

INFORME FINAL

“Establecimiento de los protocolos de colecta, multiplicación y crianza del coleóptero biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri* sobre su hospedante *Dysmicoccus brevipes* en tres cultivos hospedantes bajo condiciones controladas con miras a su producción masiva y liberación en campo”.

**MSc. Ileana Moreira González
MSc. Vladimir Villalba Velásquez**

Marzo, 2010

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	3
Introducción.....	7
Objetivos.....	9
Revisión de Literatura	10
Materiales y Métodos	16
Resultados y Discusión	20
Conclusiones	28
Recomendaciones	29
Bibliografía Consultada	30

RESUMEN

En Costa Rica y el resto del mundo se ha orientado el desarrollo sostenible hacia el manejo integrado de plagas, protección al medio ambiente, productos orgánicos y biocontrol, por lo que se hace visible una clara tendencia a la disminución en el uso de agroquímicos dentro de los sistemas de producción agrícola (Vaquerano, 2003). Es posible hacer agricultura y ganadería productivas y rentables sin necesidad de utilizar productos químicos de síntesis artificial; bajo estos conceptos es que la producción de Biocontroladores es una alternativa que permite la disminución de prácticas agrícolas deteriorantes del medio ambiente porque ganan ventajas sobre la salud del agricultor. La familia *Pseudococcidae* forma uno de los más grandes grupos de insectos, que incluyen a las llamadas cochinillas harinosas y/o chanchitos blancos; las cuales provocan importantes daños económicos debido a la succión de los tejidos y producción de mielecilla que favorece en muchos el desarrollo de hongos patógenos y la defensa de ciertas especies de hormigas (González, 1989). La cochinilla harinosa, *Dysmicoccus brevipes* presenta características morfológicas y ecológicas que le brinda resistencia al control químico (López, 1991); por otra parte, según este mismo autor, al presentar este insecto una superposición de generaciones, es prácticamente imposible encontrar a la totalidad de la población en un estado susceptible al insecticida, lo que dificulta aun más su control mediante el uso de plaguicidas.

Por lo anteriormente expuesto es que la utilización de enemigos naturales nativos o introducidos, se convierte en una opción eficaz dentro del manejo integrado de ésta plaga agrícola y forestal mediante el uso de entomófagos (parásitos y predadores), y entomopatógenos (González y Rojas, 1966). Por tal razón, se pretendió obtener a través de colectas de campo en plantaciones de piña, el pie de cría del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del depredador *Cryptolaemus montrouzieri* que permitieran fomentar el desarrollo y crecimiento en el laboratorio de sus colonias con el propósito de estudiar, describir y reportar el ciclo biológico de ambas especies; tratando de establecer un protocolo de producción masiva de ambos bajo condiciones de laboratorio.

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biocontroladores del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) y en el invernadero de docencia de la Escuela de Biología del ITCR en Cartago. Para la colecta en campo de *D. brevipes* y *C. montrouzieri* se realizaron muestreos sobre plantaciones de piñas orgánicas infestadas por la plaga en la finca "Corsicana" ubicadas en la zona de La Virgen de Sarapiquí, en la provincia de Heredia. Se colectaron aquellas colonias que tuviesen gran cantidad de huevos y población adulta. En recipientes plásticos acondicionados con malla fina y con la ayuda de una tijera de podar se extrajeron las colonias de las bases de las hojas bajas de piña y fueron colocadas en su interior para ser transportadas al laboratorio e iniciar el pie de cría. Otra manera en que se recolectaron los especímenes en campo fue directamente sobre frutos de piña afectados por la plaga, se colectaron aquellos en las que las colonias eran bastante numerosas para ser colocados en recipientes plásticos y trasladados al laboratorio; una vez llegadas al laboratorio las piñas fueron colocadas dentro de cámaras Flanders para favorecer el crecimiento, desarrollo y establecimiento de la colonia. Similar a la metodología anterior, se colectaron muestras de piña infestadas por cochinilla harinosa, buscando mediante una lupa de campo la presencia de larvas y/o huevos del coccinélido *Cryptolaemus montrouzieri*. Una vez colectadas fueron trasladados al laboratorio en recipientes plásticos con malla fina que contenían larvas del depredador en su interior como fuente de alimento para que no murieran por inanición durante su traslado. Una vez que las muestras llegaron al Laboratorio fueron transferidas a cámaras Flanders sobre plantas de piña ornamental de unos 6 meses de edad aproximadamente, ayotes tiernos y maduros y tubérculos de papa brotados + GA₃ al 0,25%, 0,5%, 0,75% los cuales fueron desinfectados con 3cc/L de Piretrina y 5cc/L de jabón potásico; seguidamente se contaron 50 individuos los cuales eran introducidos en cada cámara por semana durante 4 semanas para llevarles el registro semanal del porcentaje de sobrevivencia y el de multiplicación de las especies bajo estudio. Para la reproducción y crianza masiva del depredador bajo condiciones de laboratorio se procedió a criarlo en dieta artificial según Singh (1997). Los

adultos y larvas de *C. montrouzieri* fueron distribuidos aleatoriamente, dos larvas y cinco adultos por cada placa petri. En cada placa se distribuyó la dieta artificial en pequeñas cantidades y se cubrieron con sus respectivas tapas, se revisó cada dos días para así evitar su descomposición. Las baterías se ubicaron en mesones en el invernadero de docencia de la Escuela de Biología con una temperatura entre 16-25°C y una humedad relativa de 40-70%. Los estudios de alimentación y desarrollo se realizaron por separado, se registró el tiempo de sobrevivencia expresado en días y/o horas, así como también el ciclo de vida del insecto.

Como resultado se obtuvo que la colecta más importante para el establecimiento del pie de cría se originó a partir de frutos de piña infestados por grandes colonias de *D. brevipes*, en la finca orgánica "Corsicana". Tanto las colectas del hospedante como la de su depredador llegaron en perfecto estado al Laboratorio, no se reportaron insectos muertos durante el traslado. Por la alta incidencia de *D. brevipes* en frutos de piña, se determinó que *Ananas comosus* podría ser una planta importante para el establecimiento del pie de cría. Para los tratamientos de desinfección realizados se determinó que el jabón potásico no tuvo un efecto secundario sobre las colonias establecidas, con una residualidad de 0 días antes de la introducción del hospedante y fue en el que se dio un desarrollo poblacional más estable de las colonias de *D. brevipes*. En el caso de la piretrina se determinó que el efecto secundario fue de 0-25% de mortalidad con una residualidad desconocida. Según Beardsley, 1982 el marchitamiento de piña causada por *D. brevipes*, coincide con los resultados observados ya que los síntomas típicos aparecieron por primera vez 46-65 días después de la cochinilla se colocaron en las plantas de piñas ornamentales. En la utilización de Ayotes (*Cucurbita maxima*) se obtuvo que hubo diferencias en el establecimiento de la colonia dependiendo del estado de madurez, siendo menor en los ayotes sazones y mayor en los ayotes tiernos. En cuanto al establecimiento de la colonia en brotes de papa (*Solanum tuberosum*) se determinó que el 100% de tubérculos con mayor desarrollo de brotes se dio en la concentración 0,75%, y al comparar las diferentes condiciones lumínicas se observó que las semillas de papa colocadas en la luz obtuvieron un mayor número de brotes, mayor tamaño y mejor establecimiento de las colonias de *D. brevipes*; el cual, es un insecto partenogenético, ovovivíparo y con tres estadios larvales; el primer estadio tiene una duración de 10 a 26 días en promedio, el segundo de 6 a 22 días y el tercer y último estadio entre los 7 a los 24 días, para un período total larval de 26 a 55 días, con un promedio de 34 días, resultados que coinciden con los reportados por Bennett *et al*, 1982. Los adultos poseen 17 pares de filamentosos cerros blancos y con promedio de vida de unos 56 días de las hembras. *C. montrouzieri* produjo huevos de 0,5mm de ancho por 1,0mm de largo, alargados y de color amarillo depositados de a uno o en grupo con un período de incubación de seis a ocho días. Las larvas son de forma oblonga a ovaladas miden aproximadamente 1cm de largo y 0,3cm de ancho, ésta etapa duró entre 18 a 20 días aproximadamente. La pupa mide cerca de 5mm de largo, de color blanco y cubierta por lanosidades que le dan aspecto dormante; la duración del período de pupa bajo las condiciones del ensayo fue de 8 a 12 días aproximadamente. El adulto mide 5mm de largo por 3mm de ancho; son de color negro excepto la cabeza, abdomen y la punta del ala posterior que son rojo-anaranjado, el dimorfismo sexual es leve y la diferencia es que las coxas del protórax son de color anaranjado para los machos y negras para las hembras. Las temperaturas entre 16-25°C y una humedad relativa de 40-70% siendo estas condiciones ideales para el desarrollo de *C. montrouzieri*. Se concluye que el mejor sistema de multiplicación bajo condiciones de laboratorio del coleóptero biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri* sobre su hospedante *Dysmicoccus brevipes* fueron las plantas de piña ornamentales (*Anana comosus*), que el ciclo de vida de vida de *Dysmicoccus brevipes* tiene una duración promedio de huevo a adulto de 95 días y el de *Cryptolaemus montrouzieri* entre 28-32 días en promedio con temperaturas de 26,6°C y humedad relativa de 40-75%. Finalmente se deja establecido el protocolo de cría de estos insectos bajo condiciones de laboratorio.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Plantas hospedras utilizadas en el desarrollo de los insectos	20
Cuadro 2.- Número promedio de cochinillas ninfas por tratamiento y tiempo	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Adulto de <i>Dysmicoccus brevipes</i> sobre tallo de maleza presentes en los bordes de las plantaciones de piña.....	11
Figura 2.- Estado adulto de <i>Cryptolaemos montrousieri</i> depredador de <i>Dysmicoccus brevipes</i> ..	14
Figura 3.- Estado adulto de <i>Cryptolaemos montrousieri</i>	15
Figura 4.- A. Piñas ormanetales. B. Piñas de plantas inoculadas con el hospedante.....	17
Figura 5.- A.- Ayotes tiernos inoculados. B.- Baterías de jaulas Flanders en inberandero.....	19
Figura 6.- A.- Características de las frutas seleccionadas. B. Colonias de <i>D. brevipes</i>	21
Figura 7.- Movimiento de la población de <i>D. brevipes</i>	22
Figura 8.- Tipos de Ayotes seleccionados para inocular. A.- Ayote sazón. B.- Ayote tierno	23
Figura 9.- Establecimiento de las colonias de <i>D. brevipes</i> en ayotes	23
Figura 10.- Desarrollo de brotes en papa para el establecimiento de <i>D.brevipes</i>	24
Figura 11.- Biocontrolador <i>C. montrousieri</i> en piñas colectadas en el campo.....	25
Figura 12.- Ciclo de vida de <i>C. montrousieri</i>	27

INTRODUCCION

En Costa Rica y el resto del mundo se ha orientado al desarrollo sostenible hacia el manejo integrado de plagas, protección al medio ambiente, productos orgánicos y biocontrol, por lo que se hace visible una clara tendencia en cuanto a la disminución y alternativas al uso de agroquímicos en los sistemas de producción agrícola. Estas directrices no son producto de mera coincidencia, sino, son el llamado y la demanda de los agricultores por herramientas sanas que le permitan cosechar productos limpios de plaguicidas que lleguen a los consumidores finales con un valor agregado para su salud.

