

Manual para la cría masiva
de *Cyrtobagous salviniae*
utilizado en el control biológico
de *Salvinia molesta*



**Manual para la cría masiva
de *Cyrtobagous salviniae* utilizado
en el control biológico
de *Salvinia molesta***

Maricela Martínez Jiménez

**Manual para la cría masiva
de *Cyrtobagous salviniae* utilizado
en el control biológico
de *Salvinia molesta***

IMTA

Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua

México, 2005

571.7028
M33

Martínez Jiménez, Maricela
Manual para la cría masiva de Cyrtobagous salviniae utilizado en el control biológico de Salvinia molesta / Maricela Martínez Jiménez.- México: IMTA, 2005.

43 pp. 22.5 x 15.5 cm

Incluye bibliografía

ISBN 968-5536-46-5

1. Malezas acuáticas 2. Contaminación del agua 3. Control biológico

Coordinación editorial:
Coordinación de Comunicación,
Participación e Información,
Subcoordinación de Editorial y Gráfica.

Cuidado de edición:
Antonio Requejo del Blanco.

Diagramación:
Luisa Guadalupe Ramírez Martínez.

Diseño de portada:
Óscar Alonso Barrón.

Ilustraciones y fotografías:
Maricela Martínez Jiménez.

Primera edición: 2005.

El presente manual se realizó gracias al apoyo
del Proyecto Sagarpa-Conacyt 0278

D.R. © Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
Paseo Cuauhnáhuac 8532,
Progreso, Jiutepec, Morelos
CP 62550

ISBN 968-5536-46-5

Todos los derechos reservados. Ni la totalidad ni parte de la presente publicación puede ser reproducida, almacenada en sistemas de recuperación de información o transmitida bajo cualquier forma o por ningún medio, sea electrónico, mecánico, de fotocopiado o grabación, sin la previa autorización, por escrito, del editor.

Impreso en México - *Printed in Mexico*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
1 ANTECEDENTES	11
1.1 Clasificación taxonómica de <i>Salvinia molesta</i>	11
1.2 Características de <i>Salvinia molesta</i>	11
1.3 Factores que afectan el crecimiento de <i>Salvinia molesta</i>	12
1.4 Diseminación de <i>Salvinia molesta</i>	13
1.5 Métodos de control	13
1.5.1 Control químico	13
1.5.2 Control físico	14
1.5.3 Control biológico	14
1.5.4 Características del coleóptero <i>Cyrtobagous salviniae</i>	15
1.6 Cuarentena de insectos para el control biológico de malezas acuáticas	15
1.7 Cría masiva de insectos	17
2 METODOLOGÍA	19
2.1 Cuarentena de <i>Cyrtobagous salviniae</i>	19
2.2 Revisión sanitaria de las colonias producidas	19
2.2.1 Detección de hongos entomopatógenos	19
2.2.2 Detección de bacterias entomopatógenas	20
2.2.3 Obtención de cepas puras de bacterias entomopatógenas	20
2.2.4 Identificación de bacterias entomopatógenas	20
2.2.5 Detección de microsporidios	22
2.2.6 Detección de nemátodos	22
2.3 Cría masiva de <i>Cyrtobagous salviniae</i>	22
2.3.1 Verificación del estado sanitario de las colonias	24
2.4 Liberación de <i>Cyrtobagous salviniae</i>	25
2.4.1 Precauciones para la liberación	25
2.5 Monitoreo	25
2.5.1 Cobertura	25
2.5.2 Determinación de la biomasa	26
2.5.3 Determinación de la densidad de la maleza	26
2.5.4 Determinación del número de adultos	26
2.5.4.1 Determinación del estado sanitario	26

LITERATURA CITADA	27
ANEXO FOTOGRÁFICO	31
ANEXO 1	
Formato para el control de la cría de <i>Cyrtobagous salviniae</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Tricomas del complejo <i>auriculata</i> .	33
2. Diferenciación de las especies de <i>Salvinia</i> a través del arreglo de sus esporocarpos.	33
3. Características de <i>Salvinia molesta</i> .	34
4. Esporocarpos de <i>Salvinia molesta</i> .	34
5. Esporangios de <i>Salvinia molesta</i> al interior del esporocarpo.	35
6. Crecimiento primario y secundario de <i>Salvinia molesta</i> .	35
7. Crecimiento terciario de <i>Salvinia molesta</i> .	36
8. Barrera flotante para el control de <i>Salvinia molesta</i> en canales de riego.	36
9. Adulto de <i>Cyrtobagous salviniae</i> .	37

