayor producción obtuvieron (FAO 2016). Analizando los datos de la Unión Europea, en 2014, la producción media fue de 228.571 t, de los cuales el 27,34 % es producido por Lituania, seguida de Polonia y Letonia (FAO 2016). España, en 2014, obtuvo una producción de 12.629 t con una superficie de 7.737 ha situándola en el sexto puesto entre los países productores de alubia en la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016).

En España (Figura 2), se observa que Castilla y León, en 2014, fue la comunidad con la mayor superficie dedicada al cultivo de alubia con 3.094 ha y una producción de 5.073 t, suponiendo el 40% de la producción total de España. A esta comunidad le siguió Galicia con el 34,86 % y Navarra con el 9,56% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016).

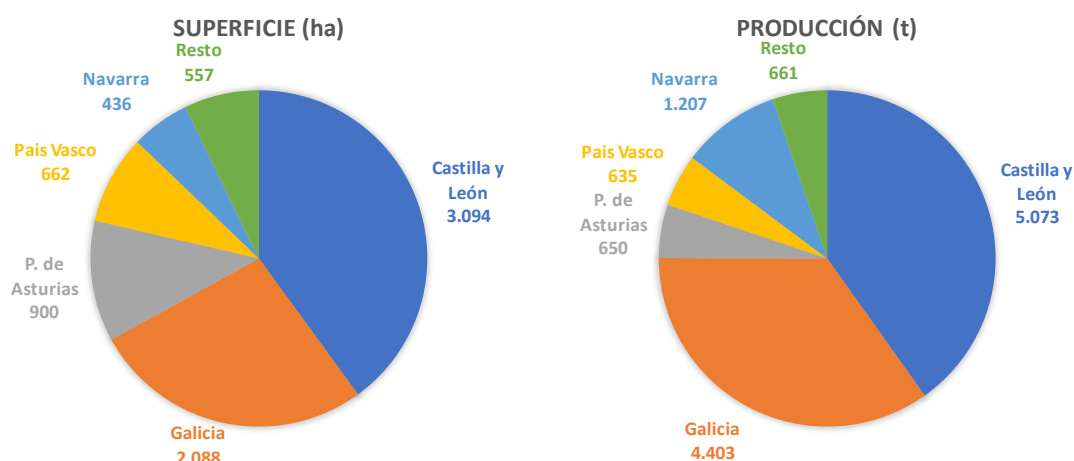


Figura 2: Superficie y producción de España distribuidas por Comunidades Autónomas (Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2016).

Dentro de la Comunidad de Castilla y León, León fue la provincia que mayor superficie y producción tuvo en 2014, con 2.440 ha y 3.855 t, suponiendo el 75,97 % de la producción de este cultivo en la comunidad y 30,53 % de España. Le siguió Ávila con un 10,44 % de la producción de Castilla y León. El resto de provincias presentaron una producción muy por debajo de las anteriormente mencionadas (Junta de Castilla y León 2016). Desde el siglo XVIII se cultiva alubia en la provincia de León y a lo largo de estos siglos, sobre todo en los últimos 40 años, el cultivo de esa legumbre ha tenido fases de prosperidad y retroceso, presentando una heterogeneidad varietal en las distintas áreas de cultivo (Reinoso Sánchez, Boto Fidalgo, y González Morala 2007).

En los años 90, con el apoyo de la Universidad de León y de la Diputación Provincial de León, se llevaron a cabo trabajos por toda la provincia leonesa, identificando más de 50 variedades locales de alubia. Estas se encuentran preservadas en el Grupo de Ingeniería y Agricultura Sostenible de la Universidad de León y en el Centro de Recursos Filogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Por Orden Ministerial de 6 marzo de 1984 fue reconocida con carácter provisional la denominación específica "judías de la Bañeza" y en la actualidad existe la Promotora y el Consejo Regulador de la Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Alubia de La Bañeza-León" (Orden A.P.A/289/2006; Orden A.Y.G./1254/2005), destinada a promocionar este producto tradicional y a velar por su calidad. La mayor superficie dedicada a este cultivo

en 2015 en la provincia se encuentra en El Páramo, siguiéndole en orden decreciente de importancia la Bañeza, Esla-Campos, La Maragatería - La Cepeda, Sahagún, Tierras de León y La Cabrera (Junta de Castilla y León 2015).

El cultivo de la judía grano, en la provincia de León, tuvo su apogeo entre los años 1975 y 1986 con una extensión de 22.000 hectáreas (30.000 toneladas). Desde entonces progresivamente, la superficie cultivada fue descendiendo (Reinoso Sánchez, Boto Fidalgo, y González Morala 2007), llevando en 2014 a tener una superficie de 2.440 ha y con una producción de 3.855 t.

Las variedades grano cultivadas tradicionalmente en la Península Ibérica son mayoritariamente locales, aunque se han obtenido variedades de judía grano comerciales mejoradas éstas apenas se han introducido en los campos de cultivo, debido a la elevada interacción genotipo-ambiente que presenta el cultivo lo que dificulta el desarrollo de variedades adaptadas a un amplio rango de ambientes (Casquero *et al.* 2006).

Esta leguminosa se caracteriza principalmente por la gran diversidad de tipos de semillas con una amplia variedad de colores, formas, texturas y tamaños. Sin embargo, en general, también la región de producción sirve para identificar y describir las clases comerciales o tipos de judía (Voysest y Dessert 1991), siendo muchas veces esto lo indicativo de la variedad.

Entre las variedades grano tradicionales en España destacan la “Granja Asturiana” variedad tradicional producida en el Principado de Asturias e incluida en la IGP Faba Asturiana. En Galicia la IGP para la Faba de Lourenzá, que incluye dos variedades la “Faba Galaica” y la “Faba do Marisco” cultivadas en el Valle que da nombre a esta haba de calidad. En el País Vasco están amparadas por la marca de calidad Eusko Label las alubias de “Tolosa”, “Gernika” y la “Pinta Alavesa”. En Cataluña son distinguidas las variedades “Ganxet” y “Santa Pau” producidas en las comarcas del Maresme y de La Selva, la primera, y en la Garrotxa la segunda variedad; Añadir que mientras la judía de Ganxet ya cuenta con una D.O.P., la segunda está tramitando el mismo distintivo.

En Castilla y León hay dos Indicaciones Geográficas Protegidas, que son la IGP “Judías de El Barco de Ávila” y la IGP “Judía de La Bañeza León”. Se acogen a la primera IGP las variedades “Blanca Redonda”, “Blanca Riñón”, “Morada Larga”, “Morada Redonda”, “Arrocina”, “Planchada” y el “Judión de El Barco”. En León la tradición y calidad de las judías grano dio lugar a la I.G.P “Alubia de La Bañeza León”, que fue ratificada en BOE

n° 35 del 10/02/2006 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; Este reglamento ampara las variedades de “Canela”, “Plancheta”, “Pinta” y “Riñón menudo”.

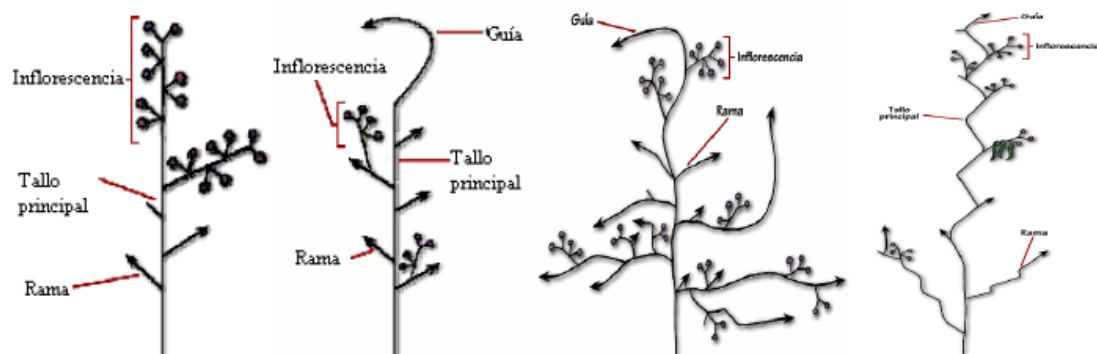
1.2. Características botánicas de la alubia

P. vulgaris L. es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Fabaceae o Leguminosae. La germinación es epigea, y requiere 5-7 días para que se lleve a cabo. Presenta una raíz principal con numerosas raíces secundarias, cuya longitud puede variar entre 10 y 30 cm (Graham y Ranalli 1997). Presenta dos cotiledones tras la germinación, los cuales son sustituidos por unas hojas verdaderas. Las hojas son trifolioladas, con folíolos enteros o lobulados y con estípulas persistentes (Figura 3).

Pueden tener diferentes hábitos de crecimiento (van Schoonhoven y Pastor-Corrales 1987) (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentaje de la superficie y de la producción a nivel mundial en el año 2014 (FAO, 2016).

Características	Hábitat			
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Hábitat	Determinado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado
Brote terminal	Reproductivo	Vegetativo	Vegetativo	Vegetativo
Porte	Erecto arbustivo	Erecto arbustivo	Postrado trepador o semitrepador	Trepador
Guía terminal	Ausente o pequeña	Ausente o medio	Pequeña o larga	Muy larga
Distribución de vainas	A lo largo del tallo	A lo largo del tallo	Fundamentalmente en la zona basal	A lo largo del tallo o fundamentalmente en la zona superior



Las flores son zigomorfas, es decir, presentan un plano de simetría bilateral, y están dispuestas en racimos axilares insertados en los nudos hinchados, con brácteas persistentes o caducas. La flor, puede presentar una gran variedad cromática y contiene diez estambres y un solo ovario multiovulado, con una fecundación predominantemente autógena, obteniéndose un fruto o vaina recta o ligeramente curvada. La floración se inicia, normalmente entre los 28 y 42 días tras la siembra, aunque puede variar según las características climáticas de la zona. La duración de la floración varía en función de los hábitos de crecimiento: las de hábito determinado, tienen una floración concentrada en un periodo corto de 5-6 días. Sin embargo, las de hábito indeterminado presentan una floración escalonada que duraría entre 15 y 30 días. El fruto es una legumbre o vaina en cuyo interior se localizan de 4 a 8 semillas (Graham y Ranalli 1997).

La formación de la semilla puede durar desde los 23 días en las cultivares de crecimiento determinado hasta casi 50 días en las de hábito indeterminado. La madurez fisiológica puede extenderse hasta los 200 días tras la siembra. Las semillas pueden ser redondas, elípticas, algo aplanadas o redondeadas de forma alargada, con una amplia variación de colores (Figura 3).



Figura 3: Planta y semillas de la alubia.

1.3. Conservación de las semillas de alubia

Cuando se producen semillas de alubia, la mayor preocupación es su conservación. Los productores se enfrentan a la pérdida significativa en el almacenamiento debido al ataque de plagas, como por ejemplo *Acanthoscelides obtectus* (Familia: Bruchidae), *Bruchus rufimanus* (Familia: Bruchidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Familia: Silvanidae), entre otras (Cubero Salmerón, Moreno, y Giraldez 1983; de Liñán Vicente 1998).

Un manejo inadecuado en postcosecha durante el almacenamiento, puede afectar la calidad de las semillas y tener grandes pérdidas debido al ataque de insectos (Araujo *et al.* 1985).

Los insectos empiezan su ataque en el campo y continúan en los almacenes, haciendo orificios, impidiendo su comercialización para alimentación o propagación (Gallo *et al.* 2002). Su control se lleva a cabo principalmente con la utilización de productos químicos, poniendo en riesgo la salud y generando residuos que posteriormente son detectados en los granos (Tejeda Tribiño 2011; Mazzonetto y Vendramim 2003).

2. GORGOJO DE LA ALUBIA (*Acanthoscelides obtectus*)

Con el aumento de las exportaciones e importaciones de semillas de unas zonas a otras, se ha favorecido la propagación de diversas plagas como es el caso del gorgojo ya que se puede encontrar en campos agrícolas, áreas urbanas y graneros.

Pertenecientes a la familia Bruchidae, los gorgojos de las semillas están ampliamente distribuidos en todo el mundo, pero en las regiones tropicales y subtropicales, es donde se encuentra el mayor número de especies. Las larvas de los insectos de esta familia, se alimentan de semillas de aproximadamente 34 familias de plantas, especialmente de fabáceas (Romero-Nápoles 2002a; de la Cruz-Pérez *et al.* 2013). Este insecto afecta a los granos tanto en campo como en el almacenamiento, donde llegan a causar hasta un 100% de pérdidas (Dell'Orto y Arias 1985).

A. obtectus, conocido con el nombre común del gorgojo de la alubia proviene de las regiones ecuatoriales de Latinoamérica, esparciéndose por Norteamérica, Europa y África (Huignard 1978). Es considerado una importante plaga de *P. vulgaris* y *P. lunatus*, afectando a los granos en el almacenamiento o en el campo. Es una especie polífaga y puede afectar alrededor de 35 especies de leguminosas (Romero-Nápoles y Johnson 2004).

Los adultos son de color paja, tienen una forma ovoide y miden de 2 a 4 mm de longitud. Son buenos voladores, que infectan los cultivos de alubia de los campos para el almacenamiento (Gallo *et al.* 2002).

Sus larvas se alimentan exclusivamente de las semillas, y causan daños considerables en la misma. Las galerías destruyen los cotiledones, causando una reducción en el peso de las semillas y su germinación (Gallo *et al.* 2002; Quintela 2002).

La clasificación taxonómica de *A. obtectus* es («Fauna Europaea» 2017):

- Reino: Animalia
 - Subreino: Eumetazoa
 - Phylum: Arthropoda
 - Subphylum: Hexapoda
 - Clase: Insecta
 - Orden: Coleoptera
 - Familia: Chrysomeloidea
 - Subfamilia: Bruchinae
 - Tribu: Bruchini
 - Subtribu: Acanthoscelidina
 - Género: *Acanthoscelides*
 - Especie: *A. obtectus* Say, 1831

2.1. Ciclo de vida de *A. obtectus*

El gorgojo de la alubia *A. obtectus* (Say), es uno de los principales problemas de la alubia almacenada en todo el mundo (D'Aubeterre *et al.* 2012). Las larvas (inmaduros) son las que causan los daños en semillas, alimentándose, provocan pérdida en su valor comercial, nutritivo, peso y capacidad germinativa (Dell'Orto y Arias 1985). Su depreciación comercial es debido a las galerías en el grano, los restos de excrementos (heces) y restos de individuos que mueren en los granos durante su desarrollo, lo que favorece desarrollo de hongos y patógenos, descalificándolas para el consumo humano (S. Ramírez y Suris 2015).

Las hembras depositan los huevos directamente sobre la semilla o en el substrato en grupos de dos a diez. Estos miden entre 0,3 y 0,7 mm y presentan, inicialmente, un color translúcido volviéndose después lechoso (Vieira 1983; Howe y Currie 1964).

Las larvas recién emergidas se desplazan en busca de las semillas, perforando las semillas, donde se alimentan del endospermo (Figura 4) (Romero-Nápoles 2002b). En esta fase las larvas (1° estadio), presentan un color blanco lechoso, miden cerca 1 mm y pudiendo llegar hasta 4 mm en el último estadio, en el cual hacen cámaras para pasar la fase de pupa haciendo un orificio para la salida del adulto. En una única semilla se pueden desarrollar más de una decena de insectos.

En la fase adulta el insecto presenta forma ovoide, midiendo de 3 a 4 mm. son de color marrón o gris oscuro en todas en la parte ventral del abdomen, pigidio, patas, antenas. La hembra es más grande que el macho. Se puede observar la separación entre sexos por la inclinación del pigidio, en la hembra es oblicua y en el macho es vertical. Salen del grano maduros sexualmente y aptos para la copula (Halstead 1963; Gallo *et al.* 2002).

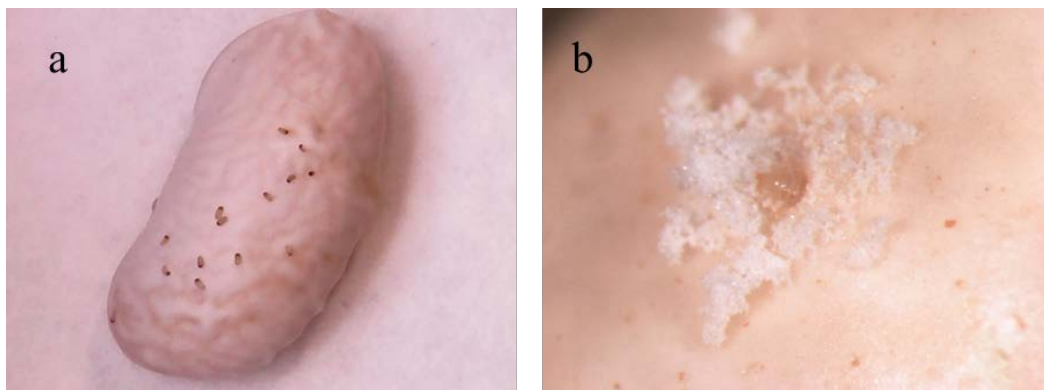


Figura 4: Larvas de *A. obtectus* a) sobre una semilla de alubia; b) penetrando en la semilla de alubia.

Los adultos para dar continuidad a su ciclo biológico no necesitan alimentarse, y pueden empezar a emparejarse a las 24h iniciando una nueva generación, pueden tener varias generaciones en el mismo año, pudiendo permanecer en los granos almacenados hasta terminar todo el ciclo (Romero-Nápoles 2002b). Los insectos son ágiles caminadores y voladores, y presentan la capacidad de fingir estar muertos (tanatose), cuando son perturbados, lo que dificultan su estudio (S. Ramírez y Suris 2015).

2.2. Dimorfismo sexual de *A. obtectus*

El término dimorfismo se utiliza en campo de la biología para aludir a dos aspectos anatómicos diferentes en animales o plantas. En el diccionario de la Real Academia Española está definido como: “Condición de las especies animales o vegetales que presentan dos formas o dos aspectos anatómicos diferentes”. En este sentido, es posible distinguir entre diversos tipos de dimorfismos, siendo el sexual es el más típico.

El dimorfismo sexual está presente en la mayoría de las especies. Se caracteriza por un conjunto de variaciones morfológicas y fisiológicas entre machos y hembras de una misma especie, conllevando a una alteración en la fisonomía externa entre los dos sexos, que puede ser identificada por la presencia de algunas diferencias en la forma, coloración, tamaño, más o menos visible dependiendo de la especie.

El grado de dimorfismo sexual varía entre unas especies y otras. En el caso de los insectos, en algunos se puede percibir las variaciones por la morfología externa, en la cual presentan diferencias en las antenas, pigidio, forma y coloración de los élitros, así como la forma del V esternito abdominal (Halstead 1963).

El dimorfismo sexual entre la hembra y el macho, de *A. obtectus*, prácticamente no es visible a simple vista. Para hacer una distinción entre sexos se requiere el uso de una lupa estereoscópica, que posibilita identificar el conjunto de características morfológicas que diferencian los sexos.

El tamaño de los insectos es una de las características utilizadas para diferenciar machos y hembras. En general, las hembras son mayores que los machos. Sin embargo, este criterio no ser del todo fiable, ya que su tamaño está directamente relacionado con la cantidad de alimento disponible para el desarrollo larval y la cantidad de larvas por semilla. Así algunos insectos se desarrollarán más que otros independientemente de su sexo.



Figura 5: Vista dorsal macho izquierda y vista dorsal hembra derecha.

Respecto a las diferencias entre machos y hembras de *A. obtectus* según Halstead, (1963) y Haines, (1991) los machos, en su región dorsal el pigidio es vertical y es visto parcialmente, mientras que en las hembras el pigidio es oblicuo y bastante visible (Figura 5).

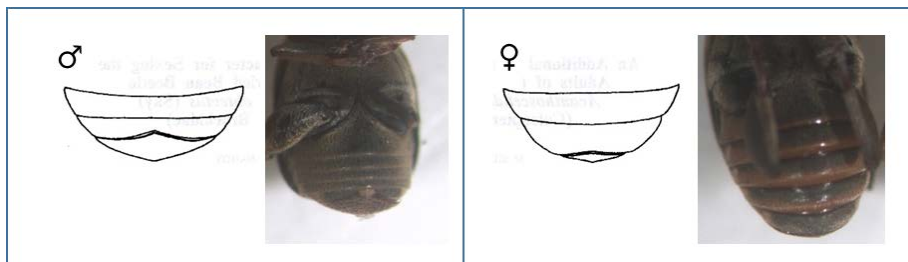


Figura 6: Vista ventral de último segmento abdominal y posición del pigidio. (Izquierda macho; Derecha hembra) comparación con Nahdy (1994).

En los machos el 5° esternito es más corto en el segmento anterior y el pigidio es más puntiagudo con dirección hacia bajo ventralmente y convexo. Ya en las hembras, ese esternito es tan largo como en el segmento anterior y el pigidio es prácticamente recto u oblicuo (Figura 6) (Nahdy 1994; Vélez Ángel 1997).

También se puede apreciar otra diferenciación por la parte ventral en el último segmento del abdomen (esternito abdominal V) y por la posición del pigidio (Figura 7) (Balachowsky, 1962; Bousquet, 1990; Haines, 1991; Halstead, 1963; Vélez Ángel, 1997).

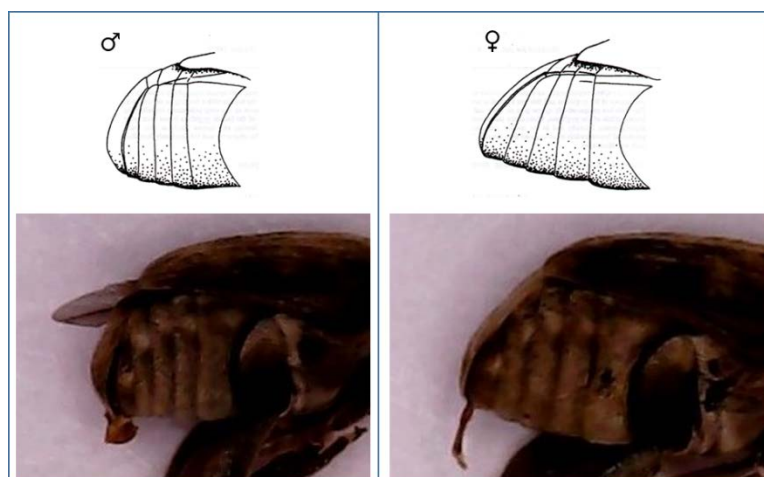


Figura 7: Vista lateral de último segmento abdominal y posición del pigidio. (Izquierda macho; Derecha hembra) en comparación con Nahdy (1994).

Otra diferencia sería una variación en el color y padrón del pigidio de los machos y hembras (Nahdy 1994). Esta característica podría según él ser usada para diferenciar los dos sexos (Figura 8).

No es fácil confirmar esas observaciones en *A. obtectus* en función de la similitud en su morfología externa. Otra dificultad añadida sería trabajar con una gran cantidad de insectos vivos ya que son pequeños, muy ágiles y con una gran capacidad de vuelo (Nahdy 1994).

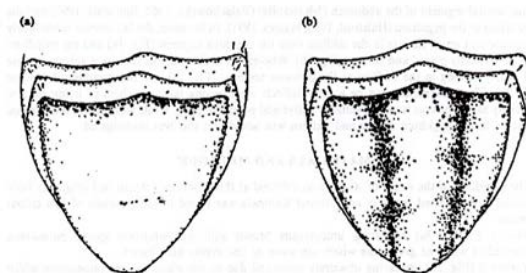


Figura 9: Patrón de coloración del pigidio, vista dorsal (Izquierda macho; Derecha hembra) (Nahdy 1994)

Otra diferencia sería que el macho presenta vellosidades abdominales más clara que en la hembra (Vélez Ángel 1997).

Una forma más segura de confirmar esa diferenciación, si todavía quedan dudas, sería la observación de la genitalia, debido a que hay una estructura particular y diferenciada en ambos sexos (Figura 9) (Romero-Nápoles 2002b).

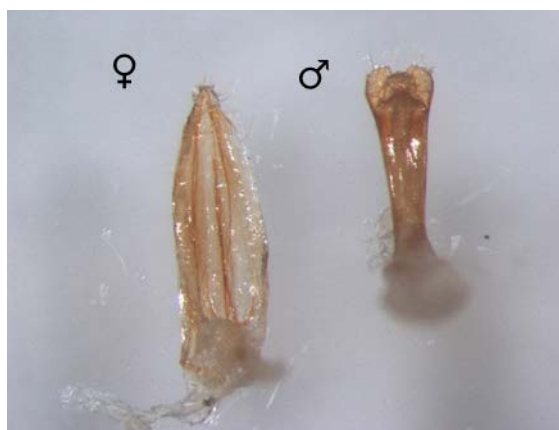


Figura 8: Órgano sexual (Izquierda hembra; Derecha macho).

2.3. Daños provocados por *A. obtectus*

Según Ruedell *et al.* (1974) las infestaciones de *A. obtectus*, pueden causar una reducción de 70% en la germinación de las semillas, si es atacado por 1 a 3 insectos. Oliveira *et al.* (1979) estudiaron el ataque de estos insectos en 11 cultivares de alubia en el almacenamiento durante un año, y observó que la germinación llegó a cero.

Los daños provocados por el *A. obtectus* en las alubias están directamente relacionados con las condiciones de humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento. Cuanto más prolongado sea el almacenamiento y las altas temperaturas más perjudiciales son las consecuencias. Tales condiciones favorecen el endurecimiento del grano, posibilitando la infestación del gorgojo lo que conlleva cambios en la textura, sabor con la degradación de

los fitatos y metionina, aumentando el tiempo de cocción (Martín-Cabrejas, Esteban, y Perez 1997).

El daño más importante causado por el *A. obtectus* en la alubia es la pérdida de post-cosecha. Conforme Sgarbiero *et al.* (2003) un 35% de la producción de judía de Centroamérica, México y Panamá se pierde debido al ataque de este insecto. En Brasil, el insecto y las malas condiciones de almacenamiento en el medio rural provocan pérdidas de 20 a 30%.

Es importante resaltar los daños indirectos, los cuales favorecen la entrada de microorganismos, contaminando el grano por ácaros y hongos. El valor del grano está directamente relacionado a su nivel de infestación por insecto. Los granos dañados presentan agujeros externos por donde sale el adulto. Los granos que en apariencia parecen estar en buenas condiciones, pueden tener infestaciones internas suficientes para inviabilizar su comercialización (Rosolem y Marubayashi 1994). El daño lleva a pérdidas en el peso, en el valor nutritivo y germinativo de las judías con la consecuente desvalorización comercial.

2.4. Métodos de control

En los métodos de control para esta plaga podemos citar.

- Control químico
 - Limpieza y aplicación de productos residuales, después del almacenamiento.
- Control físico
 - Alteración de las condiciones atmosféricas del almacén, desfavoreciendo el insecto plaga.
- Control mecánico
 - Empleo de embalajes (bolsas de plásticos o papeles o cajas) para protección contra los insectos.
- Control comportamental

- Uso de feromonas para monitorear o controlar los insectos que estén en el almacén.
- Control biológico
 - Empleo de:
 - Enemigos naturales
 - Aceites esenciales
 - Agentes de biocontrol
 - Variedades resistentes.

3. MÉTODOS DE CONTROL BIOLÓGICO DE *A. obtectus*

3.1. Aceites esenciales (plantas bioactivas)

Plantas bioactivas son plantas que presentan importantes principios activos para medicinas, alimentos, cosméticos, productos de higiene y pesticidas agrícolas (Epagri 2010).

Las plantas producen varios tipos de componentes orgánicos, que se dividen en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios intervienen en la supervivencia y desarrollo de las plantas. Los metabolitos secundarios son compuestos químicos adquiridos por las plantas como ventaja evolutiva para su supervivencia y reproducción (dos Santos *et al.*, 2013; Vizzotto *et al.*, 2010) y pueden actuar también como pesticidas naturales de defensa contra los herbívoros o microorganismos patógenos (Jamal, Silveira, y Ronchi 2008).

Los insecticidas provenientes de extractos de plantas bioactivas se están estudiando como alternativa de manejo integrado de plagas (Lima Júnior 2011). Algunos de los primeros insecticidas botánicos usados fueron: nicotina, piretrina, rotenona, sabadina y otros alcaloides y rianodina (Dequech *et al.* 2008). El estudio con aceites, empezó como alternativa de protección para paliar la contaminación de los productos químicos (Prakash y Rao 1997; Isman 2000).

Este tipo de sustancias con poder insecticida se puede emplear como compuesto aislado, identificado y sintetizado posteriormente a gran escala o bien, una vez identificada la actividad del insecticida, como extracto vegetal bruto (Yang y Tang 1988).

Los extractos botánicos pueden actuar de diferentes maneras sobre los insectos tales como: provocar la mortalidad de la plaga, inhibición y reducción de su capacidad de alimentación, retrasar su desarrollo, provocar deformaciones y/o esterilidad (Dequech *et al.* 2008) repulsión, toxicidad en nematodos, ácaros y otras plagas agrícolas (Ebadollahi y Jalali Sendi 2015).

Los insecticidas de síntesis química pueden dejar residuos por mucho más tiempo que los aceites ya que estos se degradan mucho (días o horas) más rápido que los químicos con lo que son menos agresivos a los enemigos naturales. Debido a su rápida degradación, los insecticidas botánicos, son aplicados con mayor frecuencia por lo que pueden incrementar los costes productivos respecto a los químicos (Prakash y Rao 1997).

Dentro los insecticidas botánicos, los aceites esenciales volátiles son los más estudiados para control de plagas y enfermedades (Yang *et al.* 2003; Lee, Annis, y Choi 2004; Rozman, Kalinovic, y Korunic 2007). Sin embargo, para su registro, se necesitan trabajos que demuestren su toxicología (Daglish 2006).

3.1.1. Acción fumigante de aceites de plantas bioactivas sobre A. obtectus.

La protección de cultivos agrícolas depende de la utilización de insecticidas químicos, que plantean posibles peligros para la salud y un riesgo para el medio ambiente (Isman 2000; Shaaya *et al.* 1997).

Para proteger los productos almacenados contra insectos, la fumigación es el método más eficaz (Shaaya *et al.* 1997). Sin embargo, el número de productos aplicables disminuye cada año debido al desarrollo de resistencias en los insectos y presiones sociales contra el uso de productos químicos tóxicos (Bughio, 2004; Shaaya *et al.*, 1997).

Comúnmente se utilizaron como fumigantes el bromuro de metilo y la fosfina (Shaaya *et al.* 1997). No obstante, en 1995, el bromuro de metilo fue señalado como uno de los contribuyentes al debilitamiento de la capa de ozono. El protocolo de Montreal estableció la congelación de su consumo en los países desarrollados manteniendo los niveles de 1991, reduciéndose su consumo al 25% en 1998, 50% en 2001, 75% en 2003 y finalmente su supresión el 1 de enero de 2005 (PNUMA 2000). Dicho protocolo prevé una excepción para su uso agrícola, cuando se demuestre que no hay alternativas viables.

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensas tanto morfológicos como químicos contra los insectos (Prakash y Rao 1997) y poseen actividades insecticidas, presentes en la fracción de aceite esencial, monoterpenoides, en la mayoría de los constituyentes de los aceites esenciales (G. H. Schmidt, Risha, y El-Nahal 1991; Shaaya *et al.* 1997).

El uso de aceites esenciales de plantas pueden ser una alternativa para el control de insectos ya que algunos de ellos presentan selectividad a ciertas plagas, son biodegradables y no tóxicos (Isman 2001; Prabakar y Jebanesan 2004).

Los aceites pueden ser obtenidos de varias partes de la planta (Isman 2000). Según Shaaya *et al.* (1997) los daños causados por los insectos en los granos almacenados pueden superar los 40% cuando no se utilizan medidas de protección. En algunos países de Asia y África, para la protección de leguminosas contra los insectos de almacén, en los hogares y en las pequeñas explotaciones, se utilizan aceites comestibles como insecticidas de contacto (Shaaya *et al.* 1997).

3.2. Variedades resistentes de alubias al gorgojo *A. obtectus*

Uno de los métodos de control que viene presentando resultados favorables en el control de los gorgojos de la alubia es la utilización de plantas resistentes. La resistencia de plantas es una práctica que tiene la finalidad de mantener los insectos-plaga en un nivel más bajo que el nivel el daño económico. El método de resistencia de plantas es una forma de control ventajosa, de fácil utilización, bajo coste, no contamina el medio ambiente y es compatible con otras prácticas agrícolas (Gallo *et al.* 2002).

