

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DE 5 METODOS PARA EXTRACCION DE
HUEVECILLOS DE Diabrotica virgifera zea KRYSAN
AND SMITH COLEOPTERA: CHRISOMELIDAE EN
SUELO MAICERO DE AHUALULCO, JALISCO.

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
LAURA PATRICIA GOMEZ

GUADALAJARA, JAL. SEPTIEMBRE 1993



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número1326/90....

SRITA. LAURA PATRICIA GOMEZ
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EVALUACION DE 5 METODOS PARA LA EXTRACCION DE HUEVOS DE Diabrotica virgifera Zeas Krysan & Smith (Coleptera: Crysomelidae) EN SUELA MAIZERO DE ANUALILCO, JALISCO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la Biol. Gloria Abud Quintero.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara Jal., 14 de Septiembre de 1990



EL DIRECTOR

ADOPTO ESTE NOTA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS
 EL SECRETARIO

M.V.Z. MAGUEL CARRAJAL SORIA

c.c.p. La Biol. Gloria Abud Quintero; Directora de Tesis.- Pie.
 c.c.p. El expediente del alumno

cq/r.

C. Dr. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) Fasante LAURA PATRICIA GOMEZ código número 080419805 con el título EVALUACION DE 5 METODOS PARA EXTRACCION DE HUEVECILLOS DE Diabrotica virgifera zea Krynar AND SMITH (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE EN SUELO MAICERO DE AHUALULCO, JALISCO) consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

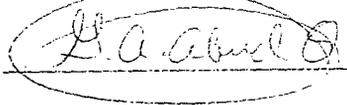
Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 18 de Agosto

1993

EL DIRECTOR DE TESIS



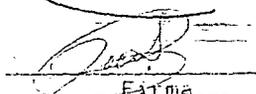
SINDDALES

1. M. en C. MARTIN PEDRO TENA MEZA
Nombre completo



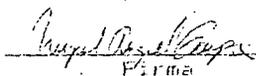
Firma

2. Biol. ROSIO T. AMPARAN SALIDO
Nombre completo



Firma

3. Biol. MIGUEL A. CAMPA MOLINA
Nombre completo



Firma

Evaluación de 5 métodos para extracción de huevecillos de
Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith (Coleóptera:
Chrysomelidae) en suelo maicero de Ahualulco, Jalisco.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A él por sobre todas las cosas, porque me dio la oportunidad del logro de mis metas y mis sueños.

A MI ESPOSO HECTOR MANUEL

Porque gracias a su cariño y apoyo incondicional, logre la realización de este trabajo. Gracias, con todo mi amor.

A MI ABUELITO MIGUEL GOMEZ

Por todo lo que me brindo en su vida, por su fe en mi y por sus sabios cosejos. A su recuerdo tan querido, dedico hoy esta tesis.

A MIS PADRES: MANUEL Y ESPERANZA

Por toda su ayuda, comprensión y amor, en los momentos en que mas necesite de ellos. Mil Gracias.

A MI ABUELITA JESUS, A MARTHA, A MIGUEL Y A MIS AMIGOS DE SIEMPRE.

A MI DIRECTORA DE ESTA TESIS

La Biol. Gloria Abud Quintero, por brindarme su apoyo y sabia colaboración para la realización de este trabajo, agradeciendole también, su amistad, paciencia y dedicación.

A MI ASESOR DIRECTO

El Biol. Jaime Reyes Rueda, por sus ideas y su experiencia que enriquecieron este trabajo. Por toda la ayuda que me brindo y por haberme motivado siempre para seguir adelante. A el con toda mi admiración y cariño.

A FRANCISCO VERA SORIA (Asesor Estadístico)

Por su esfuerzo, dedicación y apoyo, en la parte estadística de esta tesis y principalmente por su amistad. A él y a su colaboradora Monica gracias por siempre.

AL DR. BRANSON, F.T.

Con toda mi admiración y respeto por todas sus sugerencias que fueron muy valiosas en mi trabajo.

AL BIOL. LEONARDO URDIALES

Porque con sus importantes ideas se logro una mejor realización de este trabajo.

AL M en C. OSVALDO CAMACHO CASTILLO

Por su importante colaboración en la estadística de esta tesis.

A LA SARH Y EN PARTICULAR AL PROGRAMA DE SANIDAD VEGETAL

Por todas las facilidades que me otorgaron, para realizar este trabajo dentro de sus instalaciones.

Y gracias también a todos los que de alguna contribuyeron a la realización de esta tesis, en especial a la Facultad de Ciencias Biológicas.

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
ANTECEDENTES	8
OBJETIVOS	18
DATOS GEOGRAFICOS	19
METODOLOGIA	22
TRABAJO DE LABORATORIO:	
METODO 1	25
METODO 2	27
METODO 3	28
METODO 4	29
METODO 5	31
TRABAJO DE GABINETE	32
RESULTADOS	34
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
<p>Fig.1 a) Adulto de <u>Diabrotica virgifera zea</u> Krysan and Smith, segun Krysan et al, 1980.</p>	5
<p>b) Fémur y mancha característica, según Krysan et al, 1980.</p>	5
<p>c) Huevecillo mostrando su reticulación característica (40x).</p>	5
<p>d) Reticulación del huevecillo aumentada (700x). Tomado de Rowley and Peters (1972).</p>	5
<p>Fig.2 Ciclo de vida de <u>D. y. zea</u> en maíz de temporal, modificado de Félix y Reyes (1990).</p>	7
<p>Fig.3 Area principal de presencia de <u>D.y.zea</u> en Jalisco.</p>	9
<p>Fig.4 Mapa del estado de Jalisco mostrando el municipio de Ahualulco del Mercado y la localización del área de trabajo.</p>	20
<p>Fig.5 Modelo tradicional de muestreo " 5 de Oros". (Recomendado por la SARH).</p>	24

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla.1 Resultados observacionales de los huevecillos de <u>Diabrotica virgifera zea</u> Krysan and Smith, obtenidos de muestras de suelo, por tratamiento.	35
Tabla.2 Soluciones y densidades empleadas para la flotación de los huevecillos y tiempo de extracción de los mismos.	37
Tabla.3 Tabla de frecuencia para el Método 1.	39
Tabla.4 Tabla de frecuencia para el Método 2.	39
Tabla.5 Tabla de frecuencia para el Método 3.	40
Tabla.6 Tabla de frecuencia para el Método 4.	40
Tabla.7 Tabla de frecuencia para el Método 5.	42
Tabla.8 Medidas de tendencia central y dispersión.	42
Tabla.9 Análisis de Variancia.	44
Tabla.10 Prueba de Rango Múltiple de Duncan para comparación de medias.	44

RESUMEN

Siendo Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith, la principal plaga rizofaga del maíz de mayor incidencia en el estado de Jalisco y debido a su difícil detección en su estado de huevecillo, según algunos trabajos para su extracción reportados con anterioridad, y puesto que este estado de desarrollo es previo a la emergencia de las larvas que son las que causan el mayor daño a las plantas de maíz, se buscaron nuevos métodos que sirvieran para tal fin y resultaran adecuados para la infraestructura de nuestro país.

De esta manera, se pusieron a prueba 5 métodos, uno probado previamente y 4 adaptados por primera vez para la extracción de los huevecillos de este coleóptero, los cuales se basaron en las diferencias de densidad de ciertas soluciones químicas, resultando todos ellos aptos para este propósito, siendo el mejor el No. 4 que combinó un prelavado de las muestras y flotación con solución de azúcar, y el menos efectivo fue el No. 3 que involucró flotación con solución de azúcar con muestras en reposo.

INTRODUCCION

En México, el maíz constituye todavía la base de la alimentación para el área rural y urbana. Debido a esto se producen anualmente cerca de 10 millones de toneladas de este grano (Félix, 1986) y sólo Jalisco produjo 350, 000 toneladas en el ciclo Primavera/Verano 1991. Por esta razón se considera a nuestro estado el primer productor de esta gramínea a nivel nacional (González Hinojosa, com. pers).

En Jalisco se ha limitado el rendimiento del maíz debido a diversos factores que lo afectan; entre éstos han ocupado un importante lugar un complejo de insectos que actúan como plagas de suelo por la gran superficie que infestan y por su densidad en las áreas mas productivas, causando un gran daño a dicho cultivo (Félix, 1986).

En nuestro estado durante los últimos ciclos agrícolas, el complejo de plagas rizófagas del maíz ha estado constituido por coleópteros como: "Querecilla o Alfilerillo" Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith; "Catarinita del maíz" Colaspis chapalensis Blake; "Gusanos de Alambre" Ischiodontus sp. Megaphenthes sp y Pyrophorus sp; y

"Gallinas ciegas" de los géneros: Anomala, Cyclocephala, Phyllophaga, Macroductylus, Eutheola, Dyscinetus, Cotinus, Euphoria, Golofa y Diplotaxis, los cuales han ocasionado un grave problema en la producción de este cereal (Covarrubias y Reyes, 1988).

Se considera que dichas larvas rizófagas infestan en nuestro estado como mínimo 250,000 hectáreas de maíz, siendo más acentuado su nivel de daño en las regiones consideradas con mayor potencial productor como son: Zapopan, Ameca, San Martín Hidalgo y Cd. Guzmán entre otras, ocasionando disminución en su rendimiento de grano (Félix, 1987). Estas plagas ocasionan diversos daños a las plantas, tales como: lesiones a las semillas germinadas y plantulas y disminución del sistema radicular, lo cual provoca achaparramiento de la planta, debilidad o infestaciones por organismos fitopatógenos (Ríos y Romero, 1982).