INTRODUCCIÓN

Salvinia molesta, originaria de Brasil, es después del lirio acuático una de las principales malezas acuáticas del mundo. Esta planta ha sido introducida en los Estados Unidos, India, sudeste de Asia, África y Australia a través del comercio de plantas acuáticas utilizadas en acuarios. En los Estados Unidos, las autoridades del río Sabine la reportaron en 1998 en la presa Toledo Bend situada en los estados de Texas y Louisiana. En 1999, la oficina de Pesca y Protección a la Vida Silvestre, reportó una infestación de *Salvinia molesta* en el Valle Imperial y en los drenes del distrito de riego de Palo Verde en Blythe, California. Hasta el momento, existen reportes de infestaciones en los Estados Unidos en más de cincuenta sitios en 11 estados, de los cuales tres están situados en la frontera con México: California, Texas y Nuevo México.

En el año 2000, la Comisión Nacional del Agua, detectó en México la infestación de esta maleza en las presas Morelos y Matamoros en el estado de Baja California. La presa Morelos es el punto de conexión entre las aguas del distrito de riego de Palo Verde y del Valle Imperial (infestado por esta maleza), y la red de canales y drenes mexicanos, convirtiendo este punto en la entrada de la maleza a nuestro país. En 2002, el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) reportó una severa infestación de *Salvinia* en las lagunas Las Ilusiones y Tabasco, en la ciudad de Villahermosa, Tabasco (Martínez, 2003). Otros reportes indican la presencia de esta maleza en los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca sin que, hasta el momento, se haya realizado acción alguna para su control (Vásquez, 1991).

La rápida colonización de *Salvinia molesta* se efectúa a través de las diminutas hojas fácilmente transportadas por el viento, además de contar con una alta tasa reproductiva ya que entre dos y cinco días una planta se duplica. Aunado a esto, las actividades de pesca recreativas han constituido una de las principales vías de reinfestación por medio de lanchas, remolcadores y otros vehículos, que trasladan la maleza a otros sitios.

La proliferación de esta planta en los cuerpos de agua, así como en las cuencas a su alrededor, provoca graves problemas de índole económica, ecológica y de salud. Dentro de los problemas económicos se pueden citar las pérdidas de agua por evapotranspiración, el azolvamiento prematuro de embalses, la limitación de la actividad pesquera y recreativa, la obstrucción de canales de riego y la operación de obras hidráulicas. Como problemas ecológicos, se encuentra que la acumulación en grandes cantidades de esta maleza provoca el estancamiento de agua, lo cual disminuye el oxígeno disuelto y por consiguiente, la muerte de especies acuáticas. En cuanto a problemas de salud, la proliferación de malezas acuáticas constituye al hábitat para el desarrollo de mosquitos transmisores de dengue (*Aedes aegypti*), malaria (*Stephensis malaria*) y filariasis (*Culex quinque fasciatus*) o caracoles transmisores de *Schistosoma* sp.

Las medidas de control de esta maleza han comprendido el control químico y mecánico lo que, como en otros casos de control de malezas, ha dado resultados temporales a un alto costo económico y ecológico. El uso de alternativas de control con menos impacto en el medio ambiente y, sobre todo, que ejerzan un control sustentable de la maleza es una vía de desarrollo que ha tenido resultados favorables en varios países. Dentro de estas vías, el control biológico por medio de insectos y patógenos altamente específicos ha dado resultados satisfactorios sin riesgos ambientales.

Investigaciones recientes han identificado tres insectos como potenciales agentes de biocontrol de *Salvinia*: *Cyrtobagous salviniae* (Coleoptera: Cuculionidae); *Samea multiplicalis* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Paulinia acuminata* (Orthoptera: Acrididae) (Forno y Bourne, 1984). De éstos, *Cyrtobagous salviniae* ha sido introducido en varios países donde ha logrado reducir la tasa de crecimiento de la maleza. El presente manual describe el proceso de cuarentena y cría masiva de *Cyrtobagous salviniae* para su uso en el control integral de *Salvinia molesta*.