Una variedad resistente es aquella que su constitución genotípica sufre menos daños que otras en las mismas condiciones de un ataque de plaga (Gallo *et al.* 2002). Resalta que la resistencia es influenciada por diversos factores, pudiendo ser positiva o negativa. En ese sentido se considera que la expresión fenotípica de la resistencia (mayor o menor daño) es resultante de la interacción genotipo-ambiente.

La resistencia de plantas puede ser definida como un conjunto de características hereditarias que permiten a una especie vegetal reducir su utilización como planta hospedera de determinadas especies de insectos (Beck 1965). La resistencia de plantas a insectos se presenta en tres modos: no preferencia, antibiosis y tolerancia. En la forma de

resistencia de no preferencia, la planta es poco utilizada para la alimentación del insecto, ovoposición o refugio. En el modo antibiosis la planta actúa en la biología del insecto, provocando además de su mortalidad en la fase temprana de vida, reducción de tamaño, peso y fecundidad, alterando el ciclo biológico del insecto. La planta tolerante es poco dañada bajo un mismo nivel de infestación de las plagas in alterar el comportamiento ni la biología del insecto (Painter 1951).

3.3. Agentes de biocontrol empleados con *A. obtectus*

El control biológico de plagas consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de sus poblaciones, se trata de una técnica milenaria que dejó de practicarse con la generalización de la lucha química como medida de control de plagas. Hasta que los diversos problemas que ocasionó el uso intensivo de insecticidas químicos ha ganado de nuevo terreno a esta alternativa en los últimos años (Nicholls 2008).

Muchos son los tipos de insecticidas químicos que se han utilizado para el control de plagas. Sin embargo, debido al desarrollo de resistencias de estos insectos a los insecticidas y a una mayor conciencia ambiental sobre el impacto a la salud y al medio que causan estas sustancias, se ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de control alternativos (Alahmadi, Ouf, y Ibrahim 2012).

Los problemas ambientales y la resistencia de las plagas asociados a un uso intensivo de insecticidas químicos, ha incrementado los estudios sobre estrategias integradas de manejo de plagas con control biológico. Existiendo un creciente interés en el estudio de los hongos como bioinsecticidas, como se evidencia por el número de productos comerciales disponibles y en desarrollo que tienen como materia prima sustancias fúngicas (Abdul-Wahid y Elbanna 2012). Esta industria se ha desarrollado en el uso de hongos patógenos para controlar las poblaciones de insectos plaga, específicamente en plagas agrícolas (Hajek 2004).

En el control biológico sobre insectos plaga, el hongo *Beauveria bassiana* ha revelado ser de gran eficacia sobre coleópteros, por ejemplo, sobre la especie *Enaphalodes rufulus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Meyers *et al.* 2013) o sobre la especie *Monochamus alternus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Maehara y Kanzaki 2014). Por otro lado, las cepas de hongos de *Trichoderma* spp. muestran buenos resultados para ser usados en el control biológico de

plagas, como por ejemplo sobre *Lucanus cervus* (Coleoptera: Lucanidae) (Alahmadi, Ouf, y Ibrahim 2012) y *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) (Á. Rodríguez-González *et al.* 2017).

A. obtectus daña los cultivos tanto *in-situ* como almacenados provocando pérdidas de hasta el 60% de la cosecha. Para su control se han utilizado insecticidas sintetizados químicamente, los cuales penetran en el interior del grano matando al insecto en cualquiera de sus estados de desarrollo (Faiguenbaum 2003).

Han sido investigadas técnicas de control biológico utilizando enemigos naturales de la plaga, como el parasitoide *Horismenus ashmeadii* que ataca a *A. obtectus* a nivel de campo, pero fracasa en condiciones de almacenaje (Schmale *et al.* 2002) o el depredador *Xylocoris flavipes*, que produce una respuesta baja pero constante sobre los adultos de esta especie (Sing y Arbogast 2014).

B. bassiana ha mostrado buenos resultados en el control de coleópteros, varios estudios revelaron altas tasas de mortalidad después del crecimiento de este hongo sobre distintos estadios de distintas especies de coleópteros (A. Rodríguez-González 2014; Maehara y Kanzaki 2014; Meyers *et al.* 2013).

Trichoderma spp., también ha mostrado buenos resultados en el control biológico de plagas, esta familia de hongos ha sido más estudiada sobre especies vegetales, pero existen estudios recientes sobre insectos, los cuales arrojan buenos resultados (Castrillo, Griggs, y Vandenberg 2013; Razinger *et al.* 2014).

4. *Trichoderma* spp. PERSON, FRIES

Trichoderma es un género de ascomicetes filamentosos que se encuentra entre los hongos saprofitos más aislados. Aparecen con frecuencia en el suelo y crecen sobre madera, corteza, otros hongos y muchos otros sustratos, teniendo un alto potencial oportunista y una gran adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Harman y Kubicek 2002).

4.1. Taxonomía y morfología de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* fue definido en 1794 por Persoon. pero no fue hasta el siglo XX cuando se empezó a estudiar al llamar la atención de los agricultores y comprobar que era capaz de controlar hongos que causaban enfermedades en las plantas (Weindling 1932;

Weindling 1934; Mukherjee *et al.* 2013). Se ha definido su taxonomía como (Samuels 1996):

- Reino: Fungi
- Subreino: Dikarya
 - División: Ascomycota
 - Subdivisión: Pezizomycotina
 - Clase: Sordariomycetes
 - Subclase: Hypocreomycetidae
 - Orden: Hypocreales
 - Familia: Hypocreaceae
 - Género: *Trichoderma* Persoon, Fries

En la actualidad se han definido 256 especies de este género (Bissett *et al.* 2015).

Los hongos de este género crecen rápidamente a una temperatura entre 25 y 30 °C, y reducen su velocidad conforme se aumenta la temperatura, deteniendo su desarrollo a partir de 35 °C. Las colonias cuando están en medio maíz-dextrosa-agar (CMD) presentan un aspecto transparente mientras que en medio patata-dextrosa-agar (PDA) el micelio es de una tonalidad blanca. Pasados unos días, entre 3 y 10 según la especie, se forman los conidios tomando un aspecto que puede variar de amarillo a verde en sus distintas tonalidades o seguir con tonalidades blanquecinas, aunque este último caso es menos frecuente. También puede segregarse sustancias al medio, haciendo que éste torne a un color amarillento, sobre todo si se emplea medio PDA (Figura 10) (Samuels 1996).

Los conidióforos son muy ramificados. Las hifas principales producen las laterales que pueden estar emparejadas o no, en función de la especie (Barnett y Hunter 1998). Tanto las hifas principales como las secundarias surgen con un ángulo de 90° respecto al eje principal. El típico conidióforo de *Trichoderma*, con hifas emparejadas, asume un aspecto piramidal.

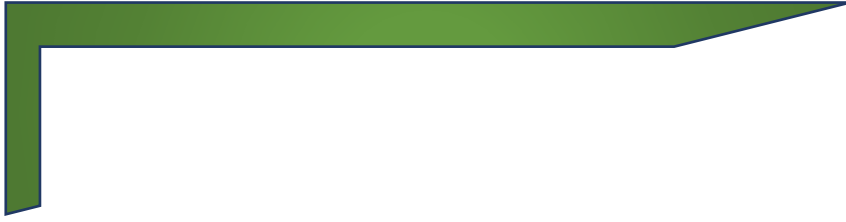
Las fiálides pueden ser cilíndricas o casi globosas, aunque cuando crecen en medio se pueden agrandar. Las fiálides pueden mantenerse en espirales, con un ángulo de 90° respecto a otros miembros de la espiral, o pueden ser peniciladas (similares a *Gliocladium*), es decir, que en sus extremos presentan una especie de pincel (Figura 10). Las fiálides pueden estar densamente agrupadas en el eje principal ancho como *T. polysporum* y *T. hamatum* o pueden ser solitarias como *T. longibrachiatum* (Samuels 1996).

Los conidios normalmente no presentan ningún líquido sobre ellos, pero en algunas especies pueden aparecer algunas gotas de líquido verde claro o amarillo como *T. virens* y *T. flavofuscum*. Los conidios de la mayoría de las especies son elipsoidales, con un tamaño 3-5 x 2-4 μm (relación de longitud/anchura $\geq 1,3$) (Samuels 1996). Los conidios son lisos (Barnett y Hunter 1998).

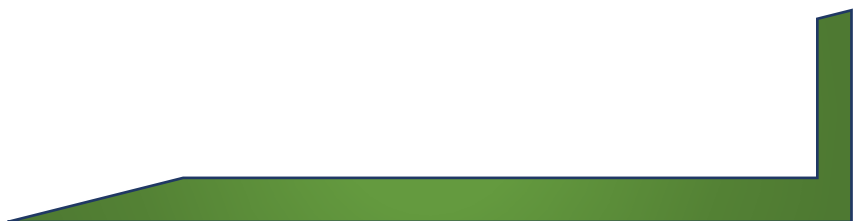
El teleomorfo de *Trichoderma* pertenece al género *Hypocrea* Fr (Druzhinina *et al.* 2011). Se caracteriza por el estroma discoidal. Los peritecios están completamente sumergidos. Las ascosporas son bicelulares pero desarticuladas en el septo temprano en su desarrollo en 16 ascosporas parciales, de manera que puede contener 16 ascosporas. Éstas son hialinas o verdes y típicamente espinulosas (Samuels 1996).

Trichoderma se puede aislar de los suelos forestales o agrícolas en todas las latitudes. Aunque las especies de *Hypocrea* se encuentran más frecuentemente en la corteza o en la madera decorticada, algunas pueden crecer en hongos de soporte, como *H. pulvinata*, *H. sulphurea*, *H. latizonata*, *H. avellanea* (Samuels 1996).

En la actualidad, el uso del teleomorfo (*Hypocrea*) ha quedado relegado en favor del anamorfo (*Trichoderma*) siendo válido desde del 1 de enero de 2013 (según la decisión tomada en el Congreso Internacional de Botánica en julio de 2011) (Druzhinina *et al.* 2011).



Material y Métodos



MATERIAL Y MÉTODOS

1. CONDICIONES DE DESARROLLO DE *A. obtectus*

La población original de *A. obtectus* se recogió en almacenes ubicados en la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Alubia de La Bañeza-León”. Esta población fue mantenida en laboratorio en botes cilíndricos de cristal (100 mm de diámetro y 200 mm de altura) en semillas de la variedad local Riñón menudo, tapados con una malla anti-pulgón para permitir el intercambio de aire. Todos los estadios de *A. obtectus*, (adultos, huevos y larvas) previo a los ensayos, se mantuvieron en una cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas de temperatura ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($60 \pm 1^\circ\text{C}$) y sometidos a un periodo de oscuridad de 24 h.

2. DIMORFISMO SEXUAL DE *A. obtectus*

Los adultos de *A. obtectus* para el mantenimiento de la población fueron tamizados y separados en una cohorte de 100 insectos adultos (50 machos y 50 hembras).

Para el sexado de los adultos, la diferenciación se hizo con la ayuda de una lupa observando el tamaño del último segmento abdominal (parte ventral de los insectos) y según las características indicadas por Balachowsky (1962), Halstead (1963), Bousquet (1990), Haines (1991) y Vélez (1997).

Una vez separados los adultos, se observó la variación de color en el pigidio y la vellosidad abdominal para ver si dichas características podrían ser usadas como diferencias morfológicas en la separación sexual de los insectos como el descrito por Nahdy (1994) y Vélez Ángel (1997). Tras la observación de estas características (tamaño, curvatura del pigidio y color y vellosidad abdominal), el insecto adulto se sacrificaba (el insecto fue introducido en 5 ml de alcohol etílico al 96°), y posteriormente, con la ayuda de una pinza entomológica y microscopio estereoscópico se presionaba el abdomen hasta exponer y extraer su órgano sexual con la ayuda de un alfiler para poder confirmar su sexo.

3. TABLA DE VIDA *A. obtectus*

3.1. Insectos

Todos los adultos de *A. obtectus* empleados en el ensayo, procedían de la población mantenida en laboratorio descrita anteriormente (apartado 1 de material y métodos) de la presente tesis. Con una frecuencia de 15 días se hizo la limpieza de alubias e insectos, para evitar la presencia de hongos y mantener siempre la cría de insectos en las mejores condiciones posibles (Figura 11).

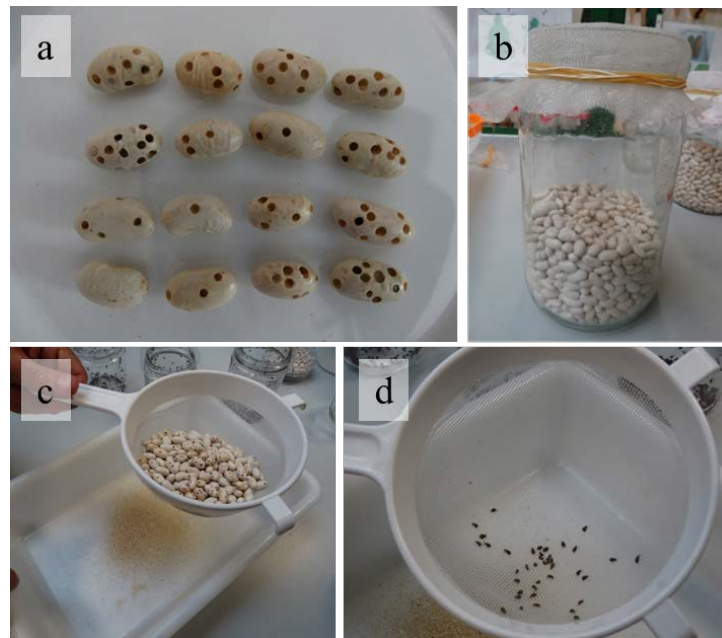


Figura 10: a) Semillas afectadas por *A. obtectus*; b) Bote de cría; c y d) Limpieza de insectos.

4. BIOENSAYO

Para la realización de este bioensayo, se utilizó la metodología descrita por Aragón-Sánchez *et al.* (2016). Para el estudio de la mortalidad, longevidad de los adultos (♀-♂) y la fecundidad de las hembras, se utilizaron adultos recién emergidos (de 1 a 3 días de edad) de la cría de mantenimiento previamente descrita. Cada insecto fue sexado, y se formaron 50 parejas que fueron introducidas cada una de ellas en placas Petri (de 55 mm diámetro) junto con 3 semillas de alubias de la variedad local Riñón menudo, que se utilizaron como sustrato de ovoposición (Figura 12).

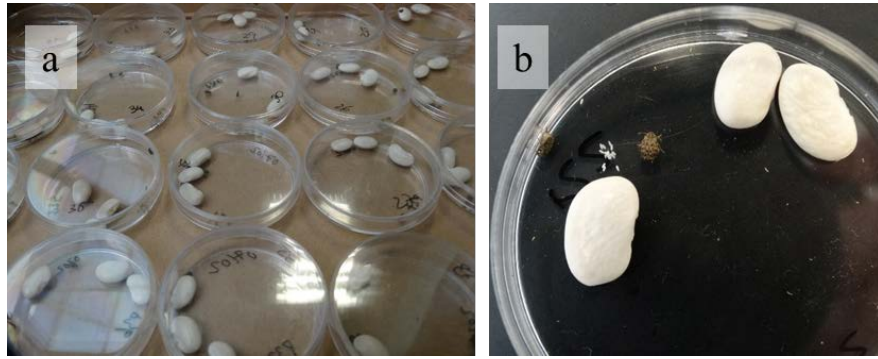


Figura 11: a) Placas Petri con parejas de insectos y sustratos de ovoposición (3 alubias); b) Detalle de una pareja de *A. obtectus* en placa Petri con alubias de la variedad Riñón.

Diariamente, con ayuda de una lupa estereoscópica, se contabilizó el número de huevos puestos, por cada hembra y la mortalidad que se fue produciendo en ambos sexos. Si el macho moría antes que la hembra, éste era reemplazado, finalizando el bioensayo en la fecha que la que se produjo la muerte de la hembra.

De cada placa Petri, fue aislada una cohorte de 100 huevos viables (Figura 13) (de 0-24 horas) para estimar el porcentaje de eclosión de huevos y el tiempo de desarrollo. Los huevos aislados fueron individualizados en botes plásticos de 25 ml (40mm altura y 30mm diámetro), junto con una alubia de la variedad local Riñón menudo, como sustrato de alimentación en el momento de eclosión de las larvas.

Diariamente con ayuda de una lupa estereoscópica fueron observados y anotados el número de huevos eclosionados y no eclosionados, así como las larvas muertas sin penetrar en la alubia. El bioensayo se realizó hasta un máximo de 25 días, en los que se observó diariamente la emergencia de los adultos, así como la mortalidad que se fue produciendo.



Figura 12: Huevos viables de *A. obtectus*.

5. ACCIÓN FUMIGANTE DE ACEITES ESENCIALES SOBRE *A. obtectus*

5.1. Insectos y cría en laboratorio

Todos los adultos de *A. obtectus* empleados en el ensayo, procedían de la población mantenida en laboratorio descrita anteriormente en el apartado 1 de material y métodos de la presente tesis.



Figura 13: Aceites esenciales utilizados en los ensayos.

5.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales utilizados en los experimentos fueron proporcionados por los laboratorios Martin-Granizo. Los aceites seleccionados fueron Verbena (*Verbena* sp.), Geranio (*Geranium* sp.), Romero (*Rosmarinus* sp.) y Canela (*Cinnamomum* sp.) (Figura 14).

5.3. Diseño de los experimentos.

Dosis puras (sin dilución) de cada aceite esencial fueron utilizadas frente a los distintos estadios de *A. obtectus*: adultos, larvas y huevos. Las dosis de cada aceite esencial fueron aplicadas con la ayuda de micropipetas graduadas (Eppendorf AG) (Figura 15). Las dosis utilizadas fueron 1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ l.

En cada ensayo se emplearon 5 tratamientos (Verbena, Geranio, Romero, Canela y el control) con 6 repeticiones de acuerdo con un diseño totalmente aleatorizado. Como cámaras de fumigación se utilizaron botes plásticos (40 mm de diámetro y 70 mm de altura), en los que en su tapa fue colocado un plástico cilíndrico (7 mm de diámetro y 20 mm de longitud), y en su extremo un algodón (2 cm²) (Figura 16).



Figura 14: Aplicación de los aceites: a) micropipeta; b) pipeteando el aceite; c) aplicación en el trozo de algodón.



Figura 15: a) Componentes de la cámara de fumigación; b) montaje de la cámara; c) cámara fumigación.

5.4. Ensayo frente a adultos de *A. obtectus*

Diez adultos de *A. obtectus* recién emergidos de la alubia (0-24h) fueron separados en cada bote (repetición) (Figura 17) para cada una de las dosis y tratamientos descritos.

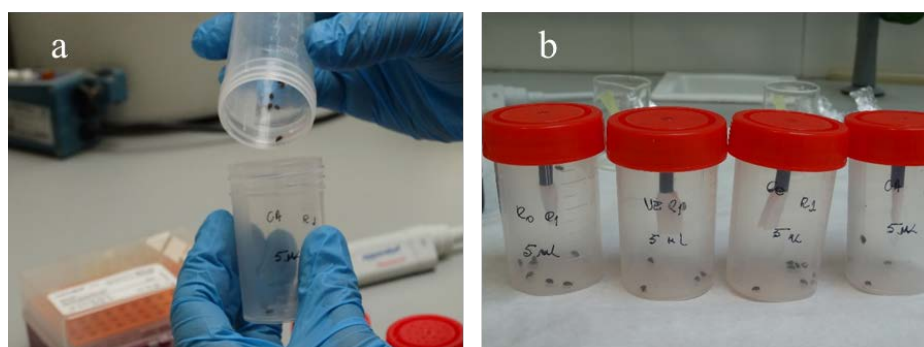


Figura 16: a) Transferencia de insectos para la cámara de fumigación; b) insectos en cámara después de la aplicación de los aceites.

Después de la aplicación de los aceites, los botes fueron mantenidos en cámara de cultivo con las condiciones controladas anteriormente descritas durante 24, 48 y 72 horas (Figura 18). Tras el periodo de exposición, se hizo el conteo de los insectos muertos, según la metodología descrita por Silva *et al.* (2015).



Figura 17: Ensayo de control de gorgojo con aceites esenciales en la cámara de cultivo.

5.5. Ensayo frente a larvas de *A. obtectus*

Para los ensayos frente a larvas de *A. obtectus*, fueron utilizadas larvas de primer estadio recién eclosionadas de los huevos (0-24h). Veinte fueron introducidas en cada bote (repetición) para cada una de las dosis y tratamientos descritos. Las larvas fueron obtenidas al tamizar los botes de cría con las alubias que contenían la población de *A. obtectus*

mantenida en laboratorio. El material obtenido (excrementos, huevos, larvas y restos de alubias) fueron colocados en placas Petri (90 mm diámetro) junto con semillas de alubia (Figura 19). Las larvas recién eclosionadas, se adhirieron a las alubias. Y con ayuda de una lupa y de un pincel humedecido en agua destilada, 20 larvas adheridas a las alubias fueron extraídas hacia los botes (cámaras de fumigación) donde se hizo la aplicación de los aceites.

Después de la aplicación de los aceites, los botes fueron mantenidos en cámaras con las condiciones controladas, anteriormente descritas, durante 3, 6 y 8 horas. Tras el periodo de exposición, se hizo anotó el número las larvas muertas.



Figura 18: Obtención de las larvas: a) semilla en el material tamizado; b) larvas en la semilla.

5.6. Ensayo frente a huevos de *A. obtectus*

Se utilizaron huevos recién puestos (0-24h) por hembras jóvenes (1-3 días de edad) y mantenidos en placas Petri (90 mm de diámetro). Se colocaron 10 alubias de la variedad local Riñón menudo junto a los insectos para inducir la ovoposición (Figura 20). Previamente, el fondo de la placa había sido cubierto con un papel absorbente de color negro, para facilitar la localización de los huevos. Los huevos fueron retirados diariamente de las placas y separados para los ensayos con ayuda de un pincel fino (de la numeración 00) humedecido con agua destilada (Figura 20).

Veinte huevos, recién puestos (0-24h) fueron separados en cada bote (repetición) para cada una de las dosis y aceites esenciales descritos. Los huevos eran contados y transferidos a las cámaras de fumigación para aplicación de los aceites (Figura 21a) conforme metodología descrita anteriormente.

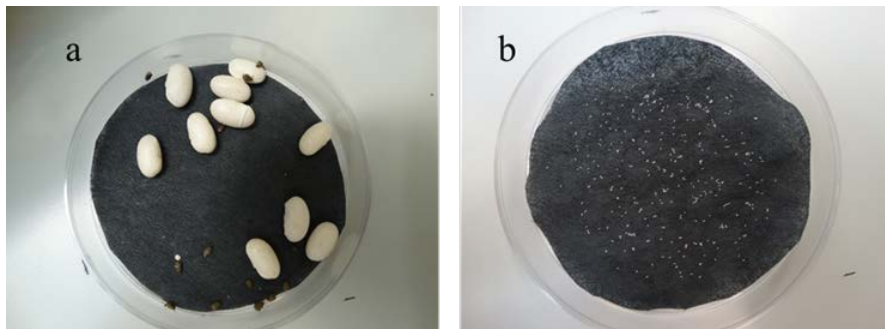


Figura 19: a) Sustrato para ovoposición (*A. obtectus* + alubias); b) Huevos recién puestos.

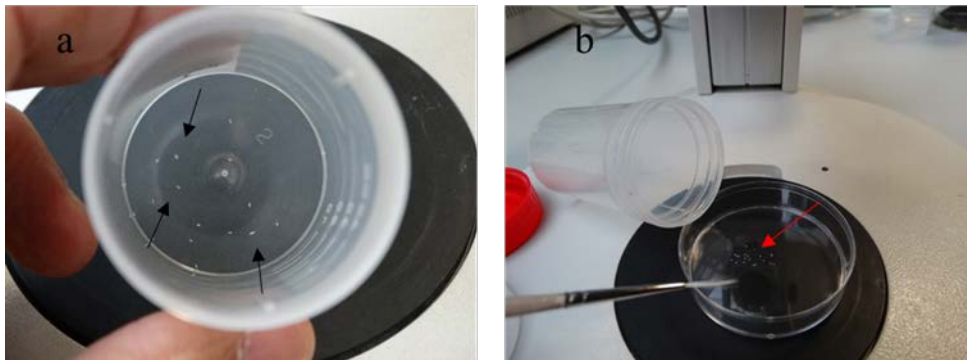


Figura 20: a) Huevos en cámara de fumigación; b) Tras 24 horas de exposición al aceite, de nuevo transferencia para placas Petri.

Después de la aplicación de los aceites, los botes con 20 huevos de *A. obtectus* fueron mantenidos en las cámaras con condiciones controladas anteriormente descritas durante 24 horas. Tras el periodo de exposición de 24 horas, los huevos fueron transferidos para placas Petri y mantenidos en las condiciones anteriormente descritas (Figura 21b). Diariamente (hasta un máximo de 7 días) se observaron los huevos y se contabilizaron el total de larvas emergidas de cada tratamiento.

6. VARIEDADES RESISTENTES

Para este ensayo se utilizaron 32 variedades de alubia procedentes del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Las semillas fueron multiplicadas en campo de la localidad de Bercianos del Páramo (León) durante las campañas 2013 y 2014. Tras la cosecha de las variedades de alubia, éstas fueron almacenadas en botes de cristal (90 mm de diámetro y 120 mm de altura), tapados con una malla anti-pulgón para permitir el intercambio de aire en cámara con condiciones controladas, descritas anteriormente. Las muestras se observaron durante 40 días para corroborar que no venían infectadas con *A. obtectus* u otra plaga, procedente del campo.

Pasado este tiempo, las variedades de alubias fueron sometidas a un tratamiento térmico ($-5 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 48 horas, para eliminar cualquier infestación de insectos (Boff, Sartori, y Bogo 2006). Las variedades de alubias fueron dejadas durante 24 horas a temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), antes de su utilización en los ensayos.

6.1. Ensayo con libre elección.

Para este ensayo se evaluó la atracción de *A. obtectus* por las distintas variedades de alubia (alubias que presentaban distintos colores y formas para su ovoposición). Se construyó una estructura del tipo olfactómetro (Figura 22), que constaba de cuatro botes (40 mm de diámetro y 70 mm de altura) con un bote central (120 mm de diámetro y 60 mm de altura) conectado a los otros cuatro botes mediante cilindros de plástico (60 mm de largo y 5 mm de diámetro), según el modelo descrito por Rentería López *et al.*(1997). En el bote central del olfactómetro fueron liberadas 28 parejas de *A. obtectus* (0-48 horas de edad), que previamente habían sido sexadas conforme a la metodología descrita anteriormente en el apartado 3.1 de la presente tesis.

En los botes laterales fueron colocadas aleatoriamente 10 gramos de las distintas variedades evaluadas, para cada variedad 7 tratamientos y 8 repeticiones fueron realizadas. Las variedades utilizadas fueron: De arroz, Canaria, Bocheta, Riñón menudo, De Ibeas, Manto marrón y Habichuela (Tabla 2 y Figura 23). Tras la liberación de los insectos en las estructuras del tipo olfactómetro, las variedades de alubias colocadas en los botes exteriores

fueron mantenidas en condiciones controladas (descritas en el apartado 1 de material y métodos de la presente tesis) durante 48 horas. Pasado este tiempo, el número de insectos presentes en cada variedad fueron anotados y transferidos a otros botes de las mismas características.

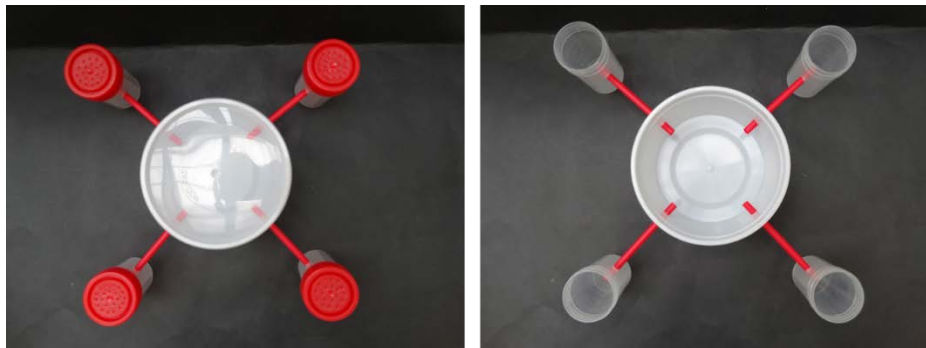


Figura 21: Estructura de tipo olfactómetro (Izquierda cerrada; derecha abierta).

Tabla 2: Características de las alubias utilizadas en el ensayo con libre elección.

| Código Variedad | Nombre Entrada | Color | Provincia |
|--------------------------|-----------------------|---------------|------------------|
| BGE004033 | De arroz | Negra | Zamora |
| BGE004453 | Canaria | Amarilla | León |
| BGE005490 | Judía bocheta | Marrón | Alicante |
| Ri menudo ⁽¹⁾ | Riñón menudo | Blanca | León |
| BGE032310 | Judía de Ibeas | Roja | Burgos |
| BGE036009 | Judía de manto marrón | Marrón/Blanca | León |
| BGE038492 | Habichuela | Negra | Málaga |

⁽¹⁾(Reinoso 2001)

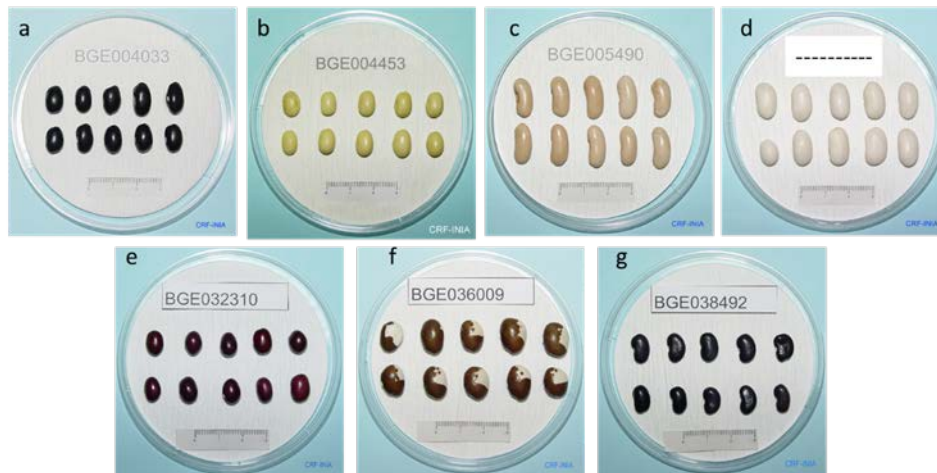


Figura 22: Variedades de *P. vulgaris* utilizadas en el ensayo: a) De arroz; b) Canaria; c) Bocheta; d) Riñón; e) De Ibeas; f) Manto marrón; g) Habichuela. (Imágenes tomadas del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF)).

Tras 28 días en cámara con condiciones controladas comenzaron las emergencias de insectos en cada variedad. Los insectos emergidos de las alubias fueron sacados de los botes, anotando el número de insectos extraídos (por sexos y totales) en cada variedad y día.

6.2. Ensayo sin libre elección.

En los ensayos sin libre elección, fue evaluado el tiempo de emergencia de los insectos en cada variedad, el daño en las semillas (número de orificios por semilla), el total de insectos emergidos por cada variedad, la pérdida de peso en las distintas variedades (diferencia de peso de alubias iniciales menos peso de alubias tras la emergencia de insectos), así como el peso de los insectos (peso de los insectos emergidos en cada variedad). Se realizaron 32 tratamientos (uno por cada variedad) con 4 repeticiones cada una. Cada repetición fue realizada con un bote de plástico (40 mm de diámetro y 70 mm de altura), en el que fueron introducidas 10 gramos de alubias de cada variedad (Tabla 3). En cada bote fueron colocadas 3 parejas de insectos recién emergidos (0-24h). Los botes con las variedades de alubias y los insectos fueron mantenidos en cámara con condiciones controladas (descritas en el punto 1 de material y métodos de la presente tesis) durante 7 días, pasado este tiempo,

los insectos fueron extraídos de los botes. Tras 27 días desde el inicio de los tratamientos, se observaron las primeras emergencias de insectos en las variedades.