Uno de los insectos rizófagos que causa más problemas en el rendimiento del maíz de temporal en Jalisco es Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith, debido a su densidad y tipo de daño (Eranson et al, 1982).

Por tal motivo se hace imprescindible identificar la presencia de la plaga en un cultivo en su estado de huevecillo, puesto que ello ayudaría a tomar las medidas de control adecuadas antes de que la plaga se manifieste en su estado larval.

Y debido a que Amparán (1987) concluye en su trabajo "...Las técnicas de muestreo y extracción de huevecillos de muestras de suelo utilizadas de manera convencional, no parecen ser eficaces para la cuantificación del índice poblacional de D. v. zeee K and S..." sugiriendo mejorar las técnicas hasta ahora conocidas, se hizo necesario estructurar el presente trabajo en busca de nuevos métodos que se adaptaran a las condiciones de infraestructura de nuestro país.

GENERALIDADES

Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith, en su estado adulto mide 5mm. de longitud, es de color verde y se caracteriza por sus élitros con franjas amarillas angostas y por la coloración oscura del borde externo del fémur (Krysan et al, 1980), (Figs. 1a y 1b).

Los huevecillos tienen una longitud de 0.65mm. y una anchura de 0.45mm, presentan un color amarillo pálido, así como una fina reticulación en el corión formada por polígonos angulares (Reyes, 1980), (Figs. 1c y 1d).

La larva mide 11mm. en su máximo desarrollo, es de color blanco-cremoso y presenta una hendidura bien definida en la placa anal del noveno segmento abdominal (Mendoza y Peters, 1964).

Larva es desnuda, de coloración blanco-cremosa. A los 4 días se le oscurecen ligeramente los ojos, las puntas de las cercas anales y los segmentos basales de las antenas. Se encuentran también 2 hileras de espinas en la parte media dorsal del cuerpo. A los 8 días los ojos están completamente quitinizados, además de la parte basal del clípeo y las mandíbulas.

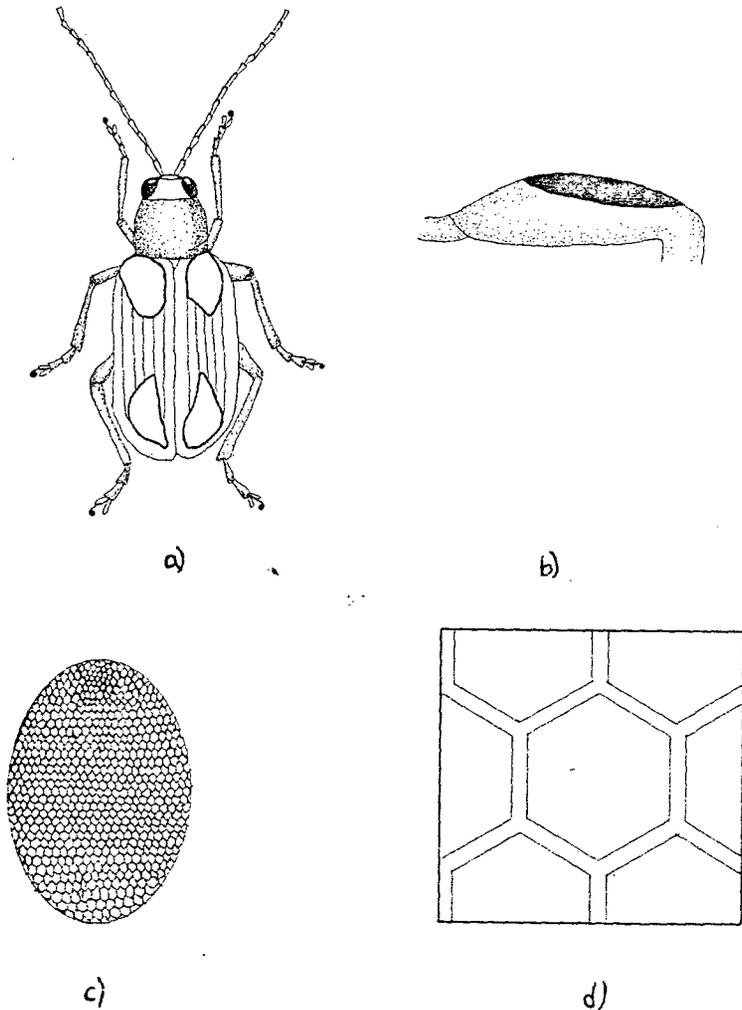


Fig. 1 a) Adulto de Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith, según Krysan et al, (1980).
 b) Fémur de D.v.zeae K and S., y mancha característica según Krysan et al, (1980).
 c) Huevecillo de D.v.z. mostrando su reticulación característica (40x).
 d) Reticulación del huevecillo de D. virgifera aumentada (700x), tomada de Rowley and Peters (1972).

Posteriormente se les notan 4 dientecillos, uno grande y uno mediano en la parte central y un pequeño a cada lado. Las uñas tarsales se encuentran completamente quitinizadas.

El ciclo de vida de éste insecto es de un año, iniciándose con las oviposuras desde finales del mes de Agosto, permaneciendo en el suelo en estado de diapausa alrededor de ocho meses, dependiendo de las condiciones del temporal de lluvias. La etapa larvaria es de 32 días aproximadamente, pasando por 3 estadios y dentro del último instar se observa el período prepupal con una duración de más o menos 3 - 6 días. La pupa tiene una longevidad de 9 días, finalizando el ciclo con la emergencia de los adultos de mediados de Agosto a principios de Septiembre, los cuales tienen un período de vida de 94 días aproximadamente (Reyes, 1983), (Fig. 2).

El daño en los cultivos de maíz es ocasionado principalmente por el estado larval de D. v. zea K and S. ya que se alimenta tanto de las raíces subterráneas como de las adventicias y en ocasiones, cuando se presentan altas poblaciones, perforan el cuello de la planta, provocando el achaparramiento, debilidad y acame del maíz (Reyes, 1983).

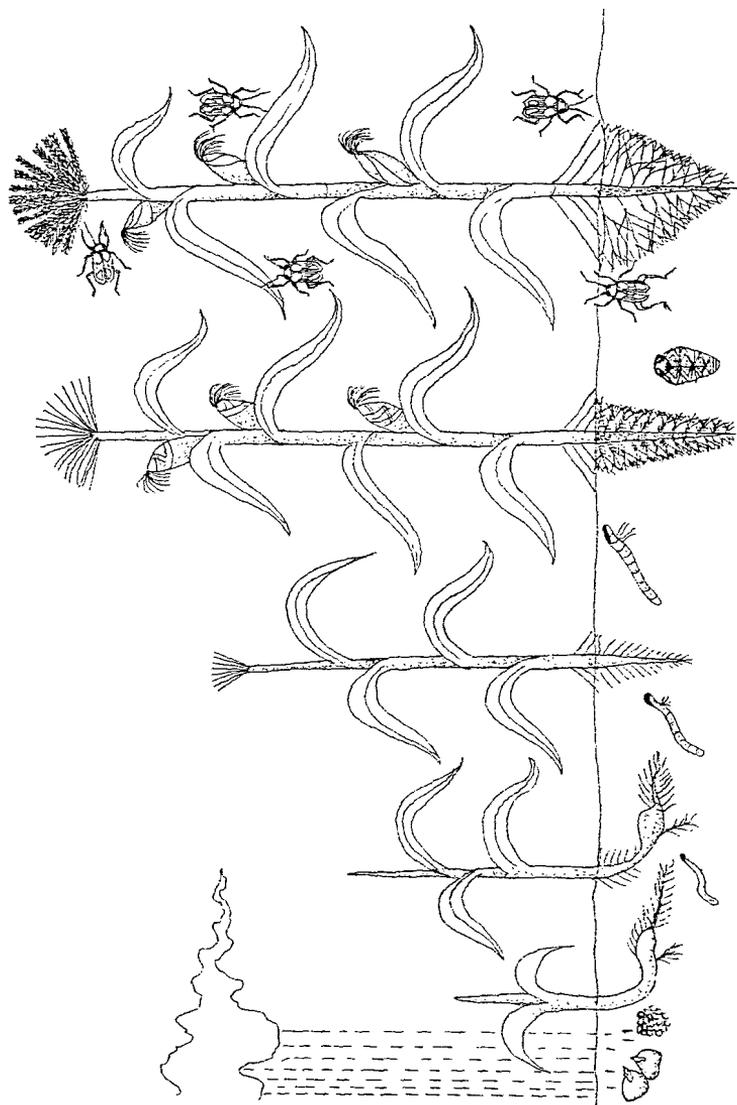


Fig. 2 Ciclo de vida de Diabrotica virgifera zeae K and S, en maíz de temporal. Modificado de Félix y Reyes (1990)

ANTECEDENTES

En México podemos encontrar varias especies de *Diabrotica* ocasionando severos daños al maíz, pero en las áreas más productivas de este grano en Jalisco, bajo condiciones de temporal y humedad residual, la especie que más pérdidas ocasiona en cuanto a rendimiento del cultivo es *Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith (Félix y Reyes, 1990).

Este coleóptero se localiza desde Oklahoma hasta Centroamérica (Krysan et al, 1980) y representa un serio problema para el maíz del centro de México (Branson et al, 1982).