1 ANTECEDENTES

1.1 Clasificación taxonómica de *Salvinia molesta*

División: Polypodiophyta (Pteridophyta), helechos verdaderos.

Subclase: Salviniidae.

Orden. Salviniiales.

Familia: Salviniaceae.

Subfamilia: Salviniioideae.

Tribu: Salviniaceae.

Género: *Salvinia*

Complejo: *Salvinia auriculata*

Especie: *molesta*

Salvinia molesta es un helecho flotante que crece de manera natural en las costas de Brasil, en los estados de Sao Paulo, Paraná, Santa Catarina y Río Grande. Se le encuentra en lagos naturales, artificiales, presas, pantanos, canales de drenaje y a orillas de los ríos (Forno y Harley, 1979).

La familia de *Salvinia molesta* se encuentra formada por sólo un género con diez especies, las cuales se distribuyen alrededor del mundo. *Salvinia molesta* es agrupada en un complejo denominado *Salvinia auriculata* (Mitchell y Thomas, 1972). Las especies que conforman este complejo son: *S. auriculata*, *S. biloba*, *S. herzogii* y *S. molesta* (Forno, 1983). La característica anatómica que comparten dichas especies está dada por presentar cuatro vellosidades o tricomas unidas en el ápice, que asemejan diminutos batidores de huevos (ver figura 1 en anexo fotográfico). Las diferentes especies de *Salvinia* se pueden diferenciar a través del arreglo y número de sus esporocarpos (ver figura 2 en anexo fotográfico) y la venación de sus hojas (Forno, 1983).

1.2 Características de *Salvinia molesta*

Salvinia molesta es un helecho libre flotante con rizomas horizontales que se localiza justo por debajo de la superficie del agua (Bonnet, 1995; Room,

1983). La planta se forma por internodos, nodos, un par de hojas flotantes, una raíz sumergida y brotes (ver figura 3 en anexo fotográfico). La raíz está formada por hojas modificadas que parecen y funcionan como tal (Croxdale, 1978, 1979/81). En cada nodo de la planta se desarrollan tres brotes axilares; un par da origen a hojas y el tercero desarrolla la “raíz” (Julien y Bourne, 1988); esto en condiciones normales de crecimiento. Cuando la planta se encuentra en estrés, llega a desarrollar seis brotes por internodo como respuesta al daño causado por algún agente (Julien y Bourne, 1986).

Los esporocarpos de *Salvinia molesta* están distribuidos de forma alterna a lo largo del eje fértil. Los esporocarpos son globosos poco apiculados, de 2-3 mm de diámetro (ver figura 4 en anexo fotográfico) y contienen una gran proporción de esporangios (ver figura 5 en anexo fotográfico).

El número de brotes axiales que crece, el rango de crecimiento y el tamaño de la planta dependen de la disponibilidad de nutrientes esenciales que existan en el medio; nuevas plantas se forman cuando las viejas se rompen o se separan por daño o senescencia de los progenitores (Room, 1983).

Salvinia es una planta pentaploide, es decir, con cinco réplicas de cada uno de sus nueve cromosomas, conteniendo en total cuarenta y cinco cromosomas por célula. La reproducción de la planta se efectúa en forma vegetativa a través de estolones, ya que sus esporocarpos presenta esporangios infértiles.

Salvinia presenta tres formas de crecimiento, asociadas con el grado de plegamiento de la planta (Mitchell y Tur, 1975). El crecimiento primario ocurre en plantas aisladas, en su estado invasivo. Esta forma presenta hojas pequeñas con forma ovalada, menores de 15 mm de ancho, que yacen tendidas en la superficie del agua (ver figura 6 en anexo fotográfico). La forma secundaria sucede cuando la planta ha permanecido en el agua durante un cierto tiempo; los internodos son largos, con hojas en forma de canoa y ápices redondeados (figura 6). El tamaño de las hojas oscila entre 20 y 50 mm de ancho. El crecimiento terciario se presenta cuando la planta ha crecido tanto en número que forma un tapete estable, los internodos se acortan y la hoja adquiere una forma de corazón alcanzando longitudes de 60 mm de ancho (ver figura 7 en anexo fotográfico).