Como es bien sabido, Costa Rica es uno de los países centroamericanos con mayor índice de importaciones de agroquímicos. En Costa Rica se sobrepasan las importaciones de plaguicidas desde los Estados Unidos con respecto a los países más grandes, como Guatemala, Filipinas Colombia, Brasil y Argentina. El consumo promedio de plaguicidas en Centroamérica ratifica que nuestros niveles están por encima del consumo en los otros países: mientras Costa Rica tiene un consumo per cápita de 4 kg por persona por año, El Salvador y Guatemala 1,2 kg, Honduras 2,6 kg, Nicaragua 3,1 kg y Panamá en 3,4 kg (Vaquerano, 2003). Las consecuencias no se han hecho esperar: Costa Rica es el segundo país en el mundo con el mayor índice de cáncer gástrico (Dr. Ricardo Barahona, Gastroenterólogo, com. pers.).

Es posible hacer agricultura y ganadería productivas y rentables sin necesidad de utilizar productos químicos de síntesis artificial. De esa manera se defienden la vida, el suelo, el agua y en general, las posibilidades de que sigamos viviendo y alimentándonos con cosechas limpias, libres de venenos, más nutritivas, menos costosas y que no destruyen el medio ambiente. Bajo estos conceptos es que la producción de Biocontroladores es una alternativa que permite la disminución de prácticas agrícolas deteriorantes del medio ambiente ganan ventajas; lo interesante dentro de éste ámbito de la investigación es poder desarrollar nuevas especies de Biocontroladores que no sean las ya comúnmente utilizadas por los agricultores como es el caso de *Bacillus thuringiensis*. Costa Rica posee una Biodiversidad que nos permite explorar esa fuente de nuevos individuos o de nuevas especies que pudiesen representar un potencial muy exitoso en el Biocontrol, no obstante, mientras no desarrollemos actividades tendientes a despejar ésta y otras incógnitas seguiremos suponiendo del potencial que realmente tenemos.

La familia *Pseudococcidae* forma uno de los más grandes grupos de insectos, que incluyen a las llamadas cochinillas harinosas y/o chanchitos blancos. En esta familia se encuentra un considerable número de especies que se localizan ampliamente distribuidas en el mundo y se les considera especies polífagas, plagas de cultivos agrícolas, ornamentales y forestales; las cuales construyen colonias sobre los frutos, hojas, y raíces de los cultivos hospedantes, provocando importantes daños económicos debido a la succión de los tejidos y producción de mielecilla que favorece en muchos el desarrollo de hongos patógenos y la defensa de ciertas especies de hormigas (González, 1989).

La cochinilla harinosa, específicamente *Dysmicoccus brevipes* presenta características morfológicas y ecológicas que le brinda resistencia al control químico (López, 1991); por otra parte, según este mismo autor, al presentar la cochinilla harinosa una superposición de generaciones, es prácticamente imposible encontrar a la totalidad de la población en un

estado susceptible al insecticida, lo que dificulta aun más su control mediante el uso de agroquímicos.

Por tal razón la utilización enemigos naturales nativos o introducidos, se convierte en una opción eficaz dentro del manejo integrado de ésta plaga agrícola y forestal al que últimamente muchos autores ha denominado control biológico o biocontrol, el cual involucra el uso de otros organismos vivos para controlar plagas; no obstante, pueden ser un poco lentos en mostrar resultados y quedar rezagados frente a un crecimiento explosivo de las plagas. El biocontrol se define como la regulación o supresión del potencial reproductor de un organismo, a través de la acción de parásitos, depredadores y patógenos. En el campo de la entomología económica, la aplicación del control biológico se orienta hacia la conservación de un organismo perjudicial bajo el nivel de daño económico, mediante el uso de agentes denominados colectivamente entomófagos (parásitos y predadores), y entomopatógenos (González y Rojas, 1966)

Desde este punto de vista se demuestra que la aplicación del conocimiento biotecnológico tiene un gran potencial de usos prácticos en la agricultura encontramos a: *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleóptera: Coccinelidae, ampliamente distribuido a nivel mundial), que ha demostrado ser un importante agente de control biológico de los miembros de la familia *Pseudococcidae*, siendo el mejor biocontrolador de dicha familia por los excelentes resultados que se han visto en campo. Este enemigo natural es factible y viable producirlo bajo condiciones de laboratorio, criándolo sobre su presa (cochinilla harinosa), para luego ser liberado en campo como un método de control aumentativo, solucionando así el problema de superposición de generaciones señalado por López (1991), ya que éste depredador se alimenta de la cochinilla harinosa en todos sus estadíos (Marco, 2007).

Ante lo anteriormente planteado se visualiza como opción biotecnológica la multiplicación masiva de este enemigo natural bajo condiciones de invernadero, el cual y en base a los resultados obtenidos en ésta investigación podría convertirse en una opción comercial de manejo y disponibilidad para los agricultores o consumidores finales del producto; sin embargo, antes de llegar a ésta meta se requiere del desarrollo de métodos y tecnologías de reproducción bajo condiciones de campo que permitan disponer de cantidades suficientes para su liberación en parcelas experimentales que a un mediano largo plazo contribuyan con el control de plagas en muchos cultivos agrícolas y forestales donde la cochinilla harinosa es realmente un problema difícil de manejar. El aspecto de mayor interés de ésta investigación fue desarrollar una metodología de crianza de la plaga y su depredado bajo condiciones de invernadero que permita poner a disposición de los usuarios una tecnología que sea amigable con el medio ambiente, a través del uso de insectos biocontroladores, el cual al ser implementado fomenta y contribuye con el sistema y calidad de la producción agrícola de Costa Rica, la región y el mundo.

OBJETIVOS (General y Específicos)

Objetivo General:

- Colectar, multiplicar y criar bajo tres sistemas de alimentación en laboratorio al coleóptero biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri* sobre su hospedante *Dysmicoccus brevipes*.

Objetivos específicos:

- Obtener a través de colectas de campo en plantaciones de piña, palmito o helecho de cuero el pie de cría del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del depredador *Cryptolaemus montrouzieri*.
- Fomentar el desarrollo y crecimiento en el laboratorio de las colonias del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del depredador *Cryptolaemus montrouzieri* bajo tres cultivos hospedantes: piña (*Ananas comosus*) Calabaza (*Cucurbita maxima*) y papa (*Solanum tuberosum*).
- Estudiar, describir y reportar el ciclo biológico del coleóptero *Cryptolaemus montrouzieri* desde su fase de huevo hasta la adulta, indicando el tiempo transcurrido en cada una de las etapas por las que pasa su metamorfosis completa bajo condiciones de laboratorio.
- Establecer un protocolo de producción masiva del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del depredador *Cryptolaemus montrouzieri* bajo condiciones de laboratorio.

REVISION DE LITERATURA

Biocontrol

Baker y Cook (1974) definieron el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o latente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del medio, del hospedante o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más de estos últimos. Según Schroth y Hancock (1981), este control se puede lograr mediante el aprovechamiento del manejo natural, la introducción de plaguicidas microbianos y la manipulación del ambiente en beneficio de aquellos posibles parasitoides o depredadores presentes en el ecosistema, que pudieran controlar la interacción patógeno con su hospedante.

El biocontrol involucra el uso de microorganismos benéficos, como insectos, ácaros, bacterias, hongos, nematodos y virus especializados en atacar y controlar al insecto plaga o fitopatógeno y los daños que causan. Ofrece un enfoque ambiental amigable al manejo de enfermedades y puede ser incorporado dentro de controles físico-culturales y uso limitado de agroquímicos para un efectivo sistema MIP (Monte, 2001). En un ambiente más restringido, consiste en la introducción artificial de micoflora antagonista en el ambiente que pueda frenar el patógeno o la plaga y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del patógenos o la intensidad de los síntomas posteriores a la infección (Deacon & Berry, 1992).

Los agentes de biocontrol se han transformado en la alternativa más apropiada al uso de agroquímicos, tan peligrosos para el medio y responsables directos de la inducción de resistencia en los patógenos (Chet, 1993). Por lo anteriormente expuesto y basado en las investigaciones en ésta área conoceremos según Fry, 1989 algunos criterios para la selección de candidatos para el Biocontrol:

1. Los primeros candidatos deben ser las plagas introducidas identificando control biológico clásico.
2. El impacto económico de la plaga en la región.
3. Evaluación del éxito de biocontrol en otros países.
4. Plagas donde otros métodos de control han fracasado.
5. Plagas que no estén bajo cuarentenas.
6. Plagas con un umbral económico alto y que no son vectores de enfermedades.
7. Plagas únicas del cultivo.
8. Plagas con reconocidos enemigos naturales efectivos en otros países.
9. Análisis de costos y beneficios.