Esta plaga se encuentra distribuida en todo el centro del estado de Jalisco, pero actualmente se ha ido dispersando hacia otras áreas con alto potencial productor en maíz, principalmente hacia los estados vecinos a Jalisco como son: Nayarit, Guanajuato y Michoacán (Félix y Reyes, 1990), Fig. 3.

La especie de nuestro interés solo presenta una generación al año siendo el maíz su único hospedero cultivable (Félix y Reyes, 1990). Los huevecillos eclosionan en los primeros días del mes de Julio dependiendo de las

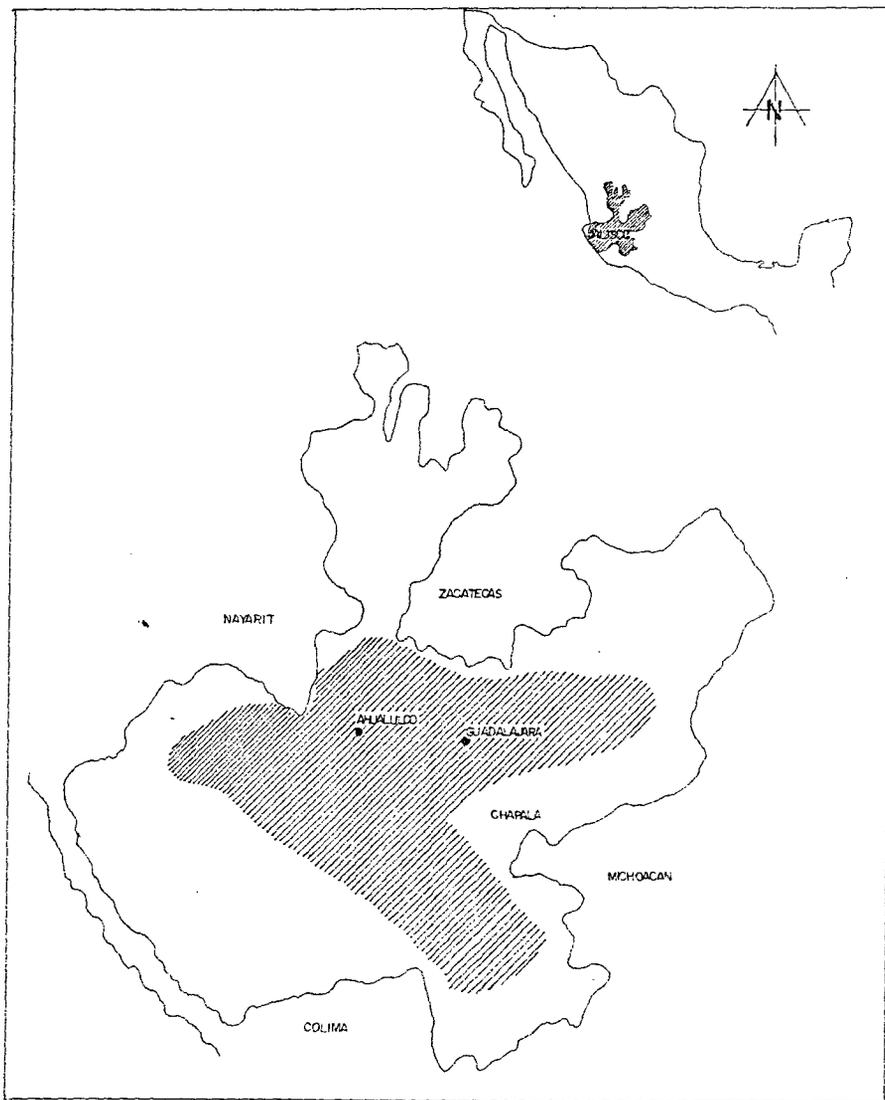


Fig. 3 Area principal de presencia de D. virgifer azeae K and S., en Jalisco, según Félix y Reyes (1990).

condiciones de temporal de lluvias, ocasionando en su estado larval el daño más severo a la planta en su sistema radicular (Reyes, 1983; Amparán, 1987).

La oviposición de las hembras de D. v. zeae, se efectúa a diferentes profundidades de acuerdo al tipo de suelo. Así la mayor cantidad de huevecillos encontrada en Jalisco en suelos de textura arenosa se localiza en las capas más superficiales de tierra aproximadamente 0-15cm. de profundidad y en suelos de textura arcillosa la mayor cantidad de los mismos se localiza a una profundidad aproximadamente de 15-30cm. (Branson et al, 1982).

En el municipio de Ahualulco del Mercado, se han tenido reportes frecuentes de daños al maíz de temporal de esa zona producidos por D. v. zeae en los últimos años. Por tal motivo ha crecido la importancia de este insecto en relación a su densidad y/o grado de infestación en el suelo (Félix y Reyes com. pers.).

Debido a que las técnicas de extracción de huevecillos usadas convencionalmente no resultan eficaces de acuerdo a lo antes citado, se buscaron nuevos métodos para ser adaptados en la recuperación de los huevecillos de D. v. zeae los cuales fueron tomados de entre las técnicas que

existen tanto en el área clínica como fitopatológica, escogiendo algunas de las mas usuales, de las cuales se describió su proceso por ser este la base de los nuevos métodos implementados.

En el área clínica son muy utilizados diferentes métodos de extracción de huevecillos de parásitos humanos, los cuales se extraen de muestras de heces fecales, entre los cuales se encuentran los métodos de flotación que se utilizan en base a las diferencias de densidad de ciertas soluciones químicas, principalmente azúcar, cloruro de sodio o sulfato de zinc. Los huevecillos o quistes flotan en la superficie de las soluciones más pesadas, ya que suelen tener densidades que varían entre 1.05 y 1.15, en tanto que la materia fecal se hunde gradualmente hasta el fondo. Los métodos de flotación de uso más frecuente son: La flotación en salmuera (Willis, 1921) y la flotación en sulfato de zinc por centrifugación (Faust et al, 1938). (Melvin and Brooke, 1971; Brown and Neva, 1988).

a). Técnica de flotación con solución saturada de cloruro de sodio (Método de Willis).

Esta técnica emplea una salmuera (solución acuosa saturada de NaCl), que se prepara disolviendo 18 grs. de sal

común en 1000ml. de agua, para obtener una densidad de 1.20 grs/ml.

Su desarrollo consiste en colocar una porción bien mezclada de heces en un vasito de precipitado o en una cápsula chica y se agregan unas gotas de solución salina saturada. Se mezcla con una varilla de vidrio hasta obtener una buena suspensión, luego se agrega mas solución salina saturada hasta rebasar el borde del recipiente. Se deja en reposo y se coloca un portaobjetos de modo que quede en contacto con la superficie del líquido. Los huevos ascienden por diferencia de densidad y se adhieren a la superficie del vidrio, al que se da vuelta, se colorea, se cubre y se observa al microscopio. (Iovine and Selva, 1979; Guerci, 1988).

b). Técnica de flotación por centrifugación con sulfato de zinc. (Método de Faust).

Este método emplea para su realización una solución de sulfato de zinc al 33%, la cual se elabora disolviendo 330grs. de sulfato de zinc granular en 1000ml. de agua, ajustandose la densidad de 1.180 grs/ml. con un hidrómetro.

La técnica consiste en hacer una suspensión fina moliendo 1gr. de heces recién expulsadas en 10ml. de agua corriente tibia, se cuela a través de una capa de gasa húmeda en un embudo o por un tamiz y se coloca en un tubo de centrifuga. La suspensión se centrifuga durante 1 minuto a 2,300 r.p.m. El sobrenadante se decanta, se añaden 2ml. de agua y el sedimento se suspende de nuevo por agitación añadiéndose más agua hasta llenar el tubo. Se repite el lavado y el centrifugado hasta que el sobrenadante sea bastante claro. Generalmente se requiere lavar 3 veces. Se decanta el líquido sobrenadante y se agregan 4 o 5 ml. de solución de sulfato de zinc, se agita y se centrifuga durante 1 minuto a 2,500 r.p.m. Después se toma con una asa de platino el material que flota en la superficie, se coloca en el portaobjetos y previa coloración se observa en el microscopio. (Brown and Neva, 1988).

Por otro lado en fitopatología, para la obtención de huevecillos de nemátodos se utiliza el método de Jenkins (Técnica de colado o tamizado) el cual basa su desarrollo en el lavado manual de la muestra con abundante agua a través de tamices y en la centrifugación de la materia resultante con una solución saturada de azúcar para obtener los huevecillos libres de materia orgánica (Coveness and Jensen, 1955; Streets, 1969).

La técnica consiste en procesar una pequeña muestra de suelo, por ejemplo 300cc., la cual se mezcla con un volumen mucho mayor de agua, más o menos 2 litros, de manera que los nemátodos y sus huevecillos floten en el agua y puedan ser colectados en tamices con poros de ciertos tamaños.

La mezcla de agua-suelo se agite y se permite que repose durante 30 segundos. El sobrenadante se cuela en un tamiz de 20 mallas (20 orificios por pulgada cuadrada), el cual retiene los residuos de gran tamaño pero permite que los nemátodos se cuelen a otro recipiente. El líquido que contiene a los nemátodos se vierte después a través de un tamiz de 60 mallas, el cual retiene a los nemátodos de gran tamaño y algunos residuos, pero deja que los más pequeños y sus huevecillos pasen a través de él y se colecten en otro recipiente. Este último se pasa a través de un tamiz de 200 mallas, el cual retiene los nemátodos de menor tamaño y sus huevecillos. Los tamices de 60 y 200 mallas se lavan 2 o 3 veces para remover lo mejor posible la mayor parte de los residuos, y la muestra de interés se coloca entonces en cajas de Petri con agua para su examen directo y posterior aislamiento. Se tienen resultados más efectivos si después del lavado se emplea la centrifugación con solución saturada de azúcar, ya que se obtienen éstos por flotación libres de materia orgánica. (Streets, 1969; Agrios, 1986).