1.3 Factores que afectan el crecimiento de *Salvinia molesta*

Salvinia es una planta peri-anual que no presenta una estacionalidad periódica, aunque los cambios en crecimiento pueden estar

relacionados con cambios en la temperatura. El crecimiento óptimo se da a temperaturas de 30° C; temperaturas arriba de los 40° C y debajo de los 10° C detienen el crecimiento (Room, 1986). Las exposiciones por más de dos horas a temperaturas superiores a los 43° C y por debajo de los 3° C matan a la planta (Whiteman y Room, 1991).

Salvinia adapta su crecimiento a aguas con bajos nutrientes (Room y Thomas, 1986), aunque la proporción de brotes axilares que se desarrollan está relacionado con el contenido de nitrógeno que hay en la planta (Room, 1983; Julien y Bourne, 1986). A bajos niveles de nitrógeno las hojas y raíces alargan su longitud, hay una mayor ocurrencia de esporocarpos y la producción de estolones y raíces baja (Room, 1983; Julien y Bourne, 1986; Room y Julien, 1995).

Salvinia puede crecer en aguas con un rango de conductividad que va de 100µS/cm a 1,400 µS/cm (Mitchell *et al.*, 1980; Room y Gill, 1985). En aguas con salinidad de un 10% o en agua de mar, *S. molesta* reduce su crecimiento en un 25%; con una salinidad de un 20%, el crecimiento es muy lento; con un 30%, la planta muere a los treinta minutos de haber sido expuesta (Room y Julien, 1995). El pH óptimo de crecimiento es de 6.0; en campo crece en rangos que van de 5.2 a 9.5 (Mitchell *et al.*, 1980).

1.4 Diseminación de *Salvinia molesta*

Salvinia es diseminada entre los cuerpos de agua por la acción del viento y, principalmente, por el hombre mediante su uso en acuarios o cuando de forma accidental la planta se adhiere en los botes y equipos acuáticos (Room y Julien, 1995).

1.5 Métodos de control

1.5.1 Control químico

Los herbicidas utilizados para el control de *Salvinia* son el Diquat (Reward y Rodeo), 2,4-D (Weedar 64), Endothall (Aquathol K), Fluridone (Sonar A.S.) y quelato de cobre (Clearigate, Komeen y Cutrine Plus), los cuales han sido utilizados en mezcla con un surfactante.

Particularmente, *Salvinia* se ha visto resistente al control químico debido a que: a) los tallos y brotes se encuentran bajo el agua, b) las hojas no se pueden humectar debido al aire atrapado entre las numerosas vellosidades

que cubren completamente las hojas (figura 1), que las hace impermeables y c) el arreglo vertical de las hojas impide su humectación por los agentes herbicidas. Dadas estas condiciones, el uso de herbicidas ha necesitado la adición de grandes cantidades de surfactantes, conocidos por su alta toxicidad.

1.5.2 Control físico

El control de *Salvinia* puede realizarse mediante su traslado en una barcaza, a la cual diversas lanchas acarrean el material vegetal para después ser depositado en un lugar alejado del espejo de agua. Este método es útil en infestaciones incipientes y lugares de fácil acceso. Por otro lado, la instalación de barreras flotantes es recomendable en lugares tales como canales y drenes, debido a su relativamente fácil manejo (ver figura 8 en anexo fotográfico).

1.5.3 Control biológico

Este tipo de control implica la introducción de enemigos naturales propios del lugar de origen de la plaga (insecto o planta). El razonamiento de esta estrategia se basa en que la plaga o maleza no causa ningún daño en su centro de origen, debido a que allí existe todo un complejo de enemigos naturales que regulan su población, manteniéndolo en niveles que no ocasionan daño económico. La transformación en plaga (insecto o planta) se debe a un fenómeno de dispersión accidental (por movilización de material vegetativo realizada por el hombre, en la mayoría de los casos), sin acompañamiento de sus factores regulativos (enemigos naturales) alterando, de esta manera, el equilibrio poblacional. Así, la estrategia consiste en hacer una exploración de enemigos naturales en el lugar de origen de la plaga (insecto o planta); después de la exploración y recolecta, los enemigos naturales son sometidos a un proceso de cuarentena (de por lo menos dos generaciones), que implica la cría y mantenimiento de la población. De esta forma se eliminarán organismos indeseables tales como hiperparásitos o patógenos. Después de la cuarentena, se procede a liberar los organismos benéficos en el lugar del problema, se determina si hubo establecimiento y se evalúa el impacto ecológico de la especie liberada (Arredondo, 1993). Esta estrategia ha sido aplicada en varios países, en donde se han obtenido buenos resultados. Por ejemplo, en Australia se ha usado para combatir *Pistia stratiotes* (lechuga de agua), con el coleóptero *Neohydronomus affinis*, importado de Brasil en 1982 (Cilliers, 1991).