Cochinilla Harinosa (*Dysmicoccus brevipes*)

Nombre Común: Cochinilla del tallo y corona

Taxonomía:

Reino: *Animal*

División: *Exoterygota*

Clase: *Insecta- Hexapoda*

Orden: *Homóptera*

Familia: *Pseudococcidae*

Genero: *Dysmicoccus*

Especie: *Dysmicoccus brevipes*

Esta cochinilla es principalmente una plaga de la piña y otras bromelias; sin embargo, también se infestan anonáceas, banana, apio, cítricos, café, algodón, Euphorbia, sepium, Hibiscus, hierba Hilo, mora, nutgrass, piña de orquídeas y Straussia; la importancia económica de esta especie ha sido registrada en Perú, Colombia y Venezuela. Además se han observado en otros lugares como Jamaica, Estados Unidos, América Central, Hawaii, Islas Filipinas, Brasil y la República Dominicana. También infesta a la piña, caña

de azúcar y algunas gramíneas silvestres. Los individuos de esta especie se localizan en las raíces, corona y base de los tallos del espárrago o en el pseudotallo de la piña a la altura de la superficie del suelo ligeramente protegidos, donde se alimentan succionando la savia de la planta. En el lugar de la alimentación se producen lesiones de color café oscuro, que facilita el ingreso de patógenos. En otros casos las plantas quedan pequeñas al ser afectada gran parte de las raíces. El incremento del área esparraguera y sobre todo el desconocimiento sobre el comportamiento de esta plaga ha determinado su diseminación (Carter,1993).

D. brevipes es una especie que mide de 2.5 a 3 mm de longitud, es ovovivípara por lo que se desconoce las características de las posturas y estados inmaduros que presenta cuerpo oval o redondo siendo más ensanchado en la extremidad caudal, es de color rosa o rosa-naranja; patas de color café amarillento, el cuerpo está cubierto por la capa delgada de cera blanca harinosa o pulverulencia, que permite que sea visible y fácilmente observables los segmentos del cuerpo, no tiene zonas desnudas en el dorso; posee unas hebras filamentosas cilíndricas alrededor del cuerpo de apariencia cerosa, siendo más largos los últimos seis pares posteriores, es especial el último que alcanza la longitud del cuerpo. Se observan 17 pares de filamentos de cera lateralmente visibles, a menudo ligeramente curvada, pares posteriores más largos y los filamentos anteriores más cortos que los pares posteriores. Se presenta y distribuye en todas las partes de la planta, por lo general en las áreas protegidas (Alam *et al*, 1990). Para otros autores *D. brevipes* presenta setas en la zona dorsomedial del segmento VIII, ya que en los segmentos VII y VI es discooidal, con poros presentes cerca de los ojos. Tiene centralmente una apariencia multilocular por la cantidad de poros que se observan y que restringen a los segmentos VI, VII y VIII. Hay poros translúcidos en el fémur y la tibia posterior, 2, 3 o incluso 4 cónicos, sin cuello ventral oral en el grupo en sentido lateral de la coxa frontal; concentración de poros discooidales en la zona dorsomedial del segmento abdominal VIII y 17 pares de hebras filamentosas (Figura 1) (Beardsley, 1965; Beardsley *et al* 1982).



Figura 1. Adulto de *Dysmicoccus brevipes* sobre tallo de maleza presentes en los bordes de las plantaciones de piña (Fuente: Ing. Marco Chacón)

Daño que Producen en plantas cultivadas

D. brevipes es una de las plagas cochinilla de mayor importancia económica en Hawai a causa de su implicación con las enfermedades de la piña. En piña, cuatro tipos de daños son posibles: 1) la transmisión de la marchitez de piña (también llamado cochinilla se marchitan y canto marchitamiento), 2) la producción de las zonas cloróticas donde se ha prolongado y la alimentación de los tejidos subyacentes se han agotado, 3) los daños a la parte inferior de la piña por la alimentación de grandes poblaciones de cochinilla que hace que la parte inferior cortes no comercializables y pueden provocar la putrefacción y la

filtración de los frutos, y 4) "franja cochinilla", que los resultados de la alimentación de una breve sección de cada de 3 o 4 hojas interiores espiral. Se caracteriza por manchas de color verde pálido a amarillo y por el colapso de los tejidos de almacenamiento de agua dentro de estas líneas (Beradsley *et al* 1982; Hill, 1983, Carter, 1993).

El "Marchitamiento de piña", o la "Cochinilla de la marchitez", hace que sea el tipo más grave de los daños que producen en las plantaciones y es la principal causa de pérdida de cosechas a nivel mundial. Hay dos tipos de marchitamiento, "se marchitan rápido" y "marchitez lenta"; ambos tipos provocan el colapso de las raíces por la invasión de organismos saprofitos o por el agotamiento de la raíz. "Marchitamiento rápido" es producido por un corto período de alimentación de una gran colonia de cochinillas y se caracteriza por la decoloración de las hojas a tonos amarillento o rojizos y la pérdida de rigidez en las mismas. La "Marchitez lenta" se produce después de que se ha dado el establecimiento y desarrollo de una gran colonia de cochinillas y muestran menos cambios de color las hojas de la piña. Las hojas serán cubiertas con la cochinilla en los sitios de alimentación y una forma de reconocerla en campo es observar las puntas de las hojas con colores dorados y la caída de la hoja se flácida al tacto. Marchitamiento de piña también ha sido llamado "marchitez borde" porque los márgenes del campo son los primeros y la infección se mueve hacia adentro como la cochinilla es dispersada hacia el interior. Afortunadamente, esta enfermedad ha sido controlada por las últimas 3 décadas por el control de la hormiga de rutina quienes las cuidan y las trasladan de un lugar a otro a cambio de la secreciones azucaradas que les producen de alimento; sin embargo, puede volver a ser frecuente su aparición en campo si las cochinillas no son continuamente reprimidas por limitar las poblaciones de hormigas (Beardsley *et al* 1982; Rohrbach *et al* 1988).

Métodos de Control de *D. brevipes*

En general el control de esta cochinilla es difícil debido a su ubicación, sin embargo según Alam *et al* 1990 es posible tomar algunas medidas tendientes a disminuir su incidencia, entre las que podemos citar las siguientes:

- Buena desinfección de las coronas antes de la siembra.
- Evitar sembrar en áreas en donde anteriormente estuvo infestado por esta plaga.
- Mantener el cultivo con una adecuada fertilización, debido a que las plantas vigorosas muestran tolerancia al ataque de esta plaga.
- En condiciones de alta infestación realizar aplicaciones de insecticidas a través del sistema de riego. Esto es posible en caso de riego por goteo, siendo esto difícil en el sistema de riego por gravedad.
- Los campos que se renuevan, deben ser rotados con otros cultivos que no sirvan de hospedero de esta plaga. Además se debe eliminar las plantas voluntarias y realizar araduras para exponerlas tanto a enemigos naturales como a condiciones ambientales que le sean adversas. La rotación mínima debe ser de dos años.

Control Químico

El control químico de especies de hormigas que tienden a proteger y defender las colonias de *D. brevipes* en campo ha demostrado ser eficaz en el control de la cochinilla harinosa en plantaciones de piña. En el pasado, productos químicos como el heptacloro y mirex se han utilizado para controlar las poblaciones de hormigas y, posteriormente, la cochinilla de la marchitez en la piña. Desafortunadamente, estos químicos tienen efectos perjudiciales sobre el medio ambiente debido a su lenta degradación, y han sido prohibidos para su uso por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de Norteamérica (Carter, 1993).

Como grandes conos invertidos que forman los montículos las colonias de hormigas son destruidos durante la preparación de la tierra para el establecimiento de una nueva plantación, procedimientos como el arado o el pase de rastra destruye los montículos debido a que sus nidos se encuentran cerca de la superficie del suelo y la reinvasión de las colonias de los campos infestados adyacentes, las zonas en

barbecho o no cultivadas es lento. Establecimiento de las poblaciones de hormigas en las nuevas plantaciones por lo tanto se puede prevenir mediante el uso de cebo o polvos adecuados sobre la entrada de los nidos, en otros casos con el uso del espray de químicos específicos para las hormigas aplicados a los márgenes de las nuevas plantaciones y zonas adyacentes. Algunas colonias en el campo puede sobrevivir a través de la preparación de la tierra, pero son incapaces de sobrevivir hasta la obtención de una alimentación adecuada que pueden no llegar a encontrar y suelen desaparecer. Si es necesario, pueden ser controlados por cebos y fumigaciones en toda la plantación entera (Vargas, 2009). En la actualidad en Costa Rica en el manejo convencional de la cochinilla se utiliza el diazinon como producto químico “estrella”, el cual posee banda toxicológica amarilla, obteniéndose excelentes resultados de control y asegurándose una fruta libre de la presencia del insecto; el diazinon actúa por contacto directo y las empresas dentro de su programa de aplicaciones la realizan cada 37 y 25 días en promedio en preinducción y postinducción respectivamente utilizando una dosis de 1.8 L/ha de i.a. en preinducción y de 0.6 a 1.5 en postinducción; este producto es un organofosforado, su uso inadecuado puede constituirse en un riesgo sobre la salud humana y de otras formas de vida a causa de la inhibición de la acetilcolinesterasa (Coto *et al* 2004).

Control Cultural.

Se recomienda que los campos infestados deben ser entregados a una rotación de cultivo y eliminar todos los residuos de los cultivos y quemarlos. Residuos de cosechas y vecinos que no controlen el problema en campo son lugares que pueden albergar poblaciones de la cochinilla hasta la nueva siembra. Los límites del campo deben mantenerse limpios de malezas y los desechos que puedan apoyar el desarrollo y establecimiento de cochinillas entre o cerca de las plantaciones debe ser erradicado. Las malas hierbas también proporcionan fuentes alternativas de alimentos que mantienen las poblaciones de hormigas entre los períodos en que las infestaciones de la cochinilla son pequeñas; otra alternativa y como bien la indica Jimenez, 1999; los extractos botánicos a base de los aceites esenciales del chile, ajo y motaza mezclados con jabones de sales potásicas se han obtenido frutas libres de cochinilla; aunado a este manejo amigable, se han utilizados al octaborato de sodio y al ácido bórico para el control de hormigas que mantienen una relación simbiótica con las cochinilla.

Control Biológico.