Para el caso de Diabrotica spp. la mayoría de los métodos reportados para la extracción de sus huevecillos consisten en combinaciones de lavado, tamizado y flotación (Matteson, 1966; Shaw et al, 1976; Montgomery et al, 1979).

El uso de la flotación para la extracción de huevecillos de muestras de suelo no es una técnica nueva, ya que desde hace tiempo se han hecho algunos trabajos referentes a ésto: (Landell, 1936; Coveness and Jensen, 1955) entre otros, pero la mayoría involucra una complicada combinación de tamices y embudos, o el uso de soluciones que afectan la viabilidad de los organismos. Una técnica utilizada tradicionalmente para éste propósito es la de Matteson (1966), con la cual se obtienen altos porcentajes de recuperación de huevecillos de Diabrotica spp., además de que no afecta la viabilidad de los mismos. Sin embargo, no es adecuada para las condiciones tecnológicas de nuestra entidad por poseer una metodología complicada y difícil (Matteson, 1966).

Otro método utilizado con el mismo fin, es el desarrollado por Shaw et al, (1976), el cual consiste en la separación de huevecillos de insectos rizófagos, por medio de una máquina y mediante el uso de sulfato de magnesio, con

lo cual se pueden procesar muestras hasta de medio kilogramo en poco tiempo, pero no resulta fácil su uso por presentar un diseño difícil de construir.

Otra técnica empleada también en la separación de los huevecillos de estos insectos consiste en extraerlos de diferentes tipos de suelos, que varían de arenoso a arcilloso. Para probar la efectividad de este método se colocó a cada muestra un número conocido de huevecillos que al final del proceso se lograban extraer casi en su totalidad; esto permitió utilizar una técnica para la estimación poblacional de un insecto. Así mismo, el procesamiento de las muestras requería de poco tiempo pero su uso es difícil por poseer las mismas características de los métodos anteriores (Montgomeri et al, 1979).

El primer método desarrollado en Jalisco para la extracción de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith de muestras de suelo fue una adaptación al método de Matteson, (1966), realizada por Branson en 1980, y referida por comunicación personal a Reyes, (1980), con la cual se obtuvieron altos porcentajes de recuperación (Reyes, 1980; Branson, 1982).

Amparán, 1987, utiliza la misma técnica modificada de Matteson en la recuperación de huevecillos de D. v. zeae K and S., para determinar la proporción de los mismos en estratos de tierra de 0-15cm y de 15-30cm de profundidad, con resultados variables (Amparán, 1987).

Covarrubias, 1987, también utiliza el método modificado de Matteson para recuperación de huevecillos de D. v. zeae K and S. de muestras de suelo, con la que obtiene altos porcentajes en la recuperación de los mismos (Reyes, 1982; Covarrubias, 1987).

OBJETIVOS

- 1.- Realizar la extracción de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith., a partir de muestras de suelo, probando 5 métodos.

- 2.- Determinar cuál de los métodos probados para la extracción de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith., de muestras de suelo, es el más adecuado y sencillo para su realización.

DATOS GEOGRAFICOS

Monografía de Ahualulco del Mercado, Jalisco.

El municipio de Ahualulco del Mercado, se localiza en la parte Oeste de la región central del estado de Jalisco, a una altitud de 1,500 m. sobre el nivel del mar, limita al Norte con los municipios de Antonio Escobedo y Tequila, al Sur con Ameca, al Este con Teuchitlán y al Oeste con Etzatlán, (Fig. 4).

Su extensión territorial comprende 152, 200 Km² clasificados agrológicamente de la forma siguiente: 6,521 has. de riego, 5,859 has. de temporal y humedad residual, 1, 800 has. de bosques, 1,464 has. de pastizales y 76 has. de tierras improductivas.

La topografía que presenta es más o menos plana, comprendiendo altitudes entre 900 y 1,500 m. sobre el nivel del mar.

Los ríos y arroyos que comprenden la subcuenca hidrológica, "Alto Río Ameca", son los que constituyen la hidrología Pacífico centro.

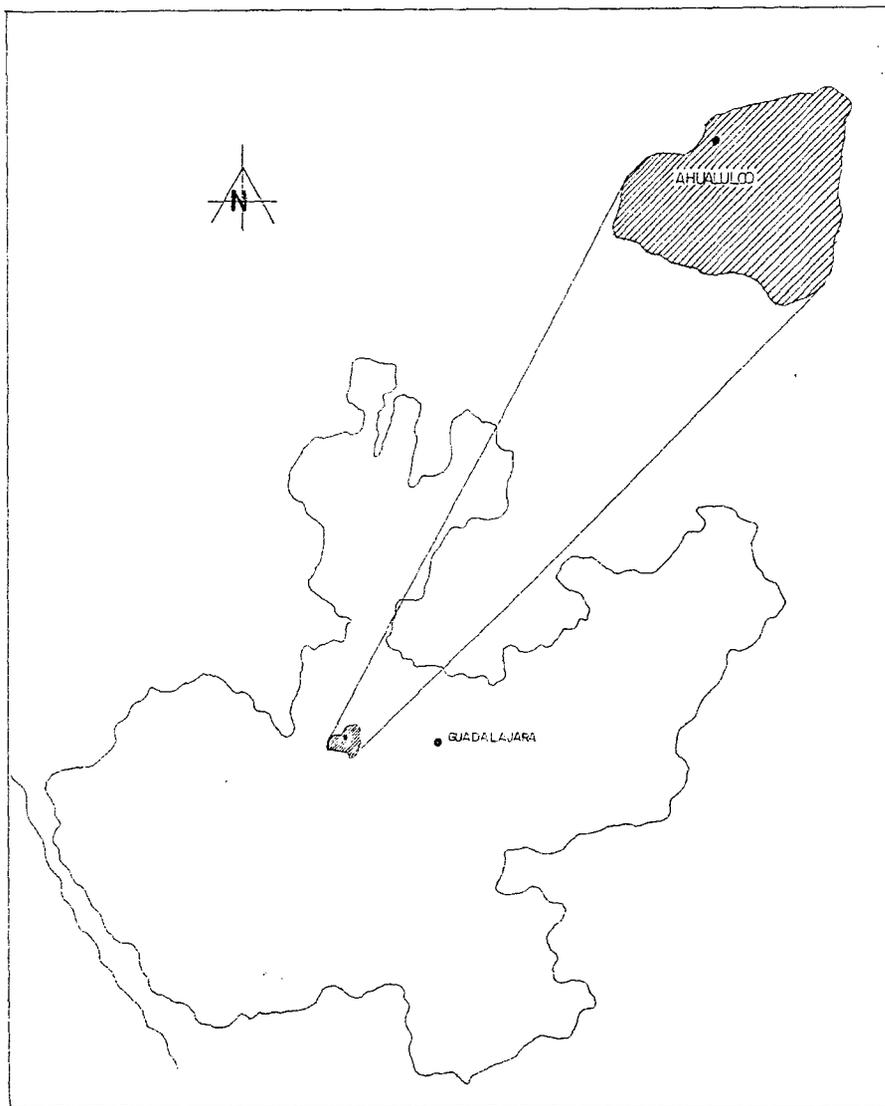


Fig. 4 Mapa del estado de Jalisco mostrando el municipio de Ahualulco del Mercado y la localización del área de trabajo 1990.

El clima está clasificado como semi-seco, con invierno y primavera seco y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual alcanza en promedio 21.3°C, teniéndose registrada como máxima 47°C y como mínima 0.5°C.

Todo el municipio está ocupado por áreas que tienen un régimen pluviométrico superior a los 800 milímetros anuales y en promedio recibe una precipitación pluvial anual de 871.4 mm., el 100% de los suelos son del tipo chernozem. Su actividad agrícola está integrada por 5 cultivos y 1 frutal, cubriendo conjuntamente una superficie de 16 367 has., de las cuales 84.9 % corresponden a la superficie de temporal y humedad residual y el 15% a riego. Entre los cultivos destacan tanto por su superficie cosechada como por su volumen; el sorgo, el maíz, y la caña de azúcar, que cubren aproximadamente las tres cuartas partes de la superficie labrada.

De las características que presenta la superficie se tienen que la mayor parte está condicionada al temporal de lluvias, se aplica en gran parte de ella fertilizantes y así mismo se utiliza semilla mejorada y se tiene un bajo grado de mecanización (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 1989).

METODOLOGIA

Como alternativa a los métodos reportados para la extracción de huevecillos de organismos diversos, se implementaron 4 métodos para la obtención de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith, a partir de muestras de suelo tomando como base el método modificado por Branson, 1980, a la técnica de Matteson, 1966 por haber sido probada con buenos resultados (Reyes, 1980; Branson, 1982; Amparán, 1987; Covarrubias, 1987).