Tabla 3: Características de las variedades utilizadas en el ensayo sin libre elección.

| Código Variedad | Nombre Entrada | Color | Provincia |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------|
| BGE004033 | De arroz | Negra | Zamora |
| BGE004453 | Canaria | Amarilla | León |
| BGE005490 | Judía bocheta | Marrón | Alicante |
| BGE023200 | Haba del Bierzo | Marrón/Blanca | León |
| BGE029594 | Judía blanca pinta negra | Blanca punto negro | Salamanca |
| BGE029633 | Canela | Marrón | Salamanca |
| BGE031981 | Judía del tío Anselmo | Marrón | Ávila |
| BGE032310 | Judía de Ibeas | Roja | Burgos |
| BGE034103 | Judía branca | Branca | León |
| BGE036009 | Judía de manto marrón | Marrón/Blanca | León |
| BGE038492 | Habichuela | Negra | Málaga |
| Ri menudo ⁽¹⁾ | Riñón menudo | Blanca | León |
| BGE034106 | Judía roja | Roja | La Bañeza |
| Ca ⁽¹⁾ | Canela IGP | Marrón claro | León |
| BGE029599 | Judía marrón | Marrón | Salamanca |
| BGE004459 | Colorada sin palo | Roja | León |
| BGE034296 | Judía de oro | Marrón | Palencia |
| Pm ⁽¹⁾ | Palmeña Manto Marrón | Roja/Marrón | León |
| BGE034286 | Verdina | Verde | Palencia |
| BGE004445 | Amarilla | Amarilla | León |
| BGE029569 | Judía negra | Negra | Salamanca |
| BGE025196 | Alubia gorda | Branca | León |
| Pil ⁽¹⁾ | Pinta Pil 2-1 | Marrón | León |
| Am ⁽¹⁾ | Manto amarillo | Blanca /amarillo | León |
| BGE022081 | Mocha colorada | Roja | Andalucía |
| BGE025126 | Alubia blanca redonda | Blanca | Cáceres |

Tabla 3: Características de las variedades utilizadas en el ensayo sin libre elección (continuación).

| Código Variedad | Nombre Entrada | Color | Provincia |
|------------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| BGE025126 | Alubia blanca redonda | Blanca | Cáceres |
| Ri ⁽¹⁾ | Riñón IGP | Blanca | León |
| BGE043745 | Bajoca de la manteca | Marrón | Castellón |
| Pi ⁽¹⁾ | Pinta IGP | Marrón | León |
| BGE022140 | Palmeña marrona | Marrón | León |
| BGE001131 | Judía plancheta | Blanca | Salamanca |
| BGE022835 | Judía marrón pequeña | Marrón pequeña | Cantabria |

⁽¹⁾(Reinoso 2001)



Figura 23: Variedades de *P. vulgaris* utilizadas en el ensayo: 1) De arroz; 2) Canaria; 3) Bocheta; 4) Haba del Bierzo; 5) Judía blanca pinta negra; 6) Canela; 7) Judía tío Anselmo; 8) De Ibeas; 9) Judía blanca; 10) Manto marrón; 11) Habichuela; 12) Riñón menudo; 13) Judía roja; 14) Canela IGP; 15) Judía marrón; 16) Colorado sin palo; 17) Judía de oro; 18) Palmeña manto marrón; 19) Verdina; 20) Amarilla; 21) Judía negra; 22) Alubia gorda; 23) Pinta pil 2-1; 24) Manto amarillo; 25) Mocha colorada; 26) Judía blanca redonda; 27) Riñón IGP; 28) Bajoca de la manteca; 29) Pinta IGP; 30) Palmeña marrón; 31) Judía Plancheta; 32) Judía marrón pequeña. (Imagen tomada del CRF).

7. POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *A. obtectus*

Con los ensayos que se enumeran a continuación se evaluó la susceptibilidad de los estadios inmaduros (huevos y larvas) de *A. obtectus* frente a los hongos *B. bassiana* y *Trichoderma* spp.

7.1. Colección de hongos

Para este ensayo se han utilizado cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp. de la colección de hongos del Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales, ubicado en la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León, obtenidos de distintas plantaciones de alubia común (*P. vulgaris*) ubicadas en la IGP “Alubia de La Bañeza-León” y una cepa comercial (cepa GHA) de *B. bassiana* (Tabla 4).

Tabla 4: Lista de aislados fúngicos utilizados en este ensayo.

| Número de aislado | Especie | Concentración | Zona productiva de alubia |
|-------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|
| -- | <i>B. bassiana</i> | $4,4 \times 10^{10}$
conidias/g ^(*) | (Producto comercial) |
| T005 | <i>T. longibrachiatum</i> | 1×10^7 esporas/ml | Astorga |
| T008 | <i>T. citrinoviride</i> | 1×10^7 esporas/ml | Esla - Campos |
| T013 | <i>T. atroviride</i> | 1×10^7 esporas/ml | Astorga |
| T019 | <i>T. harzianum</i> | 1×10^7 esporas/ml | Astorga |

(*) Se aplicó en su dosis comercial máxima (Bassi[®] WP; Massó S.A.; 22% WP), diluyéndolo en 1 ml de agua destilada

7.2. Crecimiento de los hongos

Los cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp. se sembraron en placas Petri con medio patata-dextrosa-agar (PDA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), durante 7 días a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y sometidos a fotoperiodo (16 horas de luz y 8 de oscuridad). Para extraer las esporas, se vertieron 20 ml de agua destilada autoclavada sobre las placas (Figura 25), raspándose sobre la superficie del medio. Posteriormente se hizo una disolución de esporas

con una concentración 1×10^7 esporas/ml, empleando para ello la cámara de Neubauer. La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración inicial (C_i), se obtuvo según la Ecuación (1):

Ecuación (1): $C_i = X \cdot 10.000 \cdot \text{factor de dilución} \cdot 16$ donde

- X = promedio de esporas de cada dilución

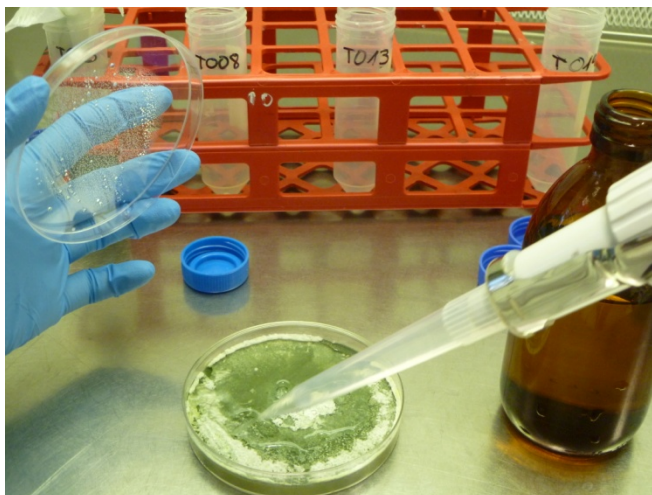


Figura 24: Preparación de solución de esporas de *Trichoderma* a partir del crecimiento del aislamiento en medio patata-dextrosa-agar (PDA).

Una vez obtenida la C_i se calculó el volumen inicial (V_i) según la Ecuación (2) para una concentración final (C_f) de $1 \cdot 10^7$ esporas/ml y un volumen final (V_f) de 1,5ml.

Ecuación (2): $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$ donde:

- C_i = concentración inicial
- V_i = volumen inicial
- C_f = concentración final
- V_f = volumen final

La solución final de esporas fue almacenada a -20°C en tubos Eppendorf hasta su uso.

7.3. Diseño de los experimentos (Torre Potter)

Previo a la aplicación de los aislados fúngicos sobre los distintos estadios de *A. obtectus*, se autoclavaron papeles de filtro que sirvieron de soporte a los huevos y como humectante, se colocó un papel de filtro por cada placa Petri y se humedeció con 1 ml de agua destilada autoclavada para las placas de *A. obtectus*.

Para las aplicaciones de los tratamientos se utilizó una Torre Potter de carga manual (Burkard Scientific Limited, Po Box 55 Uxbridge, Middx, UB8 2RT, U.K.) (Potter 1952) con compresor de aire. El volumen de disolución de los aislados fúngicos empleados en cada pulverización fue de 1 ml y se aplicó sobre placas Petri de 90 mm de diámetro a una presión de 40 kPa, lo que produce un depósito de $0,004 \pm 0,0004$ ml de caldo/cm², que es equivalente a 400 l de caldo por hectárea.

Antes de comenzar los tratamientos se calibraba la Torre Potter mediante 10 repeticiones para comprobar que el residuo medio (Y) de la Ecuación (3) estuviese comprendido entre:

$$\text{Ecuación (3): } 1,5 \text{ mg/cm}^2 \leq (Y) \leq 2,0 \text{ mg/cm}^2$$

Si el residuo medio era menor de $1,5 \pm 0,2$ mg/cm², no sería suficiente el volumen de caldo/cm², y si el residuo medio fuera mayor de $2,0 \pm 0,2$ mg/cm², tendríamos problemas de pérdidas de líquido por goteo (Mead-Briggs, Brown, y Candolfi 2000).

El residuo del volumen de la disolución de los aislados fúngicos se ajustó de manera que se mantuviese a la concentración de esporas obtenida, calculada para un gasto de 400 l de caldo por hectárea. Para todos los aislados fúngicos, se utilizó como líquido transportador agua destilada.

Para el tratamiento sobre huevos de *A. obtectus*, cada aislado fúngico se evaluó con 6 repeticiones y 20 huevos de *A. obtectus* por cada repetición. Para el tratamiento sobre adultos de *A. obtectus*, cada aislado fúngico se evaluó con 6 repeticiones y 10 huevos de *A. obtectus* por cada repetición.

Una vez realizados los tratamientos con los aislados fúngicos, se precintaron las placas con parafilm y se almacenaron en cámara con condiciones controladas anteriormente descritas en el punto 3 de la presente tesis. Durante los 15 días posteriores a los tratamientos, se

realizó un conteo diario de los huevos no viables (inhibidos por la acción de los hongos) que se fue produciendo en cada placa.

7.4. Aplicación en semilla pildorada

Los tratamientos utilizados para este experimento fueron los cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp. (Tabla 4). Fueron utilizadas semillas de alubia de la variedad Riñón menudo como sustrato de alimentación para las larvas (1 alubia por placa Petri). Las semillas fueron desinfectadas en una disolución de 1 litro (50 % agua + 50 % lejía) durante 1 minuto. Posteriormente las alubias fueron lavadas con agua destilada. 10 ml de la solución de esporas de cada tratamiento fue vertido sobre 6 alubias (una por repetición) colocadas en placa Petri. Las semillas permanecieron en placas Petri con solución la solución de esporas descrita durante 12 horas en cámara de flujo laminar hasta la completa evaporación de la solución.

Seis repeticiones de cada tratamiento, con 20 larvas recién emergidas (0-24 horas) por cada repetición fueron utilizada.

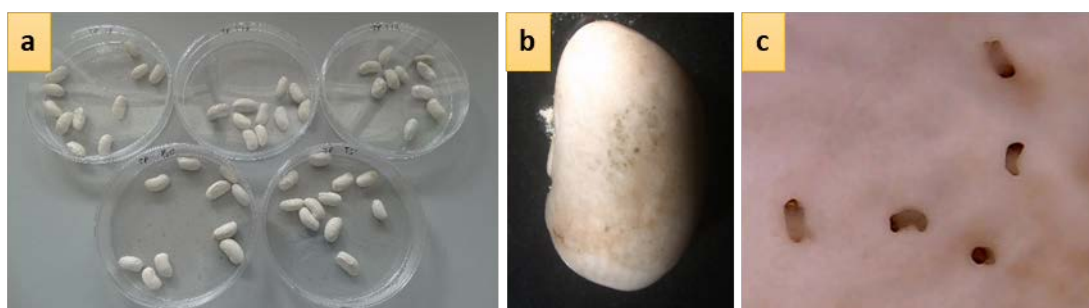


Figura 25: Alubias que han sido pildoradas con esporas de *Trichoderma* spp. a) Alubias pildoradas en las placas Petri; b) Detalle de una alubia pildorada de la variedad local Riñón menudo con esporas de *Trichoderma* spp.; c) Larvas de *A. obtectus* sobre la superficie de alubia de la variedad local Riñón menudo.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis de varianza se realizaron de acuerdo con los diseños totalmente aleatorizados utilizados en los ensayos. Para determinar entre que medias existían diferencias significativas entre los distintos parámetros evaluados, se utilizó la prueba de

comparaciones múltiples DMS (Diferencia Mínima Significativa). La mortalidad (para los ensayos con aceites esenciales y *Trichoderma* spp.) fue corregida mediante la fórmula de Abbott. Todas las pruebas señaladas se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics, versión 22.0 (SPSS Inc, 1999), empleándose un nivel de significación del 5%.

Para el cálculo de los parámetros de la tabla de vida se utilizó el programa informático r_m 2.0 (Taberner *et al.* 1993).



Resultados y Discusión



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DIMORFISMO SEXUAL DE *A. obtectus*

1.1. Tamaño del insecto

En relación con el tamaño de los insectos en general las hembras son mayores que los machos, pero, esto no puede ser usado como un factor único en el sexado de estos insectos, ya que se encontraron machos mayores y de igual tamaño que hembras.

El tamaño puede estar influenciado por la cantidad de insectos en la cría. Se observó que, en las crías con altas infestaciones de insectos con edades variadas, donde hay mucha competición por alimento, hay insectos de tamaños variados, independiente del sexo. En crías nuevas con poca infestación, los insectos recién emergidos generalmente son más difíciles de diferenciar por el tamaño, ya que tanto machos y hembras son mayores. Nahdy (1994) argumenta que, en los adultos recién emergidos, esa diferenciación no es confiable, pudiendo ocurrir un grado de sobreposición.

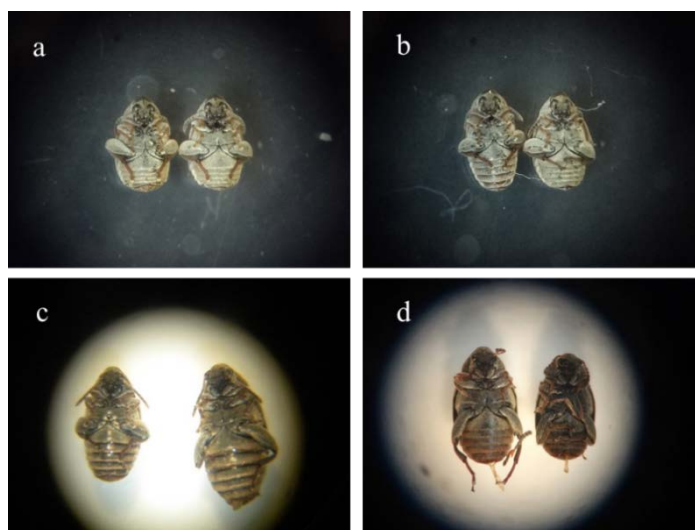


Figura 26: Dimorfismo sexual. a) Macho y hembra del mismo tamaño; b) Macho mayor que la hembra; c) Macho menor que la hembra; d) Hembra mayor que el macho.

1.2. Forma del último segmento ventral

Respecto a la forma o variación del último segmento abdominal ventral (5° esternito), es posible afirmar que es la manera más fácil de identificación. En algunos insectos esa diferenciación es bastante visible. Sin embargo, hay que estar atento a los machos recién emergidos, en ellos esa diferenciación no está tan clara. Además, se suele confundir hembras pequeñas con machos.

Parte del proceso de diferenciación en cuanto al tamaño, así como el de la variación en el pigidio entre machos y hembras, así como la vellosidad abdominal de *A. obtectus* puede ser observado en la Figura 27.

1.3. Color del pigidio y vellosidad abdominal

En relación con el color del pigidio, no se encontró un patrón fijo de dimorfismo sexual como el descrito por Nahdy (1994), y tampoco, en la vellosidad abdominal, como el recogido por Vélez Ángel (1997). Esto conlleva a afirmar que, en este estudio, el color del pigidio y la vellosidad abdominal no serían elementos distintivos, característicos del dimorfismo sexual en estos insectos (Figura 28).

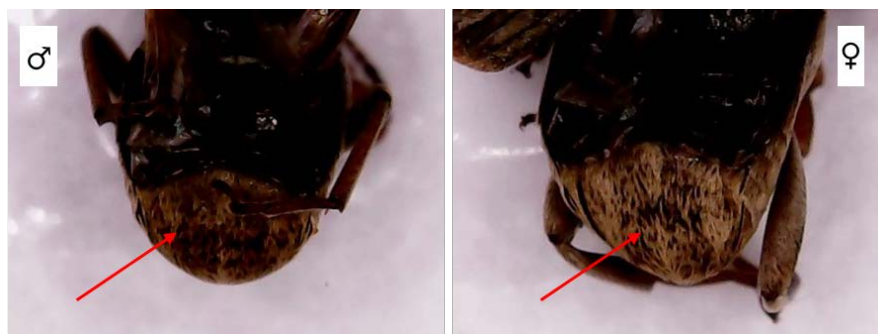


Figura 27: Patrón de coloración del pigidio, vista dorsal (Izquierda macho; Derecha hembra)

1.4. Genitalia del macho

El edeago está formado por el tegmen y el lóbulo medio. El tegmen resulta de la fusión de tres estructuras, los lóbulos laterales, la pieza basal y el manubrio. El lóbulo medio o edeago presenta un saco interno, por lo general en su interior se presentan algunas estructuras

esclerosadas (armadura), las cuales tienen un gran valor taxonómico para el reconocimiento de especies (Figura 29).

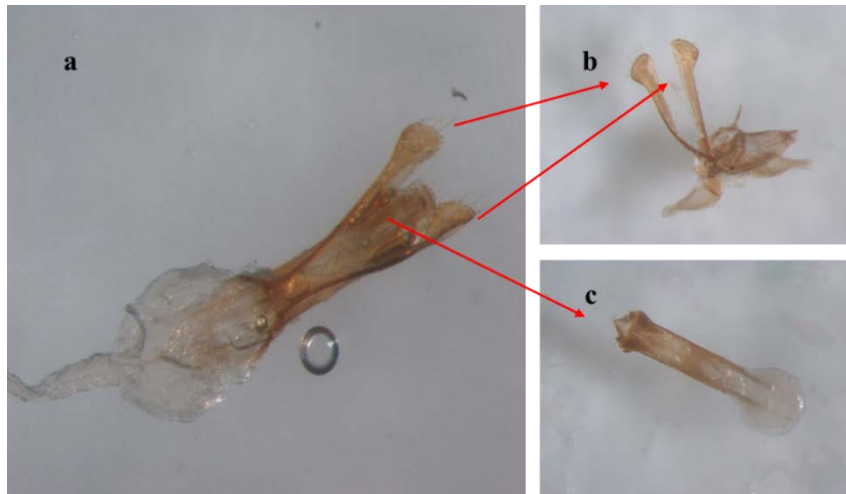


Figura 28: Edeago del macho de *A. obtectus*: a) órgano sexual macho; b) lóbulos laterales; c) lóbulo medio

1.5. Genitalia de la hembra

De manera general la genitalia de la hembra está formada por la placa genital, bursa copulatrix, conducto espermático, cápsula espermatecal y glándula accesoria (Figura 30).



Figura 29: Órgano sexual de la hembra de *A. obtectus*.

El conocimiento en detalle de estas estructuras tiene gran utilidad en la determinación del sexo y en la copula del insecto (Figura 31) de cara a establecer poblaciones de cría para realizar ensayos de control de la plaga.

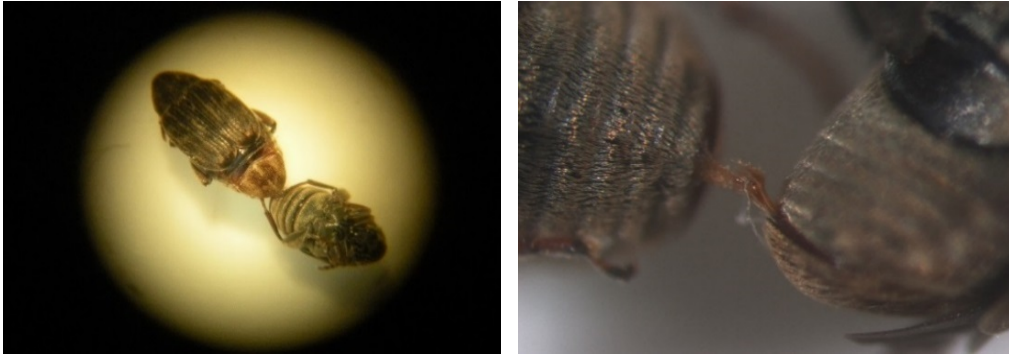


Figura 30: Cópula de *A. obtectus*

2. TABLA DE VIDA DE *A. obtectus*

A lo largo del estudio se han realizado observaciones sobre distintos parámetros biológicos de *A. obtectus* en distintos periodos de su ciclo de vida: Pre-oviposición, oviposición, fecundidad, mortalidad y desarrollo del insecto. Los valores medios de los períodos de pre-oviposición, oviposición, y del número de huevos puesto por hembra (Fecundidad), se representan en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros biológicos de *A. obtectus* estudiados (media de días \pm error estándar).

| Pre-oviposición
(Días \pm Error) | Periodo
Oviposición
(Días \pm Error) | Fecundidad
(Huevos por hembra) |
|---------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| 2,90 \pm 0,18 | 5,26 \pm 0,45 | 31,70 \pm 0,39 |

Las hembras de *A. obtectus* evaluadas mostraron un periodo de pre-oviposición y oviposición de 2,90 y 5,26 días, respectivamente, mientras que su fecundidad media es de 31,70 huevos/hembra.

2.1. Fertilidad

Los períodos de pre-oviposición y oviposición fueron observados para determinar el máximo potencial reproductivo de las hembras copuladas. El conocimiento de estos factores es importante para un buen manejo de la plaga y para el establecimiento de poblaciones de cría de cara a ensayar pesticidas.

En las parejas individualizadas se observó que el 6% de las hembras no ovipositaron tras haber sido copuladas.

En el ensayo realizado las medias observadas de los periodos de pre-oviposición y oviposición para las hembras de *A. obtectus* fueron de 2,9 y 5,2 días respectivamente en la variedad de alubia riñón. García-Crispín (1994) cita que el proceso de pre-oviposición se inicia de dos a tres días después de la emergencia de los adultos.

El huevo recién puesto es hialino y transparente, después se torna en translúcido y no transparente, y a partir de cuarto o quinto día, se puede observar la larva, siendo más visible la cabeza, debido a su coloración más oscura, por la quitinización (Ramos 1976).

Para la fecundidad de la hembra se obtuvo una media de 31,7 huevos por hembra. Los resultados encontrados en este insecto difieren de los reportados por otros autores. Por ejemplo, Romero-Nápoles (2002a), menciona que la hembra de *A. obtectus* puede depositar entre 50 y 80 huevos en un periodo de 7 días. Para Dell'Orto y Arias (1985), la hembra pone un promedio de 63 huevos. Ya Ramírez y Suris (2015) dicen que las hembras de *A. obtectus* depositaron un total de 308 huevos en los primeros 4 días y Deboni (2009) cita que la puesta en hembras es de 60 huevos.

Romero-Nápoles (2002b) y Dell'Orto y Arias (1985) añaden que la fertilidad y fecundidad de las hembras, están relacionadas, con la temperatura, humedad y la calidad del alimento consumido en el estadio larvario.

En este ensayo, los huevos aislados eclosionaron en un 85,0% y emergieron el 62,0% de adultos. Ramírez y Suris (2015) evaluando el ciclo de vida de *A. obtectus* sobre la alubia negra, observaron resultados similares con eclosión de 94,8% y una emergencia de 66,4%. Ramírez *et al.* (2003) observan que los huevos no están adheridos directamente en las semillas o granos, como hacen otras especies de gorgojos, pueda que este comportamiento

afecte la eclosión de los huevos y a la mortandad de las larvas, ya que tienen que encontrar su alimento o puede ser una mortandad natural, que por algún motivo no consigue penetrar en los granos.

2.2. Proporción de sexos (♀-♂)

Partiendo de un total de 100 huevos se obtuvieron 53 adultos, de los cuales 23 eran machos y 30 hembras, con una ratio sexual de 0,5. Estudiando la biología de *Z. subfasciatus* en semillas de *P. vulgaris*, Ferreira (1960), y Carvalho y Rossetto (1968) constataron ratio sexual de 0,53 y 0,55 respectivamente, corroborando con lo observado para *A. obtectus*.

2.3. Mortalidad

Se observa una mortalidad larval (37,6%) de del primer estadio, que puede haberse visto afectada por la manipulación del experimento inhibiendo la penetración de la larva (Quentin, Spencer, y Miller 1991), o de acuerdo con Ramírez *et al.* (2003) que por alguna circunstancia no pudieron penetrar en la semilla.

La baja emergencia de los adultos, es decir, la mortalidad de larva y pupa (62,4%) , puede ser debido a que las semillas atacadas no tengan nutrientes suficientes para su desarrollo, o puede ser una mortalidad natural (Pabón, Aguirre, y Reyes 1976).

2.4. Ciclo de vida del insecto

El tiempo medio de desarrollo de los distintos estadios de *A. obtectus* sobre alubia variedad local Riñón menudo se representa en la Tabla 6 y Figura 32.

Tabla 6: Tiempo medio de desarrollo de *A. obtectus* sobre alubia de la variedad local Riñón menudo.

| Estadío | Duración
(Días ± Error estándar) |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| Huevos | 6,07 ± 0,50 |
| Larva hasta pupa | 26,28 ± 1,39 |
| Huevos hasta adulto | 32,30 ± 1,38 |
| Huevos hasta la muerte del adulto | 44,11 ± 3,76 |
| Longevidad adulto hembra | 12,8 ± 2,78 |
| Longevidad adulto macho | 8,18 ± 2,75 |

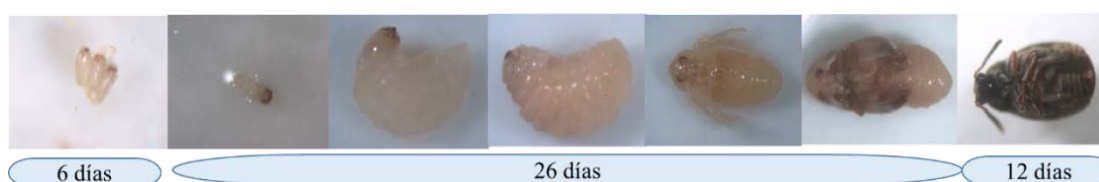


Figura 31: Ciclo de vida de *A. obtectus* sobre alubia de la variedad local Riñón menudo.

2.5. Duración fase de huevo

En las condiciones de temperatura y humedad de este experimento, ya descritas anteriormente, el periodo de incubación de los huevos de *A. obtectus* fue de 6,1 días. Comparando estos resultados con los de la literatura se observa que en este experimento los días de incubación son similares a los descritos por Ramírez y Suris (2015) con 5,6 días. Para los demás autores revisados los días fueran menos. Iica (2010) describe 5 días y Artigas (1994) afirma que el tiempo de incubación está relacionado con la temperatura y humedad y que en la temperatura de 30°C y 50% humedad el periodo de incubación es de 5 días. Romero-Nápoles (2002b) señala que este periodo es de 3 días. Es importante el conocimiento de estos días pues se puede hacer un tratamiento direccionado a los huevos de este insecto antes de la emergencia de las larvas evitando la penetración de las mismas en las semillas y por lo tanto su pérdida de valor comercial.

2.6. Duración periodo larva-pupa.

En el experimento realizado se observó que el periodo de desarrollo larval (Figura 36) hasta pupa en la variedad blanca riñón ha sido de 26,3 días. Resultados similares fueron encontrados por Ramírez y Suris (2015) con 27,63 días en variedad de frijol negro. Ica (2010) cita que ese periodo es 23 días, Romero-Nápoles (2002b) cita que el periodo es de 20 días, Capdeville (1945) y Deboni (2009) señala que ese periodo puede ser de 20 a 35 días y 11 – 42 días respectivamente dependiendo de las condiciones ambientales. Así los resultados encontrados están en conformidad con los estudios consultados, sobre todo dentro de los márgenes señalados por Capdeville (1945) y Deboni (2009), lo que implica que se debe hacer el estudio dentro de las condiciones de cada región.



Figura 32: Fase larval de *A. obtectus*.

2.7. Duración de la fase de huevo hasta la emergencia del adulto

En este experimento se observó que el tiempo comprendido entre la puesta de los huevos hasta la emergencia del adulto fue de 32,3 días. Resultados similares (33,23 días) son reportados por Ramírez y Suris (2015), en su trabajo con alubia negra.

Sin embargo, los resultados hallados se diferencian en un mayor tiempo de los descritos por Ica (2010) 28 días, Deboni (2009) 21 a 80 días; Artigas (1994), señala que ese periodo es de 30 días en la temperatura de 25°C y 80% de humedad, ya Dell`Orto y Arias (1985) planteaban ese ciclo entre 22-26 días con 30°C y 70% de humedad. Probablemente, tales diferencias son debidas a la influencia de las condiciones de temperatura y humedad ya que estas influyen de forma decisiva en el desarrollo de *A. obtectus*.

Es importante conocer estos datos en las regiones de siembras de las alubias, pues así, se puede planificar el momento para aplicar la medida de control del gorgojo.

2.8. Duración total del ciclo: huevo hasta muerte del adulto

En el análisis del ciclo total de huevo hasta la muerte de adulto se observó que el ciclo se completa en un promedio de 44,11 días en alubia blanca. Periodo más corto que el encontrado por Ramírez y Suris (2015) en alubia negra que fue de 47,8 días. Dell'Orto y Arias (1985), citan que este ciclo es de 4 a 6 semanas, similar a lo encontrado en nuestro estudio.

2.9. Longevidad de los adultos (♀-♂)

En el análisis de este aspecto, se observa que el sexo parece afectar a la longevidad del insecto. La longevidad media encontradas para los adultos en la judía variedad riñón fue de 12,8 días para hembras frente a los 8,18 días para los machos.

Los valores de longevidad encontrados en la literatura son valores para insectos adultos sin distinción de sexo. Ramírez y Suris (2015) encontraron en alubia negra una longevidad de 14,55 días para los adultos, ese mayor periodo puede ser debido a alguno factor de resistencia de la variedad del grano o como consecuencia del número de infestación larval por grano (semilla), es decir, la cantidad consumida por el insecto debido a la fase larval. Dell'Orto y Arias (1985) citan que el periodo de longevidad de los adultos es de 10-12 días, Deboni (2009) indica que *A. obtectus* puede llegar a vivir 20 días.

Con estos datos se pueden evaluar estos parámetros, sobre distintas variedades de alubias para ver si realmente la variedad puede afectar al ciclo de vida de este insecto.

El estudio del ciclo de vida de esta plaga se hace necesario, sobre todo, en variedades locales. En este estudio se realizaron experimentos con la variedad Riñón menudo.

Para una mejor estrategia de manejo de estos insectos es fundamental observar las condiciones de siembra y almacenamiento de alubia de cada región. Por ejemplo, en la región nordeste de Brasil la mayoría de los agricultores familiares siembran las alubias en

secano. En este caso la elevada temperatura y humedad favorecen tanto el ataque del gorgojo *Acanthoscelides* spp. como el de *Zabrotes* spp., a lo que hay que sumar que la forma de almacenamiento es muy precaria. En la comunidad de Castilla y León, que es de clima distinto, los agricultores tienen más recursos, tanto en plantación como en cosecha.

3. ACCIÓN FUMIGANTE DE ACEITES ESENCIALES SOBRE *A. obtectus*

3.1. Acción fumigante de aceites esenciales sobre adultos de *A. obtectus*

En las siguientes figuras se muestra el efecto fumigante de los aceites esenciales sobre los adultos de *A. obtectus*.