Hay muchos enemigos naturales de esta cochinilla en los sitios donde ha sido reportado su ataque. Los parásitos encontrados son: *Cariocus Aenasius* Compere, *Colombiensis Aenasius* Compere, *Ananatis Anagyrus* Gahan, *Propinquus Euryhopauus* Kerrich, *Pseudococcina Hambletonia* Compere y *Abnormis Ptomastidae* (Girault). Sus depredadores incluyen: ***Cryptolaemus montrouzieri*** Mulsant, *Lobodiplosis pseudococci* Felt, *Bilucernarius Nephus* Mulsant, *Scymnus* (Pullus) *unicatus* Sicard y *Pictus Scymnus* Gorham. Aunque muchos de los enemigos naturales de la cochinilla de la piña se encuentran, presentan un control mínimo de protección, si las hormigas están atendiendo la colonia de la cochinilla (Cock,1985).

El depredador *Cryptolaemus montrouzieri* Muls Coccinellidae, Coleoptera

Esta mariquita es originaria de Australia y se utiliza en muchos países del mundo para el control biológico de cochinillas, escamas, áfidos, huevecillos y larvas pequeñas de insectos dañinos. La plaga conocida como “cochinilla harinosa” ***Dysmicoccus brevipes***, es muy destructiva y ataca a más de 200 géneros de especies de plantas incluyendo cultivos alimenticios, ornamentales y forestales. Esta plaga cosmopolita en los últimos años ha invadido a muchos países y ya se encuentra en casi todas las islas del Caribe, Centroamérica, Estados Unidos y muchos países de Suramérica. Se ha demostrado en los países que tienen esta plaga que el único método práctico viable para el combate de la “cochinilla harinosa” es por medio de sus enemigos naturales como lo es *Cryptolaemus montrouzieri* Muls (Cruz *et al*, 1990).

Este escarabajo fue importado a los Estados Unidos en 1891 de Australia por uno de los primeros pioneros de control biológico, el Dr. Albert Koebele, para controlar la cochinilla de los cítricos en California. Aunque *C. montrouzieri* inicialmente ha devastado las poblaciones de la cochinilla de los cítricos en plantaciones de cítricos, no pudo sobrevivir el invierno, excepto en las zonas costeras (Schroth *et al*, 1981). *Cryptolaemus montrouzieri* es un pequeño coleóptero, de unos 3-4 mm de largo, llamado “Mariquita” o “Vaquita” es de color marrón oscuro con un bronceado a la cabeza de color naranja y la parte posterior del abdomen (Figuras 2). Las larvas crecen hasta 1,3 cm de longitud y tienen apéndices de cera de aspecto lanoso, lo que les hace parecerse a las cochinillas, aunque son casi dos veces tan grande como la cochinilla de los cítricos. Típica es la secreción de excrecencias blancas, debido a esta, la larva y su presa se parecen mucho; no obstante, la larva de *Cryptolaemus* es mas larga, más móvil y la excrecencia cerosa de mayor longitud. Las hembras adultas de *C. montrouzieri* ponen huevos de color amarillo. Los huevos eclosionan en larvas en unos 5 días a 27 ° C (80 ° F) y las tres últimas etapas larvales que duran entre 12 a 17 días es el período durante el cual las larvas se alimentan de huevos de cochinilla, orugas jóvenes, y la secreción azucarada producida por éstas. Este depredador pupa en lugares protegidos en los tallos o en las estructuras de efecto invernadero. Los adultos emergen después de 7-10 días y pueden llegar a vivir hasta cuatro meses. Cuatro días después de emerger, las hembras comienzan a ovipositar , vive aproximadamente 2 meses y pone 10 huevos al día en promedio, dentro de las colonias de cochinilla harinosa ó grupo de huevos, el total de huevos por vida de una hembra adulta puede ser de unos 400 (Chet,1993). La duración del desarrollo de huevo a larva depende sobre todo de la temperatura. La duración es de 32 días a 24° C. *Cryptolaemus* es muy activo cuando el tiempo es soleado, una temperatura de 22 - 25°C y una humedad relativa de 70 - 80% son idóneas para la multiplicación y reproducción de éste insecto. La mariquita no es activa (diapusa) cuando la temperatura es menor de 16°C. o temperaturas mayores de 33°C confunden el comportamiento de búsqueda (Schroth *et al*, 1981).



Figura 2. Estado adulto de *Cryptolaemus montrouzieri* depredador de *Dysmicoccus brevipes* (Tomado de: <http://www.coccinellidae.cl/paginasWebChile/ImagenesOriginal/Chinitas/cryptomonstruo.jpg>)

C. montrouzieri se alimenta de varias especies de “Cochinillas”; por la voracidad de sus larvas, se alimentan de todas las etapas larvales y de los adultos de su hospedante, algunos autores reportan que una sola larva puede consumir hasta 250 cochinillas pequeñas (Figura 3). Las liberaciones en campo de éste depredador son más eficaces cuando las poblaciones de la cochinilla son altas y pueden hacerse repetidas si las poblaciones de la cochinilla son bajas; aunque los adultos y las larvas jóvenes prefieren alimentarse de huevos de la cochinilla, las larvas de mayor tamaño atacan a cualquier etapa su hospedante. Los adultos pueden volar y cubrir grandes áreas en busca de comida; si los niveles

poblacionales de la cochinillas son bajos, van a volar en busca de otros insectos relacionados, por ejemplo, áfidos y escamas, aunque la reproducción es considerablemente mayor en las cochinillas (Chet,1993).



Figura 3. Estado adulto de *Cryptolaemus montrouzieri* depredador de *Dysmicoccus brevipes* alimentándose de colonias en frutos de piña.

Al igual que otras mariquitas, *C. montrouzieri* tiende a dispersarse cuando se suelta en campo. Estudios recientes han demostrado que los adultos y las larvas pasan más tiempo en la búsqueda de una hoja llena de cochinillas con secreción azucarada que si la mielecilla estuviese ausente. Hay también experiencia del control de la cochinilla bajo condiciones de invernaderos (Ito, 1983).

MATERIALES Y METODOS:

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biocontroladores del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) y en el invernadero de docencia perteneciente a la Escuela de Biología del ITCR en Cartago. El trabajo se dividió en dos etapas fundamentales, la primera:

1. Colecta en campo de *Dysmicoccus brevipes* y *Cryptolaemus montrouzieri*

1.a.- Colecta en campo de *Dysmicoccus brevipes*

El trabajo comenzó con la captura en campo de colonias de cochinilla harinosa de la especie *Dysmicoccus brevipes*. Para esto se realizaron colectas de material vegetal (principalmente hojas) como primera opción por los daños reportados en plantaciones de piña orgánica (ubicadas en la zona de La Virgen de Sarapiquí de la provincia de Heredia) específicamente en la finca Colins Street Bakery (Corsicana), la cual presentaba antecedentes y/o sintomatología de ataques y altos niveles poblacionales de ésta plaga. Con la ayuda de cuchillos y tijeras de podar, así como también pala y pico se procedió a ubicar las plantas de piñas que presentaban mayor cantidad de individuos en las colonias de cochinillas tanto de ninfas como de adultos; con la ayuda de una lupa de campo se procedió a colectar aquellas colonias que tuviesen gran cantidad de huevos, los cuales eran fácilmente reconocidos por la lanosidad característica de color blanco que los recubre. En recipientes plásticos y con la ayuda de una tijera de podar se extraían las colonias de las bases de las hojas de piña y parte del pseudo tallo y eran colocadas en su interior para ser transportadas al laboratorio de Biocontrol en el CIB para el establecimiento de las primeras poblaciones que permitieron el inicio del pie de cría del insecto plaga.

Los recipientes plásticos en los que fueron transportados los insectos plagas previamente fueron recubiertos por una malla antiáfidos, esto con el fin de facilitar la respiración del insecto y evitar la entrada de algún otro artrópodo que pudiese ser transportado al laboratorio de Biocontrol en el CIB. Al llegar las muestras al laboratorio y con la ayuda de un estereoscopio y aumento 8X se procedió a verificar que las colonias transportadas se correspondían al hospedante *Dysmicoccus brevipes*.

Otra manera en que se recolectaron los especímenes en campo fue directamente sobre frutos de piña afectados en campo por la plaga, para ello se procedió a identificar aquellas frutas en las que las colonias de la plaga eran bastante numerosas o por la gran cantidad de hormigas en las plantas de piñas afectadas por la cochinilla. Con la ayuda de un cuchillo se cortaron tratando de no perder individuos de la colonia, luego, esas piñas fueron colocadas en recipientes plásticos a los cuales también se les había colocado una malla antiáfidos que permitiera la libre circulación del aire dentro del envase sin dejar entrar cualquier otro insecto a su interior, una vez llegadas al laboratorio las piñas fueron colocadas dentro de cámaras Flanders para favorecer el crecimiento y desarrollo de la colonia bajo condiciones del invernadero de docencia de la escuela de Biología.

1.b.- Colecta en campo de *Cryptolaemus montrouzieri*

Similar a la metodología anterior, se colectaron muestras en campo de hojas de piña infestadas por cochinilla harinosa, buscando a la vez mediante una lupa de campo la presencia de larvas y/o huevos del coccinélido *Cryptolaemus montrouzieri* las cuales se caracterizaban por ser del tipo elateriforme con propatas muy marcadas y de gran movilidad. También se colectaron masas de huevos que fueron depositadas por lo general en el envés de la hoja o muy cercanas a la base de cada hoja de la planta para evitar la desecación de los mismos; los huevos estaban agrupados en masa y eran de color blanquecinos fácilmente identificables a simple observación visual; una vez colectadas las larvas y/o los huevos fueron trasladados al laboratorio de Biocontrol del CIB en recipientes plásticos cubiertos de malla antiáfidos que permitía la libre circulación de aire, a los recipientes que contenían larvas del depredador se les colocaron colonias de cochinilla harinosa para que no murieran por inanición durante su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio se examinaron exhaustivamente bajo lupa 8X las muestras colectadas con la finalidad

de determinar que efectivamente la presencia de larvas y/o huevos correspondían al depredador *C. montrouzieri*, y no a otro depredador que también pudiera encontrarse en el campo.