Para el control biológico de *Salvinia molesta*, básicamente se ha utilizado la estrategia de control biológico clásico, es decir, se han investigado los enemigos naturales de la maleza en su lugar de origen, lo que ha dado por resultado la identificación de tres insectos como potenciales agentes de

biocontrol: *Cyrtobagous salviniae* (Coleoptera: Cuculionidae), *Samea multiplicalis* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Paulinia acuminata* (Orthoptera: Acrididae) (Forno y Bourne, 1984; Sands y Kassulke, 1985). De éstos, *Cyrtobagous salviniae* ha sido introducido en varios países donde ha logrado reducir la tasa de crecimiento de la maleza. Cabe señalar que hasta el momento no existe reporte alguno de fitopatógenos que ataquen a esta planta.

1.5.4 Características del coleóptero *Cyrtobagous salviniae*

El género *Cyrtobagous* comprende dos especies: *singularis*, encontrado en plantas de *Salvinia mínima*, y *salviniae*, encontrado en *Salvinia molesta* (Julien y Griffiths, 1998). Los huevecillos de *Cyrtobagous salviniae* miden, aproximadamente, 0.5 x 0.24 mm; son inactivos y se encuentran en cavidades de los rizomas excavadas por el adulto. Al cabo de diez días a temperaturas de 25.5° C emerge la larva (1 mm, aproximadamente), de color blanco. Empieza por alimentarse de raíces o pequeños brotes, generando túneles en los rizomas y su posterior desintegración. La larva completa tres instares dentro de los rizomas, en alrededor de 23 días, con temperaturas constantes de 25.5° C (Forno *et al.*, 1983). La fase de pupa se da en un capullo (2 x 2.6mm) elaborado con los cabellos de la raíz; la pupa requiere de 12.6 días para completar su desarrollo. La duración del estado de pupa no se ve afectada por las propiedades nutricionales en que se encuentre la planta (Forno *et al.*, 1983). La oviposición no ocurre por debajo de temperaturas de 21 °C y los huevos no sobreviven debajo de los 20 o arriba de los 36 grados centígrados.

Los adultos son pequeños (2-3 mm de largo), de color negro (ver figura 9 en anexo fotográfico), con hábitos subacuáticos y se les encuentra residiendo en las hojas. El macho mide aproximadamente 1.8 x 0.9 mm, mientras que la hembra tiene longitudes de 2.2 x 1.2 mm; una vez que los adultos acaban de emerger de los capullos presentan una coloración café, empezando a oscurecerse después de cinco días.

1.6 Cuarentena de insectos para el control biológico de malezas acuáticas

El principal propósito de poner en cuarentena a los agentes utilizados en el control biológico de malezas, es mantener confinado el organismo introducido hasta completar los estudios que garanticen que su liberación no constituirá un peligro económico o ambiental para el país de introducción. Objetivos específicos conducentes a dicho propósito son:

- Confirmar la identificación del bioagente después de su introducción a un nuevo país.
- Separar el herbívoro de organismos indeseables, principalmente depredadores, parásitos, entomopatógenos, plagas y substratos vegetales de transporte.
- Realizar la crianza base o inicial del bioagente hasta completar un ciclo biológico.
- Efectuar las pruebas de especificidad húsped-hospedero.

Asimismo, la cuarentena constituye una última instancia para realizar observaciones sobre la biología del herbívoro, particularmente si ésta es deficitaria, así como mantener la crianza de un bioagente, en caso de que se requieran nuevas pruebas o se priorice la liberación de otro bioagente durante el desarrollo del programa.