Elección del area de muestreo.-

El presente trabajo se realizó en 1990, eligiéndose el mes de Marzo debido a que los huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith, no han emergido todavía ya que se encuentran en su período de diapausa. Se escogió una hectárea con suelo de textura arenosa y dedicada a cultivo de temporal, ubicada en el ejido "Hárcenas" perteneciente al municipio de Ahualulco del Mercado, Jalisco, propiedad del Sr. Eugenio Hernández, la cual se localiza en el Km.75 de la carretera Guadalajara -San Marcos en las coordenadas (20°41'08" longitud Oeste y 103°57'01" longitud Norte).

La parcela tuvo en pie los tallos de las plantas de maíz, es decir, no se habían realizado labores culturales, condición indispensable para efectuar la toma de suelo, ya que según algunos autores los huevecillos de Diabrotica virgifera Le Conte, son ovipositados preferentemente cerca de la base de la planta y el laboreo afectaría la emergencia y viabilidad de los mismos (Ball, 1957; Pries et al, 1968; Kirk, 1975).

Toma de muestras de suelo.-

El método que se eligió para la obtención de las muestras de suelo es el llamado "5 de oros" el cual es comunmente empleado en la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH, 1960) Fig. 5.

En base a este método, para una hectárea de terreno se tomaron 5 tramos de surco de 20 mts. de longitud cada uno para muestrear un total de 100 metros lineales, y cada muestra de suelo se obtuvo tomando como centro el tallo de la planta y recogiendo solamente el estrato superior de tierra, comprendido de 0-5cm. de profundidad aproximadamente, dentro de una área de 30x30cm., debido a que los huevecillos

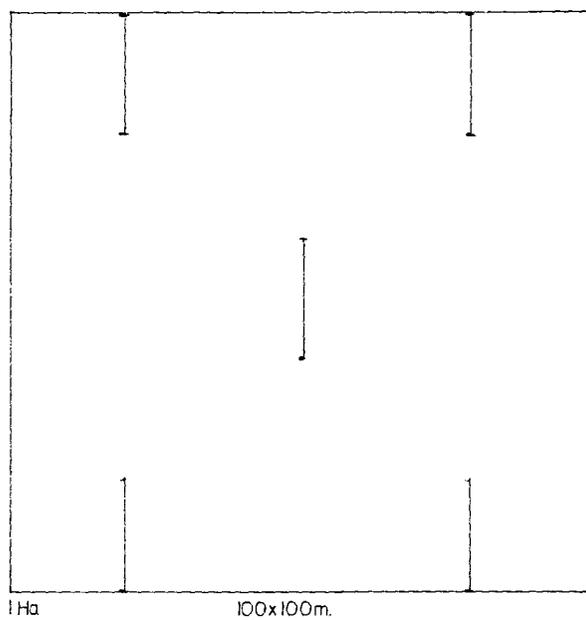


Fig. 5 Modelo tradicional de muestreo "5 de Oros".
Tomado de "Principales plagas del maíz", SARH (1980).

de D. virgífera Le Conte. en su mayoría son ovipositados con preferencia en las capas más superficiales de suelo (Ball, 1957; Chiang, 1973; Branson et al, 1982).

Toda la muestra obtenida del terreno (150 kg en promedio) se colocó dentro de sacos vacíos y posteriormente se vació sobre una superficie cubierta con un plástico para homogeneizarse con una pala, separándose de esta, 30 kg. de muestra de suelo para cada tratamiento, con la que se llenaron bolsas de plástico con un kilogramo de tierra cada una. Estas se amarraron y se marcaron con 1 clave compuesta por un número romano del I-V que correspondió al método por el cual fueron procesadas y un número arábigo del 1-30 para señalar la repetición, con lo cual se logró un control adecuado de los datos obtenidos al final del proceso de cada tratamiento.

Trabajo de laboratorio

METODO I.

Este método se consideró como testigo, debido a los buenos resultados obtenidos por Branson et al (1982), así como por Covarrubias y Reyes, 1988.

Su desarrollo consistió en disolver y agitar por 3 minutos 1kg. de azúcar en un litro de agua, a la que se le tomó la densidad mediante una balanza de cobos obteniéndose 1.218 grs/ml. A esto se le incorporó la muestra de tierra formando una mezcla de proporción 1:1:1. Estos componentes se homogeneizaron manualmente en un recipiente de plástico lo suficientemente grande para contener toda la muestra, la cual se dejó reposar durante 60 minutos, tiempo estimado para permitir la flotación de los huevecillos de Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith.

Concluido este tiempo se recogió con cuidado la materia flotante con una cuchara grande y se depositó en el interior de un tamiz del No.20 (superior), colocado sobre otro del No.60 (inferior) en el cual fueron retenidos los huevecillos de D. v. zeae Krysan and Smith debido a sus dimensiones (0.60mm x 0.45mm) (Branson et al. 1975; Reyes, 1980).

La materia colectada en el tamiz No.20, que consistió en residuos de tallos y raíces de maíz principalmente, se lavaron manualmente con abundante agua durante 1 minuto antes de desecharse, para con esto desprender los huevecillos de la especie de nuestro interés que pudieran haber quedado adheridos a ellos.

Por otra parte , lo recuperado en el tamiz del No.60, se vació al interior de un vaso de precipitados de 1 litro con ayuda de una Piseta con agua de la llave, el cual se llenó a toda su capacidad con el agua y se dejó reposar durante 5 minutos, tiempo en el cual los huevecillos se separaron de la materia orgánica depositándose en el fondo del recipiente, entonces el sobrenadante se desechó después de revisarse en una caja de Petri bajo el microscopio estereoscópico y comprobar la inexistencia de huevecillos de D. v. zaeae K and S.

El material sedimentado en el vaso se pasó a través del tamiz No.60 para eliminar el agua, y recuperar sólo el material que contenía los huevecillos, el cuál se paso a una caja de Petri con ayuda de un pincel para no dañar los huevecillos, realizandose de inmediato el conteo de los mismos bajo el Microscopio Estereoscópico. La caja de Petri se marcó previamente con el número de muestra y tratamiento empleado.

METODO II.

Infiriendo que la importancia del método anterior radicó en la densidad del medio, sólo se modificó la cantidad de

azúcar, la cuál se aumentó a 4 kilos. Se tomó la densidad del medio después de mezclarse con el agua obteniéndose 1.301 grs/ml. y se siguió el mismo procedimiento anterior.

Esta variación se hizo con el propósito de aumentar la densidad del medio en el que se encontraban los huevecillos de nuestro insecto y comprobar si esto influía en su recuperación.

METODO III.

Para este método se tomó como base la técnica modificada de Willis (1921), bajo la premisa de que la sal, que es el elemento principal de la técnica, también lograría la flotación de los huevecillos de D. v. zea. debido al cambio en la densidad del medio (Iovine and Selva, 1979; Guerra, 1988).

Aquí se utilizó una solución saturada de sal común preparada con 18 grs. de la misma disueltos en un litro de agua de la llave, a la cual se le tomó la densidad que fue de 1.200 grs/ml. Se le incorporó la muestra de tierra para formar una mezcla homogénea y se siguió el mismo procedimiento empleado para los métodos I y II.

METODO IV.

Este método se realizó en base a la metodología modificada por Urdiales (com. pers) al método de Jenkins, 1969, para recuperación de todos los estados de desarrollo de Fitonemátodos.

El trabajo consistió en 2 etapas:

1)- Lavado de la muestra.-

La muestra de tierra se colocó en un recipiente de plástico de 10 litros de capacidad al cual se le agregaron 5 litros de agua, se agitó energicamente con una cuhara de mango largo, para que la turbulencia ocasionada en el medio líquido lograra la flotación de los huevecillos de Diabrotica virgifera zeae K and S., después de lo cual se vació rapidamente el contenido líquido sobre un tamiz del No. 20 colocado sobre otro del No. 60, con el fin de evitar que los huevecillos pudieran sedimentarse.

Esta operación se repitió 3 veces consecutivas, con el propósito de obtener en cada lavado la mayor cantidad de huevecillos de D. v. z. presentes en la muestra, la cuál fue desechada posteriormente.

Por una parte el material colectado en el tamiz del No. 20, que consistió principalmente de residuos vegetales (del maíz), se lavó manualmente con suficiente agua durante 1 minuto para desprender los huevecillos que pudieron haber quedado adheridos a estos residuos, los que posteriormente se desecharon, mientras que el material retenido en el tamiz No. 60 se pasó a una caja de Petri con un pincel, la cual se marco con el número de muestra y tratamiento.

2)- Centrifugación con solución de azúcar.-

La muestra obtenida del prelavado anterior se proceso 2 veces debido a su abundancia y a las condiciones de la centrífuga ("Internacional" con cabezal para 4 tubos y con capacidad de 50 ml. cada uno) en la cual la muestra obtenida de la primera etapa se distribuyó en los tubos de la centrífuga. A éstos se les adicionó 5 grs. de caolin y 40 ml. de agua de la llave, agitándose manualmente hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, la cual se centrifugó a 200 r.p.m. durante 3 minutos. Después de esto se eliminó el contenido líquido de cada tubo y se substituyó por 40 ml. de solución saturada de azúcar al 100%, la que tuvo una densidad de 1.218 grs/ml. se agitó de nuevo manualmente para mezclarse con el sedimento durante 1 minuto centrifugándose de la misma manera.

Terminada esta etapa se recuperó el material suspendido en el medio líquido de cada tubo en el tamiz del No. 60 para eliminar el excedente líquido, y con ayuda de un pincel se pasaron los huevecillos a una caja de Petri marcada con el número de muestra y tratamiento y se procedió a contarlos.