2. Mantenimiento del Hospedante:

Una vez que las muestras llegaron al Laboratorio de Biocontroladores fueron transferidas a cámaras Flanders sobre plantas de piña ornamental de unos 6 meses de edad aproximadamente (Figura 4A), las cuales antes de ser colocadas dentro de las cámaras, eran desinfectadas con 3cc/L de Piretrina y 5cc/L de jabón potásico de manera tal de garantizar que las plantas hospedantes solo permitieran el desarrollo y el crecimiento del pie de cría de las colonias de *D. brevipes* para no obtener falsos positivos en el establecimiento del hospedante a pesar de que el uso de estos productos presentan un efecto secundario de mortalidad. Luego se contaban 50 individuos los cuales eran introducidos en cada planta y se colocaron 2 plantas/cámara/semana durante 4 semanas llevándose el registro semanal del porcentaje de sobrevivencia y el de multiplicación registrando en bitácora los datos que permitieron determinar su ciclo de vida (Figura 4B). De la misma manera en otra cámara Flander se colocó sobre un ayote previamente desinfectado con 3cc/L de Piretrina y 5 cc/L de jabón potásico colonias de 50 individuos de la cochinilla harinosa, las cuales al igual que el pie de cría sobre piñas ornamentales eran evaluadas semanalmente. Por último se tomaron tubérculos de papa brotados a los cuales se les desinfecto con una limpieza con jabón potásico + GA₃ al 0,25%, 0,5%, 0,75% respectivamente y se mantuvieron en el laboratorio de Biocontroladores bajo dos condiciones una de luz y otra de oscuridad para medir el porcentaje de sobrevivencia y crecimiento de la colonia de *D. brevipes*.



Figura 4. A Piñas ornamentales mantenidas bajo condiciones de invernadero que sirvieron como planta hospedante de *Dismicoccus brevipes*. B Dos plantas de piñas inoculadas con el hospedante dentro de la cámara Flander.

3. Reproducción de *C. montrouzieri*

Para la reproducción y crianza masiva del depredador bajo condiciones de laboratorio se procedió de la siguiente manera:

a. Primera dieta: Mediante el uso de una dieta artificial basada en Singh (1997).

Una de las opciones para la reproducción de *C. montrouzieri* fue la elaboración de una dieta artificial, que cumpliera con los requerimientos alimenticios de dicho coccinélido, permitiéndole el desarrollo normal de todo su ciclo de vida, y facilitando de esta manera la reproducción comercial del mismo. La dieta artificial formulada por Singh (1997) y empleada con éxito para la reproducción de insectos de la familia *Coccinellidae* es la siguiente:

a.1.- Composición de la dieta:

Ingrediente	Cantidad
Agar	1,3g
Azúcar	16g
Miel	6g
Agua	100ml
Jalea real	4,5g
Harina de soya	0,5g
<i>D.brevipes</i> (seca y pulverizada)	2g

Fuente: Singh 1997

a.2.- Preparación de la dieta:

De acuerdo a lo planteado por Singh (1977), primero en un recipiente de vidrio se disolvió el agar con el azúcar, la miel y el agua, la cual previamente se ha llevado a una temperatura entre 35-38°C; posteriormente se agregó la jalea real a la solución y se revolvió lentamente con una espátula de aluminio hasta obtener una emulsión homogénea. Seguidamente se agregó la harina de soya y la presa seca pulverizada revolviendo vigorosamente; de ser necesario para dar consistencia a la mezcla en algunos casos se tuvo que añadir una parte extra de jalea real. Seguidamente esta dieta se sometió a esterilización en autoclave por espacio de 20 minutos a razón de 1.2 atm. Finalmente, si el caso lo ameritaba y por la baja población de individuos en el laboratorio, el sobrante de la dieta se almacenó a una temperatura aproximada de 5°C en el refrigerador.

a.3.- Evaluación de la dieta

Para la evaluación de la palatabilidad y gusto por parte de los insectos de la dieta artificial se tomaron un total de 50 adultos y 10 larvas recién nacidas, que se distribuirán en dos baterías de microjaulas tipo Flanders. En cada batería, se colocaron 10 placas petri, cada una cubierta en su base con papel bond blanco #20 para facilitar la limpieza de estas. Los adultos y larvas de *C. montrouzieri* fueron distribuidos aleatoriamente a cada una de las placas petri; dos larvas y cinco adultos por cada placa. En cada una de las jaulas se distribuyó la dieta artificial dentro de cada placa en pequeñas cantidades, no mayor al tamaño de una arveja; luego, se cubrieron con sus respectivas tapas. La dieta se revisó cada dos días para así evitar su descomposición, eliminando con la ayuda de un pincel cada vez que fuese necesario todos los restos de los días anteriores que los insectos no hayan consumido o resto de los excrementos generados por éstos. Las baterías se ubicaron en mesones en el invernadero de docencia de la Escuela de Biología con una temperaturas entre 16-25°C y una humedad relativa de 40-70%.

El experimento y la toma de datos se basó en la observación de *C. montrouzieri* con respecto a su alimentación, y desarrollo. Los estudios se realizaron por separado, correspondiendo el primero al estudio de las etapas larvales hasta la fase de pupa y el segundo estuvo directamente relacionado con el comportamiento de los adultos. En el primer ensayo se registró el tiempo de sobrevivencia expresado en días y/o horas, también la evolución del estado de las larvas y su evolución completa de ciclo de vida (huevo-larvas-pupas-adultos). En el segundo ensayo se registró cada semana la sobrevivencia de los adultos respecto al alimento que reciben expresado en días, identificación de sexos, cópula y número de

huevos depositados por cada hembra. El estudio, tanto para las larvas como para los adultos, consistió en las observaciones durante 71 días las cuales se reportaron en la bitácora respectiva. Las mediciones o lecturas semanales, en la que se reportaron los conteos y la observación diaria de la cantidad de *C. montrouzieri* vivos en cada una de las placas petri contenidas dentro de las jaulas Flanders también se registraron en la Bitácora.

b. Segunda Dieta: Mediante el uso de calabazas para la reproducción del hospedante

La otra forma de reproducción para el hospedante se realizó utilizando calabazas o ayotes frescos (*Cucurbita maxima*) de un tamaño mediano y de un peso entre 1 a 1,5 Kg aproximadamente. Las calabazas seleccionadas como material de reproducción del hospedante no fueron tratadas químicamente con insecticidas a base de Imidalcroprid como ingrediente activo, no presentaban golpes o heridas para que no afectaran el normal desarrollo de las colonias de *Dysmicoccus brevipes*.

Las calabazas se mantuvieron frescas dentro de las jaulas Flanders y fueron inoculadas con colonias de individuos de *Dysmicoccus brevipes* (aproximadamente 4 focos del hospedante /calabaza). Antes de colocar las calabazas en las jaulas tipos flanders fueron lavadas con agua de chorro y seguidamente asperjadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% para luego dejarlas secar sobre papel absorbente. Con la ayuda de un pincel se colocó la solución de hipoclorito al 3% sobre el corte del pecíolo. Cada dos semanas y dependiendo de la cantidad de individuos del hospedante que había bajo crianza, se tomaron las calabazas y fueron contaminadas con colonias de *Dysmicoccus brevipes*; seguidamente se comenzó una observación diaria sobre las colonias del comportamiento del depredador *C. montrouzieri* y se registraron datos de sobrevivencia y establecimiento sobre la colonia del hospedante evaluando las etapas juveniles, pupas y nueva emergencia de los adultos (Figura 5 A y B).



Figura 5 A. Ayotes (*Cucurbita máxima*) tiernos inoculados con poblaciones de *D. brevipes* **B** Baterías de jaulas Flanders colocadas bajo condiciones de invernadero con temperaturas promedios de 16-25°C y humedad relativa entre el 40 al 70%.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Colecta en campo de *Dysmicoccus brevipes* y *Criptolaemus montrouzieri*

Con la finalidad de establecer un pie de cría del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del enemigo natural *Cryptolaemus montrouzieri* en las instalaciones del laboratorio de Biocontroladores del CIB se realizaron colectas en diferentes zonas de Heredia y Cartago. La colecta más importante para el establecimiento del pie de cría se originó a partir de frutos de piña infestados por grandes colonias de por *D. brevipes*, en la finca orgánica “Corsicana” ubicada en La Virgen de Sarapiquí (Figura 6 A y B). Esta finca se seleccionó por el manejo orgánico que se le da a la plantación que garantizó durante el ensayo que las muestras estuviesen libres de agroquímicos y por ende libre de efectos residuales que afectaran el establecimiento de la colonia. De forma contraria se pudo observar que iniciar con muestras contaminadas con agroquímicos indujo a resultados con un mal establecimiento del pie de cría del hospedante y consecuentemente con malos rendimientos en la multiplicación del enemigo natural, por lo que se considera de importancia que el material colectado debe provenir preferiblemente de empresas o fincas en donde el manejo de agroquímicos sean en la menor cantidad posible que permita un establecimiento de la colonia en laboratorio más rápido y por lo tanto el porcentaje de sobrevivencia aumente. Tanto las colectas del hospedante como la de su depredador llegaron en perfecto estado a las instalaciones del Laboratorio de Biocontroladores en el CIB. No se reportaron insectos muertos durante el traslado del campo hasta el laboratorio.

2.- Establecimiento del insecto plaga *Dysmicoccus brevipes*

Los insectos hospedantes una vez que llegaron del campo fueron establecidos en tres cultivos (Cuadro 1). Todas las plantas colectadas en campo se encontraban infestadas por *D. brevipes* lo que facilitó su establecimiento bajo condiciones de invernadero en cámaras Flanders (Cuadro 1).

Cuadro 1. Plantas hospederas utilizadas en el desarrollo de los insectos.

Planta seleccionada	Sitio de colecta	Estado de la planta	Tratamiento de desinfección y mantenimiento
Frutos de Piña* (<i>Ananas comosus</i>)	Heredia, Sarapiquí. Finca Corsicana	Cosecha, Planta madura e infestada	0% aplicaciones de insecticidas, fungicidas, herbicidas.
Plantas Ornamentales de Piña	Heredia, Sarapiquí. Finca Corsicana	Siembra, Planta en pote, No infestada	a. 3cc/L de Piretrina b. 5cc/L de jabón potásico
Ayotes	Cartago, Feria Orgánica	Cosecha, Planta tierna, No infestada	a. 3cc/L de Piretrina b. 5cc/L de jabón potásico
Papa	Cartago, Feria Orgánica	Cosecha, No infestado	Limpieza con jabón potásico + GA ₃ al 0,25%, 0,5%, 0,75%. En condiciones de Luz y Oscuridad.