El diseño estructural requerido para las construcciones del proceso de cuarentena varía de acuerdo con características tales como el tamaño y dispersión del tipo de organismo introducido (hongo, nemátodo, artrópodo, planta), y con los grados de restricción y seguridad establecidos por los distintos países. Cuarentenas de alto nivel de seguridad han sido progresivamente construidas en Estados Unidos, Canadá y Australia, países con una larga tradición en el control biológico de malezas (Fisher y Andrés, 1999; De Clerck-Floate *et al.*, 2000). En Latinoamérica, varios países poseen construcciones del proceso de cuarentena para el control de artrópodos plaga, las cuales pueden servir al propósito básico requerido al introducir un bioagente de maleza, o bien, se pueden adaptar o ampliar para efectuar pruebas de especificidad. La introducción a Chile de herbívoros de probada especificidad sobre la maleza *Ulex europaeus* se realizó utilizando recintos para cuarentenas de este tipo (Norambuena *et al.*, 2000). En México sólo se cuenta con un centro de cuarentena para insectos benéficos: el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en Tecomán, Colima. Desafortunadamente, este centro no cuenta con instalaciones para procesos de cuarentena de insectos para el control biológico de malezas acuáticas.

La cuarentena para artrópodos de malezas debe contar, como mínimo, con cuartos de seguridad que garanticen que al abrir los contenedores con bioagentes exóticos para su identificación confirmatoria, limpieza y crianza inicial, no habrá escape de éstos o sus antagonistas. En dichos cuartos de seguridad se deben tener claves y documentos que permitan la identificación del bioagente, así como de otros organismos, incluyendo

especies plaga animales y vegetales. La cuarentena debe contar con sistemas de control de las condiciones ambientales de luz, temperatura, cabinas de crecimiento, refrigerador, equipos de inspección, esterilización e incineración. También, con cajas de confinamiento de artrópodos y otros materiales varios de laboratorio que permitan el manejo y observación de los organismos. Otros utensilios necesarios para la manutención de la cuarentena deben ser también mantenidos en su interior (Fisher y Andrés, 1999).

1.7 Cría masiva de insectos

El objetivo de la cría masiva de insectos es la producción, con mínimos de trabajo y espacio, de un número máximo de individuos de una misma especie. La cría de insectos está encaminada a resolver problemas como:

- Incrementar o mantener la cepa de un programa de introducción de una especie exótica, hasta que las colonias sean establecidas en campo.
- Aumentar en el campo las poblaciones de especies nativas.
- Producir grandes cantidades de insectos para ser liberados en masa, cuando se requiere aplicar un control biológico tipo inundación.
- Controlar el estado sanitario de las colonias producidas.

2 METODOLOGÍA

2.1 Cuarentena de *Cyrtobagous salviniae*

Los insectos que serán sometidos a un proceso de cuarentena son ubicados en lotes. Cada lote es colocado en plantas de *Salvinia molesta* en acuarios de vidrio de 30x30x60 cm, los cuales se cierran herméticamente con un marco recubierto de tela de cielo. Para diferenciar los acuarios, cada lote es numerado en serie.

Para diferenciar cada etapa de la cuarentena, cada colonia se denomina, en lo subsecuente: *Colonia silvestre* a los insectos que constituyen la colonia inicial; *Progenitores* a los insectos obtenidos de la cría de la *Colonia silvestre*. A los insectos obtenidos a partir de los *Progenitores* se les conocerá como *F1*; las siguientes se denominarán *F2*, *F3*, etcétera.

A partir de la *Colonia silvestre* se obtienen los *Progenitores* de la siguiente manera: los insectos de la *Colonia silvestre* son colocados en acuarios sobre plantas de *Salvinia molesta*. Al cabo de cinco días, tiempo necesario para que la hembra oviposite, los insectos son retirados de las plantas y éstas se colocan en acuarios cerrados herméticamente con manta de cielo.

Una vez transcurridos más o menos 45 días, tiempo en el cual se desarrolla el ciclo del insecto, se cosechan los insectos de las plantas que se tenían en los acuarios. Una vez obtenidos los progenitores, a partir de esta colonia, se realiza la misma técnica para obtener los descendientes que constituirán la primera generación, denominada *F1*.