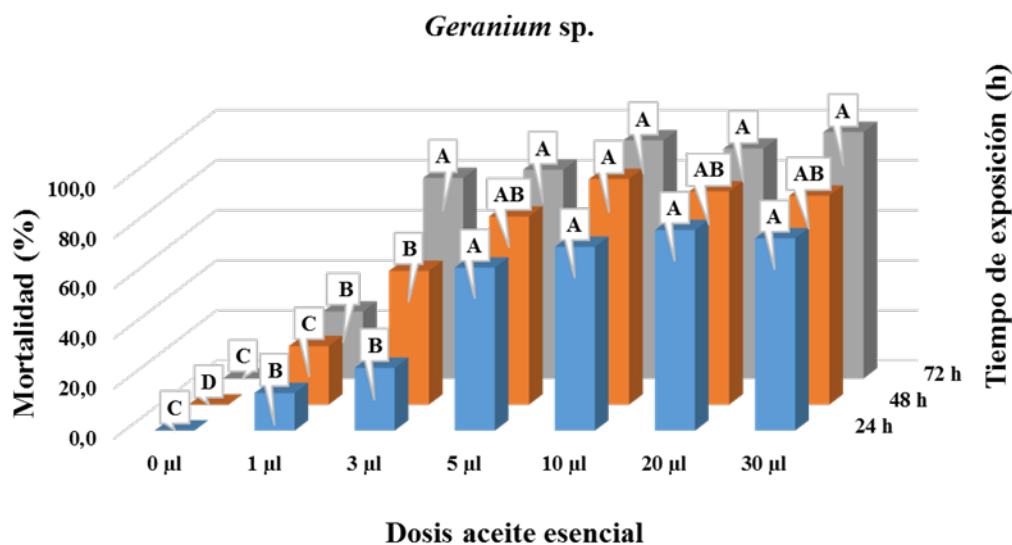


Figura 33: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (*Geranium* sp.) sobre adultos de *A. obtectus* tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Geranio en 24 horas, a mayores dosis (5, 10, 20 y 30 µl), causa mayores mortalidades (65,0; 73,0; 80,0; y 76,0% respectivamente), significativamente diferente de las mortalidades causadas con las menores dosis (0, 1 y 3 µl), con mortalidades del 0,0; 15,0 y 25,0%, respectivamente. Para un periodo de exposición de 48h, el aceite esencial de Geranio causa la mayor mortalidad con una concentración de 10 µl, sólo significativamente mayor que las obtenidas en las menores dosis 0, 1 y 3 µl. Por último, una concentración de 30 µl de aceite esencial de geranio tras 72 horas de exposición, causa las mayores

mortalidades de adultos de *A. obtectus*, sólo significativamente diferente de las mortalidades obtenidas por 0 y 1 µl (Figura 34).

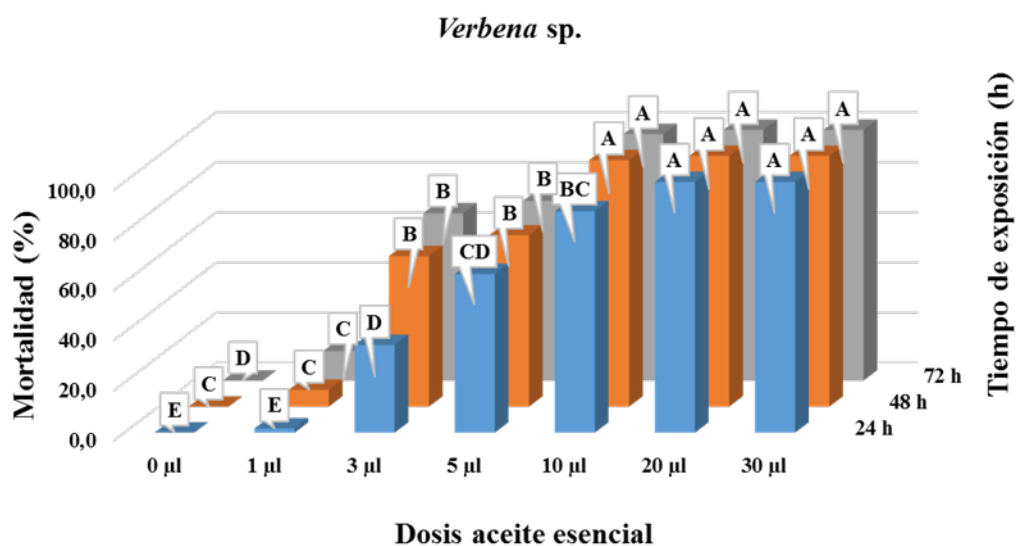


Figura 34: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial Verbena (*Verbena sp.*) sobre adultos de *A. obtectus* tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

A las 24 horas desde la aplicación de los tratamientos, el aceite esencial de Verbena obtuvo una mortalidad del 100,0% de los adultos evaluados en la dosis de 20 y 30 µl, significativamente superior al resto de dosis inferiores evaluadas. Tras un tiempo de exposición de 48 y 72 horas, el aceite de Verbena obtuvo una mortalidad del 100% de los adultos de *A. obtectus* evaluados en las concentraciones de 10, 20 y 30 µl, significativamente superiores al resto de dosis inferiores evaluadas en ambos periodos de exposición (Figura 35).

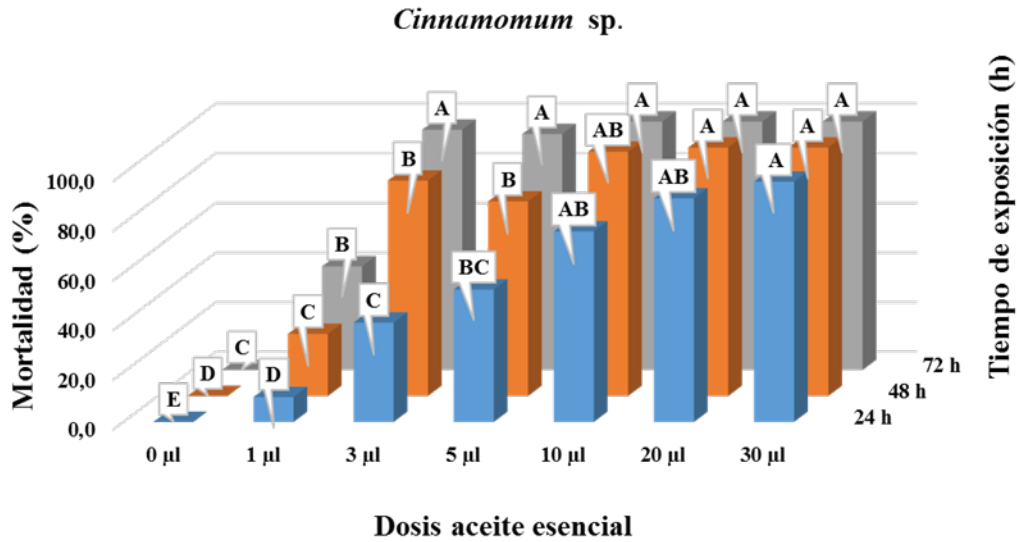


Figura 35: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (*Cinnamomum sp.*) sobre adultos de *A. obtectus* tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 24 horas de exposición, el aceite esencial de Canela a una dosis de 30 µl causó una mortalidad del 100% sobre adultos, significativamente superior a las concentraciones de 0, 1, 3 y 5 µl. El aceite de Canela después de 48 de exposición causó una mortalidad del 100,0% en las dosis más altas evaluadas (20 y 30 µl), significativamente diferente de las dosis inferiores (0, 1, 3 y 5 µl). Y finalmente, tras 72 horas de exposición, el aceite esencial de Canela causó las mayores mortalidades en las dosis 3, 5, 10, 20 y 30 µl, significativamente superiores a las obtenidas con dosis 0 y 1 µl (Figura 36).

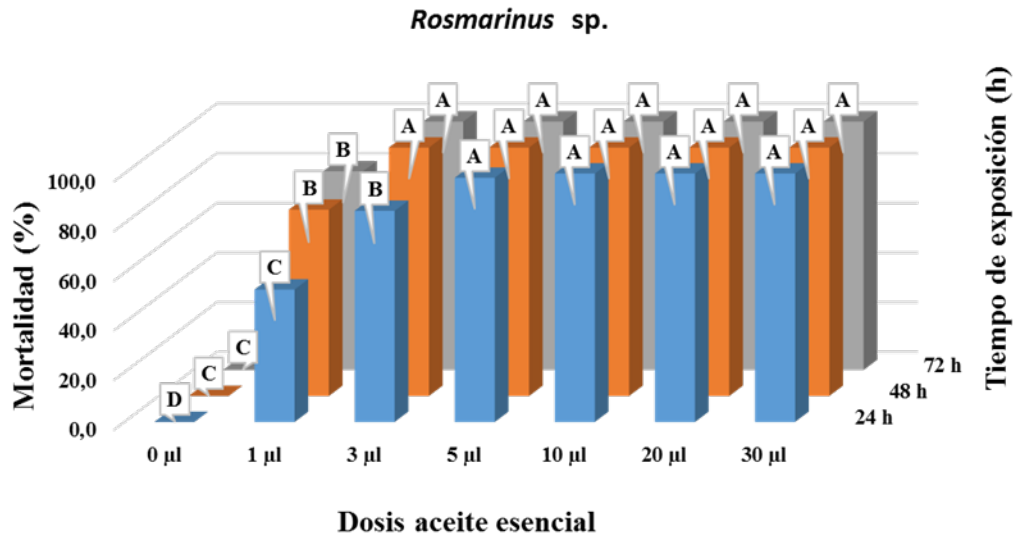


Figura 36: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus sp.*) sobre adultos de *A. obtectus* tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Romero, tras 24 horas de exposición, obtuvo un control total sobre adultos de *A. obtectus* con las dosis 5, 10, 20 y 30 µl, significativamente superiores a las obtenidas con las dosis 0, 1 y 3 µl. Tras 48 y 72 horas de exposición, el efecto volátil del aceite esencial del Romero causó el 100,0% de mortalidad sobre los adultos de *A. obtectus* en las dosis de 3, 5, 10, 20 y 30 µl evaluadas, significativamente mayor que las mortalidades obtenidas en las dosis 0 y 1 µl en ambos periodos de exposición (Figura 37).

En las siguientes figuras se muestra la comparación entre aceites de su efecto fumigante sobre los adultos de *A. obtectus* para una misma dosis aplicada.

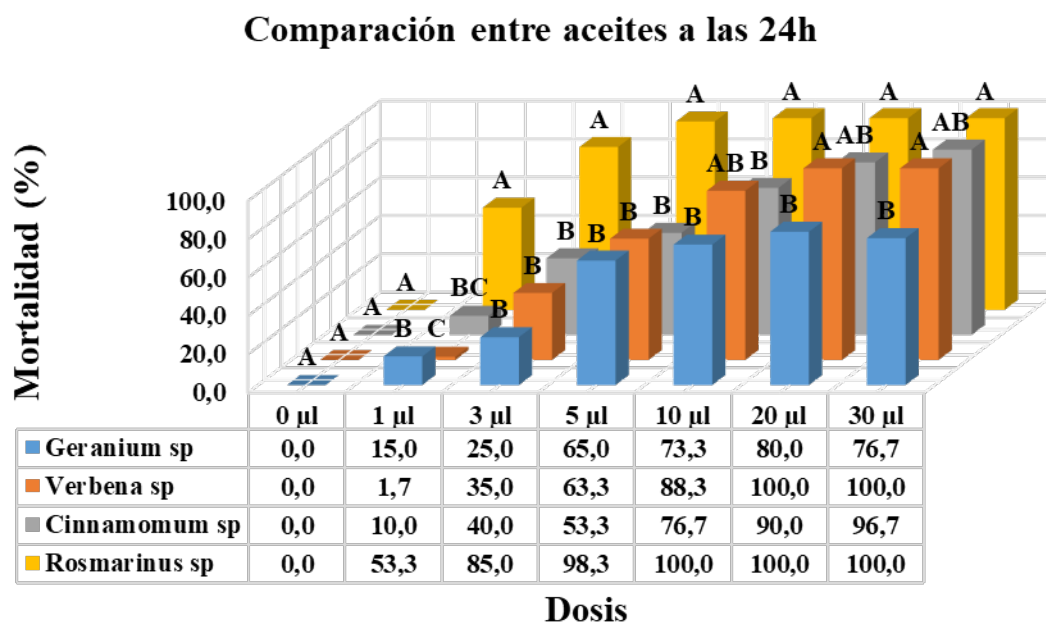


Figura 37: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium* sp.), Verbena (*Verbena* sp.), Canela (*Cinnamomum* sp.) y Romero (*Rosmarinus* sp.) en similares dosis sobre adultos de *A. obtectus* tras 24 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Para una dosis de 1µl, la mayor mortalidad de *A. obtectus* fue obtenida para el aceite de Romero (53,3%), significativamente superior al obtenido con el aceite de Geranio (15,0%), Canela (10,0%) y Verbena (1,7%) (Figura 38). Con una dosis de 3 µl, de nuevo, el aceite esencial de romero causó la mayor mortalidad sobre adultos de *A. obtectus*, con el 85,0% de los insectos muertos, significativamente superior a las obtenidas con el aceite esencial de Canela (40,0%), Verbena (35,0%) y Geranio (25,0%) (Figura 38).

Todos los aceites esenciales a una dosis de 5µl, causaron mortalidades superiores al 50,0% en los insectos, siendo el aceite esencial de Romero quien causó una mayor mortalidad (98,3%), significativamente superior a las obtenidas por los aceites de Canela, Verbena y Geranio con una mortalidad del 53,3; 63,3 y 65,0% respectivamente (Figura 38). Cuando la dosis aplicada fue de 10µl, el aceite esencial de Romero causó una mortalidad de 100% en los insectos, sólo difiriendo significativamente de las mortalidades obtenidas por el aceite esencia de Canela (76,7%) y Geranio (73,3%) (Figura 38).

Comparación entre aceites a las 48h

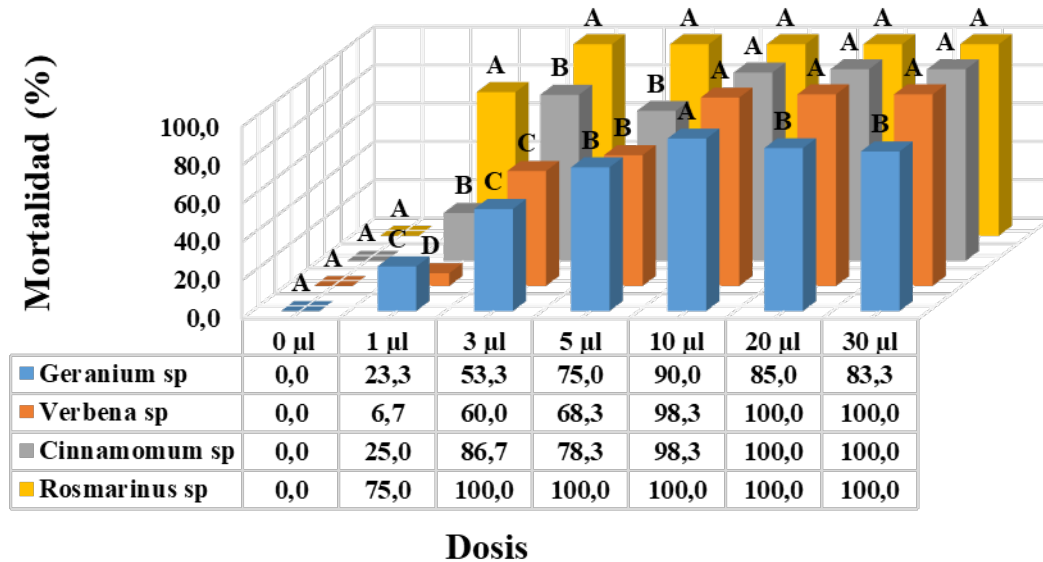


Figura 38: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium sp.*), Verbena (*Verbena sp.*), Canela (*Cinnamomum sp.*) y Romero (*Rosmarinus sp.*) en similares dosis sobre adultos de *A. obtectus* tras 48 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Cuando la dosis utilizada fue de 20 y 30 µl, los aceites de Romero y Verbena obtuvieron las mejores mortalidades sobre los adultos (100,0% de mortalidad). Dichos aceites, fueron significativamente mejores en ambas dosis que el aceite esencial de Geranio, que solamente obtuvo una mortalidad del 80,0 y 76,7% en las dosis de 20 y 30µl, respectivamente (Figura 39).

En dosis de 1, 3 y 5 µl, el aceite esencial de Romero obtuvo las mejores mortalidades sobre los adultos de *A. obtectus* (75,0% para 1 µl y 100,0% para 3 y 5 µl), significativamente superiores al resto de aceites evaluados en cada una de las dosis descritas (Figura 39). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los aceites evaluados cuando la dosis aplicada fue de 10µl (Figura 39). Por último, para las dosis de 20 y 30 µl, los aceites de Romero, Canela y Verbena, obtuvieron las mayores mortalidades sobre adultos de *A. obtectus*, siendo significativamente superiores estos aceites a las mortalidades obtenidas por el aceite esencial de Geranio (85,0 y 83,3% en las dosis de 20 y 30 µl, respectivamente (Figura 39).

Comparación entre aceites a las 72h

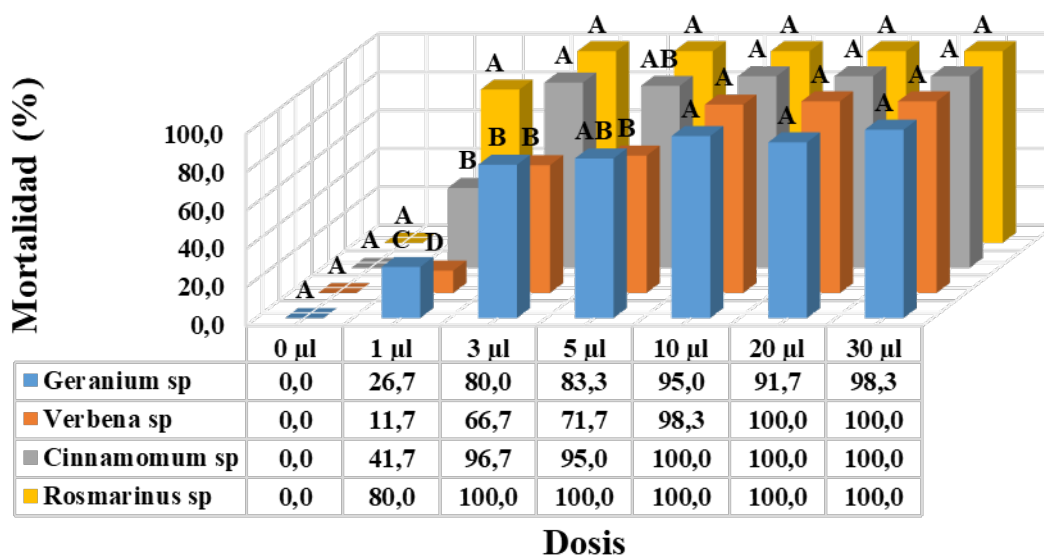


Figura 39: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium* sp.), Verbena (*Verbena* sp.), Canela (*Cinnamomum* sp.) y Romero (*Rosmarinus* sp.) en similares dosis sobre adultos de *A. obtectus* tras 72 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Con dosis de 1 µl, el aceite esencial de Romero fue el más efectivo en el control de adultos de *A. obtectus* (mortalidad del 80,0%), significativamente superior de las mortalidades que presentaron el aceite esencial de Canela (41,7%), Geranio (26,7%) y Verbena (11,7%). Con dosis de 3 µl, el aceite esencial de Romero y Canela fueron los más eficientes (100,0 y 96,7% de mortalidad, respectivamente), significativamente diferente de las mortalidades obtenidas por Geranio (80,0%) y Verbena (66,7%) (Figura 40). El aceite esencial de Romero, en dosis de 5 µl, es el más efectivo (100,0% de mortalidad) contra los adultos de *A. obtectus*, siendo solamente significativamente mayor que el aceite de Verbena (71,7%) (Figura 40). No existieron diferencias significativas en cuanto a las mortalidades obtenidas (100,0%) por todos los aceites evaluados cuando estos fueron aplicados a dosis de 10µl, 20 µl y 30 µl (Figura 40).

3.2. Acción fumigante de aceites esenciales sobre larvas de *A. obtectus*.

En las siguientes figuras se muestra el efecto fumigante de los aceites esenciales sobre las larvas de *A. obtectus*.

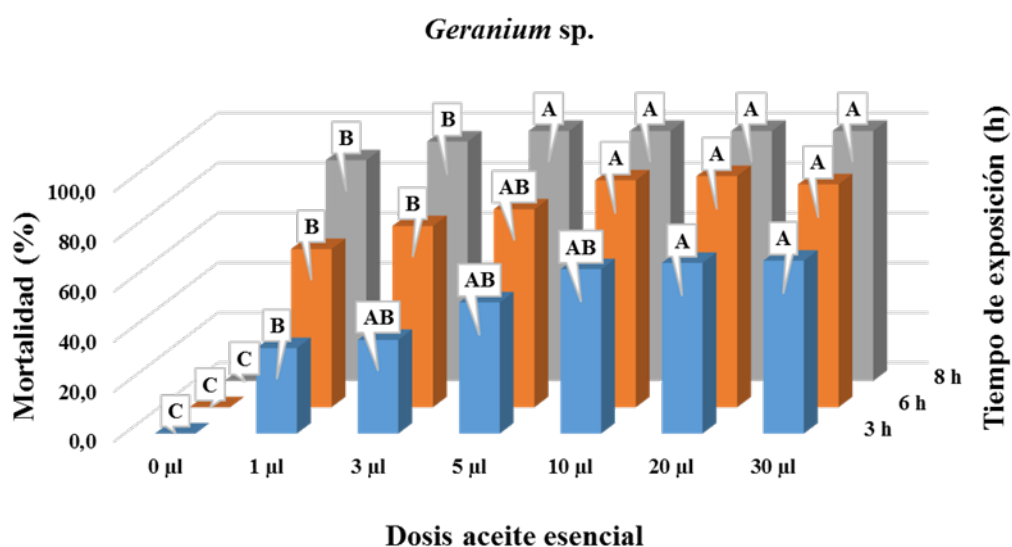


Figura 40: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (*Geranium sp.*) sobre larvas de *A. obtectus* tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Geranio tras 3 horas de exposición obtuvo una buena mortalidad en las dosis (5, 10, 20 y 30 µl) sobre larvas de *A. obtectus*, con mortalidades del 52,0; 65,0; 68,0 y 69,0%, respectivamente (Figura 41). Sólo las mortalidades obtenidas con las dosis de 20 y 30 µl, fueron significativamente mayores que las obtenidas en las menores dosis 1 y 3 µl, con un 34,0 y 37,0% de las larvas muertas, respectivamente (Figura 41). Para un periodo de exposición de 6h, hubo un aumento de las mortalidades para todas las dosis evaluadas, con mortalidad superiores al 50,0% en las dosis de 1 y 3 µl, que continuaron siendo significativamente inferiores de las mortalidades obtenidas con las dosis 10, 20 y 30 µl (Figura 41). Tras 8 horas de exposición, el Geranio obtuvo una mortalidad del 100,0% sobre las larvas en las dosis de (5, 10, 20 y 30 µl), de nuevo significativamente diferentes de las mortalidades obtenidas con las dosis 1 y 3 µl, con una mortalidad del 88,0 y 95,0% respectivamente (Figura 41).

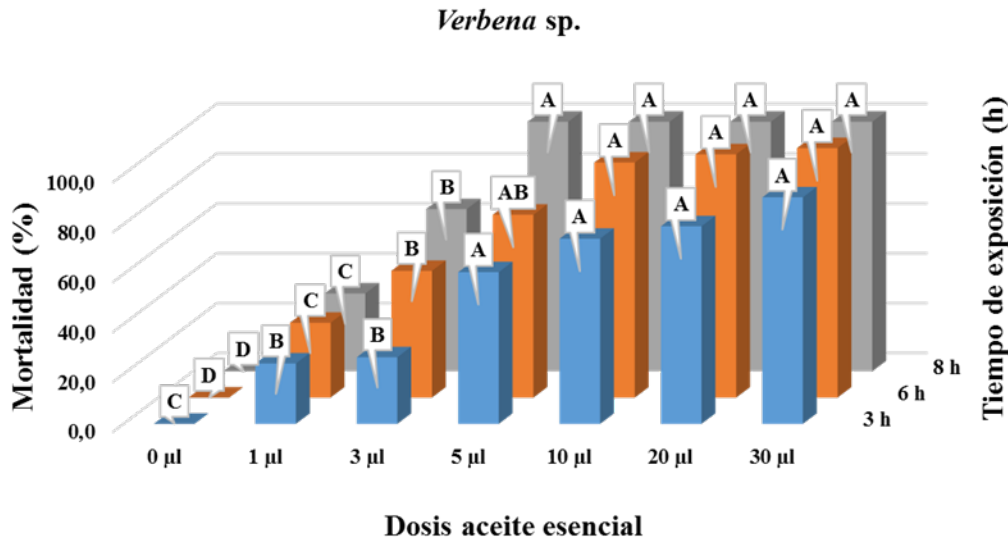


Figura 41: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Verbena (*Verbena* sp.) sobre larvas de *A. obtectus* tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Después de 3 horas de exposición, el aceite esencial de Verbena obtuvo una mortalidad en larvas del 60,0; 74,0; 79,0 y 90,0% en larvas evaluadas en la dosis de 5, 10, 20 y 30 µl, respectivamente, significativamente superior al resto de dosis menores evaluadas, que alcanzaron mortalidades de 24,0 y 26,0% para las dosis de 1 y 3 µl (Figura 42). Tras 6 horas de exposición, el aceite de Verbena en dosis de 10, 20 y 30 µl obtuvo una mortalidad del 94,0; 97,0 y 100,0% respectivamente, significativamente superiores a las mortalidades obtenidas con las dosis 1 µl (30,0%) y 3 µl (50,0%) (Figura 42). A las 8 horas de exposición, las dosis de 5 a 30 µl provocaron una mortalidad de 100,0%, significativamente superiores a las dosis 1 y 3 µl, con un 31,0 y 65,0% de larvas muertas, respectivamente (Figura 42).

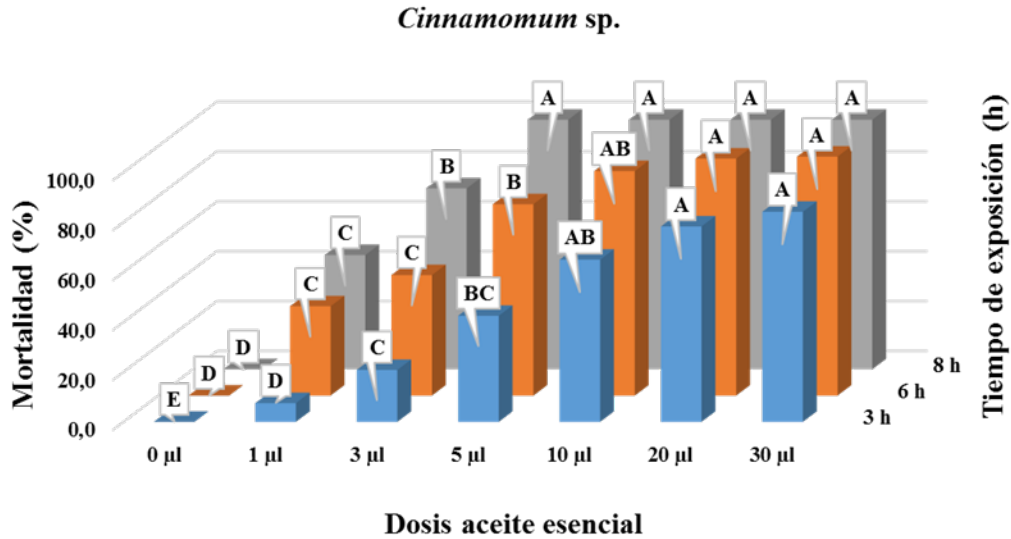


Figura 42: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (*Cinnamomum sp.*) sobre larvas de *A. obtectus* tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 3 horas de exposición, el aceite esencial de Canela a las dosis 20 y 30 µl causaron las mayores mortalidades sobre larvas, con un 78,0 y 84,0% respectivamente, significativamente superior a las mortalidades obtenidas con las concentraciones de 0, 1, y 3 µl (0,0; 7,0 y 20,0% respectivamente) (Figura 43). El aceite de Canela después de 6 horas de exposición causó mortalidades del 90 % en las dosis más altas evaluadas (20 y 30 µl), significativamente superiores a la mortalidad obtenida con la dosis 5 µl (76,0%) y dosis inferiores (0, 1 y 3 µl) (Figura 43). Finalmente, tras 8 horas de exposición, el aceite esencial de Canela causó 100,0% de mortalidades en las dosis 5, 10, 20 y 30 µl, significativamente superiores a las obtenidas con dosis 1 y 3µl (45,8 y 72,8%, respectivamente) (Figura 43).

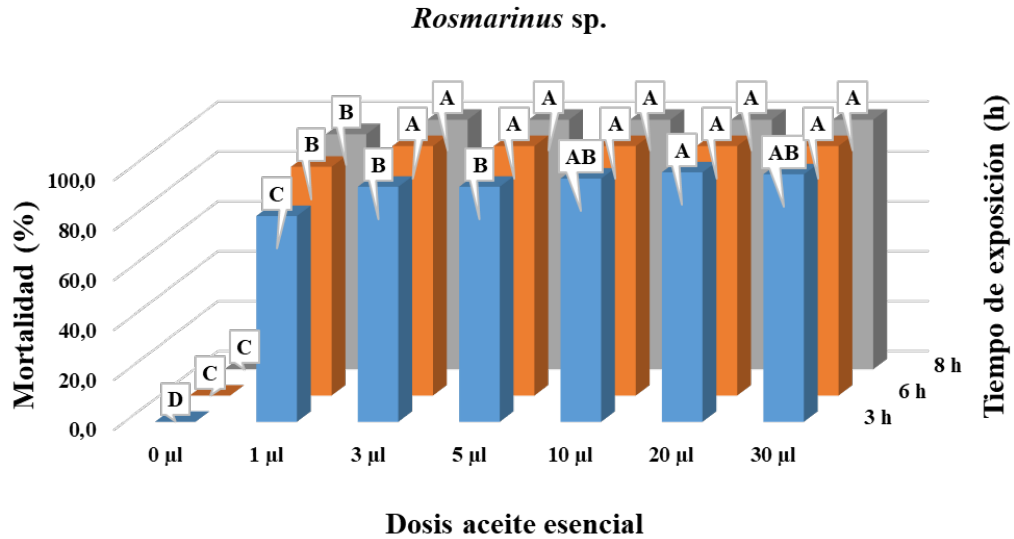


Figura 43: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus sp.*) sobre larvas de *A. obtectus* tras 3, 6 y 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada tiempo de exposición indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Romero, tras 3 horas de exposición, obtuvo mortalidades superiores al 80,0 % en todas las dosis evaluadas. Siendo la dosis a 20 µl (100,0%) la que acumuló mayores mortalidades, pero solamente significativamente superiores de las mortalidades obtenidas en 0, 1, 3 y 5 µl (con 0,0; 82,5; 94,2 y 94,2%, respectivamente (Figura 44). Tras 6 y 8 horas de exposición, el aceite esencial del Romero causó la muerte al 100,0% de las larvas evaluadas en las dosis de 3, 5, 10, 20 y 30 µl, significativamente superiores de las mortalidades obtenidas en las dosis 0 y 1 µl en ambos periodos de exposición (0 y 91,0% para 6 horas y 0,0 y 94,0% para 8 horas) (Figura 44).

En las siguientes figuras se muestra la comparación entre aceites de su efecto fumigante sobre las larvas de *A. obtectus* aplicados a diferentes concentraciones.