*Los frutos de piña fueron colectados con la finalidad de obtener el pie de cría de *D. brevipes* y no para el proceso de multiplicación del insecto.



Figura 6. A. Características de frutas seleccionadas como fuente de inóculo para el pie de cría. B. Colonias de *D. brevipennis* colectadas en La finca Corsicana en Sarapiquí de Heredia.

Por la alta incidencia del hospedante *D. brevipennis* en frutos de piña, se determinó que *Ananas comosus* podría ser una planta importante para el establecimiento del pie de cría. Para los tratamientos de desinfección realizado se determinó que el jabón potásico no tuvo un efecto secundario sobre las colonias establecidas, con una residualidad de 0 días antes de la introducción del hospedante; en el caso de la piretrina se determinó que el efecto secundario fue de 0-25% de mortalidad con una residualidad desconocida. De acuerdo a los diferentes tratamientos (Cuadro 2) se observó que el tratamiento en el que se utilizó sales potásicas fue en el que se dio un desarrollo poblacional más estable del hospedero *Dysmicoccus brevipennis* observación que no sucedió en aquellas tratadas con piretrinas en donde el porcentaje de mortalidad de la colonia fue mayor y el establecimiento de la colonia se vio retardado.

Cuadro 2. Número promedio de cochinillas ninfas por tratamiento y tiempo

Tratamiento	Semana								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Piretrinas	17.25	33	16.5	15.25	19	18.25	22	70.75	18.5
Sales potásicas	16.5	16.5	17.25	35.25	25	29.75	29.25	54	39.25
Agua	5.5	17	1.25	55	8.75	20	36.75	15.25	19.75

De la misma manera y según lo reporta Chet, (1993) evidencia que existió una alta incidencia del hospedante *D. brevipennis* en los frutos de piña que les permitió determinar que *Ananas comosus* era una planta importante y excelente para el establecimiento del pie de cría bajo las condiciones de laboratorio que utilizó con temperaturas de 28°C y humedad relativas del 55%. Este mismo autor reporta que la desinfección el jabón potásico no tuvo un efecto secundario sobre las colonias establecidas de *D. brevipennis*, pero si vió las colonias afectadas con el uso de insecticidas organofosforados.

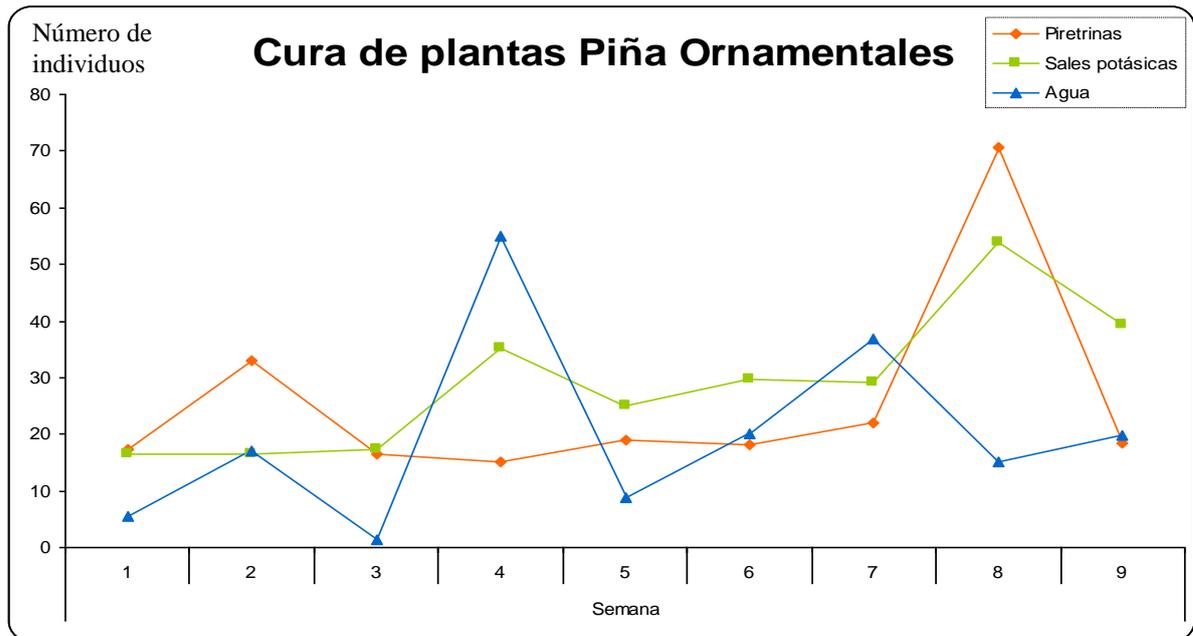


Figura 7. Movimiento de la población de *Dysmicoccus brevipes* posterior a la desinfección de los materiales con diferentes compuestos químicos.

El efecto de los diferentes compuestos utilizados en la desinfección sobre el establecimiento de la colonia o pie de cría es variable (Figura 7). Estos tratamientos presentaron grandes fluctuaciones en las poblaciones para el establecimiento del pie de cría del hospedante; sin embargo, se puede observar los grandes cambios como los picos que corresponden a las semanas 4 y 8 en donde se hicieron reintroducciones del hospedante, posiblemente por el efecto de la baja temperatura en el invernadero donde se estableció el ensayo.

Coincidentalmente a los resultados obtenidos y según lo reporta Beardsley, (1982) en los estudios en Hawai, el marchitamiento de piña causada por *Dysmicoccus brevipes*, coincide con lo observado en nuestro caso ya que los síntomas típicos aparecieron por primera vez 46-65 días después de la cochinilla se colocaron en las plantas de piña ornamental. Cuando las plantas fueron infectadas durante el período a mediados del crecimiento, el retraso antes de la aparición de los primeros síntomas era de aproximadamente dos semanas ya que cuando estaban infestadas las plantas o se encontraban en la fase de diferenciación de brotes la aparición era más rápida; sin embargo, el daño máximo se produjo al mes de inoculado el hospedante, lo que representó un menor tiempo en comparación con los dos meses que se necesitaron cuando la infestación de las plantas de piña se había producido temprano en la temporada de crecimiento. Los Coccidos alimentados en la parte inferior de las hojas en general fueron más abundantes entre el 11-30a de las hojas del centro de la planta. Las plantas marchitas de la que *D. brevipes* había sido eliminado producido hojas sanas y nuevas centrales una vez que la colonia fue retirada de la planta hospedante y se colocó sobre el mesón de trabajo en el invernadero de docencia de la Escuela de Biología. La recuperación fue más rápida después de la infestación en el período comprendido entre mediados de crecimiento reproductivo que después de la infestación en la etapa de plántula. Prácticamente no había signos de recuperación cuando las plantas habían sido infectadas en la fase de diferenciación de yemas.

A pesar de las introducciones de nuevos individuos se puede evidenciar que los tratamientos, para el caso de las aplicaciones de sales potásicas se mantienen con mayor estabilidad en relación con el tiempo; a diferencia de las piretrinas que en el momento en que pierden su efecto residual se observa un incremento inmediato de las poblaciones, el cual baja posteriormente al igual que los otros tratamientos. Esta deducción para todos los tratamientos en la semana 9 se debe a la vida útil de los materiales vegetales seleccionados para los mismos. La utilización de Ayotes (*Cucurbita maxima*) como un sustituto de la

calabaza por su cercanía taxonómica también es reconocido por Vargas Carrillo (2009) de la misma manera para el establecimiento de *C. montrouzieri*. Para los ensayos realizados se obtuvo que hubo diferencias en el establecimiento de la colonia dependiendo del estado de madurez, siendo menor en los ayotes sazones y mayor en los ayotes tiernos (Figura 8). Para el establecimiento del hospedante se inicio realizando introducciones de hasta 50 individuos por semana para todos los tratamientos (Figura 9).



Figura 8. Tipos de ayotes seleccionados para inocular *D. brevipes*. A. Ayote sazón B. Ayote Tierno.

En las condiciones bajo las cuales se realizaron los ensayos arrojan resultados que cuando las condiciones controladas fueron favorables para las colonias entonces se vio favorecido el establecimiento del hospedante. En cuanto a los tipos de ayotes se determinó que el ayote tierno fue el que presento mayor número de individuos y por ende mejor establecimiento de la colonia de *D. brevipes*. En cuanto al establecimiento de la colonia en brotes de papa (*Solanum tuberosum*) con *D. brevipes* se inicio con el desarrollo del material vegetativo; los brotes de papa de acuerdo a Porcuna *et al.* 2001 se obtienen por inmersión temporal en medio líquido de GA₃ (Acido Giberélico). Por lo que para poder determinar la mejor forma de desarrollo de brotes se probaron diferentes dosis (Cuadro 1). Como resultado de las diferentes dosis de GA₃, se obtuvieron diferentes desarrollos de brotes en semillas de papa mantenidas en oscuridad y a la luz (Figura 4). Mediante las observaciones realizadas se determinó que el 100% de tubérculos con mayor desarrollo de brotes se dio en la concentración 0,75%, y al comparar las diferentes condiciones lumínicas se observó que las semillas de papa colocadas en la luz obtuvieron un mayor número de brotes y mayor tamaño; no obstante, la literatura reporta que los brotes etiolados, los cuales se obtienen en condiciones de oscuridad, son los más utilizados para el establecimiento y multiplicación del insecto hospedante (Figura 10) (Marco, 2007).



Figura 9. Establecimiento de *D. brevipes* en diferentes estados de madurez de fruto de ayote. A. Ayote tierno con presencia de *D. brevipes* con colonias superiores a 50 individuos, B. Ayote sazón, con una baja presencia de *D. brevipes* con poblaciones menores a 10 individuos.