METODO V.

Esta metodología fue una modificación a la técnica de Faust utilizada en análisis clínicos para extracción por flotación de huevecillos de parásitos de humanos contenidos en heces fecales, bajo la premisa de que el sulfato de zinc también provocaría la flotación de los huevecillos de D. y. zea K and S, debido al cambio en la densidad del medio (Iovine and Selva, 1979; Brown and Neva, 1988).

Para el desarrollo de este método, primero se disolvieron 330grs. de sulfato de zinc granular en un litro de agua para conseguir una solución al 33%, a la cual se le determinó una densidad de 1.180 grs/ml.

El procedimiento de lavado y centrifugado de las muestras fué igual al del método anterior.

Trabajo de gabinete

Los huevecillos de Diabrotica virgifera zeae K and S., obtenidos de cada uno de los tratamientos probados, después de ser contabilizados se sometieron a las siguientes pruebas estadísticas:

Primero se desarrollaron Tablas de Frecuencia para cada método a fin de conocer la proporción mayor de valores dentro de un determinado intervalo.

Después se realizaron Medidas de Tendencia Central y Dispersión para comprobar si los datos de cada método se distribuan de forma normal y si existia homogeneidad en las varianzas, condiciones muy importantes para el posterior análisis de variancia.

Enseguida se efectuó el Análisis de Variancia (ANOVA) de los resultados obtenidos, con el proposito de saber si se aceptaba o no la hipótesis de nulidad de que las medias eran iguales. Como ésta se rechazó y se aceptó la hipótesis alternativa de que las medias fueron diferentes entre si, o de que por lo menos una fué diferente a las demás, se buscó una prueba estadística que lo demostrara, eligiendose la Prueba de Rango Multiple de Duncan.

Esta prueba se aplica para tamaños iguales de muestra y permite hacer todas las comparaciones múltiples posibles entre pares de medias, ya que puede separar un conjunto de diferentes medias significativas, en subconjuntos de medias homogéneas.

RESULTADOS

Los tratamientos empleados para la extracción de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith de muestras de suelo, presentaron los siguientes resultados.

Todos los tratamientos probados mostraron resultados positivos para nuestro trabajo, ya que con todos se obtuvo un número variable de huevecillos en cada observación los cuales se sumaron en cada tratamiento para obtener un total de huevecillos por muestra, dando como resultado que el método que extrajo mayor número de huevecillos (1299) fue el No. 4, mientras que el que extrajo el menor número de ellos fue el método No. 3 (535 huevecillos), además de ser el ambos de fácil realización. Tabla No. 1

Dentro del tratamiento No. 2, hubo un dato que se alejó demasiado del promedio (observación No. 6, 158 huevecillos), lo cual provocó anomalía en el mismo, así como en el tratamiento No. 4 (observación No. 7, 109 huevecillos), pero se continuó con el análisis de datos por tratarse de resultados reales. Tabla No. 1.

Tabla 1. Resultados observacionales de los huevecillos de Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith, obtenidos por tratamiento.

OBSERVACIONES	TRATAMIENTO				
	I	II	III	IV	V
01	12	15	40	89	25
02	26	8	22	44	30
03	18	87	30	27	27
04	23	36	18	29	20
05	43	57	14	46	19
06	20	158	19	16	14
07	39	20	21	109	39
08	13	24	9	34	22
09	32	24	16	29	20
10	34	32	19	23	49
11	40	34	12	20	44
12	19	20	34	43	37
13	25	34	18	33	44
14	15	34	16	52	37
15	37	27	17	19	31
16	18	23	9	33	39
17	25	31	13	54	21
18	13	16	27	49	23
19	27	26	19	49	61
20	22	19	10	57	26
21	18	16	9	24	27
22	26	27	15	43	35
23	30	6	6	41	27
24	8	12	17	33	20
25	11	9	8	49	38
26	19	17	6	39	40
27	35	27	26	73	32
28	15	11	22	40	34
29	10	35	22	55	30
30	27	16	21	47	37
$\Sigma =$	700	901	535	1299	948

El tiempo de realización de cada tratamiento fue variable debido a las técnicas empleadas para cada uno de ellos. En el método 1, el tiempo requerido por muestra para el proceso y conteo de los huevecillos fué aproximadamente de 90 minutos (75 y 15 respectivamente) con un tiempo total de 2,700 minutos (45 hrs), en la realización de todo el tratamiento. El método 2, tuvo un tiempo aproximado por muestra de 95 minutos (75 de proceso y 20 para conteo de los huevecillos) y un tiempo total de 2,850 minutos (47 hrs, 30 min). En el método 3, se tuvo un tiempo por muestra de 85 minutos aproximadamente (75 de proceso y 10 de conteo de huevecillos) y un tiempo total de 2550 minutos (42 hrs, 30 min). Para el método 4, se requirió de un tiempo aproximado por muestra de 48 minutos (40 de proceso y 8 de conteo) teniéndose un tiempo total de 1440 minutos (24 hrs). El método 5, tuvo un tiempo aproximado por muestra de 45 minutos (40 de proceso y 5 de conteo de huevecillos) y un tiempo total de 1350 minutos (22 hrs, 30 min), por todo el tratamiento. Tabla # 2.

Se realizaron en seguida las tablas de distribución de frecuencias para cada uno de los tratamientos, a fin de conocer la frecuencia con la que se repitió una observación dentro de un determinado intervalo y así conocer la proporción mayor de valores dentro de estos mismos.

Tabla 2. Soluciones y densidades empleadas para la flotación de los huevecillos de D. y. zeee y tiempo de extracción de los mismos.

	TRATAMIENTO				
	I	II	III	IV	V
NUMERO OBTENIDO	700	901	535	1,299	948
SOLUCION EMPLEADA PARA LA FLOTACION	AZUCAR	AZUCAR	SAL	AZUCAR	SULFATO DE ZINC
DENSIDAD DE LA gr./ml. SOLUCION	1.218	1.301	1.200	1.218	1.180
TIEMPO DE EXTRACCION EN MINUTOS	2,700	2,850	2,550	1,440	1,350

En base a la frecuencia relativa (sobre 1 %), se eligió un porcentaje que superara el promedio, (0.60%), para cada tratamiento, con la finalidad de hacer comparaciones de frecuencias entre los mismos, de lo cual se obtuvo lo siguiente:

Para el tratamiento No. 1, el porcentaje de 0.60% se encontró dentro de los intervalos que van de 8-25, con una frecuencia acumulativa de 18. Tabla # 3.

En el tratamiento No. 2, el porcentaje de 0.60% estuvo en el intervalo 6-30, con una frecuencia acumulativa de 20. Tabla #4.

En el método No. 3, el porcentaje de 0.60% se encontró dentro de los intervalos 6-29, con una frecuencia acumulativa de 27. Tabla # 5.

Para el tratamiento No. 4, el porcentaje de 0.60% se encontró dentro de los intervalos que van de 16-45, con una frecuencia acumulativa de 18. Tabla #6.

En el método No.5, el porcentaje de 0.60% estuvo dentro de los intervalos de 14-37, con una frecuencia acumulativa de 22. Tabla # 7.

Tabla 3. Tabla de frecuencias para los huevecillos de D. v. zeae, obtenidos del método 1, (Daniel, 1990).

INTERVALOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	VALOR DE CLASE
08-13	6	0.200	06	10.5
14-19	7	0.230	13	16.5
20-25	5	0.170	18	22.5
26-31	5	0.170	23	28.5
32-37	4	0.133	27	34.5
38-43	3	0.100	30	40.5
	$\Sigma=30$	$\Sigma=1$		

Tabla 4. Tabla de frecuencias para los huevecillos de D. v. zeae obtenidos del método 2, (Daniel, 1990).

INTERVALOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	VALOR DE CLASE
06-30	20	0.670	20	18
31-55	7	0.233	27	43
56-80	1	0.033	28	68
81-105	1	0.033	29	93
106-130	0	0.000	29	118
131-155	0	0.000	29	143
156-180	1	0.033	30	168
	$\Sigma=30$	$\Sigma=1$		

Tabla 5. Tabla de frecuencias para los huevecillos de
D. v. zaeae obtenidos del método 3, (Daniel, 1990).

INTERVALOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	VALOR DE CLASE
06-11	7	0.233	07	08.5
12-17	8	0.270	15	14.5
18-23	10	0.033	25	20.5
24-29	2	0.070	27	26.5
30-35	2	0.070	29	32.5
36-41	1	0.033	30	38.5
	$\Sigma=30$	$\Sigma=1$		

Tabla 6. Tabla de frecuencias para los huevecillos de
D. v. zaeae obtenidos del método 4, (Daniel, 1990).

INTERVALOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	VALOR DE CLASE
16-30	8	0.270	08	23
31-45	10	0.333	18	38
46-60	9	0.300	27	53
61-75	1	0.033	28	68
76-90	1	0.333	29	83
91-105	0	0.000	29	98
106-120	1	0.033	30	113
	$\Sigma=30$	$\Sigma=1$		

Lo anterior dió por resultado que en todos los tratamientos, excepto en el número 4, el porcentaje de valores calculado, 0.60% del total de las observaciones por tratamiento, se encontró dentro de intervalos que fueron desde 6 hasta 37, mientras que en el tratamiento No. 4, este porcentaje se encontró dentro de intervalos desde 16 hasta 45, lo que indicó un mayor número de huevecillos en cada observación y por lo tanto en la muestra.