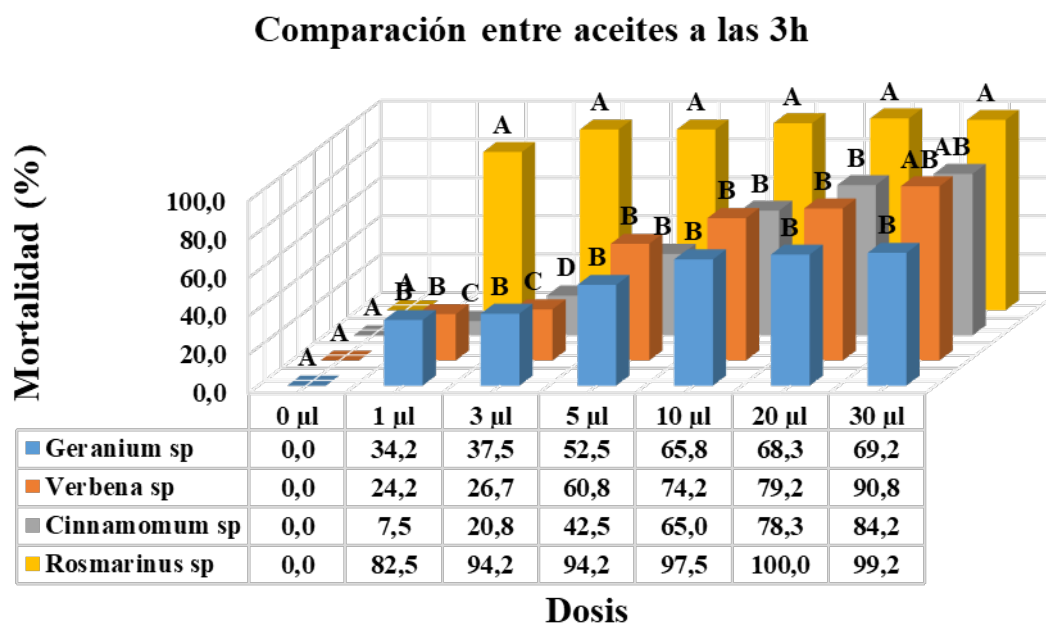


Figura 44: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium sp.*), Verbena (*Verbena sp.*), Canela (*Cinnamomum sp.*) y Romero (*Rosmarinus sp.*) en similares dosis sobre larvas de *A. obtectus* tras 3 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre aceites para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 3 horas de exposición, para la dosis de 1, 3, 5, 10 y 20µl, la mayor mortalidad de larvas fue obtenida para el aceite de Romero, 82,2; 94,2; 94,2; 97,5 y 100,0% de larvas muertas respectivamente, significativamente superior a las mortalidades obtenidas por el resto de aceites esenciales evaluadas dentro de la misma dosis aplicada (Figura 45).

Cuando la dosis aplicada de romero fue de 30 µl, se obtuvo prácticamente un control total sobre larvas (99,2% de larvas muertas), sólo significativamente superior a las mortalidades obtenidas a la misma dosis con el Geranio (69,2%) (Figura 45).

Comparación entre aceites a las 6h

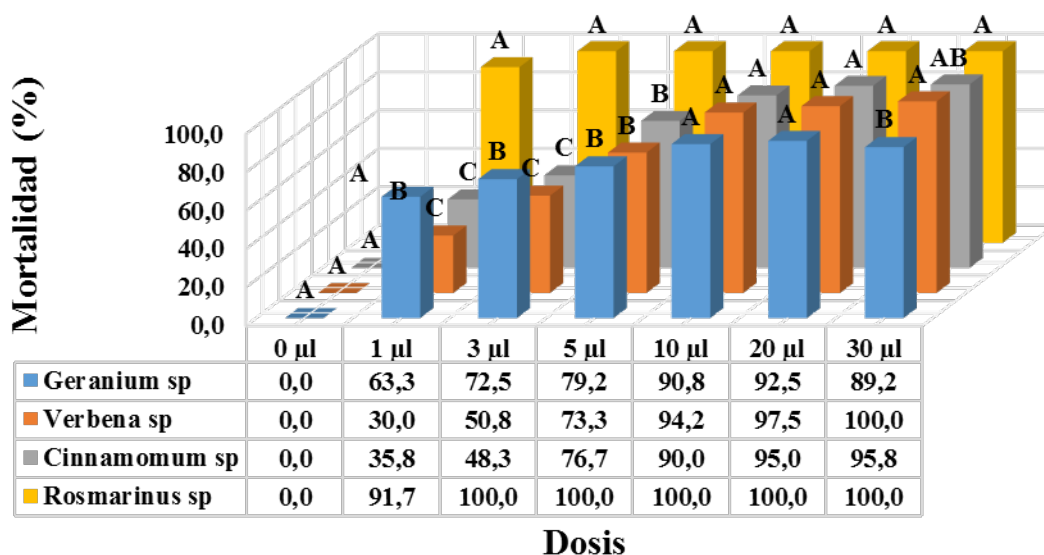


Figura 45: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium* sp.), Verbena (*Verbena* sp.), Canela (*Cinnamomum* sp.) y Romero (*Rosmarinus* sp.) en similares dosis sobre larvas de *A. obtectus* tras 6 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 6 horas de exposición el aceite esencial de Romero en dosis 1, 3 y 5 µl, obtuvo las mejores mortalidades, con un 91,7; 100,0 y 100,0% de larvas muertas, significativamente superiores al resto de aceites evaluados en cada una de las dosis descritas (Figura 46). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los aceites evaluados cuando la dosis aplicada fue de 10 y 20µl. Para una dosis de 30 µl, el aceite de romero (100,0% larvas muertas) y de verbena (100,0% larvas muertas), sólo fueron significativamente mayores que las mortalidades obtenidas sobre larvas con el aceite de geranio (89,2%) (Figura 46).

Comparación entre aceites a las 8h

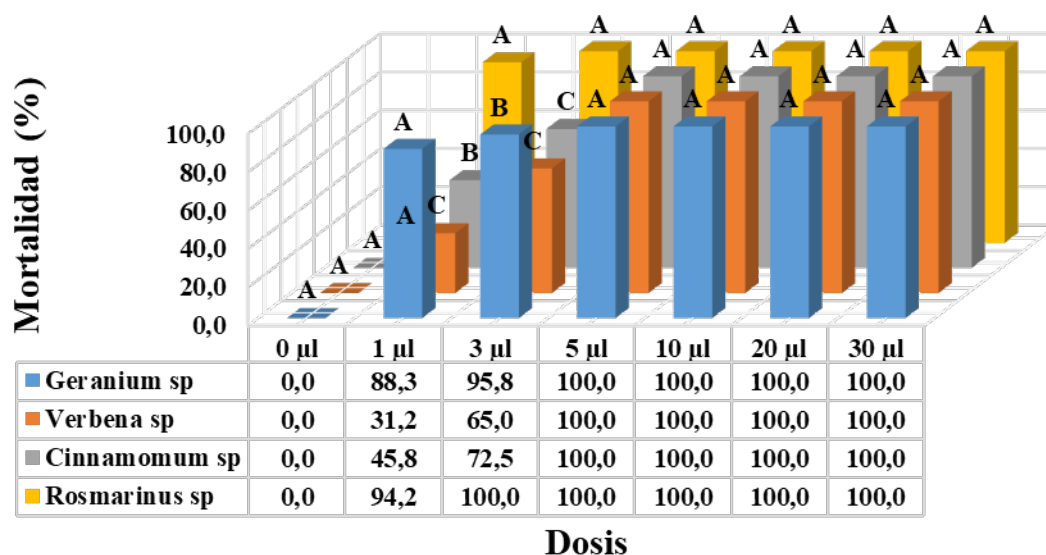


Figura 46: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium* sp.), Verbena (*Verbena* sp.), Canela (*Cinnamomum* sp.) y Romero (*Rosmarinus* sp.) en similares dosis sobre larvas de *A. obtectus* tras 8 horas de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indican diferencias significativas entre ellos para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 8 horas de exposición, con dosis de 1 µl, el aceite esencial de Romero y Geranio fueron los más eficaces para el control de larvas de *A. obtectus*, (94,2 y 88,3 % de larvas muertas respectivamente), significativamente superior de las mortalidades obtenidas por el aceite esencial de canela (45,8%) y verbena (31,2%) (Figura 47). Con la dosis de 3 µl, sólo el aceite esencial de romero, con una mortalidad del 100,0%, fue significativamente superior al resto de aceites evaluados dentro de la misma dosis y tiempo de exposición evaluado (Figura 47). En dosis superiores de 5, 10, 20, 30 µl, no hubo diferencias significativas entre los aceites evaluados, con 100,0% de mortalidad de larvas en todos ellos (Figura 47).

3.3. Acción fumigante de aceites esenciales sobre huevos de *A. obtectus*

En las siguientes figuras se muestra el efecto fumigante de los aceites esenciales sobre huevos de *A. obtectus*.

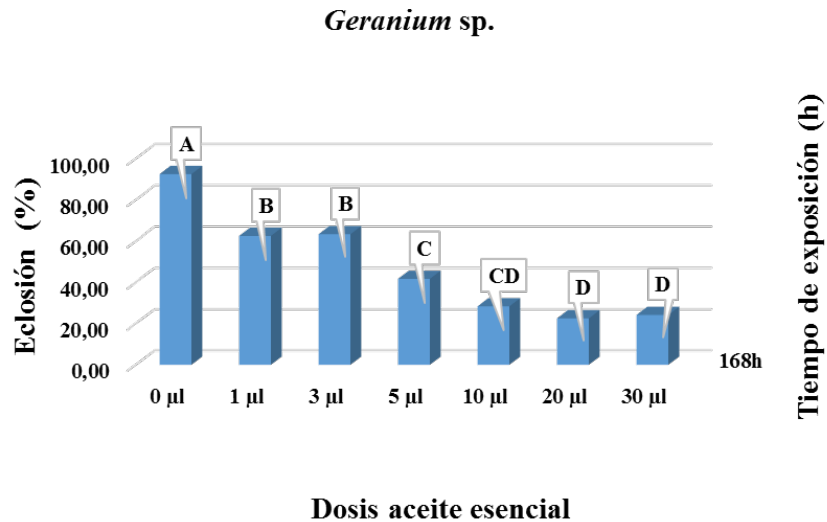
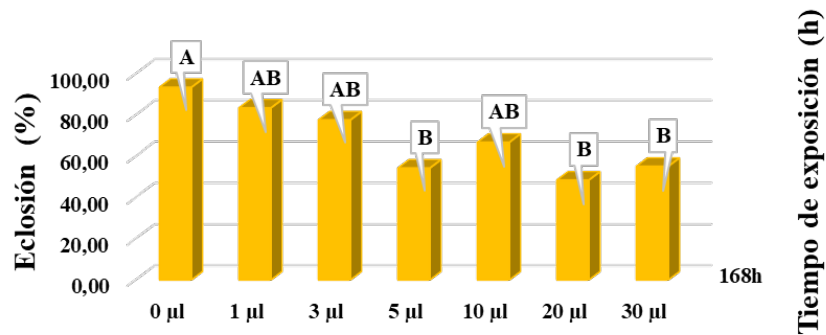


Figura 47: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Geranio (*Geranium sp.*) sobre huevos de *A. obtectus* tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 7 días de exposición, el aceite esencial de Geranio a dosis de 20 y 30 µl dio lugar al menor número de huevos eclosionados de *A. obtectus* (22,5 y 24,1%, respectivamente), significativamente menor a las eclosiones obtenidas con las concentraciones de 0, 1, 3 y 5 µl, en las que eclosionaron un porcentaje de huevos del 92,5; 65,5; 63,3 y 41,6%, respectivamente (Figura 48).

Verbena sp.

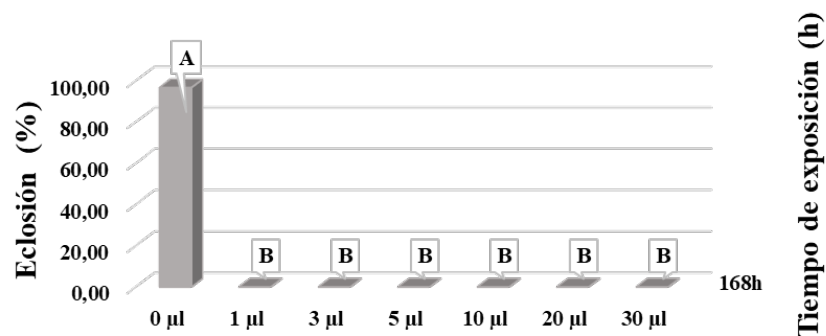


Dosis aceite esencial

Figura 48: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Verbena (*Verbena sp.*) sobre huevos de *A. obtectus* tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Verbena después de 7 días de exposición, a dosis de 5, 20 y 30µl, redujo la eclosión el 54,1; 48,3 y 55,0% respectivamente, significativamente menores que las eclosiones obtenidas en la dosis control (0 µl), con un 93,3% de los huevos eclosionados (Figura 49).

Cinnamomum sp.



Dosis aceite esencial

Figura 49: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Canela (*Cinnamomum sp.*) sobre huevos de *A. obtectus* tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 7 días de exposición, el aceite esencial de Canela, en todas las dosis evaluadas (1, 3, 5, 10, 20 y 30 μ l) evitó la eclosión de todos los huevos de *A. obtectus* evaluados (0,0% de huevos eclosionados), significativamente menores de las eclosiones obtenidas en la dosis control (0 μ l), con un 96,6 % de los huevos eclosionados (Figura 50).

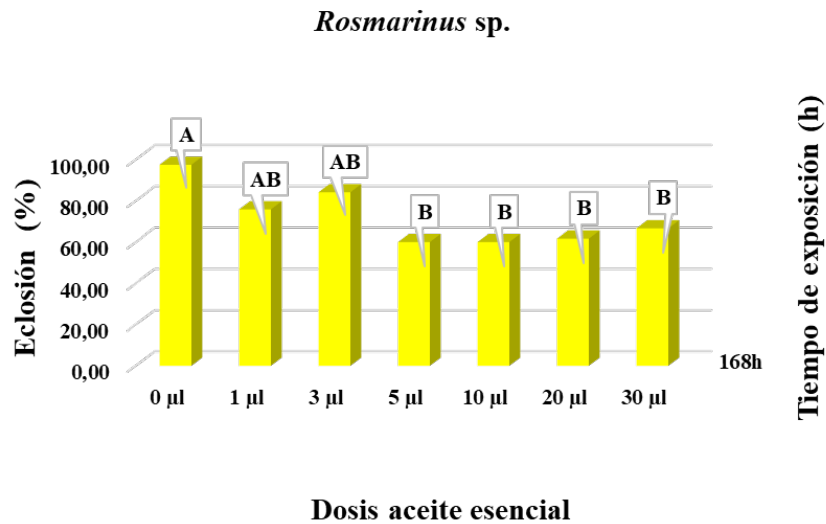


Figura 50: Efecto de distintas concentraciones del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus* sp.) sobre huevos de *A. obtectus* tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre dosis aplicadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aceite esencial de Romero, después de 7 días de exposición, a dosis de 5, 10, 20 y 30 μ l, redujo la eclosión el 60,0; 60,0; 61,6 y 66,6% respectivamente, significativamente menores de las eclosiones obtenidas en la dosis control (0 μ l), con un 97,5% de los huevos eclosionados (Figura 51).

En las siguientes figuras se muestra la comparación entre aceites de su efecto fumigante sobre huevos de *A. obtectus*.

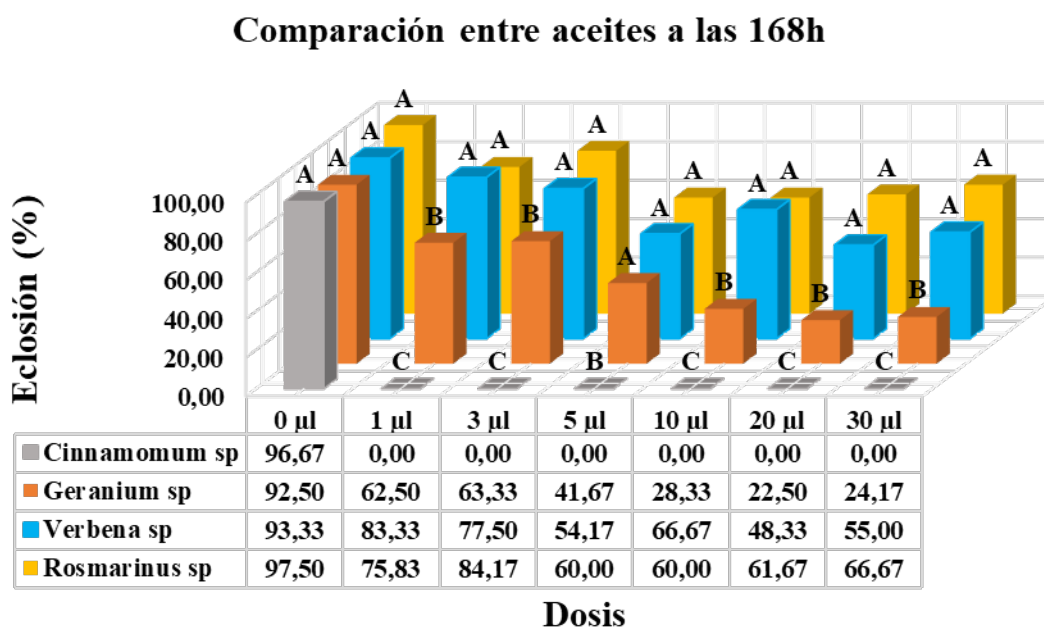


Figura 51: Comparación de aceites esenciales de Geranio (*Geranium sp.*), Verbena (*Verbena sp.*), Canela (*Cinnamomum sp.*) y Romero (*Rosmarinus sp.*) en similares dosis sobre huevos de *A. obtectus* tras 168 horas (7 días) de exposición. Letras diferentes para cada aceite esencial indica diferencias significativas entre aceites para una misma dosis aplicada ($P \leq 0,05$, test DMS).

Después de 7 días de exposición, el aceite esencial de Canela, en dosis de 1, 3, 5, 10, 20 y 30µl, controló totalmente la eclosión de los huevos con un 0,0% de huevos eclosionados en las dosis descritas, significativamente menores de las eclosiones obtenidas en el resto de aceites esenciales evaluadas dentro de una misma dosis (Figura 52).

Se sabe que los aceites esenciales de plantas poseen actividades insecticidas y/o repelentes frente a los insectos, y además no representan amenaza para el medio ambiente o para la salud humana, convirtiéndose de esta forma en una alternativa posible a los insecticidas sintéticos (Jumbo, Faroni, y Oliveira 2014). En este apartado hemos evaluado la fumigación de distintos aceites esenciales frente a distintos estadios de *A. obtectus*, y que podrían ejercer un buen control sobre este insecto en alubias almacenadas.

Todos los aceites esenciales evaluados poseen control sobre los distintos estadios evaluados, aumentando dicho control con el aumento de las dosis evaluadas y tiempos de

exposición. Siendo 72 horas de exposición y concentraciones superiores a 3µl (en Canela y Romero) y 10µl (en Geranio y Verbena) las que consiguieron un control total sobre los adultos de *A. obtectus*. Estos periodos máximos de exposición (72 horas) observados para el control de *A. obtectus* en nuestro ensayo, no excedieron de 14 días al igual que en los ensayos descritos por Ilboudo *et al.* (2010) y Jumbo *et al.* (2014) para los aceites esenciales de *Hyptis*, Canela y Clavo, respectivamente. Las pérdidas de actividad de los aceites esenciales se deben normalmente a la degradación de los compuestos activos de los aceites, en los que los aceites esenciales que contienen compuestos más hidrogenados son más susceptibles a la oxidación (Kim *et al.* 2003). Todos los aceites evaluados en este ensayo mostraron diferencias significativas en términos de toxicidad crónica (acciones en el desarrollo de los distintos estadios de *A. obtectus* evaluados).

El mejor control total sobre huevos de *A. obtectus* fue ejercido por el aceite esencial de Canela de manera independiente de la dosis evaluada. Esto se debe a las diferencias en los efectos directos o indirectos del principio activo del aceite (aldehído cinámico) en uno o más estadios de vida de los insectos (huevo, larva, pupa y adulto), como se ha descrito anteriormente por otros autores (Papachristos y Stamopoulos 2002; G. Schmidt y Streloke 1994).

Las diferentes actividades de aceites esenciales en huevos y adultos han sido descritas para algunos insectos (Yang *et al.* 2003; Yang *et al.* 2005; Abd El-Salam 2010), y específicamente para *A. obtectus*. Papachristos y Stamopoulos, (2002) y Regnault-Roger y Hamraoui (1994) han demostrado que la capacidad de las larvas para entrar en las alubias y las susceptibilidades larva/pupa son afectadas diferencialmente por cada tipo de aceite esencial evaluado.

En nuestro ensayo el aceite esencial de Canela ha mostrado tener el mejor control sobre todos los estadios de *A. obtectus* evaluados. Otros estudios, describen para este aceite tener un carácter repelente contra *A. obtectus* a dosis altas (Hori 2003; Prajapati, Tripathi, y Aggarwal 2005).

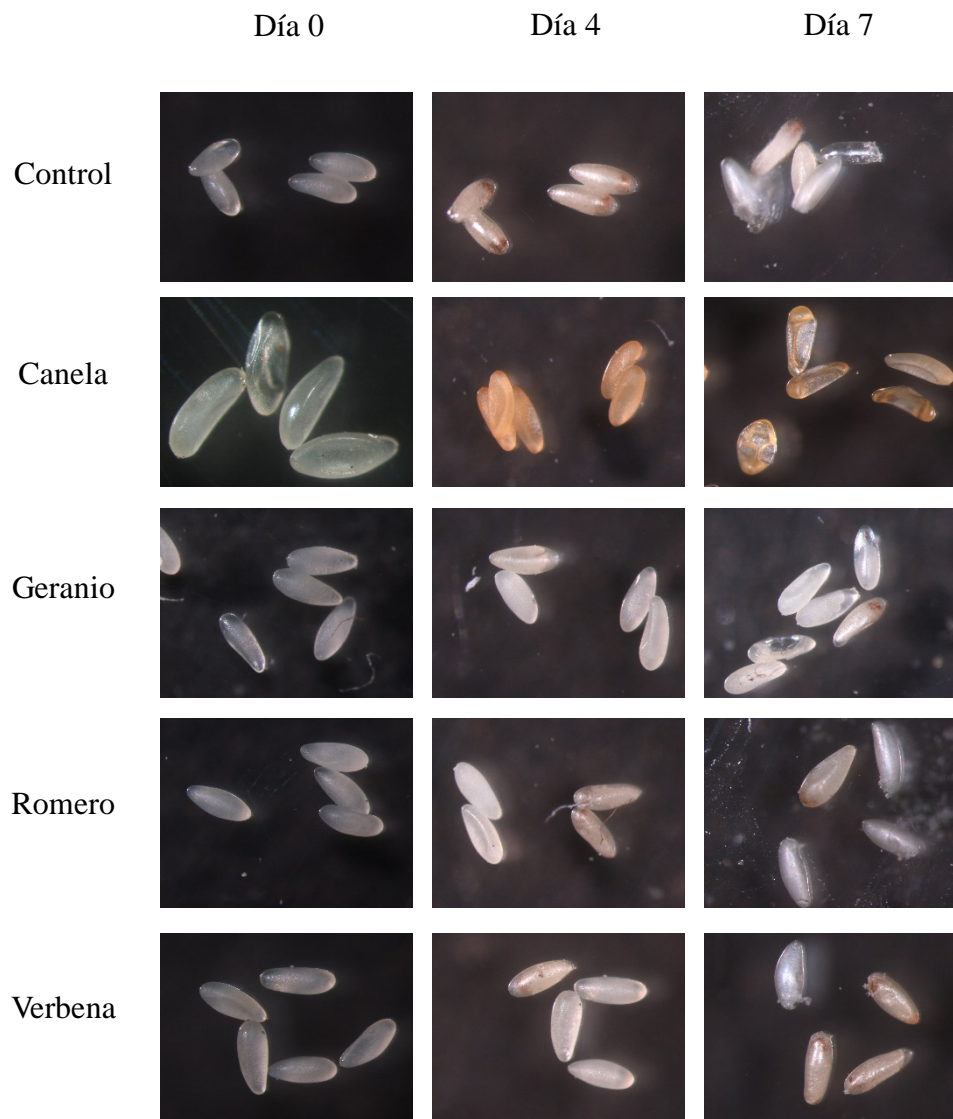


Figura 52: Huevos de *A. obtectus* sometidos a los distintos aceites esenciales [Geranio (*Geranium* sp.), Verbena (*Verbena* sp.), Canela (*Cinnamomum* sp.) y Romero (*Rosmarinus* sp.)] respecto al control observados en el día 0, día 4 y día 7.

4. VARIEDADES RESISTENTES A *A. obtectus*.

4.1. Ensayo con libre elección

En las siguientes figuras se muestra la comparación entre variedades en función de su efecto atractivo sobre *A. obtectus*.



Figura 53: Detalle del número de adultos de *A. obtectus* extraídos de distintas variedades de alubia.

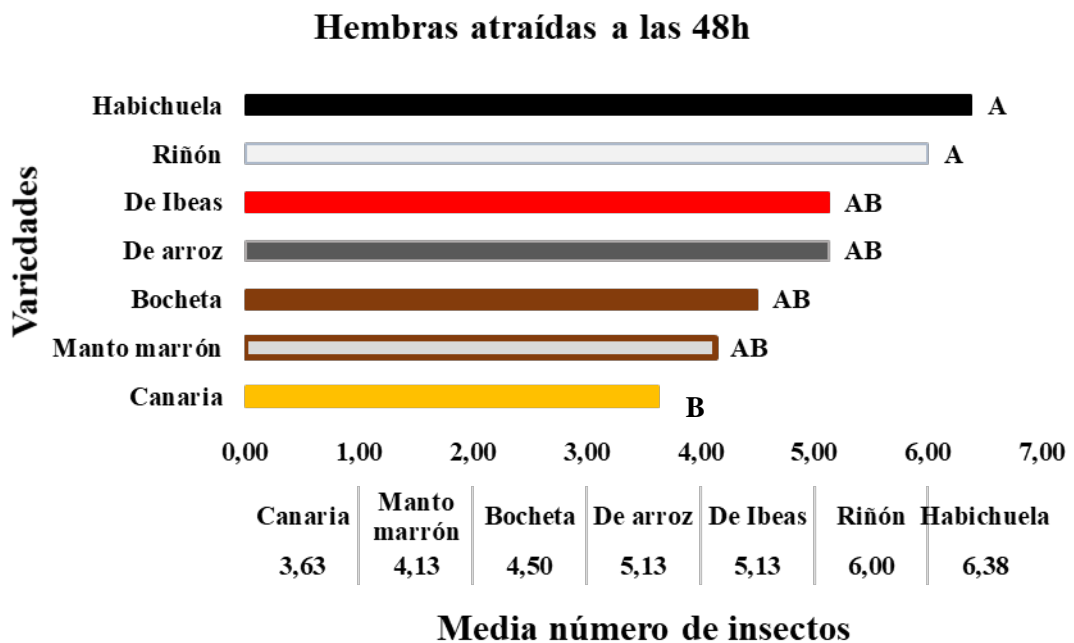


Figura 54: Comparación de medias de hembras atraídas por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Las variedades Habichuela y Riñón, después de 48 horas de exposición a adultos de *A. obtectus*, fueron las variedades que atrajeron a una mayor cantidad de hembras, con una media de 6,38 y 6 hembras atraídas en cada variedad respectivamente, sólo significativamente mayores que la media de hembras atraídas por la variedad Canaria (3,63 hembras) (Figura 55).

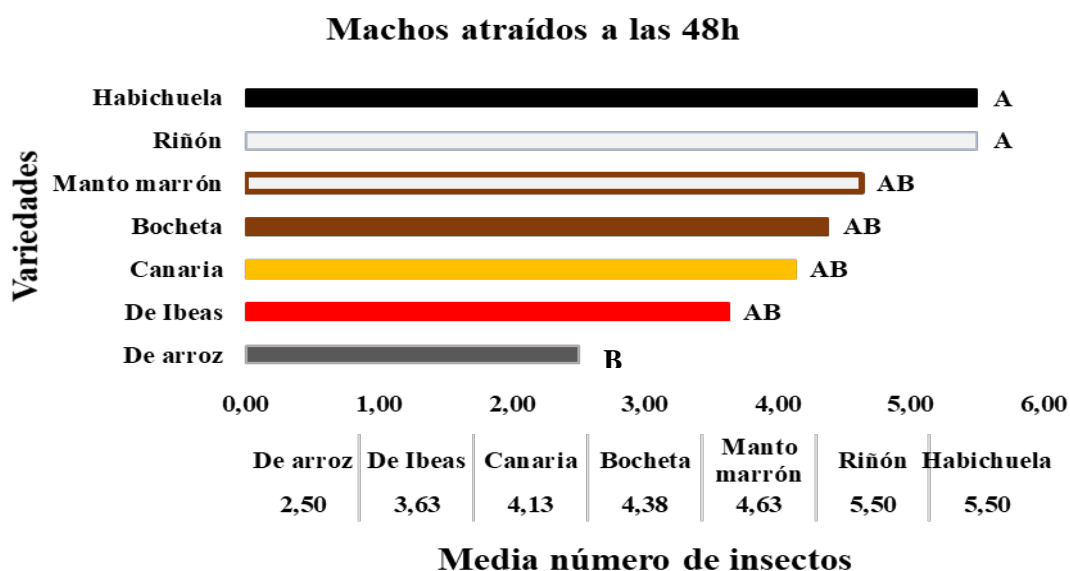


Figura 55: Comparación de medias de machos atraídos por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

De nuevo, las variedades Habichuela y Riñón, tras 48 horas de exposición a adultos de *A. obtectus*, fueron las variedades que atrajeron a una mayor cantidad de machos, con una media de 5,5 machos atraídos en ambas variedades descritas. Este número de machos atraídos en estas variedades sólo fueron significativamente mayores que la media de machos atraídos por la variedad De arroz (2,5 machos) (Figura 56).

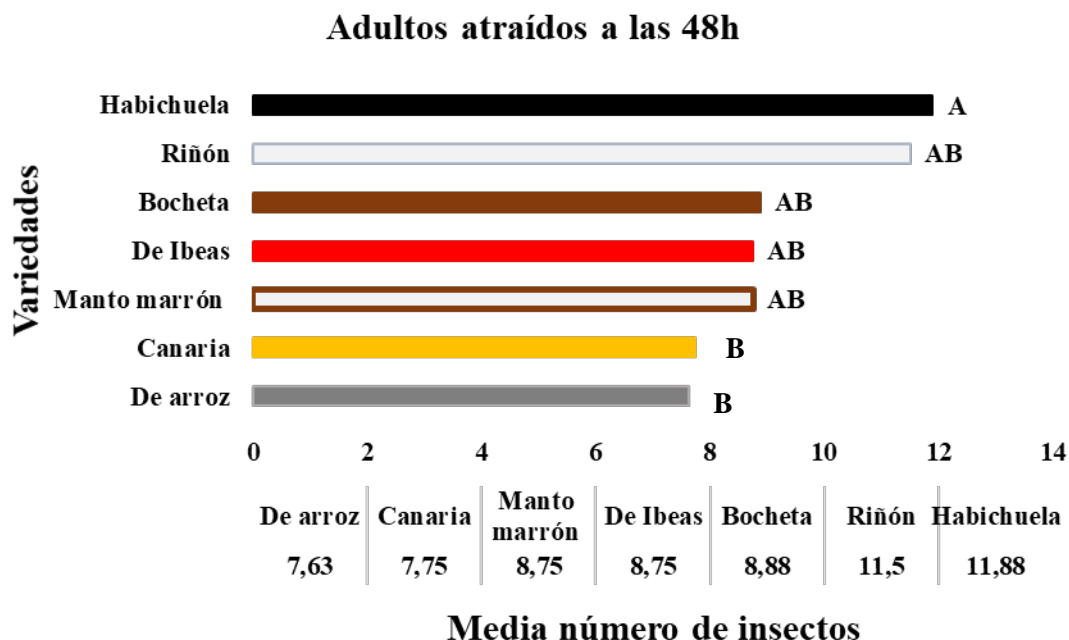


Figura 56: Comparación de medias del total de insectos atraídos por las distintas variedades evaluadas después de 48h de exposición. Letras diferentes para el tiempo de exposición descrito indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Las variedades Habichuela y Riñón, después de 48 horas de exposición a adultos de *A. obtectus*, fueron las variedades que atrajeron a una mayor cantidad de adultos de *A. obtectus* (machos y hembras), con una media de 11,8 y 11,5 insectos atraídos en cada variedad descrita respectivamente, sólo significativamente mayores que la media de insectos totales atraídos por las variedades Canaria y De arroz (con una media de 7,75 y 7,63 insectos) (Figura 57).

Tras un periodo de exposición de 48 horas los insectos, se distribuyeron por las distintas variedades evaluadas. La habilidad de los insectos de encontrar, reconocer y aceptar el hospedero es uno de los requisitos para el desarrollo de la especie (Wasserman y Futuyma 1981).