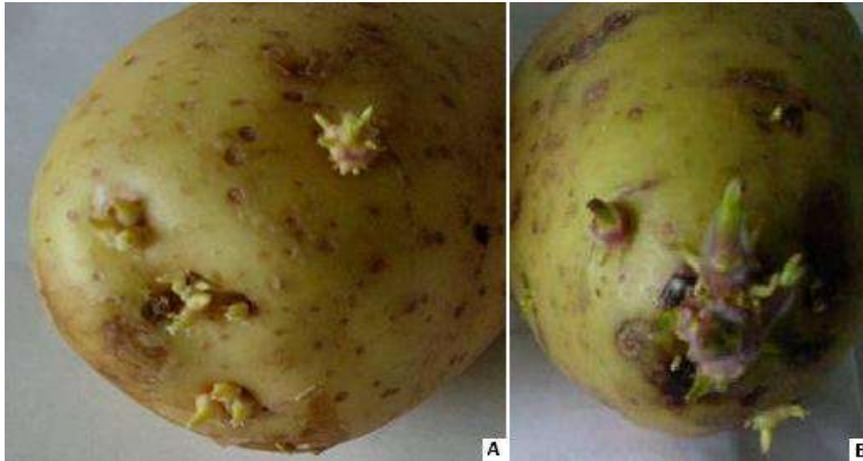


Figura 10. Desarrollo de brotes en papa, para el establecimiento de *D. brevipes*. A. Desarrollo de brotes a 0,75% de GA₃, con presencia de etiolación, B. Desarrollo de brotes a 0,75% de GA₃ con presencia de clorofila.

3.- Ciclo de vida de *Dysmicoccus brevipes*

Dismicoccus brevipes posee reproducción sexual y asexual llamado partenogénesis, en el que las larvas de las hembras sin fertilizar por los machos originan individuos femeninos; no obstante cuando hay intervención del macho entonces la descendencia es de ambos sexos. El ciclo de vida de *D. brevipes* fue ampliamente estudiada por Ito (1983) y coinciden sus resultados con los reportados bajo las condiciones desarrolladas en ésta investigación. En general éste insecto pasa por tres estadios larvales antes de convertirse en un adulto. La esperanza de vida reportada (desde el primer instar a la muerte como adulto) fue de 78 a 111 días, con un promedio de 95 días, misma que reporta Ito (1983).

Huevos

En ésta especie las hembras no ponen huevos porque son ovovivíparos, es decir, los huevos eclosionan dentro de la hembra y de ella salen vivas las larvas del primer instar. No se determinó para esta etapa un valor promedio por cuanto la mayoría de las cópulas no eran efectuadas por los insectos durante el día, lo que no permitió reportar el dato desde la cópula hasta la emergencia del primer instar.

Las larvas

Las larvas, son la etapa de dispersión primaria de la cochinilla *D. brevipes* y atraviesa tres instares los cuales se caracterizan por tener cuerpos aplanados con pelos largos que ayudan a su dispersión por el viento y son protegidos bajo el cuerpo de la madre durante un corto tiempo antes de desarrollar una capa de cera, se determinó al igual que Bennett *et al*, (1982) que éstas cumplen los siguientes tiempos por estadio la del primer estadio tiene una duración de 10 a 26 días en promedio, el segundo instar de 6 a 22 días y el tercer y último instar entre los 7 a los 24 días. Así, el periodo larval total varía de 26 a 55 días, con un promedio de 34 días. Dentro de las observaciones realizadas se evidenció que las larvas sólo se alimentan desde el primer estadio hasta la primera parte del segundo instar.

Adultos

Las hembras adultas son gordas y convexas en la forma del cuerpo y de color blanco semirosado en su parte dorsal. Filamentos de cera laterales son generalmente menos de un cuarto del tamaño del ancho del cuerpo. Se contaron 17 pares de estos filamentos de cera alrededor del cuerpo de los adultos que coincide

con lo reportado por Alam *et al*, (1990) en la descripción de esta especie. No se pudo contabilizar el número de individuos por hembra adulta por la gran cantidad de individuos en las colonias que dificultó la toma de este dato; sin embargo, según Carter, (1993) una hembra adulta puede dejar unos 400 individuos durante su vida reproductiva y con un promedio de vida de unos 56 días. Los machos son de menor tamaño que la hembra pero con las mismas características morfológicas que describen a éstas y además poseen una diferencia en el número de segmentos antenales que puede ser entre 8 a 10 segmentos.

Comportamiento

Durante el ensayo y mientras las plantas hospedantes permanecieron en las cámaras Flanders, las colonias de Cochinillas por lo general se concentraron en la base de las hojas de sus plantas hospedantes en donde se encontraban succionando la savia de las plantas de piña y estaban protegidas de la acción de sus depredadores o la acción del clima a excepción de aquellas criadas sobre ayotes y tallos etiolados de papa, observación que también reportan Alam *et al*, (1990). A diferencia de las colectas realizadas en campo para el inicio y establecimiento del pie de cría de *D. brevipes* no presentó asociación simbiótica con hormigas que según varios autores como Beardsley *et al*, (1982), Alam *et al*, (1990) y Jiménez, (1999) son esenciales para el adecuado desarrollo de las colonias de las cochinillas de la piña; porque esos lugares ocultos en la base de la hoja de la piña le proporcionan el refugio a éstos insectos, la protección de sus depredadores y parásitos, y además son mantenidos limpios de las secreciones que se acumulan por la melaza segregada y que es perjudicial para la colonia (Jiménez, 1999). Debido al papel fundamental de las hormigas, las prácticas de control de éste insecto incluyen a menudo el control de las especies de hormigas que las atienden y las cuidan porque sin las hormigas, las poblaciones de la cochinilla tendrían movimientos muy pequeños y lentos para invadir nuevas áreas y con seguridad el campo estaría libre de un ataque severo de ésta plaga (Beardsley *et al*, 1982).

4.- Ciclo de vida del biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri*

Debido al poco desarrollo y reproducción del hospedante *D. brevipes*, en los diferentes sustratos utilizados durante el ensayo, no se pudo dar inicio con el pie de cría de *C. montrouzieri* que permitiera dejar el protocolo establecido para su reproducción exitosa bajo condiciones de laboratorio; sin embargo, en las plantas de piña colectadas en campo e infectadas con *D. brevipes*, se pudo observar y determinar algunas de las características y condiciones de desarrollo, así como también confirmar la actividad depredadora de este insecto biocontrolador (Figura 11).



Figura 11. Biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri* encontrado en una de las plantas de piña colectadas en campo; A. Estadio larval de *C. montrouzieri* depredando un adulto de *D. brevipes*; y B. Estado adulto de *C. montrouzieri* depredando ninfas de *D. brevipes*.

Características y condiciones desarrollo

Clase: Insecta

Orden: Coleóptera

Familia: Coccinellidae

Subfamilia: Scymninae

Genero: *Cryptolaemus*

Especie: *Cryptolaemus montrouzieri*

Se pudo evidenciar que la duración del ciclo de vida (Figura 6) es altamente dependiente de la temperatura y la humedad relativa presente en las cámaras Flanders. Bajo condiciones de alimentación óptimas, lo que significaría alimentar al depredador con todos los estadios de la presa (*D. brevipipes*), y a temperaturas de 26,6°C y humedad relativa de 75-80% el ciclo duró entre 28-32 días en promedio.

Huevos

Los huevos midieron en promedio 0,5mm de ancho por 1,0mm de largo, son de forma ovalada y alargados y de color amarillo; son depositados de a uno o en grupo, en medio de las masas algodonosas de las colonias de *D.brevipes* se observó que el período de incubación de los huevos estuvo regido por la humedad relativa y la temperatura. En circunstancias favorables, la incubación duró de seis a ocho días (Figura 12 A).

Larvas

Las larvas son de forma oblonga a ovaladas; recién eclosionadas miden aproximadamente 1mm de largo y tienen lanosidades cortas y ralas. El cuerpo es de color amarillo sucio, a medida que crecen se va cubriendo de largos filamentos lanosos de color blanco y forma triangular muy parecidos a los de su hospedante. La larva desarrollada mide aproximadamente 1cm de largo y 0,3cm de ancho, pero los filamentos la hacen parecer dos veces mas larga. La cabeza al igual que los últimos tres tarsos son negros y éste larval duró entre 18 a 20 días aproximadamente (Figura 12 B).

Pupas

La pupa mide cerca de 5mm de largo. Es de color blanco, esta cubierta por las lanosidades de la larva dándole aspecto de larva dormante. En el borde del abdomen de la pupa desnuda se observa una hilera de espinas cortas que seguramente le sirven de defensa y anclaje al sustrato. La duración del período de pupa bajo las condiciones del ensayo fue de 8 a 12 días aproximadamente.

Adultos

El adulto de *C. montrouzieri* mide 5mm de largo por 3mm de ancho, con la convexión característica de los coccinélidos; son de color negro excepto la cabeza, abdomen y la punta del ala posterior que son rojo-anaranjado. El cuerpo esta cubierto de cerdas cortas. La cabeza es muy pequeña en donde se destacan los ojos compuestos de color negro. El dimorfismo sexual es leve y la diferencia es que las coxas del protórax son de color anaranjado para los machos y negras para las hembras. Las temperaturas entre 16-25°C y una humedad relativa de 40-70% siendo estas condiciones ideales para el desarrollo de *C. montrouzieri* (Figura 12 C).

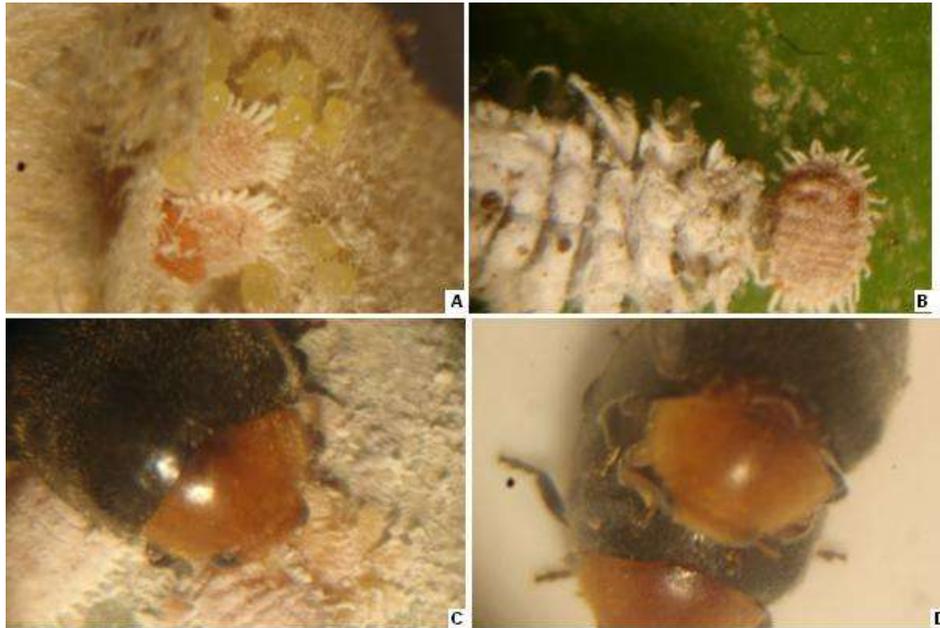


Figura 12. Ciclo de vida de *C. montrouzieri*. A. Huevo; B. Larva; C. Adulto D. Reproducción.