Enseguida se realizaron medidas de tendencia central y dispersión para cada uno de los 5 métodos y se encontró que el tratamiento que tuvo la media mayor fué el No.4 (43.3), y el que presentó la media menor fue el No.3 (17.83). En cuanto a las varianzas, éstas no presentaron homogeneidad ya que fueron desde 832.033 en el método No. 2, hasta 65.11 para el método No.3. Tabla # 8.

A continuación, se procedió a realizar el Análisis de variancia (ANOVA) correspondiente, dando este por resultado un rechazo de la hipótesis de nulidad de que todas las medias son iguales, ya que la tabla de análisis de varianza mostró un valor para la prueba F de 9.22, que fué mayor que el valor crítico de $F = 2.37$, calculado de la tabla de Distribución Normal Unitaria (Daniel, 1990), con un nivel de significación de .05 y con 4 y 145 grados de libertad.

Tabla 7. Tabla de frecuencias para los huevecillos de D. v. zea obtenidos del método 5, (Daniel, 1990).

INTERVALOS	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	FRECUENCIA ACUMULATIVA	VALOR DE CLASE
14-21	6	0.200	06	17.5
22-29	7	0.233	13	25.5
30-37	9	0.300	22	33.5
38-45	6	0.200	28	41.5
46-53	1	0.033	29	49.5
54-61	1	0.033	30	57.5
	$\Sigma=30$	$\Sigma=1$		

Tabla 8. Medidas de tendencia central y dispersión, (Daniel, 1990).

	TRATAMIENTO				
	I	II	III	IV	V
\bar{X}	23.33	30.03	17.83	43.30	31.60
S^2	92.92	832.033	65.11	403.39	106.74
S	09.64	28.84	08.07	20.08	10.33
ΣX	700	901	535	1.299	948

De esta manera se aceptó la hipótesis alternativa de que las medias son diferentes entre si o de que por lo menos una fue diferente a las demás. Tabla # 9.

Para comprobar lo anterior se eligió la prueba de rango múltiple de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 con la cual se realizaron todas las comparaciones múltiples posibles entre pares de medias, (Hines and Montgomery, 1987).

La prueba de Duncan mostró los resultados siguientes:
La media poblacional del tratamiento No. 4, fué mayor que la de los tratamientos : 5, 2, 1 y 3.
La media poblacional del tratamiento No. 5, fué mayor que la del tratamiento 3.
La media poblacional del tratamiento No. 2, fué mayor que la del tratamiento No. 3.
Todos los otros pares de medias no fueron considerados como significativamente diferentes, ya que las medias poblacionales de los tratamientos 5, 2 y 1 y las de los tratamientos 1 y 3, constituyeron subconjuntos de medias homogéneas, y sólo el método No. 4 fué diferente a todos los demás. Tabla No. 10

Tabla 9. Análisis de Variancia, (Walpole and Myers, 1987).

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
ENTRE LOS GRUPOS (INTERGRUPOS)	11066.44	4	2766.61	9.2209
DENTRO DE LOS GRUPOS (INTRAGRUPOS)	43505.3	145	300.0365	
TOTAL	54571.74	149		

Tabla 10. Prueba de Rango Multiple de Duncan para comparación de medias, (Walpole and Myers, 1987).

	\bar{y}_3 17.83	\bar{y}_1 23.33	\bar{y}_2 30.03	\bar{y}_5 31.60	\bar{y}_4 43.30
P	2	3	4	5	
rP	2.772	2.918	3.017	3.089	
Rp	8.766	9.228	9.541	9.769	

P= MEDIAS
 rP= RANGOS MINIMOS ESTUDENTIZADOS SIGNIFICATIVOS OBTENIDOS DE TABLA (A-12) CON 145 GRADOS DE LIBERTAD.
 Rp= MINIMO RANGO SIGNIFICATIVO, OBTENIENDO POR LA MULTIPLICACION DE CADA $rpx\sqrt{S^2/n}$

DISCUSION

De los 5 métodos realizados en este trabajo, el primer tratamiento previamente probado con buenos resultados por Branson (1982), Amparán (1987) y Covarrubias (1987), y los 4 posteriores inferidos de tratamientos probados para organismos diversos, mostraron buenos resultados para los fines de esta tesis, ya que con todos se obtuvo un número variable de huevecillos.

De todos los tratamientos, el No. 4 extrajo mayor cantidad de huevecillos, lo cual se pudo deber a que el lavado manual de las muestras con abundante agua, desprendió con mayor facilidad los huevecillos de Diabrotica virgiferæ zeæ Krisan and Smith adheridos a los residuos vegetales, además de que la centrifugación con solución saturada de azúcar, posee antecedentes de buen funcionamiento para la obtención de huevecillos de fitonemátodos, lo que coincide con lo reportado por Coveness and Jensen (1955) y Urdiales (com. pers).

El menos efectivo fué el método No.3, ya que con él se extrajo el menor número de huevecillos, lo que no coincidió con lo reportado por Iovine and Selva (1979) y Guerci

(1988). que refieren la técnica de Willis con muy buenos resultados en la extracción de huevecillos de parásitos de humanos. Esto pudo deberse a que la sal probablemente, no es un buen elemento que permita la separación de los huevecillos de D. virgifera zea de muestras de suelo. Los métodos 1 y 5 fueron intermedios ya que se obtuvo un número variable de huevecillos, lo cual se ajustó con los trabajos reportados por Matteson (1966), para extracción de huevecillos de Diabrotica spp. y Brown and Neva (1988), que reportan la técnica de Faust (1938) para recuperación de huevecillos de parásitos de humanos, los 2 con buenos resultados.

En el tratamiento 2 se extrajo mayor cantidad de huevecillos que en el tratamiento No. 1. Esto pudo deberse a la la cantidad de azúcar empleada en el método 2 (de 4 kg), en relación a la empleada en el tratamiento 1 (de 1 kg), lo cual aumentó la densidad del medio, lo que correspondió a lo reportado por Matteson (1966), que afirma que la flotación de los huevecillos de Diabrotica spp. puede variar debido a la concentración de azúcar.

De los 5 tratamientos desarrollados, sólo el No. 4 fué significativamente diferente a los demás, lo que pudo deberse a que las técnicas de flotación por reposo

empleadas en los tratamientos 1-3, no lograron desprender los huevecillos que pudieron haber estado adheridos a los residuos de tierra y plantas, y a que en el tratamiento 5 aunque también requirió de un prelavado como en el tratamiento 4, extrajo menor cantidad de huevecillos debido a la densidad de la solución empleada en el proceso de centrifugación (1.180 grs/ml), la cual fue menor a la del tratamiento 4 (1.218 grs/ml). Cabe señalar, que en éstos últimos dos tratamientos donde se extrajo mayor número de huevecillos respecto a los demás, la centrifugación no parece ser el factor determinante en la recuperación de éstos mismos, ni tampoco la densidad por sí sola; sino el lavado inicial de las muestras de tierra con agua corriente que se llevo a cabo en ambos métodos antes de someterlos a las soluciones empleadas en la fase de centrifugación, ya que en los tratamientos con prelavado (4 y 5) a mayor densidad mayor número de huevecillos y en los tratamientos sin lavado inicial de la muestra (1, 2 y 3) también a mayor densidad mayor número de huevecillos, sin embargo si comparamos la densidad de los métodos 2 y 4 observamos, que aunque en el primero de ellos la densidad es mayor (1.301 grs/ml), se obtiene menos cantidad de huevecillos que en el segundo con densidad menor (1.218 grs/ml), por lo que queda la posibilidad de que con dicho prelavado y el uso de una solución saturada de azúcar con la muestra en reposo en lugar

de la centrifugación, se puedan obtener los mismos resultados.

Resultó laborioso manejar la muestra de tierra necesaria para probar los 5 tratamientos (150 kg.), pero se trabajó con esta cantidad por haberse utilizado submuestras de 1 kg. por ser éstas de fácil manejo en general y debido a que con la técnica utilizada en el muestreo "5 de oros" se extraen grandes volúmenes de tierra, lo cual también ayudó a tener mayor veracidad en los datos.

Se muestreo solamente una profundidad de 0-5 cm. y cerca de la base de la planta porque según Branson (1982), Amparán (1987) y Covarrubias (1987), en esta capa se podían encontrar los huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith, y nosotros sólo necesitábamos muestras que contuvieran estos huevecillos para poder probar nuestros métodos.

Con la implementación de estos 4 métodos, se pudo demostrar que con material poco sofisticado como el que se utilizó en nuestro trabajo: 2 botes de plástico de 5 y 10 litros, 1 cuchara de mango largo, 1 piseta para agua, 1 vaso de Precipitados de 1 litro, 2 tamices de 20 y 60 mallas, 1 pincel, cajas de Petri, y Centrífuga, se obtuvieron buenos

resultados en la recuperación de los huevecillos de la especie de nuestro interés, con lo que se pudo evitar el uso de complicadas combinaciones de tamices y embudos o de maquinaria costosa y difícil de construir, como en los trabajos desarrollados por Shaw et al (1976), para recuperación de huevecillos de plagas rizófagas del maíz de muestras de suelo del norte y del oeste de Estados Unidos, o el desarrollado por Montgomeri et al (1979), para recuperación de huevecillos de Diabrotica longicornis Say., también de muestras de suelo.