2.2 Revisión sanitaria de las colonias producidas

Con el fin de determinar la posible infección de las colonias, una muestra de cien larvas y adultos de la colonia silvestre, progenitores y descendientes es revisada de acuerdo con los procedimientos establecidos por Poinar y Thomas (1984), que a continuación se desarrollan:

2.2.1 Técnica de detección de hongos entomopatógenos

- Macerado aséptico de insectos vivos.

- Observación al microscopio.
- Siembra del macerado anterior en medio sabourad-dextrosa- agar (SDA+Y).
- Medio sabourad-dextrosa-agar + extracto de levadura.
- Neopeptona 10 g
- Dextrosa 40 g
- Extracto de levadura 2 g
- Agar 15 g

Esterilizar a 120 °C y 1.5 lb de presión por 15 minutos.

Las cajas se incuban 1-15 días a 25 °C y, posteriormente, se observa al microscopio para la identificación de posibles hongos entomopatógenos.

2.2.2 Técnica para la detección de bacterias entomopatógenas

- Desinfección superficial del insecto con hipoclorito de sodio al 0.12%.
- Macerado aséptico del insecto vivo en un pequeño volumen de agua estéril.
- Dilución serial del homogeneizado anterior.
- Siembra en agar nutritivo de cada dilución.
- Incubación a 35 °C durante 24 horas.

Agar nutritivo

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 5 g
- Agar 15 g

Esterilizar a 120 °C y 1.5 lb de presión por 15 minutos.

2.2.3 Obtención de cepas puras de bacterias entomopatógenas

Para el caso de bacterias, después de haber incubado durante 24 h las diluciones del homogeneizado descrito, las diferentes colonias que emergieron se diferencian y aíslan basándose en la forma, color y textura.

2.2.4 Identificación de bacterias entomopatógenas

Una vez que se obtienen cepas puras, se aplica la coloración de Gramm a cada una de las colonias aisladas en agar nutritivo. La reacción a la tinción de Gramm diferencia las bacterias Gramm negativas y positivas.

- Preparar un frotis de un cultivo de 24 h de incubación en un portaobjetos.
- Cubrir el frotis, previamente fijado a la flama, con violeta cristal, durante 30 segundos.
- Ecurrir el colorante y lavar el frotis con agua corriente.
- Aplicar el yodo de Gramm y dejarlo reaccionar por 30 segundos.
- Ecurrir el colorante y lavar el frotis con agua corriente.
- Enjuagar con alcohol.
- Cubrir el frotis con la solución de safranina de Gramm y dejarlo actuar de 10 a 20 segundos.

Ecurrir el colorante y lavar con agua corriente. Dejar secar la preparación y observar al microscopio con el objetivo de inmersión. Las bacterias Gramm positivas retienen la combinación de los colorantes de yodo y violeta, por lo que aparecerán al examen del microscopio de color rosado; las bacterias Gramm negativas aparecerán de color azul-morado.

Después de la coloración de Gramm, se procede a sembrar éstas en algunos medios selectivos para bacterias entomopatógenas. Dichos medios son:

Medio diferencial para *Streptococcus feacalis*

- | | |
|------------------------|------|
| - Peptona | 10 g |
| - Extracto de levadura | 1g |
| - Sorbitol | 2 g |
| - Tirosina | 5 g |
| - Agar | 12 g |

Esterilizar por 10 min a 10 lb de presión. Ajustar a un pH de 6.2. Agregar 0.01% de 2,3,5-trifenil tetrazolium chloride (TTC) y 0.1% acetato. Verter una pequeña capa en cajas Petri estériles. Al medio sobrante adicionar 4 g de tirosina. Agitar perfectamente hasta disolver la tirosina. Verter una capa de este medio sobre la capa anteriormente vertida en cajas de Petri. Inocular una caja con las bacterias aisladas e incubar a 37 °C por 4 h. Incubar por tres días a 45 grados centígrados.

Las colonias cultivadas en medio diferencial para *Streptococcus feacalis*, deben ser colonias de color rojo oscuro rodeadas de zonas claras (Poinar y Thomas, 1984).

Medio diferencial tertigol-7 + TTC agar (T7 + TTC) para *Escherichia coli*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Enterobacter* sp. y *Pseudo monas aeruginosa*.

- | | |
|------------------------|-------------------|
| - Peptona | 5 g |
| - Extracto de levadura | 3 g |
| - Lactosa | 10 g |
| - Agar | 15 g |
| - Tertigol-7 | 0.1 ml |
| - Bromitol azul | 0.025 ml |
| - Agua destilada | aforar a un litro |

Mezclar los ingredientes.