Cryptolaemus montrouzieri Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) es un importante depredador de *Dismicoccus brevipes* (Homoptera: Pseudococcidae). Su aplicación para el biocontrol de plagas de cochinilla se ha considerado una herramienta muy importante debido a que otros métodos de control como el químico por ejemplo ha resultado ineficaz por la capa cerosa que recubre al insecto-plaga y debido también a sus hábitos alimenticios y de ubicación en la planta hospedante (Porcuna *et al*, 2001 ; Vargas Carrillo, 2009). Se pudo observar bajo las condiciones controladas en las que se desarrolló el presente trabajo de investigación que se pudo determinar la capacidad y la eficiencia depredadoras de *C. montrouzieri* hacia *D. brevipes* mediante la confrontación de la larva de primer instar (L1), la larva de tercer instar (L3), y el adulto de *C. montrouzieri* y la ninfa 1 (N1), ninfa 2 (N2), ninfa 3 (N3), y hembra del hospedante *D. brevipes* en bioensayos a nivel de laboratorio. En los resultados obtenidos se observó que el adulto de *C. montrouzieri* es la etapa más depredadora y más eficiente comparada con las otras etapas de desarrollo de éste insecto, así mismo se observó que la L3 tiene una eficiencia de depredación similar a la del adulto y la L1 depreda significativamente menos a cualquier etapa de *D. brevipes*; la actividad depredadora de *C. montrouzieri* aumenta conforme se incrementa el desarrollo del insecto y cada etapa de desarrollo muestra una eficiencia de depredación diferente. Se observó que cuando el número de larvas en las placas petri era de 10 individuos se daba canibalismo entre las larvas. Según López (1991), el número de larvas por cada placa no debe ser mayor a dos debido a la existencia de canibalismo en *C. montrouzieri* en los primeros estadios larvales; lo que concuerda con lo planteado por Bhat *et al.* (1983), quien menciona que al escasear el alimento se produce el canibalismo entre larvas de los primeros instares.

CONCLUSIONES

- El mejor sistema de multiplicación bajo condiciones de laboratorio del coleóptero biocontrolador *Cryptolaemus montrouzieri* sobre su hospedante *Dysmicoccus brevipes* fueron las plantas de piña ornamentales (*Anana comosus*) mantenidas en cámara Flanders, seguida del ayote (*Cucurbita máxima*) y por último y menos favorable los tallos etiolados de papa (*Solanum tuberosum*).
- El ciclo de vida de *Dysmicoccus brevipes* se caracterizó porque el primer estadio larval tiene una duración de 10 a 26 días en promedio, el segundo instar de 6 a 22 días y el tercer y último instar entre los 7 a los 24 días, para un periodo larval total de 26 a 55 días, con un promedio de 34 días. Su ciclo de vida estuvo en promedio de huevo a adulto en 95 días.
- El ciclo de vida de *Cryptolaemus montrouzieri* a temperaturas de 26,6°C y humedad relativa de 40-75% el ciclo duró entre 28-32 días en promedio, con un estado larval de duración entre 18 a 20 días aproximadamente y un estado pupal entre 8 a 12 días.
- Se estableció que para la producción masiva del hospedante *Dysmicoccus brevipes* y del depredador *Cryptolaemus montrouzieri* bajo condiciones de laboratorio la planta hospedante que mejor responde a las necesidades de las colonias es la piña aisladas y mantenidas individuales y de unos ochos meses de edad aproximadamente.

RECOMENDACIONES

- Es factible que la variación climática generada dentro de la cámara Flanders haya afectado la tasa de multiplicación de ambas especies por lo que se recomendaría su evaluación bajo cámara climática.
- Los estudios de oviposición deberían ser realizados en el caso del predador con un número conocido de hospedantes que permitan ver la capacidad reproductiva de las hembras.
- Estos estudios preliminares podrían conllevar a la aplicación en campo del depredador con miras a cuantificar la acción Biocontroladora de *C. montrouzieri*, por lo que se sugiere llevar un pequeño ensayo en campo de una finca comercial.

Bibliografía Consultada

- ALAM, M. M., J. C. REID, and G. MULLE. 1990. The present status and future needs of biological control in the Caribbean community, *Caribbean meetings on Biological Control*, 5-7 November 1990, Guadeloupe, F.W.I.
- BHAT, P., M. CHACKO and K. SREEDHARAM, 1983. Biology of the ladybird beetle *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, a predator of mealybugs. *Placrosym standing committee 1983*: 221-226.
- BAKER, K.; COOK, R. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. WH. Freeman & Co. San Francisco, USA, 136p.
- BEARDSLEY, J.W. 1965. Notas sobre la cochinilla Piña complejo, con descripciones de dos nuevas especies (Homoptera: Pseudococcidae). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* 19 (1): 55-68.
- BEARDSLEY, J.W., T.H. SU, F.L. McEWEN, D. GERLING. 1982. Las investigaciones de campo sobre la relación de la hormiga de cabeza grande, la cochinilla de piña Gray, y la piña Wilt Cochinillas enfermedad en Hawai. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* 24 (1): 51-68.
- BENNETT, F. D. and M. YASSEEN. 1982. Parasite introduction for the biological control of three pests in the Lesser Antilles and British Honduras. *PANS* 18:468-474.
- CARTER, W. 1983. La cochinilla Piña, *Pseudococcus brevipes*, Y Wilt de Piñas. *Phytopathology* 23 (3): 207-242.
- CHET, I. 1993. *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wisley-Liss. New York. USA. 211 p.
- COTO D; PEREZ, J; VILLALOBOS, M. 2004. Insectos Plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central. Editorial CATIE, Turrialba, Costa Rica. Pág 232-234.
- COCK, M. J. W. 1985. Review of Biological Control of Pest in the Commonwealth Caribbean and Bermuda up to 1982. *Commonwealth Inst. Biol. Cont. Tech. Comm.* #9:244 pp.
- CRUZ, C. and A. SEGARRA. 1990. Recent biological control experiences in Puerto Rico, *Caribbean Meetings on Biological Control*, 5-7 November 1990, Guadeloupe, F.W.I.
- DEACON, J.; BERRY. L. 1992. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne planta pathogens. In: *Biological Control of Plant Diseases. Progress and Challenges for the Future*. Tjamos, E.; Papavizas, G.; Cook, R. Eds. Plenum Press. New York; USA p. 157-167.
- GONZALEZ, R. 1989. *Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile*. Santiago. Ed. Ograma S.A. 310 p.
- GONZALEZ, R. H. y ROJAS, S. 1966. Estudio analítico del control biológico de plagas agrícolas en Chile. *Agricultura Técnica* 26(4): 133-147.
- HILL, D.S. 1983. *Brevipes Dysmicoccus* (Ckll.), pp. 214. En *Agrícola de insectos plagas de los trópicos y su control*, 2nd Edition. Cambridge University Press. 746 páginas.
- ITO, K. 198. Estudios sobre las historias de vida de la cochinilla de piña, *Pseudococcus brevipes* (Ckll.). *J. Econ. Ent.* 31 (2): 291-198.
- JIMENEZ, J. 1999. Manual práctico para el cultivo de piña de exportación. Editorial Tecnológica de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Pág 106-109.
- LOPEZ, E. 1991. Control racional del chanchito blanco (*Planococcus citri* Riso) en chirimoyo mediante el uso de enemigos naturales. *La Palma*. N°1 p. 6-14.

- MARCO, M. 2007. Evaluación de tres dietas artificiales para la crianza de *Cryptolaemus montruzieri* Mulsant. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile. 38p.
- MONTE, E. 201. Understandig Trichoderma: between biotechnology and microbiol exologu. International Microbiology 4:1-4.
- PORCUNA, I. BOIX, C y JIMENEZ, A. 2001. Control biológico de plagas mediante el manejo de insectos útiles: los insectarios de la CAPA (on line)
[http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/Produ%E7%E3o%20Integrada%20na%20Uni%E3o%20Europ%E9ia/G\)%20Normas%20Tecnicas%20%20PI%20UE/G1\)%20Normas%20T%E9cnicas%20%20PI%20Espanha/G1.15\)%20Valencia/G1.15.5\)%20Artigos%20sobre%20PI/Controle%20Biologico.pdf](http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/Produ%E7%E3o%20Integrada%20na%20Uni%E3o%20Europ%E9ia/G)%20Normas%20Tecnicas%20%20PI%20UE/G1)%20Normas%20T%E9cnicas%20%20PI%20Espanha/G1.15)%20Valencia/G1.15.5)%20Artigos%20sobre%20PI/Controle%20Biologico.pdf). (Consultado 13-02-1010)
- ROHRBACH, K.G., J.W. BEARDSLEY, T.L. ALEMAN, N. J. REIMER y G. W. SANFORD. 1988. Cochinilla Wilt, gorgojos y hormigas en la piña. Plant Disease. 72 (7): 558-565.
- SCHROTH, M.; HANCOCK, J. 1981. Selected tropics in Biological Control. Anual Review of Microbiology. 35:453-476.
- SINGH, P. 1977. Artificial diets for insects, mites and spiders. 594 p. IFI Plenum Data Company, New York, USA.
- VARGAS CARRILLO, E. 2009. Propuesta de Alternativas de manejo de las principales plagas y enfermedades en el cultivo de la pina, basado en el uso racional de agroquímicos dirigidas hacia la reducción del escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe, Región Huetar Norte de Costa Rica. Poryecto GEF-PERCar, Costa Rica. 15 p.
- VAQUERANO, B. 2003. Plagsalud, Una Mirada al pasado, presente y futuro. OPS/OMS, PLAGSALUD, San José, Costa Rica.