La estadística realizada para este trabajo mostró anomalía en las varianzas, debida a la distribución no normal de los datos en los tratamientos 2 y 4, lo que pudo deberse a algunos datos disparados que se presentaron en ellos.

Estas observaciones anormales pudieron presentarse debido a que durante la homogeneización de las muestras de tierra, se distribuyeron algunos grupos de huevecillos en el mismo lugar.

Estadísticamente el rechazo de la hipótesis de nulidad mostrado en el análisis de variancia demostró que las muestras provinieron de poblaciones diferentes y por lo

tanto existió diferencia entre los tratamientos desarrollados.

Las condiciones de distribución normal de los datos y de variancias homogéneas fueron determinantes para dar validez al análisis de variancia pero, aunque no se cumplió esto, se decidió continuar con la prueba de Rango Multiple de Duncan, ya que esta prueba es amplia y usada en forma efectiva para probar diferencias entre las medias, aunque no se cumplan las condiciones anteriores (Walpole and Myers, 1987).

CONCLUSIONES

Resumiendo los resultados obtenidos en este trabajo podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- Las técnicas de extracción de huevecillos de organismos diversos, son eficaces para la recuperación de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith de muestras de suelo.
- 2.- La densidad del medio influye de manera importante en la recuperación de los huevecillos de D. v. zea, como lo demuestra la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ya que a mayor densidad, mayor obtención de huevecillos.
- 3.- El método 4 fué el mejor, ya que se obtuvo con él la mayor cantidad de huevecillos en poco tiempo, puesto que combinó un prelavado de la muestra más una solución de alta densidad, a diferencia del método 3 que fué el menos efectivo ya que no involucró las condiciones antes mencionadas.
- 4.- Los métodos 2,3,4 y 5 implementados por primera vez para este tipo de trabajo, resultaron efectivos para la extracción de los huevecillos de D. v. zea K and S., y adecuados a la infraestructura de nuestro país.

RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer un análisis de costos de los tratamientos empleados para este trabajo, ya que - - - - - sólo se realizaron de forma externa estimaciones aproximadas de los mismos, resultando el más caro el tratamiento No. 2, que necesitó de 120 kg. de azúcar para todo su desarrollo, y el más barato el No. 3, que sólo requirió 18 grs. de sal común.

Se sugiere también probar estos métodos de extracción para la obtención de huevecillos de otros insectos.

También se propone realizar, este trabajo involucrando otros tipos de suelo, ya que sólo se trabajó con muestras de textura arenosa.

Se recomienda también el empleo de otras soluciones para la obtención de huevecillos de éste o de otros insectos por diferencias de densidad.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, N.G. 1986. Fitopatología. 1a. Edición. Editorial Limusa. México. 756pp.
- Amparán, S.R.T. 1987. "Estudio del efecto de factores microclimáticos sobre biología y desarrollo de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith (Coleoptera: Chrysomelidae) en el centro de Jalisco". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Guadalajara. 85pp.
- Ball, H.J. 1957. On the biology and eggs laying habits of the western corn rootworm. J. Econ. Ent. 50: 126-128.
- Branson, T.F.; P.L. Guss; J.L. Krysan and G.R. Suttler. 1975. Corn Rootworms: Laboratory rearing and manipulation. Agricultural Research Service. U.S. Department of Agriculture. 1-17pp.
- Branson, T.F.; J.R. Reyes and H.M. Valdés. 1982. Field biology of mexican corn rootworm, Diabrotica virgifera zea (Coleoptera: Chrysomelidae), in central Mexico. Environmental Entomology. 11: 1078-1083.
- Brown, W.H. and F.A. Neva. 1988. Parasitología Clínica. 5a. Edición. Editorial Interamericana. México. 360pp.
- Covarrubias, Q.S. 1987. "Distribución vertical de huevecillos de Diabrotica virgifera zea Krysan and Smith (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae) en zonas maiceras del estado de Jalisco y factores detrimentales". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Guadalajara. 55pp.
- Coveness, F.E. and A.J. Jensen, 1955. Modification of the centrifugal-floatation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 22: 87-89.
- Chiang, H.C. 1873. Bionomics of the northern and western corn rootworm. A: Review of Ent. 18: 47-72.
- Daniel, W.W. 1990. Biocestadística (Base para el análisis de las ciencias de la salud). 3a. Edición. Editorial Limusa Noriega. México. 667pp.

- Felix, F.E. 1986. Incidencia de plagas de suelo, en el rendimiento del maíz y su distribución en el estado de Jalisco. Documento interno. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Jefatura del Programa de Sanidad. 5pp.
- Felix, F.E. 1987. Determinación de la eficacia plaguicida de formulaciones granulares de insecticidas clorodifosforados contra el complejo de plagas raiceras en Jalisco. Documento interno. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Jefatura del Programa de Sanidad Vegetal. 6pp.
- Felix, F.E. y J.R. Reyes. 1990. Plagas rizófagas de cultivos básicos en Jalisco. Documento interno. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Dirección General de Sanidad Vegetal. 21pp.
- Gonzalez, H.J. (1992) Bocero oficial de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos en Jalisco.
- Guerci, A.A. 1988. Laboratorio. Métodos de análisis clínicos y su interpretación. 4a. Edición. Editorial el Ateneo. Argentina. 543pp.
- Hines, W.W. and D.C. Montgomery. 1987. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Administración. Ed. CECSA. México. 671pp.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 1989. Monografía de Ahualulco del Mercado, Jalisco. Dirección Regional de Occidente. Centro de Documentación. Secretaría de Programación y Presupuesto. S.F.P. 32pp.
- Iovine, E. y A.A. Selva. 1979. El Laboratorio en la Clínica (Metodología analítica, fisiopatología e interpretación semiológica). Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1078pp.
- Kirk, V.M. 1975. Suitable oviposition site for corn rootworm (Diabrotica virgifera) resulting from concentration of rainwater by corn plant. Agric. Meteorol. 15(1): 113-116.
- Krysan, J.L.; R.F. Smith; T.F. Branson and F.L. Guss. 1980. A new subspecies of Diabrotica virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae): description, distribution and sexual compatibility. Ann. Entomol. Soc. Am. 73: 123-130.

- Matteson, J.W. 1966. Flotation technique for extracting eggs of Diabrotica spp. and other organisms from soil. *Journal of Economic Entomology*. 59: 223-224.
- Melvin, M.D. y M.M. Brooke. 1971. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales. 1a. Edición. Editorial Interamericana. México. 198pp.
- Mendoza, C.E. and D.C. Peters. 1964. Species differentiation among mature larvae of Diabrotica undecimpunctata, D. virgifera y D. longicornis. *J. Kans. Ent. Soc.* 37: 123-125.
- Montgomery, M.E.; G.J. Musick.; J.B. Polivka and D.G. Nielsen. 1979. Modifiable washing-flotation method for separation of insect eggs and larvae. *J. Econ. Entomol.* 72: 67-69.
- Pruess, K.P.; G.T. Weekman and B.R. Somerhalder. 1968. Western corn rootworm eggs distribution and adult emergence under 2 corn tillage systems. *J. Econ. Entomol.* 6 (5): 1424-1427.
- Reyes, C.P. 1982. Diseño de experimentos aplicados (Agronomía, Biología, Química, Industrias, Ciencias Sociales y Ciencias de la Salud). Editorial Trillas. México. 344pp.
- Reyes, R.J. 1980. "Dinámica poblacional de Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith, y evaluación del daño a la raíz del maíz de temporal en Jalisco". Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara. 47pp.
- Reyes, R.J. 1983. Observaciones biológicas de campo sobre Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith, en maíz de temporal en Jalisco. II- Meza Redonda Sobre Plagas de Suelo. S.M.E. Chapingo, México. 831-840pp.
- Reyes, R.J. y S.E. Covarrubias. 1988. Distribución vertical de huevecillos de Diabrotica virgifera zeae Krysan and Smith (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae) dentro de las áreas maiceras en el estado de Jalisco. III- Meza Redonda Sobre Plagas de Suelo. S.M.E. Morelia, Michoacan. 167-178.
- Ríos, R.F. y R.S. Romero. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo en el estado de Jalisco. México (Coleoptera). *Folia Entomológica Mexicana*. 52: 41-60.

- Rowley, A.W. and D.C. Peters. 1972. Scanning Electron Microscopy of the eggshell of four species of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 15 (1): 1188-1191.
- Ruesink, W.G. and J.T. Shaw. 1983. Evaluation of a trench method for sampling eggs of the northern and western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 76: 1195-1198.
- Ruesink, W.G. 1984. Methods for the study of pest *Diabroticities* (Eggs Sampling Techniques). Natural History Survey and Illinois Agricultural Experiment Station. Inedito.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1980. *Principales plagas del maíz*. Dirección General de Sanidad Vegetal. SARH. 84pp.
- Shaw, J.T.; R.O. Ellis and W.H. Luckmann. 1976. Apparatus and procedure for extracting corn rootworm eggs from soil. Illinois Natural History Survey Biological Notes. No. 59
- Streets, R.B. 1969. The diagnosis of plant diseases. The University of Arizona Press. 260pp.
- Urdiales, V.L. 1990. Encargado del area de Fitonemátodos en el Programa de Sanidad Vegetal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Delegación Guadalajara, Jal.
- Walpole, E.R. y R.H. Myers (1987). Probabilidad y Estadística para Ingenieros. 3a. Edición. Ed. Interamericana. México. 733pp.