Algunos insectos quedaron en el bote central, no eligiendo, por tanto, ninguna de las variedades que se les ofrecieron (proporciones iguales de machos y hembras). Según Nazi *et al.* (2008), las semillas liberan sustancias volátiles que estimulan a las hembras la búsqueda de las semillas, estímulos que no son percibidos por los machos.

En relación al color de las variedades, Ramírez-Serrano *et al.* (2003) evaluando las variedades Tlaxcala 62 (color café), México 332 (color Negro), J-117 (color rosa), Hidalgo 58 (color Amarillo) y Peruano (color Amarillo), con excepción de Peruano, no presentaron diferencias significativas en cuanto al número de insectos emergidos y porcentaje de emergencia en cada variedad, por lo que podemos concluir que todas estas variedades podrían ser susceptibles al ataque de *A. obtectus* en condiciones de almacenamiento.

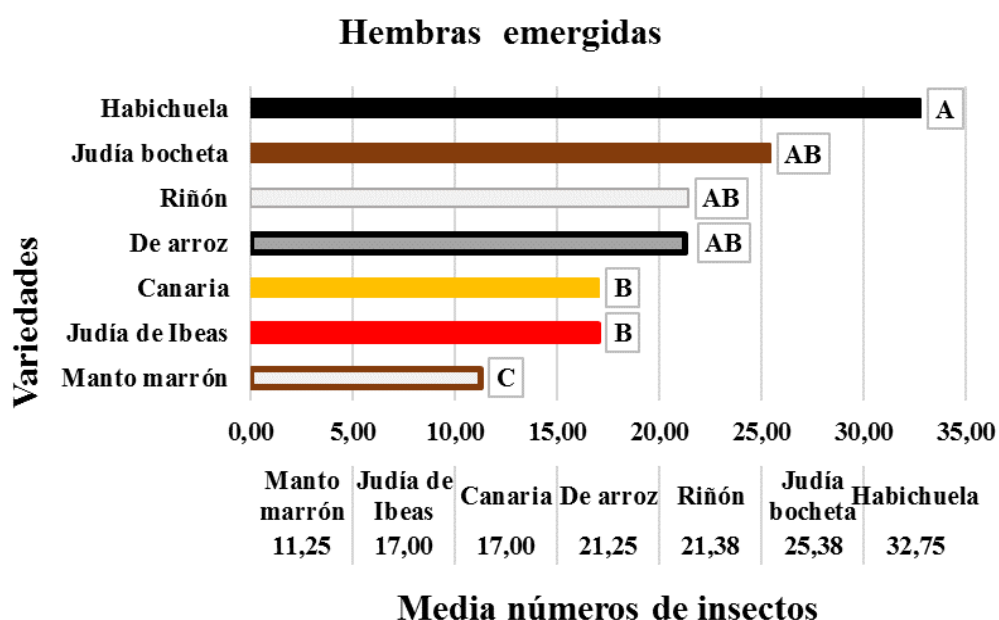


Figura 57: Comparación de medias de las hembras emergidas en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes para la emergencia de hembras en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Habichuela fue la variedad que mostró un mayor número de hembras emergidas (una media de 32,75 hembras), una media de hembras significativamente mayor que el número de hembras emergidas en el resto de variedades evaluadas, excepto las hembras emergidas en la variedad Bocheta (con una media de 25,38 hembras) (Figura 58).

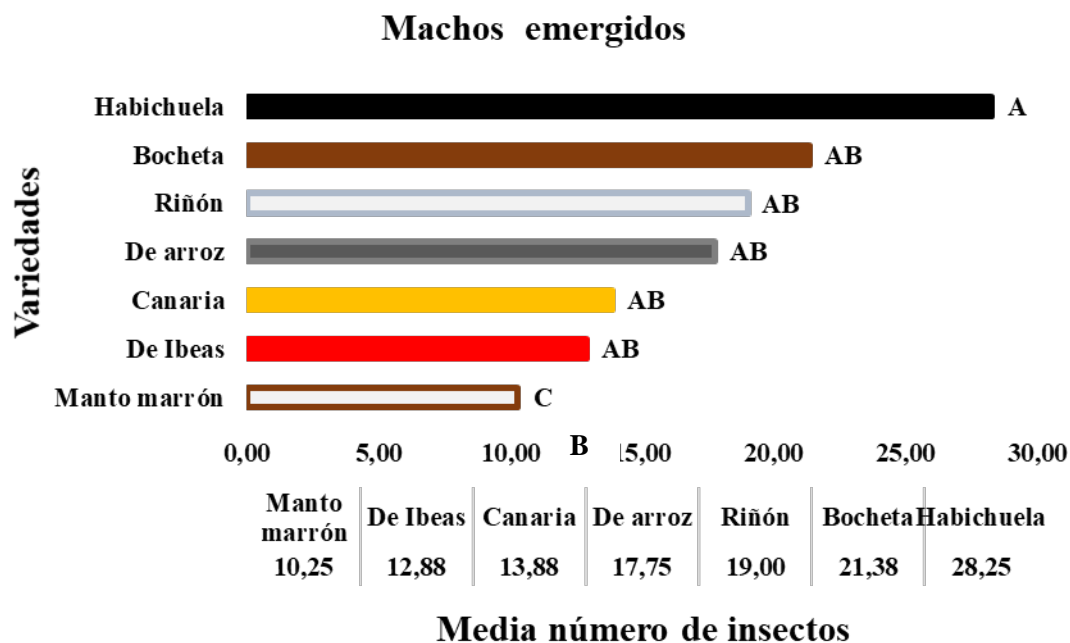


Figura 58: Comparación de medias de los machos emergidos en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes para la emergencia de machos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

De nuevo, la variedad Habichuela fue la variedad que mostró un mayor número de machos emergidos dentro de una misma variedad (una media de 28,25 machos), una media de machos solamente significativamente mayor que el número de machos emergidos en la variedad Manto Marrón (con una media de 10,25 machos) (Figura 59).

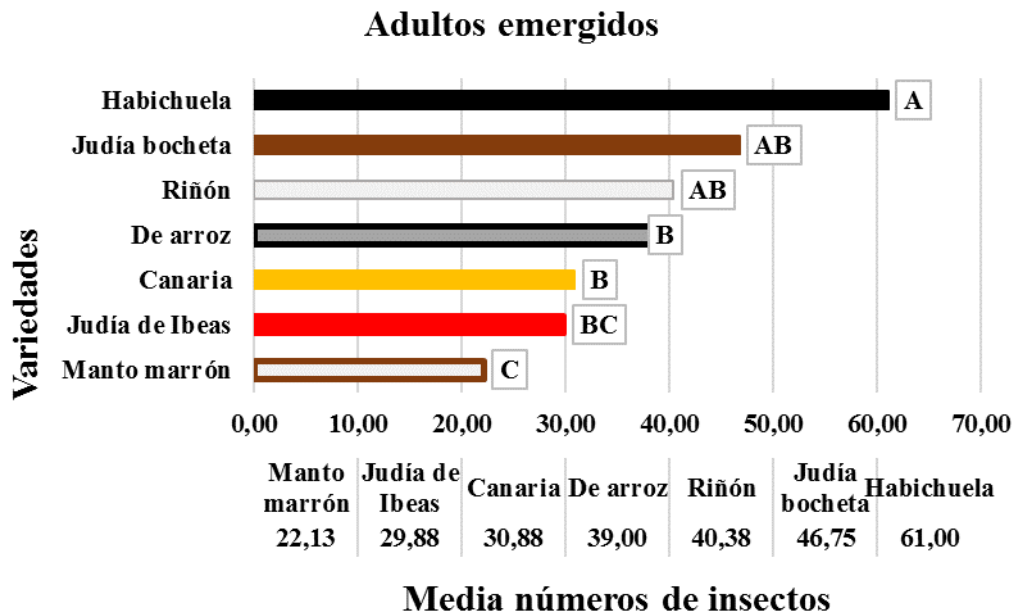


Figura 59: Comparación de medias del total de insectos emergidos en las distintas variedades evaluadas. Letras diferentes en la emergencia del total de insectos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Habichuela (61,00 insectos), fue la variedad que mostró un mayor número de insectos emergidos (ambos sexos) dentro de una misma variedad, una media de insectos emergidos significativamente mayor que los emergidos en las variedades De arroz, Canaria, Judía de Ibeas y Judía de manto marrón (con valores medios de 39,00; 30,88; 29,88 y 22,13 respectivamente) (Figura 60).

Los genes de la proteína arcelina tienen un posible papel en la resistencia contra *A. obtectus* (Osborn *et al.* 1986). Altos niveles de resistencia fueron detectados por van Schoonhoven *et al.* (1983) en variedades de alubias silvestres (*P. vulgaris*) de origen mexicano.

Kornegay y Cardona (1991), trabajando con el cruzamiento de cultivos susceptibles de ser atacados por *A. obtectus*, variedades comerciales A 36 (semillas grandes de color rojo) y Pijao (color negro), observaron que con el cruzamiento de la variedad Pijao y A36, se obtuvieron un mayor número de insectos emergidos, pero en relación a las variedades comerciales, prolongó el tiempo de aparición de los adultos, demostrando que el tamaño de la semilla o el color puede influir ligeramente en la expresión de resistencia.

En el ensayo con libre elección, la variedad Habichuela fue la más atractiva a los insectos de *A. obtectus*, seguida de las variedades Riñón, Bocheta, De Ibeas y Manto marrón. Esa preferencia puede ser favorable a su ovoposición.

Las variedades Canaria y De arroz fueron las variedades que menos insectos atrajeron en relación a las otras variedades, pudiendo tener algún compuesto volátil que ha sido detectado por la hembra, y que inhiben su comportamiento a la hora de realizar la ovoposición. Similar comportamiento ha sido descrito por Baldin y Pereira (2010), con genotipos de Arc2, Arc3, Arc4, Arc3s e Ipa 6 frente al gorgojo *Z. subfasciatus*.

La variedad Canaria ha sido la variedad que menos hembras atrajo y la variedad De arroz, la que menos machos.

4.2. Ensayo sin libre elección

En las siguientes tablas se muestra la comparación de medias entre variedades en función del periodo de desarrollo de *A. obtectus*.

Tabla 7: Comparación de medias en el periodo de desarrollo (Media \pm Error) de *A. obtectus* en diferentes variedades de alubia en el ensayo sin libre elección.

| Variedades | Periodo de desarrollo (Días) | | | |
|--------------------------|------------------------------|-------|-----|-----|
| Judía de manto marrón | 39,7 | \pm | 0,1 | a |
| Alubia gorda | 39,3 | \pm | 0,1 | ab |
| Habichuela | 39,2 | \pm | 0,1 | ab |
| Judía bocheta | 39,1 | \pm | 0,1 | ab |
| Canaria | 38,7 | \pm | 0,1 | bc |
| Judía de Ibeas | 38,3 | \pm | 0,1 | c |
| De arroz | 38,3 | \pm | 0,1 | c |
| Judía Negra | 37,5 | \pm | 0,2 | d |
| Verdina | 37,5 | \pm | 0,1 | d |
| Judía blanca pinta negra | 37,2 | \pm | 0,1 | de |
| Mocha colorada | 37,2 | \pm | 0,1 | de |
| Judía blanca | 37,1 | \pm | 0,1 | de |
| Haba del Bierzo | 36,9 | \pm | 0,1 | de |
| Colorada sin palo | 36,9 | \pm | 0,2 | de |
| Judía oro | 36,5 | \pm | 0,1 | ef |
| Judía del tío Anselmo | 36,5 | \pm | 0,1 | efg |
| Riñón | 36,5 | \pm | 0,1 | efg |
| Pinta Pil 2-1 | 36,0 | \pm | 0,1 | fgh |
| Palmeña marrona | 36,0 | \pm | 0,1 | fgh |
| Judía marrón pequeña | 36,0 | \pm | 0,1 | fgh |
| Judía Blanca redonda | 35,9 | \pm | 0,1 | fgh |
| Bajoca de la manteca | 35,8 | \pm | 0,1 | ghi |
| Riñón IGP | 35,7 | \pm | 0,1 | hi |
| Judía roja | 35,7 | \pm | 0,1 | hi |
| Judía marrón | 35,6 | \pm | 0,1 | hi |
| Amarilla | 35,6 | \pm | 0,1 | hi |
| Canela | 35,4 | \pm | 0,1 | hij |
| Palmeña manto marrón | 35,2 | \pm | 0,1 | ijk |
| Manto amarillo | 35,1 | \pm | 0,1 | ijk |
| Pinta IGP | 35,1 | \pm | 0,1 | ijk |
| Canela IGP | 34,8 | \pm | 0,1 | jk |
| Plancheta | 34,6 | \pm | 0,1 | k |

Letras diferentes para cada periodo de desarrollo en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Judía de Manto marrón, fue la variedad que mostró un mayor periodo de desarrollo, los insectos necesitaron una media de 39,7 días para emerger del interior de las alubias de esta variedad. Días de desarrollo que no fueron significativamente mayores que los días de desarrollo que necesitaron los insectos en las variedades Alubia gorda, Habichuela y Judía bocheta (con una media de 39,2; 39,2 y 39,1 días de desarrollo respectivamente). En el extremo opuesto, tenemos que la variedad Plancheta fue la variedad en la que los insectos necesitaron un menor periodo de desarrollo, con una media de 34,6 días, no siendo significativamente menor de las otras variedades (Canela IGP 34,8 días; Pinta IGP 35,06 días; Manto amarillo 35,1 días y Palmeña manto marrón 35,2 días) que mostraron también un menor tiempo de desarrollo para este insecto (Tabla 7).

Damiani *et al.* (2014), al evaluar 22 variedades de alubia, observó que los días de desarrollo fueron 36,4 días en la variedad BAF 57, aumentándose hasta los 39,7 días para las variedades BAF 3 y BAF108.

El aumento de este período (desde huevo hasta adulto), también fueron observados en las variedades: Manto marrón (39,7 días), Alubia gorda (39,2 días), Habichuela (39,2 días) Bocheta (39,0 días) y Canaria (38,6 días). Según Baldin y Pereira (2010), esto puede indicar una no preferencia para alimentación o antibiosis en cada variedad.

Barbosa *et al.* (1999) comprobó que los insectos alimentados con semillas que contenía la proteína arcelina (Arc), presentaron un periodo de desarrollo mayor que las variedades que no poseían dicha proteína. Los insectos criados en las semillas con Arc1, Arc3, Arc4 y Arc2 presentaron un periodo de 43,7; 37,5; 36,6 y 36,5 días respectivamente. Las variedades que no poseían la proteína como Porrillo 70 y Goiano precoce, presentaron 32,4 y 31,1 días de desarrollo para el gorgojo *Z. subfasciatus*.

Baldin y Lara (2008) observaron que los genotipos Arc1S, Arc5S y Arc2 presentaron resistencia del tipo antibiosis a *A. obtectus*. Y Baldin y Pereira (2010) observaron que el genotipo Arc3S no afectó al desarrollo de *A. obtectus*.

Vega Graziano y Cruz-Izquierdo (2016), al estudiar los parámetros poblacionales de cinco cultivos de judía, afirmaron que en condiciones de almacenamiento *A. obtectus* puede atacar con menor o mayor intensidad cualquiera de los materiales evaluados.

Tabla 8: Comparación de medias en el porcentaje de pérdida de peso (Media \pm Error) en las distintas variedades de alubias tras ser atacadas por *A. obtectus*

| Variedades | % pérdida de peso | |
|--------------------------|-------------------|------|
| Haba del Bierzo | 19,5 \pm 2,4 | a |
| Judía blanca | 18,8 \pm 2,3 | ab |
| Judía blanca pinta negra | 15,6 \pm 2,0 | abc |
| Canela | 14,5 \pm 1,4 | abcd |
| Judía del tío Anselmo | 14,4 \pm 2,9 | abcd |
| Judía bocheta | 14,2 \pm 0,3 | bcd |
| Habichuela | 13,8 \pm 1,7 | bcd |
| Judía de Ibeas | 12,9 \pm 2,8 | cde |
| De arroz | 12,8 \pm 1,0 | cde |
| Riñón | 11,7 \pm 1,5 | cde |
| Canaria | 11,7 \pm 3,3 | cde |
| Plancheta | 11,3 \pm 1,6 | cde |
| Judía de manto marrón | 9,9 \pm 1,8 | def |
| Amarilla | 7,7 \pm 1,7 | efg |
| Judía roja | 7,7 \pm 2,5 | efg |
| Pinta IGP | 7,6 \pm 1,5 | efg |
| Judía oro | 5,5 \pm 1,7 | fgh |
| Bajoca de la manteca | 5,5 \pm 1,0 | fgh |
| Canela IGP | 5,4 \pm 1,5 | fgh |
| Palmeña marrona | 5,2 \pm 0,8 | fgh |
| Alubia gorda | 5,0 \pm 1,3 | fgh |
| Manto amarillo | 4,2 \pm 1,0 | gh |
| Verdina | 4,2 \pm 1,5 | gh |
| Pinta Pil 2-1 | 3,5 \pm 1,0 | gh |
| Palmeña manto marrón | 3,5 \pm 0,8 | gh |
| Riñón IGP | 3,3 \pm 1,0 | gh |
| Judía marrón | 3,0 \pm 0,5 | gh |
| Judía marrón pequeña | 1,7 \pm 0,9 | h |
| Colorada sin palo | 1,2 \pm 0,4 | h |
| Judía Blanca redonda | 1,1 \pm 0,2 | h |
| Mocha colorada | 0,8 \pm 0,2 | h |
| Judía Negra | 0,7 \pm 0,1 | h |

Letras diferentes para cada porcentaje de peso perdido en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Haba del Bierzo fue la variedad que mostró un mayor porcentaje de pérdida de peso, una media de 19,4% tras ser atacadas por *A. obtectus* y desarrollarse en el interior de las alubias de esta variedad. Porcentaje de peso perdido que no fue significativamente mayor que el porcentaje de peso perdido en las variedades Judía del Bierzo, Judía Blanca

Pinta Negra, Canela y Judía del Tío Anselmo (con un porcentaje medio de peso perdido de 18,8; 15,6; 14,5 y 14,3 respectivamente). En el extremo opuesto, tenemos que las variedades Judía marrón pequeña (1,7%), Colorada sin palo (1,2%), Judía Blanca redonda (1,0%), Mocha colorada (0,8%) y Judía Negra (0,7%) tuvieron un porcentaje menor de peso perdido por alubia, significativamente menor que las alubias que presentaron un mayor porcentaje de peso perdido por alubia (Tabla 8).



Figura 60: Peso de las alubias y peso de los restos de las mismas.

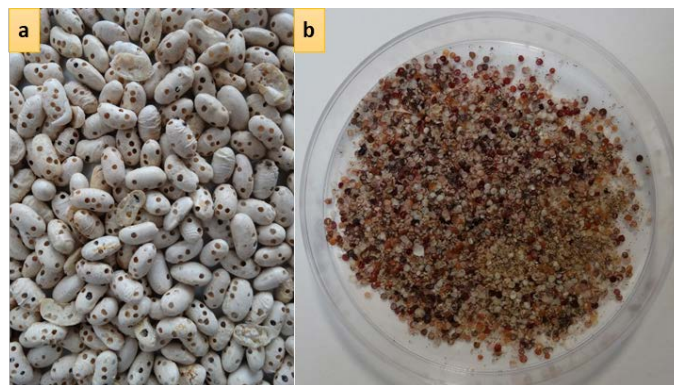


Figura 61: a) Alubias afectadas por *A. obtectus*; b) Restos de excrementos y alubia tras estar infectadas por *A. obtectus*.

Tabla 9: Comparación de medias de huevos puestos (Media \pm Error) por hembras de *A. obtectus* en diferentes variedades de alubias evaluadas.

| Variedades | Huevos puestos por hembra | | |
|--------------------------|----------------------------------|------------|----------|
| Judía bocheta | 153,5 | \pm 7,6 | a |
| Habichuela | 146,5 | \pm 12,7 | ab |
| Judía Blanca redonda | 144,5 | \pm 16,2 | abc |
| Canaria | 140,7 | \pm 26,8 | abc |
| De arroz | 132,7 | \pm 13,6 | abcd |
| Judía blanca | 131,7 | \pm 9,3 | abcd |
| Judía de Ibeas | 122,2 | \pm 22,5 | abcde |
| Judía de manto marrón | 106,0 | \pm 27,1 | abcdef |
| Canela | 99,5 | \pm 9,3 | abcdefg |
| Judía roja | 97,2 | \pm 31,6 | abcdefgh |
| Haba del Bierzo | 94,2 | \pm 17,3 | bcdefgh |
| Judía oro | 93,2 | \pm 29,3 | bcdefgh |
| Palmeña marrona | 91,0 | \pm 20,2 | bcdefgh |
| Judía del tío Anselmo | 90,7 | \pm 8,8 | bcdefgh |
| Plancheta | 89,2 | \pm 18,9 | bcdefghi |
| Riñón | 88,5 | \pm 15,9 | bcdefghi |
| Pinta Pil 2-1 | 87,5 | \pm 40,9 | bcdefghi |
| Bajoca de la manteca | 85,5 | \pm 25,2 | cdefghij |
| Verdina | 72,5 | \pm 16,0 | defghij |
| Pinta IGP | 65,0 | \pm 7,8 | efghij |
| Palmeña manto marrón | 64,7 | \pm 11,8 | efghij |
| Judía marrón | 62,2 | \pm 9,9 | efghij |
| Canela IGP | 55,2 | \pm 8,6 | fghij |
| Riñón IGP | 48,0 | \pm 16,1 | fghij |
| Manto amarillo | 47,7 | \pm 6,5 | fghij |
| Alubia gorda | 44,5 | \pm 6,8 | ghij |
| Amarilla | 43,0 | \pm 16,0 | ghij |
| Colorada sin palo | 36,5 | \pm 10,5 | hij |
| Judía marrón pequeña | 36,2 | \pm 8,2 | hij |
| Mocha colorada | 30,0 | \pm 8,0 | ij |
| Judía Negra | 29,7 | \pm 9,0 | ij |
| Judía blanca pinta negra | 26,7 | \pm 5,1 | j |

Letras diferentes para cada número de huevos puestos por hembra en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Judía bocheta, fue la variedad que mostró un mayor número de huevos puestos por hembra, una media de 153,50 huevos que no fueron significativamente mayores del

número de huevos puestos por hembras en las variedades Habichuela, Judía Blanca Redonda, Canaria, De arroz, Judía Blanca, Judía de Ibeas, Judía de Manto marrón, Canela y Judía Roja (con una media de 146,5; 144,5; 140,7; 132,7; 131,7; 122,2; 106,0; 99,5 y 97,2 huevos respectivamente). En el extremo opuesto, tenemos que la variedad Judía Blanca Pinta Negra fue la variedad en la que las hembras de *A. obtectus* realizaron una menor cantidad de puestas, con una media de 26,7 huevos, significativamente menor que las variedades descritas anteriormente, y que tuvieron un mayor número de huevos puestos por hembra (Tabla 9).



Figura 62: a y b) Huevos puestos por las hembras de *A. obtectus* sobre las semillas de alubia, c) Detalle de una larva de *A. obtectus* entrando en la semilla de alubia.

Tabla 10: Comparación de medias en el porcentaje de alubias dañadas (Media \pm Error) en las distintas variedades de alubias tras ser atacadas por *A. obtectus*.

| Variedades | % Alubias dañadas | |
|--------------------------|-------------------|------|
| Canela | 94,7 \pm 3,4 | a |
| Judía oro | 87,2 \pm 3,9 | ab |
| Pinta IGP | 84,7 \pm 6,8 | abc |
| Judía marrón | 84,2 \pm 4,2 | abcd |
| Judía bocheta | 83,1 \pm 6,9 | abcd |
| Judía roja | 83,0 \pm 2,2 | abcd |
| Palmeña marrona | 82,7 \pm 5,1 | abcd |
| Bajoca de la manteca | 82,5 \pm 4,0 | abcd |
| Haba del Bierzo | 82,2 \pm 4,8 | abcd |
| Plancheta | 81,5 \pm 0,9 | abcd |
| Judía blanca pinta negra | 81,0 \pm 5,0 | abcd |
| Canela IGP | 81,0 \pm 6,5 | abcd |
| Alubia gorda | 80,7 \pm 4,8 | abcd |
| Judía de manto marrón | 78,0 \pm 7,2 | abcd |
| Judía Blanca redonda | 76,9 \pm 4,0 | abcd |
| Judía del tío Anselmo | 74,9 \pm 7,9 | abcd |
| Palmeña manto marrón | 71,2 \pm 1,6 | bcd |
| Amarilla | 71,0 \pm 9,5 | bcd |
| Pinta Pil 2-1 | 71,0 \pm 7,6 | bcd |
| De arroz | 70,7 \pm 2,0 | bcd |
| Riñón | 68,3 \pm 7,2 | bcd |
| Mocha colorada | 67,7 \pm 3,5 | bcde |
| Manto amarillo | 67,2 \pm 6,1 | bcde |
| Judía de Ibeas | 66,2 \pm 8,2 | bcde |
| Habichuela | 63,8 \pm 1,7 | cdef |
| Judía blanca | 63,7 \pm 5,9 | cdef |
| Verdina | 61,5 \pm 2,7 | def |
| Colorada sin palo | 61,2 \pm 10,1 | def |
| Canaria | 46,5 \pm 7,7 | efg |
| Judía marrón pequeña | 44,7 \pm 5,5 | fg |
| Judía Negra | 40,5 \pm 14,5 | g |
| Riñón IGP | 40,2 \pm 13,4 | g |

Letras diferentes para cada porcentaje de alubias dañadas en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Canela, fue la variedad que mostró un mayor porcentaje de alubias dañadas, una media de 94,7% de alubias que presentaron sintomatología de haber sido atacadas por *A. obtectus*. Porcentaje de alubias dañadas que no fueron significativamente mayores que el porcentaje de alubias dañadas en las alubias de la variedad Judía oro (87,2%) Pinta IGP (84,7%), Judía marrón (84,2%), Judía bocheta (83,1%), Judía roja (83,0%), Palmeña marrona (82,7%), Bajoca de la manteca (82,5%), Haba del Bierzo (82,2%), Plancheta (81,5%), Judía blanca pinta negra (81,0%), Canela IGP (81,0%), Alubia gorda (80,7%), Judía de manto marrón (78,0%), Judía Blanca redonda (76,9%) y Judía del tío Anselmo (74,9%). En el extremo opuesto, tenemos que la variedad Riñón IGP fue la variedad que presentó un menor porcentaje de alubias dañadas, con una media de 40,2% de alubias dañadas, no siendo significativamente menor de las variedades Judía Negra (40,5%), Judía Marrón Pequeña (44,7%) y Canaria (46,5%), que mostraron también un menor porcentaje de alubias dañadas por este insecto (Tabla 10).

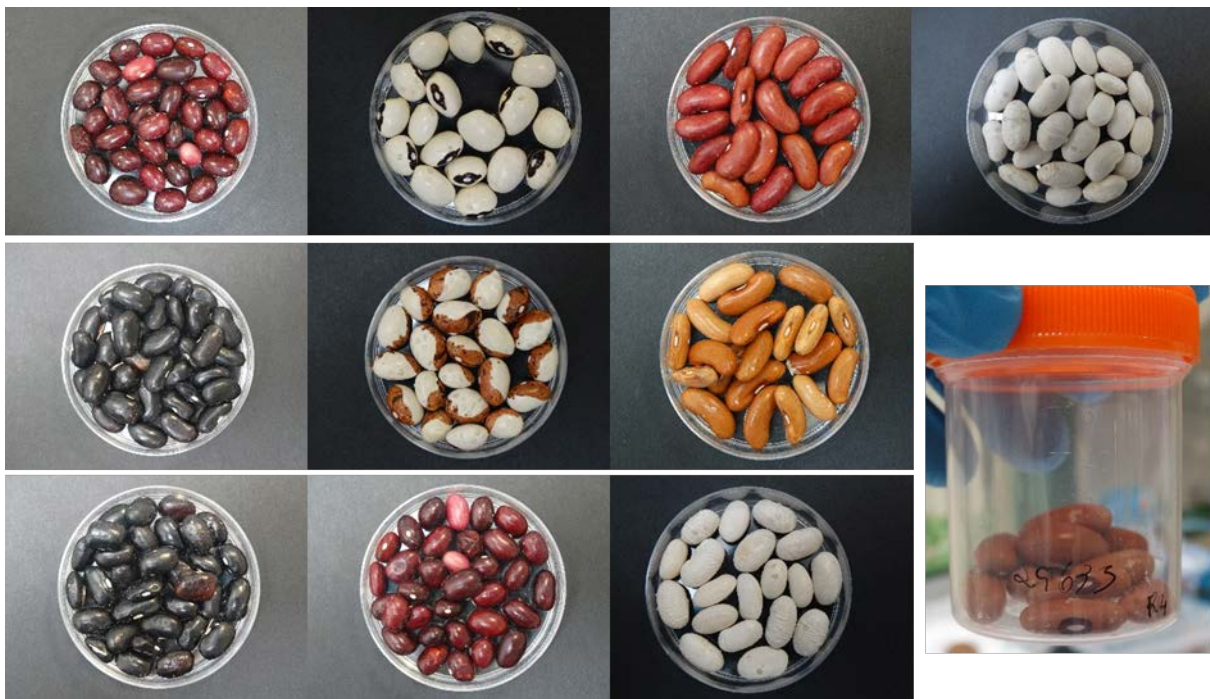


Figura 63: Algunas variedades de alubia dañadas por *A. obtectus*.

Tabla 11: Comparación de medias en el peso de los insectos emergidos (Media \pm Error) en diferentes variedades de alubia evaluadas.

| Variedades | Peso insectos emergidos (g) | |
|--------------------------|------------------------------------|--------|
| Plancheta | 0,57 \pm 0,07 | a |
| Judía bocheta | 0,55 \pm 0,06 | a |
| Judía Blanca redonda | 0,53 \pm 0,07 | ab |
| Bajoca de la manteca | 0,53 \pm 0,06 | ab |
| Judía roja | 0,52 \pm 0,16 | ab |
| Palmeña marrona | 0,52 \pm 0,08 | ab |
| Judía oro | 0,52 \pm 0,06 | ab |
| Pinta IGP | 0,50 \pm 0,06 | abc |
| De arroz | 0,47 \pm 0,04 | abcd |
| Judía de Ibeas | 0,46 \pm 0,08 | abcd |
| Habichuela | 0,45 \pm 0,05 | abcd |
| Judía blanca pinta negra | 0,44 \pm 0,01 | abcd |
| Canela | 0,43 \pm 0,05 | abcde |
| Amarilla | 0,43 \pm 0,13 | abcde |
| Verdina | 0,43 \pm 0,05 | abcde |
| Haba del Bierzo | 0,42 \pm 0,03 | abcde |
| Canaria | 0,42 \pm 0,11 | abcde |
| Palmeña manto marrón | 0,41 \pm 0,06 | abcde |
| Canela IGP | 0,41 \pm 0,06 | abcde |
| Judía del tío Anselmo | 0,38 \pm 0,07 | abcdef |
| Manto amarillo | 0,37 \pm 0,05 | abcdef |
| Judía de manto marrón | 0,36 \pm 0,07 | abcdef |
| Pinta Pil 2-1 | 0,34 \pm 0,08 | abcdef |
| Judía marrón | 0,34 \pm 0,03 | abcdef |
| Riñón | 0,33 \pm 0,04 | abcdef |
| Alubia gorda | 0,29 \pm 0,04 | bcdef |
| Judía marrón pequeña | 0,27 \pm 0,06 | cdef |
| Judía blanca | 0,27 \pm 0,04 | cdef |
| Riñón IGP | 0,24 \pm 0,09 | def |
| Mocha colorada | 0,23 \pm 0,04 | def |
| Colorada sin palo | 0,19 \pm 0,06 | ef |
| Judía Negra | 0,16 \pm 0,06 | f |

Letras diferentes para cada peso de insectos emergidos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

Las variedades Plancheta y Judía Bocheta fueron las variedades que mostraron un mayor peso de los insectos emergidos por variedad, con una media de 0,57g y 0,55g por insecto respectivamente, significativamente mayores de los pesos de insectos emergidos en las variedades Alubia gorda (0,29g), Judía marrón pequeña (0,27g), Judía blanca (0,27g), Riñón IGP (0,24g), Mocha colorada (0,23g), Colorada sin palo (0,19g) y Judía Negra (0,16g), que fue la variedad que mostró un menor peso de los adultos emergidos en esta variedad (Tabla 11).

Los insectos emergidos de la variedad Plancheta (0,57g) y Judía Bocheta (0,55g) presentaran los mayores pesos de insectos. Las variedades Judía Negra y Colorada (sin palo), presentaron menor peso que las demás variedades, esto puede significar una resistencia en estas variedades al ataque del *A. obtectus*. La reducción en el peso de los insectos emergidos también ha sido descrita por Mazzoneto y Vendramim (2002), con variedades portadoras de genotipos (Arcelina), frente al gorgojo *Z. subfasciatus*.



Figura 64: Detalle de las distintas variedades de alubia, así como algunos adultos de *A. obtectus* emergidos recientemente.

Tabla 12: Comparación de medias en el número de insectos emergidos (Media \pm Error) en diferentes variedades de alubia evaluadas.

| Variedades | Número de insectos emergidos | |
|--------------------------|------------------------------|---------|
| Judía bocheta | 124,0 \pm 10,8 | a |
| Plancheta | 109,2 \pm 14,1 | ab |
| Judía blanca | 106,2 \pm 14,2 | ab |
| Habichuela | 103,7 \pm 12,9 | ab |
| De arroz | 103,2 \pm 8,6 | ab |
| Judía oro | 99,5 \pm 11,2 | abc |
| Haba del Bierzo | 99,5 \pm 6,9 | abc |
| Judía de Ibeas | 99,2 \pm 16,6 | abc |
| Palmeña marrona | 99,0 \pm 12,5 | abc |
| Bajoca de la manteca | 98,0 \pm 11,3 | abc |
| Judía roja | 96,5 \pm 30,5 | abc |
| Pinta IGP | 95,0 \pm 9,4 | abcd |
| Judía blanca pinta negra | 94,5 \pm 5,3 | abcd |
| Canela | 91,2 \pm 10,2 | abcde |
| Canaria | 85,7 \pm 22,6 | abcdef |
| Amarilla | 84,7 \pm 24,0 | abcdef |
| Verdina | 80,5 \pm 10,0 | abcdefg |
| Judía del tío Anselmo | 79,0 \pm 16,7 | abcdefg |
| Canela IGP | 78,5 \pm 12,6 | abcdefg |
| Palmeña manto marrón | 76,7 \pm 8,4 | bcdefg |
| Judía de manto marrón | 75,7 \pm 14,4 | bcdefg |
| Riñón | 72,2 \pm 10,1 | bcdefgh |
| Manto amarillo | 71,5 \pm 7,9 | bcdefgh |
| Alubia gorda | 70,7 \pm 8,4 | bcdefgh |
| Pinta Pil 2-1 | 65,2 \pm 13,6 | bcdefgh |
| Judía marrón | 64,7 \pm 5,7 | bcdefgh |
| Judía marrón pequeña | 55,2 \pm 13,3 | cdefgh |
| Riñón IGP | 49,5 \pm 16,7 | defgh |
| Judía Blanca redonda | 47,0 \pm 7,9 | efgh |
| Mocha colorada | 40,0 \pm 7,6 | fgh |
| Colorada sin palo | 36,7 \pm 10,6 | gh |
| Judía Negra | 30,2 \pm 11,3 | h |

Letras diferentes para cada número de insectos emergidos en cada variedad indican diferencias significativas entre las diferentes variedades evaluadas ($P \leq 0,05$, test DMS).

La variedad Judía Bocheta fue la variedad que mostró un mayor número de insectos emergidos por variedad, con una media de 124,0 insectos emergidos, significativamente mayor de las variedades que mostraron un menor número de insectos emergidos en las

variedades Palmeña manto marrón (76,7), Judía de manto marrón (75,7), Riñón (72,2), Manto amarillo (71,5), Alubia gorda (70,7), Pinta Pil 2-1 (65,2), Judía marrón (64,7), Judía marrón pequeña (55,2), Riñón IGP (49,5), Judía Blanca redonda (47,0), Mocha colorada (40,0), Colorada sin palo (36,7) y Judía Negra (30,2), que fue la variedad que mostró un menor número de insectos emergidos en esta variedad (Tabla 12).

Kornegay y Cardona (1991) han evaluado varios genotipos en relación a la resistencia que presentan distintas variedades de alubias frente a *Diabrotica speciosa* y *Empoasca kraemeri*, pero los niveles encontrados en relación a la resistencia de estas variedades frente a estos insectos ha sido de moderados y bajos.



Figura 65: Adultos de *A. obtectus* emergidos de la semillas de alubia según su variedad.

5. POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *A. obtectus*

5.1. Uso de alubias pildoradas con *Trichoderma* spp. para el control de larvas de *A. obtectus*

En las siguientes figuras se muestra la comparación de medias entre aislados de *Trichoderma* spp. en función de la mortalidad provocada sobre *A. obtectus*.

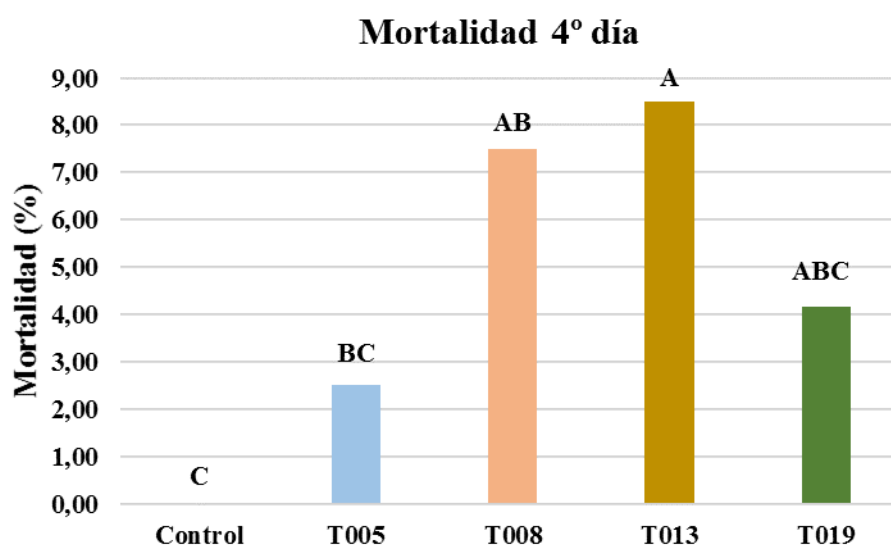


Figura 66: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de *A. obtectus* tras una exposición de 4 días a alubias pildoradas con diferentes aislados de *Trichoderma* spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).

Después de 4 días de exposición de larvas de *A. obtectus* a alubias pildoradas con diferentes aislados de *Trichoderma* spp., el aislado T-013 obtuvo una mayor mortalidad larvaria, consiguiendo matar el 8,5% de la población evaluada, significativamente mayor de las larvas muertas en los tratamientos con el aislado T-005 (2,5%) y el tratamiento control (0,0%) (Figura 67).

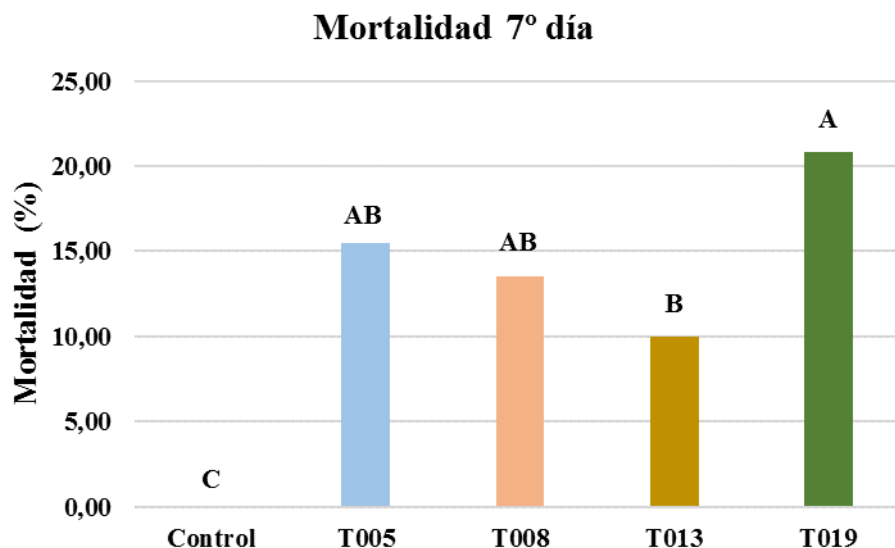


Figura 67: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de *A. obtectus* tras una exposición de 7 días a alubias pildoradas con diferentes aislados de *Trichoderma* spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).

Tras 7 días de exposición de larvas de *A. obtectus* a alubias pildoradas con diferentes aislados de *Trichoderma* spp., el aislado T-019 obtuvo un mayor control sobre las larvas de *A. obtectus*, consiguiendo matar el 20,8% de la población evaluada, significativamente mayor de las larvas muertas en los tratamientos con el aislado T-013 (10,0%) y el tratamiento control (0,0%) (Figura 68).

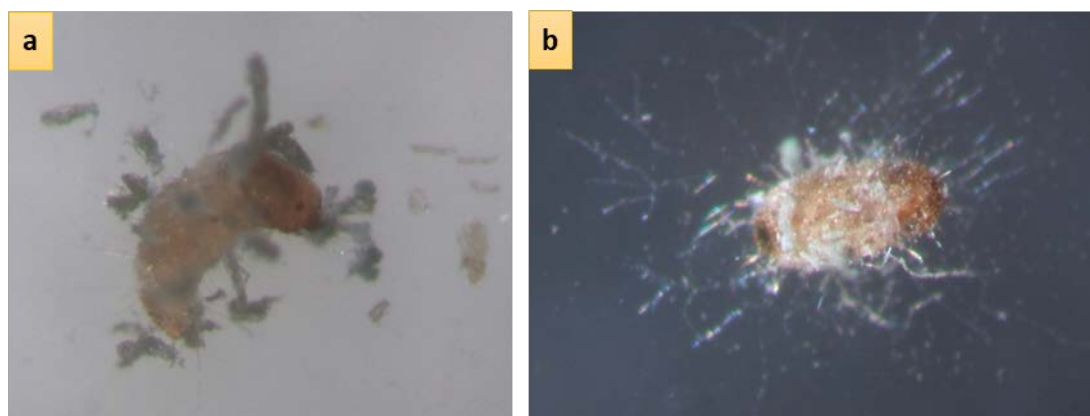


Figura 68: Larvas de *A. obtectus* muertas y sobre las cuales se desarrollan aislamientos de *Trichoderma* spp.

En la mortalidad acumulada de larvas de *A. obtectus* tras haber estado en contacto con alubias pildoradas con diferentes aislados de *Trichoderma* spp., se observa que el aislado T-013 es el tratamiento que obtuvo un mayor control sobre las larvas de *A. obtectus*, siendo capaz de matar el 80,0% de la población evaluada, significativamente mayor de la mortalidad acumulada en el tratamiento T-008 (65,0%), T-005 (63,0%), control (52,5%) y T-019 (50,0%) (Figura 70).

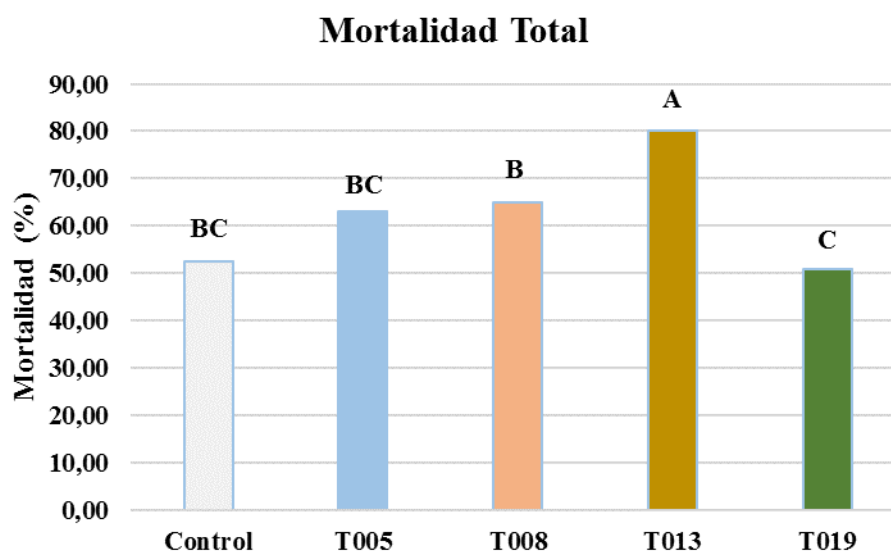


Figura 69: Comparación de medias para la mortalidad acumulada de larvas de *A. obtectus* tras la exposición a alubias pildoradas con distintos aislados de *Trichoderma* spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).

En cuanto al efecto indirecto de los distintos aislados de *Trichoderma* spp. sobre las larvas de *A. obtectus* (larvas que aun estando en contacto con los aislados que recubrían las alubias, consiguieron penetrar en ellas), podemos decir que el aislado T-008 es el tratamiento que obtuvo una mayor control sobre las larvas, siendo capaz de matar en el interior de la alubia el 13,1% de la población evaluada, significativamente mayor de la mortalidades acumuladas en los tratamiento T-013 (2,6%) y el control (0,0%) (Figura 71).

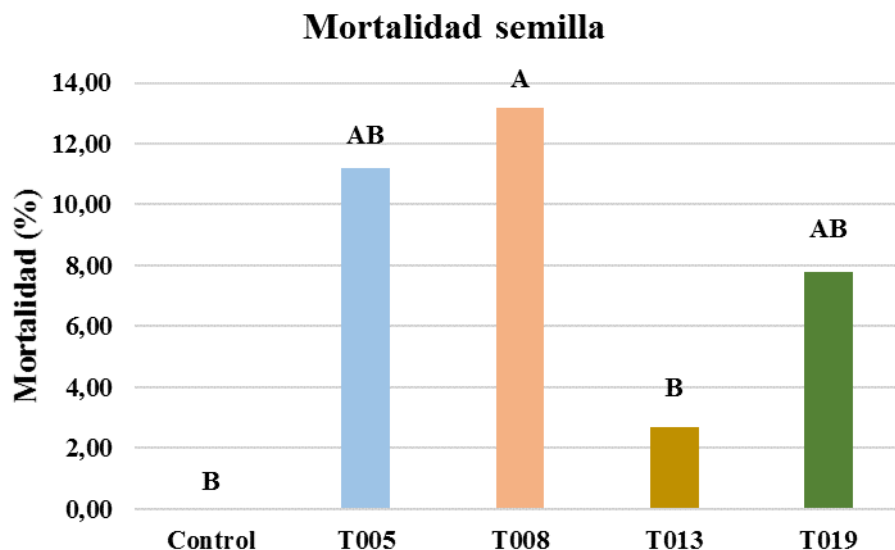


Figura 70: Comparación de medias para la mortalidad de larvas de *A. obtectus* en el interior de alubias que previamente habían sido pildoradas con distintos aislados de *Trichoderma* spp. Letras diferentes para cada aislado fúngico indican diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$, test DMS).

La aplicación de esporas de *Trichoderma* en las alubias consiguió un buen control sobre las larvas de *A. obtectus* que se adherieron a ellas, tras 4 y 7 días de exposición (con mortalidades larvarias del 8,5% y 20,8%, respectivamente), y alcanzando una mortalidad acumulada del 80,0% con el aislado fúngico T-013. O bien, a través del efecto indirecto ocasionado por los aislados fúngicos cuando las larvas entraron en la semilla, con un 13,1% de las larvas muertas. Se han descrito otros ensayos en los que los distintos estadios de insectos se ven afectados en su desarrollo y comportamiento cuando se tratan las semillas de sus huéspedes con hongos.

Por ejemplo, Akello y Sikora (2012) demostraron que la inoculación de aislamientos de hongos (uno de ellos, *T. asperellum*, cepa M2RT4) en semillas de alubia, redujo el crecimiento poblacional de *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) 33 veces en comparación con el crecimiento poblacional observado en plantas no tratadas. Menjivar (2010), redujo la población de mosca blanca en tomates inoculando de *T. atroviride*, MT-20 y S-2 cepas.

Hasta la fecha, el tratamiento de las semillas de alubias con diferentes especies de *Trichoderma* se ha centrado en combatir hongos fitopatógenos en el momento de sembrar las semillas. Esta técnica es rápida, fácil de implementar y ahorra tiempo y recursos (Martínez, Infante, y Reyes 2013). Como demuestran los ensayos descritos por Villegas

Arenas (2005), que inocularon *T. harzianum* a semillas de alubia para disminuir en el suelo el ataque a la raíz de *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium* spp. y *Pythium* spp. O más recientemente, Mayo *et al.* (2015, 2016) que han descrito el control de *R. solani* en suelo con tratamiento previo de diferentes semillas de alubia recubiertas con distintos aislados de *Trichoderma*.

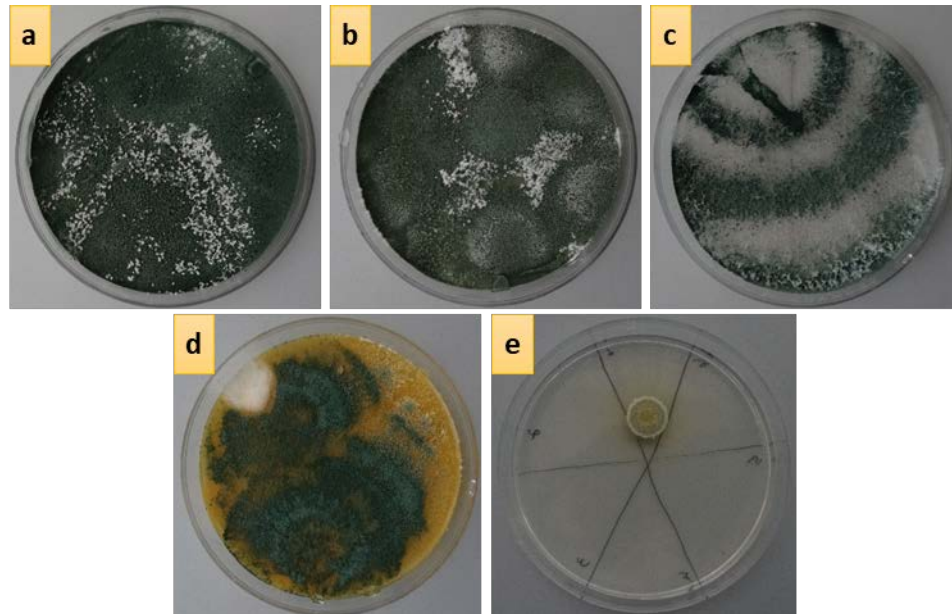


Figura 71: Comprobación de la presencia de *Trichoderma* spp. en las larvas de *A. obtectus* muertas sembradas en medio PDA. a) T-005; b) T-008; c) T-013; d) T-019; e) Control.

5.2. Comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para la inhibición de huevos de *A. obtectus*.

En la siguiente figura se muestra la comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para la inhibición de huevos de *A. obtectus*.

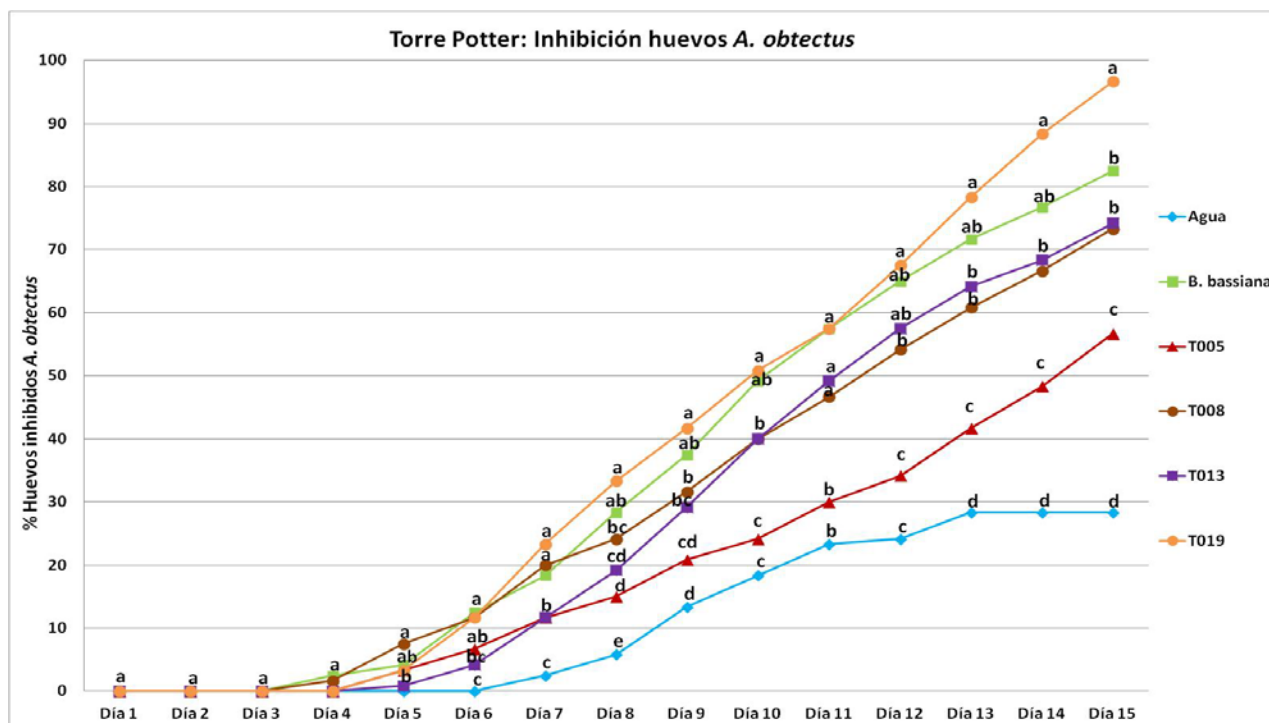


Figura 72: Comparación de medias para el porcentaje de huevos de *A. obtectus* inhibidos 15 días después de la aplicación de distintos aislados fúngicos. Letras diferentes en los índices muestran diferencias significativas entre los distintos aislados fúngicos para un mismo día de conteo ($P \leq 0,05$, test DMS).

El aislado fúngico T-019 obtuvo la mejor inhibición en huevos de *A. obtectus*, inhibiendo un 96,6% de los huevos evaluados, significativamente mayor que el resto de aislados fúngicos en el día 15 de evaluación. El aislado fúngico T-019 mostró el mejor control ovicida sobre los huevos de este insecto desde el séptimo día de evaluación. Los resultados obtenidos para T-019 (*T. harzianum*), con un 96,67% de huevos inhibidos (Figura 73), se aproximan a los resultados obtenidos por Alahmadi *et al.* (2012), quienes mostraron que el compuesto comercial (Trichodex[®], realizado a base de *T. harzianum*) resultó efectivo para el control biológico del estadio larval de *Lucanus cervus* (Coleoptera: Lucanidae) a los 3 días desde su aplicación, mostrando una mortalidad del 83,1% a los 19 días de su aplicación.

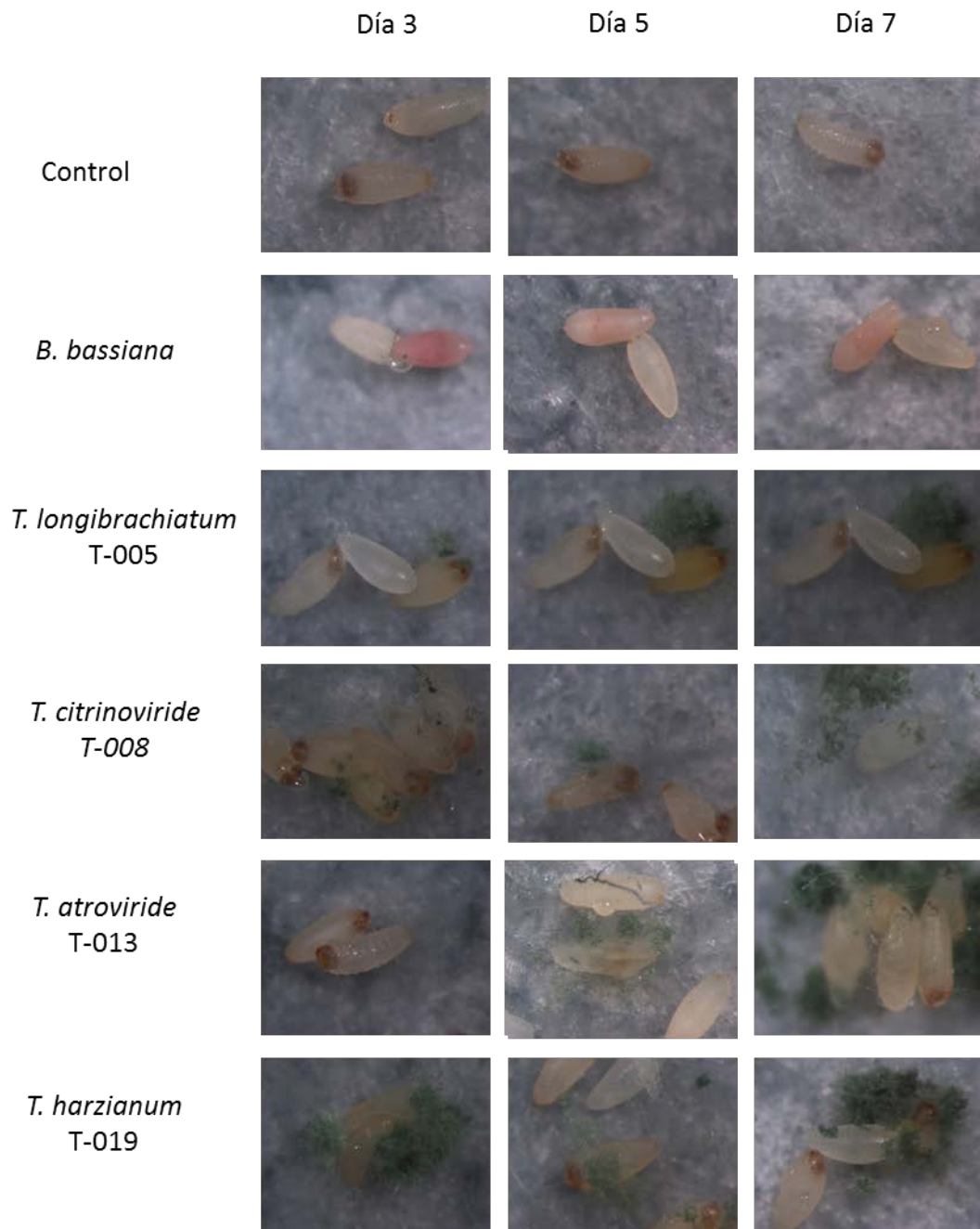


Figura 73: Efecto de las esporas de *Trichoderma* spp. sobre huevos de *A. obtectus* a los 3, 5 y 7 días.

5.3. Comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para el control de adultos de *A. obtectus*.

En la siguiente figura se muestra la comparación de medias del efecto de aislados de *Trichoderma* spp. y *B. bassiana* mediante torre Potter para el control de adultos de *A. obtectus*.

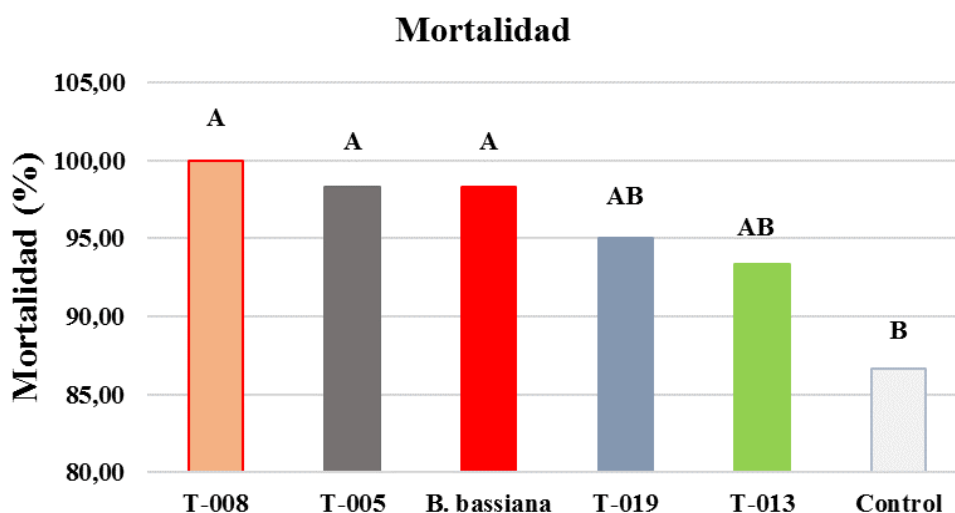


Figura 74: Comparación de medias para el porcentaje de adultos de *A. obtectus* muertos días después de la aplicación de distintos aislados fúngicos. Letras diferentes en los índices muestran diferencias significativas entre los distintos aislados fúngicos ($P \leq 0,05$, test DMS).

En cuanto a la mortalidad provocada por los distintos aislados fúngicos de *Trichoderma* spp. sobre adultos de *A. obtectus*, podemos decir que el aislado T-008 fue el tratamiento que obtuvo un control total de los adultos evaluados (100,0% adultos muertos), no siendo significativamente mayor que la mortalidad obtenida por los aislados T-005 (98,3%), *B. bassiana* (98,3%), T-019 (95,0%) y T-013 (93,3%) (Figura 75).

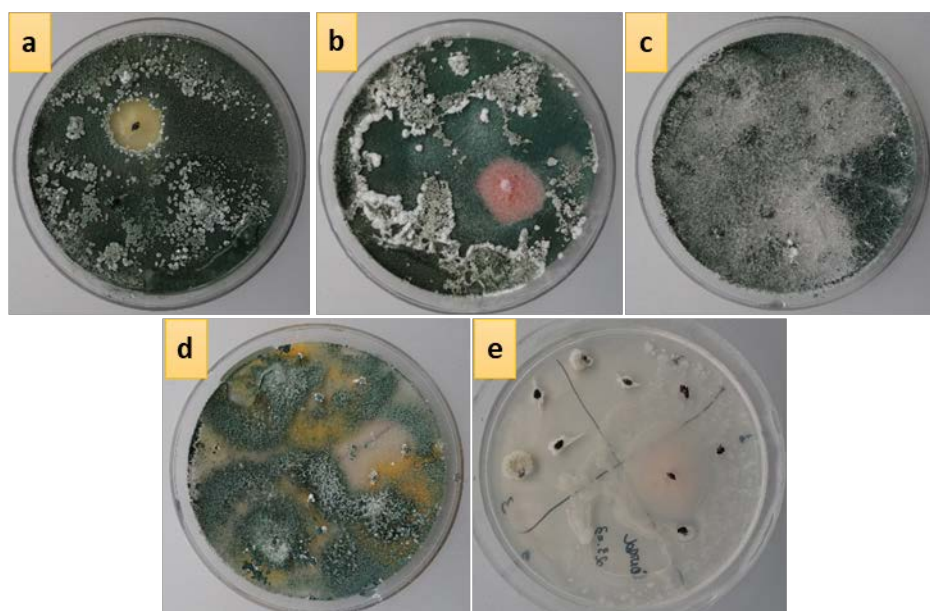
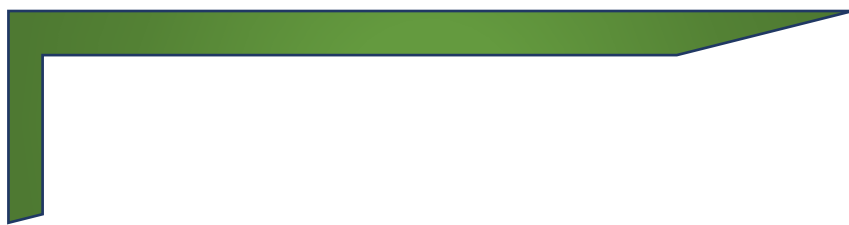


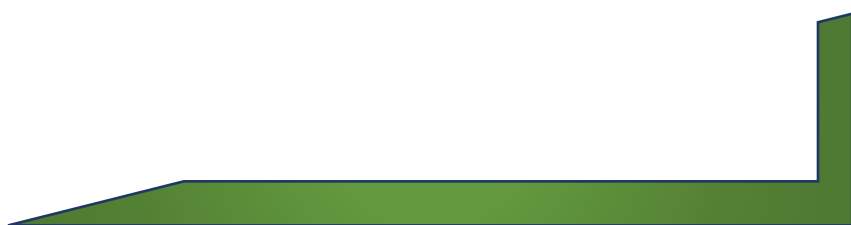
Figura 75: Comprobación de la presencia de *Trichoderma* spp. en los adultos de *A. obtectus* muertos sembrados en medio PDA. a) T-005; b) T-008; c) T-013; d) T-019; e) Control.

B. bassiana también mostró un buen control sobre los huevos de *A. obtectus* (82,5% de huevos inhibidos), difiriendo significativamente del resto de tratamientos, excepto con T013 y T008 (74,1 y 73,3% de huevos inhibidos, respectivamente), que fueron los aislados fúngicos con el tercer y cuarto mejor porcentaje de huevos inhibidos. El control con agua destilada y el tratamiento con el aislado fúngico T-005, alcanzaron solamente una inhibición del 28,3 y del 56,6% respectivamente, de los huevos en el día 15. Los datos obtenidos para *B. bassiana* fueron inferiores a los obtenidos para adultos de la especie *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), donde se observó una mortalidad del 87,7% a los 9 días desde la aplicación de los tratamientos (Cherry, Abalo, y Hell 2005), siendo la misma dosis aplicada. Una mortalidad inferior fue mostrada sobre adultos de *Xylosandrus crassiusculus* (Coleoptera: Curculionidae) con un 76,7% de adultos muertos al aplicar la máxima dosis comercial de *B. bassiana* (cepa GHA) 5 días después de la aplicación de los tratamientos (Castrillo, Griggs, y Vandenberg 2013).

Tanto T-013 (*T. atroviride*) como T-008 (*T. citrinoviride*) obtuvieron un buen porcentaje de huevos inhibidos, 74,1 y 73,3% respectivamente. Y T-008 obtuvo un control total (100,0%) sobre adultos de *A. obtectus*. Las larvas de *Delia radicum* (Diptera: Insecta) mostraron una mortalidad del 38,1% a los 14 días desde la aplicación de *T. atroviride* (Razinger *et al.* 2014), valores más bajos que los obtenidos en este estudio.



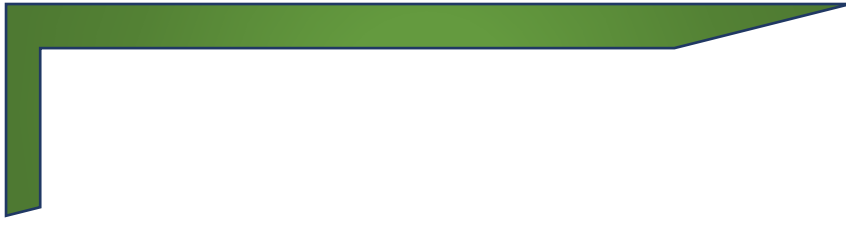
Conclusiones



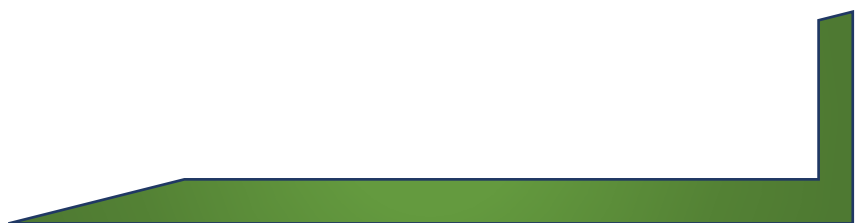
CONCLUSIONES

- Las observaciones y la concomitante descripción del conjunto de características del dimorfismo sexual del *A. obtectus*, así como las fotos de insectos, incluidas en la memoria de esta tesis doctoral, facilitan la identificación de machos y hembras de cara a establecer poblaciones de laboratorio que sirvan de base para realizar estudios y ensayos de control.
- El pigidio (V segmento abdominal) permite diferenciar adultos de *A. obtectus* machos de hembras. El tamaño, color y vello no son características definitivas en la diferenciación sexual de *A. obtectus*,
- El periodo de preoviposición de *A. obtectus* sobre alubia blanca, variedad local, Riñón Menudo es de 2,90 días, con un periodo de oviposición es de 5,26 días.
- La fecundidad de las hembras de *A. obtectus* sobre alubia blanca, variedad local, Riñón Menudo es de 31,70 huevos por hembra.
- El periodo de incubación de los huevos de *A. obtectus* sobre alubia blanca, variedad local, Riñón Menudo es de 6,07 días, periodo crítico para hacer el tratamiento antes de la emergencia de las larvas.
- El periodo de desarrollo larval hasta pupa de *A. obtectus* sobre alubia blanca de la variedad local Riñón menudo es de 26,28 días.
- La longevidad de los adultos sobre alubia blanca de la variedad local Riñón menudo es mayor en hembras (12,8 días) que en machos (8,18 días).
- Todos los aceites esenciales evaluados, causan mortalidad en los adultos de *A. obtectus*. Cuanto mayor el tiempo de exposición mayor es la mortalidad de las larvas y adultos.
- El aceite esencial de Canela permite controlar huevos, larvas y adultos de *A. obtectus*, con buenas tasas de mortalidad, incluso a dosis bajas, principalmente con actividad ovicida, donde inhibe el desarrollo larval.

- Las variedades locales blancas o de colores claros son más atractivas para el gorgojo que las variedades locales negras o de colores más oscuros.
- El hongo entomopatógeno *B. bassiana* muestra un buen control sobre huevos de *A. obtectus*, con inhibiciones superiores al 80,0%, y prácticamente total sobre adultos, con un 98,3% de adultos muertos.
- Las cepas del hongo *Trichoderma* spp. son aptas para el control del gorgojo, destacando *T. harzianum* (T-019) y *T. citrinoviride* (T-008) sobre *A. obtectus*.
- Los resultados obtenidos para *T. harzianum* coinciden con otros estudios similares, en cambio no hay estudios que apoyen los resultados obtenidos para *T. citrinoviride*, por lo que sería interesante seguir esta línea de investigación.



Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam, A.M.E. 2010. «Toxic and deterrent effects of two volatile oils against cowpea weevil, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae)». *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (16): 1596-1607.
- Abdul-Wahid, OA, y SM Elbanna. 2012. «Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta Americana*». *African Journal of Microbiology Research* 6 (5): 1024-32.
- Akello, J, y R Sikora. 2012. «Systemic acropetal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness». *Biological control* 61 (3): 215-21.
- Alahmadi, SS, SA Ouf, y RA Ibrahim. 2012. «Possible control of date palm stag beetle, *Lucanus cervus* (L.)(Coleoptera: Lucanidae), using gut protease inhibitors of different bio-control agents». *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 22 (2): 93.
- Aragón-Sánchez, M., L. R. Román-Fernández, H. Martínez-García, A. Aragón-García, V. S. Marco-Mancebón, y I. Pérez-Moreno. 2016. «Parámetros de la tabla de vida del depredador *Anthocoris nemoralis* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Anthocoridae) sobre huevos de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae).» *Entomología mexicana* 3: 221-26.
- Araujo, E.F., D.S. Martins, M.A.L. Ferreira, y R.F Silva. 1985. «Efeito de fumigantes e insecticida de contato na germinacao e vigor de sementes de feijao (*Phaseolus vulgaris* L.).» *Revista Ceres* 32 (180): 110-19.
- Artigas, Jorge N. 1994. *Entomología económica : insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos)*. Ediciones Universidad de Concepción.
- Balachowsky A. S. 1962. «Coléoptères». En *Entomologie appliquée à l'agriculture.*, editado por Balachowsky. A.S., 1038-39. Paris. doi:10.1126/science.145.3636.1038.

- Baldin, E. L. L., y F. M. Lara. 2008. «Resistance of stored bean varieties to *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae)». *Insect Science* 15 (4). Blackwell Publishing Ltd: 317-26. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00216.x.
- Baldin, Edson Luiz Lopes, y Jaqueline Magalhães Pereira. 2010. «Resistência de genótipos de feijoeiro a *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae)». *Ciência e Agrotecnologia* 34 (6). Editora UFLA: 1507-13. doi:10.1590/S1413-70542010000600022.
- Barbosa, FR, M Yokoyama, y PAA Pereira. 1999. «Efeito da proteína arcelina na biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833), em feijoeiro». *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34 (1): 1805-10.
- Barnett, Horace Leslie, y Barry B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4.aed. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Beck, Stanley D. 1965. «Resistance of plants to insects». *Annual Review of Entomology* 10 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 207-32. doi:10.1146/annurev.en.10.010165.001231.
- Bissett, John, Walter Gams, Walter Jaklitsch, y Gary J. Samuels. 2015. «Accepted *Trichoderma* names in the year 2015». *IMA Fungus* 6 (2): 263-95. doi:10.5598/imafungus.2015.06.02.02.
- Boff, M. I. C., D. V. Sartori, y A. Bogo. 2006. «Efeito de extratos de *Piper nigrum* L. sobre o caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* (Say)». *Revista Brasileira de Armazenamento* 31 (1): 17-22.
- Bousquet Y. 1990. «Beetles Associated with Stored Products in Canadá: An Identification Guide.» *Agriculture Canada Publication* 1837.
- Bughio, F.M., and R.M. Wilkins. 2004. «Influence of malathion resistance status on survival and growth of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), when fed on flour from insect-resistant and susceptible grain rice cultivars». *Journal of Stored Products Research* 40 (1): 65-75. doi:10.1016/S0022-474X(02)00077-2.
- Capdeville, C. 1945. *Plagas de la agricultura en Chile*. Imprenta Pacífico.

- Carvalho, RPLDE, y CJ Rossetto. 1968. «Biología de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann)(Coleoptera, Bruchidae)». *Revista Brasileira de Entomologia* 13 (1).
- Casquero, P A, M Lema, M Santalla, y A M De Ron. 2006. «Performance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from Spain in the Atlantic and Mediterranean environments». *Genetic Resources and Crop Evolution* 53 (5): 1021-32. doi:10.1007/s10722-004-7794-1.
- Castrillo, LA, MH Griggs, y JD Vandenberg. 2013. «Granulate ambrosia beetle, *Xylosandrus crassiusculus* (Coleoptera: Curculionidae), survival and brood production following exposure to entomopathogenic». *Biological Control* 67 (2): 220-26.
- Cherry, AJ, P Abalo, y K Hell. 2005. «A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) in s». *Journal of Stored Products Research* 41 (3): 295-309.
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. 2017. «Acompanhamento da safra brasileira: café». *Monitoramento agrícola- Safra 2017* 4 (1): 1-98. doi:ISSN 2318-6852.
- Cubero Salmerón, J. I., M. T. Moreno, y J. V. Giraldez. 1983. *Leguminosas de grano*. Madrid: Mundi-Prensa.
- D'Aubeterre, R., J. Principal, C. Barrios, y Z. Graterol. 2012. «Insectos plaga en vainas de *Acacia tortuosa* y *Prosopis juliflora* para consumo animal en las zonas semiáridas del estado Lara, Venezuela.» *Zootecnia tropical* 30 (2): 147-53.
- Daglish, Gregory J. 2006. «Opportunities and barriers to the adoption of potential new grain protectants and fumigants». *9th International Working Conference on Stored Product Protection*, 209-16.
- Damiani, CB, MIC Boff, y CR Franco. 2014. «Comportamento e aspectos biológicos de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) em cultivares crioulas de feijão, *Phaseolus vulgaris*». *Revista de la Facultad de Agronomía* 113 (1): 9-17.

- de la Cruz-Pérez, Aracely, Jesús Romero-Nápoles, José Luis Carrillo-Sánchez, Eustolia García-López, Rosaura Grether-González, Saúl Sánchez-Soto, y Manuel Pérez-De la Cruz. 2013. «Brúquidos (Coleoptera: Bruchidae) del estado de Tabasco, México». *Acta zoológica mexicana* 29 (1): 1-95.
- de Liñán Vicente, Carlos. 1998. *Entomología agroforestal*. Madrid: Ediciones Agrotécnicas.
- de Ron, A. M., P. A. Casquero, A. M. González, y M Santalla. 2004. «Environmental and genotypic effects on pod characteristics related to common bean quality». *Journal of agronomy and crop science* 190 (4): 248-55.
- Deboni, T. Cira. 2009. «Preparados homeopáticos e fitoterápicos no manejo de *Acanthoscelides obtectus* Say, 1831 (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado». Universidade do Estado de Santa Catarina.
- Dell'Orto, H., y C. J. Arias. 1985. «Insectos que dañan granos. Productos almacenados. Santiago de Chile». *FAO, serie: tecnologías poscosecha* 4: 46-49.
- Dequech, Sonia Thereza Bastos, Carla Daniele Sausen, Cintia Grendene Lima, y Rafael Egewarth. 2008. «Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratorio». *Biotemas* 21 (1). doi:10.5007/2175-7925.2008v21n1p41.
- Dos Santos, P. L., M. B. Prando, R. Morando, G.V. N Pereira, y A. Z. Kronka. 2013. «Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas». *Enciclopédia Biosfera* 53 (17): 2562-76. doi:10.1073/pnas.0703993104.
- Druzhinina, I S, V Seidl-Seiboth, A Herrera-Estrella, B A Horwitz, C M Kenerley, E Monte, P K Mukherjee, S Zeilinger, I V Grigoriev, y C P Kubicek. 2011. «*Trichoderma*: The genomics of opportunistic success». *Nature Reviews Microbiology* 9 (10): 749-59.
- Ebadollahi, Asgar, y Jalal Jalali Sendi. 2015. «A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests». *Toxin Reviews* 34 (2). Informa Healthcare: 76-91. doi:10.3109/15569543.2015.1023956.

- Epagri, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2010. «Cultivo de plantas bioativas». *Boletim Didático*. http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=214.
- Faiguenbaum, H. 2003. *Labranza, siembra y producción de los principales cultivos de Chile. Ograma*. Santiago: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- FAO. 2016. «FAOSTAT». *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- «Fauna Europaea». 2017. https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/de49afed-1cba-4fe1-964c-a544e1eeaceb#common_name.
- Ferreira, AM. 1960. «Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais». *Garcia de Orta* 8 (3): 559-81.
- Gallo, DN, OS Neto, S Carvalho, y RPL Baptista. 2002. *Entomologia agrícola*. Fundacao de Estudos Agrários Luiz de Queiroz.
- García-Crispin, J. 1994. «Agroecología de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) y *Acanthoscelides obtectus* (Say).»
- Graham, P.H., y P. Ranalli. 1997. «Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)». *Field Crops Research* 53 (1). Elsevier: 131-46. doi:10.1016/S0378-4290(97)00112-3.
- Haines, C. P. 1991. *Insects and arachnids of tropical stored products : their biology and identification (a training manual)*. Natural Resources Institute. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB19960110794>.
- Hajek, AE. 2004. *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press.
- Halstead, DGH. 1963. «External sex differences in stored-products Coleoptera». *Bulletin of Entomological Research* 54 (1): 119-34.
- Harman, Gary E, y C P Kubicek. 2002. *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Vol. 1. United Kindong: CRC Press.

- Hori, M. 2003. «Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius)(Coleoptera: Anobiidae)». *Applied entomology and zoology* 38 (4): 467-73.
- Howe, RW, y JE Currie. 1964. «Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses». *Bulletin of Entomological Research* 55 (3): 437-77.
- Huignard, J. 1978. «Regulation of the bean weevil reproduction (*Acanthoscelides obtectus* Coleoptera: Bruchidae) and research on techniques of protection of stored beans». En *2nd Int. Working Conf. Stored Prod. Entomol., Nigeria*, 360-71. Nigeria.
- Iica. 2010. «Plagas del Judía en Centroamérica. Guía de identificación y manejo integrado.»
- Ilboudo, Z, LCB Dabiré, RCH Nébié, y IO Dicko. 2010. «Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae)». *Journal of Stored* 46 (2): 142-128.
- Isman, M. B. 2000. «Plant essential oils for pest and disease management». *Crop Protection* 19 (8-10): 603-8. doi:10.1016/S0261-2194(00)00079-X.
- Isman, M. B. 2001. «Pesticides based on plant essential oils for management of plant pests and diseases.» *Korea Forest Research Institute*.
- Jamal, CM, D Silveira, y R Ronchi. 2008. «O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós-colheita da banana». En *IX Simpósio Nacional Do Cerrado*, 1-9. ParlaMundi, Brasília.
- Jumbo, LOV, LRA Faroni, y EE Oliveira. 2014. «Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units». *Industrial Crops and Products* 56: 27-34.
- Junta de Castilla y León. 2015. «Superficies de cultivos herbáceos por provincias, comarcas y municipio». Junta de Castilla y León.

http://www.agriculturaganaderia.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100/1284675455995/_/_/_.

Junta de Castilla y León. 2017. «Anuario 2014. Leguminosas.» *Anuario de estadística agraria*. Junta de Castilla y León. http://www.agriculturaganaderia.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100/1284495917557/_/_/_.

Kim, SI, JY Roh, DH Kim, HS Lee, y YJ Ahn. 2003. «Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*». *Journal of stored products* 39 (3): 293-303.

Kornegay, J, C Cardona, SV Van, y O Voysest. 1991. «Breeding for insect resistance in beans». En *Common Beans: Research for Crop Improvement*, editado por A. Schoonhoven y O van and Voysest, 619-48.

Kornegay, JL, y C Cardona. 1991. «Inheritance of resistance to *Acanthoscelides obtectus* in a wild common bean accession crossed to commercial bean cultivars». *Euphytica* 52 (2): 103-11.

Lee, BH, PC Annis, y WS Choi. 2004. «Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects». *Journal of Stored Products Research* 40 (5): 553-64.

Lima Júnior, A. F. 2011. «Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus* sp». Anápolis.

Lioi, Lucia, y Angela R Piergiovanni. 2013. «European Common Bean». En *Genetic and genomic resources of grain legume improvement*, editado por Mohar. Singh, Hari D. Upadhyaya, y Ishwari Singh. Bisht, 11-40. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-397935-3.00002-5.

Maehara, N, y N Kanzaki. 2014. «Effect of aging in adult *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) on the susceptibility of the beetle to *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)». *Journal of forest research* 19 (3): 357-60.

- Martín-Cabrejas, MA, RM Esteban, y P Perez. 1997. «Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (8): 3223-27.
- Martínez, B, D Infante, y Y Reyes. 2013. «*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos». *Revista de Protección Vegetal* 28 (1): 1-11.
- Mayo, Sara, Eleonora Cominelli, Francesca Sparvoli, Oscar González-López, Alvaro Rodríguez-González, Santiago Gutiérrez, y Pedro A. Casquero. 2016. «Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum* – *Rhizoctonia solani* interaction». *Frontiers in Plant Science* 7. Frontiers: 1109. doi:10.3389/fpls.2016.01109.
- Mayo, Sara, Santiago Gutierrez, Monica G. Malmierca, Alicia Lorenzana, María Piedad Campelo, Rosa Hermosa y Pedro A. Casquero. 2015. «Influence of *Rhizoctonia Solani* and *Trichoderma* Spp. in Growth of Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) and in the Induction of Plant Defense-Related Genes». *Frontiers in Plant Science* 6 (septiembre). Frontiers: 685. doi:10.3389/fpls.2015.00685.
- Mazoneto, F., y J. D. Vendramin. 2002. «Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em genótipos de feijoeiro com e sem arcelina». *Neotropical Entomology* 31 (3): 435-39. doi:10.1590/S1519-566X2002000300013.
- Mazonetto, F., y J. D. Vendramim. 2003. «Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado». *Neotropical Entomology* 32 (1). Sociedade Entomológica do Brasil: 145-49. doi:10.1590/S1519-566X2003000100022.
- Mead-Briggs, MA, K Brown, y MP Candolfi. 2000. «A laboratory test for evaluating the effects of plant protection products on the parasitic wasp, *Aphidius rhopalosiphi* (DeStephani-Perez)(Hymenoptera: Braconidae).» En *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*, editado por M.P.J. Candolfi, S. Blümel, R. Forster, E.M. Bakker, C. Grimm, S.A. Hassan, U. Heimbach, et al., 13-25.

- Menjivar, RD. 2010. «The systemic activity of mutualistic endophytic fungi in Solanaceae and Cucurbitaceae plants on the behaviour of the phloem-feeding insects *Trialeurodes vaporariorum*, *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*». Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.
- Mesquita, Fabrício Rivelli, Angelita Duarte Corría, Celeste Maria Patto de Abreu, Rafaella Arajo Zambaldi Lima, y Angela de Fátima Barbosa Abreu. 2007. «Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica». *Ciencia e Agrotecnologia* 31 (4): 1114-21. doi:10.1590/S1413-70542007000400026.
- Meyers, JM, FM Stephen, LJ Haavik, y DC Steinkraus. 2013. «Laboratory and field bioassays on the effects of *Beauveria bassiana* Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) on red oak borer, *Enaphalodes rufulus*». *Biological Control* 65 (2): 258-64.
- Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente. 2016. «Leguminosas grano y oleaginosas - Leguminosas y oleaginosas - Cultivos herbáceos e industriales - Producciones agrícolas - Agricultura - mapama.es». <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/default.aspx#para1>.
- Mukherjee, P K, B A Horwitz, A Herrera-Estrella, M Schmoll, y C M Kenerley. 2013. «*Trichoderma* research in the genome era». *Annual Review of Phytopathology* 51: 105-29.
- Nahdy, M.Silim. 1994. «An additional character for sexing the adults of the dried bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae)». *Journal of Stored Products Research* 30 (1): 61-63. doi:10.1016/0022-474X(94)90272-0.
- Nava, E., P. Gastélum Hurtado, J. R. Camacho Báez, y R. Herrera-Flores. 2010. «Utilización de extractos de plantas para el control de gorgojo pardo *Acanthoscelides obtectus* (Say) en frijol almacenado». *Ra Ximhai* 6 (1). Universidad Autónoma Indígena de México: 37-43.

- Nazzi, F, F Vidoni, y F Frilli. 2008. «Semiochemicals affecting the host-related behaviour of the dry bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say)». *Journal of stored products research* 44 (2): 108-14.
- Nicholls, CI. 2008. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Oliveira, A. M, B.E.V. Pacova, S. Sudo, A.C.M. Rocha, y D.F. Barcelos. 1979. «Incidência de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) e *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) em diversas cultivares de feijão armazenado (Col.: Bruchidae).» *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 8: 47-55.
- Osborn, T.C., T. Blake, P. Gepts, y F.A. Bliss. 1986. «Bean arcelin: 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L.» *Theoretical and Applied Genetics* 71 (6): 847-55. doi:10.1007/BF00276428.
- Pabón, I. A., M. C. Aguirre, y P. J. Reyes. 1976. «Resistencia de diecisiete variedades comerciales de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) en almacenamiento al ataque del gorgojo pinto de los granos (*Zabrotes subfasciatus* Boh.).» *Acta Agronómica Colombiana*: 26: 39-46.
- Painter, RH. 1951. *Insect resistance in crop plants*. New York: The Macmillan Company.
- Papachristos, DP, y DC Stamopoulos. 2002. «Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae)». *Journal of stored products research* 38 (4): 365-73.
- PNUMA. 2000. *Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono*. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente . <http://www.unep.org/ozone>.
- Potter, C. 1952. «An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids». *Annals of Applied Biology* 39 (1): 1-28.

- Prabakar, K, y A Jebanesan. 2004. «Larvicidal efficacy of some Cucurbitaceous plant leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say).» *Bioresource technology* 95 (1): 113-14. doi:10.1016/j.biortech.2003.05.001.
- Prajapati, V, AK Tripathi, y KK Aggarwal. 2005. «Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*». *Bioresource* 96 (16): 1749-57.
- Prakash, A., y J. Rao. 1997. *Botanical pesticides in agriculture*. Baton Rouge, Florida: CRC Press.
- Quentin, M. E., J. L. Spencer, y J. R. Miller. 1991. «Bean tumbling as a control measure for the common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus*». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 60 (2): 105-9. doi:10.1111/j.1570-7458.1991.tb01529.x.
- Quintela, ED. 2002. «Manual de identificação dos insetos e invertebrados: pragas do feijoeiro». *Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão*.
- Ramírez, A., J. Vera, M. Aguilera, y Garza R. 2003. «Preferencia, supervivencia y fecundidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) en cuatro genotipos de alubia resistentes a *Apion godmani* (Wagner).» *Agrociencia* 37: 195-202.
- Ramírez, S, y M Suris. 2015. «Ciclo de vida de *Acanthoscelides obtectus* (Say.) sobre frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de laboratorio». *Revista de Protección Vegetal* 30 (2): 158-60.
- Ramírez Serrano, A., J. Vera Graziano, M. Aguilera Peña, y R. Garza García. 2003. «Preferencia, supervivencia y fecundidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) en cuatro genotipos de frijol resistentes a *Apion godmani* (Wagner).» *Agrociencia* 37 (2). Colegio de Postgraduados: 195-202.
- Ramos, Yus R. 1976. «Las especies de Brúquidos (gorgojos de las leguminosas) de interés agrícola y fitosanitario (Col. Bruchidae)». *Boletín del Servicio de Plagas* 2: 1-35.
- Razinger, J, M Lutz, HJ Schroers, y G Urek. 2014. «Evaluation of insect associated and plant growth promoting fungi in the control of cabbage root flies». *Journal of economic entomology* 107 (4): 1348-54.

- Regnault-Roger, C, y A Hamraoui. 1994. «Inhibition of reproduction of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera), a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) bruchid, by aromatic essential oils». *Crop Protection* 13 (8): 624-28.
- Reinoso, Bonifacio. 2001. «Prospección, caracterización y evaluación de variedades locales de judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) de la provincia de León». Universidad de León.
- Reinoso Sánchez, Bonifacio., Juan Antonio Boto Fidalgo, y Mario González Morala. 2007. *Variedades locales de alubia o judía grano (Phaseolus vulgaris L.) de la provincia de León*. Univ. León. Secretariado Publicaciones y Medios Audiovisuales.
- Rentería López, L., J. Vera Graziano, y B. Domínguez Ruiz. 1997. «Preferencia y tasas de fertilidad de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) en seis líneas de frijol». *Agrociencia* 31 (3). Colegio de Postgraduados: 349-52.
- Rivera, Ana, Pedro A. Casquero, Sara Mayo, Antonio Almirall, Marçal Plans, Joan Simó, Roser Romero-del-Castillo, y Francesc Casañas. 2016. «Culinary and sensory traits diversity in the Spanish core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)». *Spanish Journal of Agricultural Research* 14 (1): e0701. doi:10.5424/sjar/2016141-7726.
- Rodríguez-González, A. 2014. «Mejora en las estrategias de control de Cerambícidos en el cultivo de la vid». Universidad de León. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Rodríguez-González, Á, S Mayo, Ó González-López, B. Reinoso, S. Gutiérrez, y P.A. Casquero. 2017. «Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)». *Environmental monitoring and assessment* 189 (1): 12.
- Romero-Nápoles, J. 2002a. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de antrópodos de México : hacia una síntesis de su conocimiento*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

- Romero-Nápoles, J. 2002b. «Bruchidae». En *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*, editado por J. Llorente Bousquets y J. Morrone, Primera, 513-34. México: UNAM.
- Romero-Nápoles, J, y CD Johnson. 2004. «Database BRUCOL». *Programa de Entomología, Instituto de Fitosanidad*.
- Rosolem, CA, y OM Marubayashi. 1994. «Seja o doutor do seu feijoeiro». *Informações agronômicas* 68: 01-16.
- Rozman, V., I. Kalinovic, y Z. Korunic. 2007. «Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects». *Journal of Stored Products Research* 43 (4): 349-55. doi:10.1016/j.jspr.2006.09.001.
- Ruedell, J.; Link, D. & Frederizzi, L.C. 1974. «Germinação de sementes de feijão danificadas por larvas de acanto». *Revista centro Ciências Rurais*, 4 (4): 389-92.
- Samuels, Gary J. 1996. «*Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus». *Mycological Research* 100 (8): 923-35. doi:10.1016/S0953-7562(96)80043-8.
- Schmale, I, FL Wäckers, C Cardona, y S Dorn. 2002. «Field infestation of *Phaseolus vulgaris* by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), parasitoid abundance, and consequences for storage pest control». *Environmental Entomology* 31 (1): 859-63.
- Schmidt, G.H., E.M. Risha, y A.K.M. El-Nahal. 1991. «Reduction of progeny of some stored-product Coleoptera by vapours of *Acorus calamus* oil». *Journal of Stored Products Research* 27 (2): 121-27. doi:10.1016/0022-474X(91)90022-5.
- Schmidt, GH, y M Streloke. 1994. «Effect of *Acorus calamus* (L.)(Araceae) oil and its main compound β -asarone on *Prostephanus truncatus* (Horn)(Coleoptera: Bostrichidae)». *Journal of Stored Products Research* 30 (3): 227-37.
- Sgarbiero, E, LRP Trevizan, y GC Baptista. 2003. «Pirimiphos-methyl residues in corn and popcorn grains and some of their processed products and the insecticide action on the control of *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae)». *Neotropical Entomology* 32 (4): 707-11.

- Shaaya, E., M. Kostjukovski, J. Eilberg, y C. Sukprakarn. 1997. «Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects». *Journal of Stored Products Research* 33 (1): 7-15. doi:10.1016/S0022-474X(96)00032-X.
- Silva, M F, H Treichel, M A Scariot, S Golunski, M R R Meneguzzo, y A J Mossi. 2015. «Control alternativo do *Sitophilus zeamais* em grãos de milho armazenado, com o uso de óleo essencial de *Salvia officinalis*». En *5o simpósio de segurança alimentar. Alimentação e saúde*, 5-8.
- Sing, SE, y RT Arbogast. 2014. «Optimal *Xylocoris flavipes* (Reuter)(Hemiptera: Anthocoridae) density and time of introduction for suppression of bruchid progeny in stored legumes». *Environmental entomology* 37 (1): 131-42.
- Taberner, A, P Castañera, E Silvestre, y J Dopazo. 1993. «Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches.» *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 9 (5): 535-40.
- Tejeda Tribiño, Pamela. 2011. «Efecto de polvos de hojas de canelo (*Drimys winteri* J. R. et G. Forster) sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) bajo condiciones de laboratorio». Valdivia, Chile.
- van Schoonhoven, A., y M.A. Pastor-Corrales. 1987. *Standard system for the evaluation of bean germplasm*. Cali (Colombia): Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- van Schoonhoven, A, C. V. Cardona, y J Valor. 1983. «Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in noncultivated common bean accessions». *Journal of Economic Entomology* 76 (6): 1255-59.
- Vega Graziano, J., y S. Cruz-Izquierdo. 2016. «Parámetros poblacionales del insecto *Acanthoscelides obtectus* (Say) en granos de cinco cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)». *Agrociencia* 50 (3). Colegio de Postgraduados: 347-53.
- Vélez Ángel, R. 1997. *Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia : bionomía y manejo integrado*. Editorial Universidad de Antioquia.
- Vieira, C. 1983. *Doenças e pragas do feijoeiro*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

- Villegas-Arenas, M.A. 2005. «*Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible». Orius Biotecnología.
- Vizzotto, Márcia, Ana Cristiana Krolow, y Gisele Eva Bruch Weber. 2010. «Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância». *Pelotas: Embrapa Clima Temperado*, 16.
- Voysest, O, y M Dessert. 1991. «Bean cultivars: classes and commercial seed types». En *Common beans: research for crop improvement*, 119-62. UK.
- Wasserman, SS, y DJ Futuyma. 1981. «Evolution of host plant utilization in laboratory populations of the southern cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae)». *Evolution* 35 (4): 605-17.
- Weindling, R. 1932. «*Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi». *Phytopathology* 22 (8): 837-45.
- Weindling, R. 1934. «Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi». *Phytopathology* 24 (1): 151-53.
- Yang, R. Z., y C. S. Tang. 1988. «Plants used for pest control in China: A literature review». *Economic Botany* 42 (3). Springer-Verlag: 376-406. doi:10.1007/BF02860162.
- Yang, YC, HS Lee, SH Lee, JM Clark, y YJ Ahn. 2005. «Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae)». *International journal for parasitology* 35 (14): 1595-1600.
- Yang, YC, SH Lee, WJ Lee, y DH Choi. 2003. «Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*». *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (17): 4884-88.