- Esterilizar a 1.5 lb de presión por 15 min.
- Enfriar hasta 50 °C.
- Disolver 40 mg de TTC en 5 ml de agua y filtrar al medio frío.
- Verter a cajas Petri estériles.

El tertigol-7 con la adición de 2,3,5-trifenil tetrazolium chloride (TTC) es un medio para el aislamiento de bacterias coliformes Gramm negativas. Así, *Escherichia coli* produce colonias amarillas, *Xenorhabdus nematophilus* forma colonia de color azul, algunas especies de *Enterobacter* forman colonias rojas rodeadas de una zona amarilla, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* forma colonias rojas (Poinar y Thomas, 1984).

2.2.5 Técnica para la detección de microsporidios

La detección de microsporidios se realiza por el siguiente procedimiento: una muestra de cien insectos vivos de la colonia silvestre, cien de los progenitores y cien de los descendientes son macerados asépticamente. Estos macerados son observados al microscopio bajo contraste de fases. Las esporas de microsporidios pueden ser distinguidas de otras por su forma y porque son refringentes.

2.2.6 Detección de nemátodos entomopatógenos

- Disección del insecto vivo en 0.9% NaCl.
- Observación al microscopio.

2.3 Cría masiva de *Cyrtobagous salviniae*

La cría masiva de *Cyrtobagous salviniae* se realiza sobre plantas de *Salvinia molesta*. Para evitar la introducción de parásitos no deseados, las plantas recolectadas se lavan y desinfectan de la siguiente manera:

- Las plantas se limpian perfectamente con agua corriente.

- La planta entera se desinfecta sumergiéndola en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante tres minutos.
- Se realizan tres enjuagues con agua corriente y se colocan en el estanque correspondiente.

Para fertilizar, se utiliza un fertilizante comercial soluble en agua (*Peters, N.P.K 20.20.20, Scotts*) adicionado de quelato de hierro (*Sequestrene, 330 Fe, Ciba Geigy*); éstos se utilizan proporcionalmente para proveer a la planta 5 ppm de nitrógeno y 2 ppm de hierro.

Una vez que se cuenta con plantas sanas, verdes y vigorosas, se colocan dos insectos por planta en un total de cincuenta dispuestas en acuarios. Después de cinco días se recuperan los insectos para ser colocados en plantas nuevas. La planta donde el insecto permaneció se coloca en estanques o tinas durante 45 días, tiempo en el que se lleva a cabo el ciclo del insecto. Los insectos son cosechados diariamente y colocados en plantas sanas de *Salvinia molesta* para que ovipositen en ellas y, de esta forma, establecer su producción masiva.

Durante la siembra y cosecha se recomienda cubrir las tinas con malla de invernadero u otro material para evitar que los insectos se escapen. Se sugiere utilizar el formato presentado en el anexo, para calendarizar la producción de insectos durante el año.

2.3.1 Verificación del estado sanitario de las colonias

Si al criar los insectos se observa alguna anomalía en el cuerpo de éstos (material algodonoso blanquecino o verde), puede ser síntoma de alguna infección. Algunos patógenos de insectos son relativamente fáciles de eliminar limpiando la colonia si se encuentra infectada. Si es el caso, el procedimiento es el siguiente: colocar parejas de insectos sobre plantas de lirio; ubicar las plantas en un sitio cubierto (tinas, estanques, etc.); dejar cinco días, más o menos, los insectos sobre las plantas; extraer cuidadosamente los huevecillos de la plantas y esterilizarlos superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,05% durante 1 min; luego, colocarlos en cajas de Petri (u otro recipiente limpio y esterilizado) acondicionadas con papel filtro estéril y humedecido. Por último, depositar en una incubadora de cinco a diez días, a 25 grados centígrados.

Una vez que las larvas eclosionan se colocan en plantas de *Salvinia molesta*. Para ello, se hace una incisión en el tallo de la planta y, con ayuda de un pincel, se deposita la larva adentro para que complete su ciclo. En la generación que se obtenga deberá vigilarse que no presente los síntomas ya observados.

2.4 Liberación de *Cyrtobagous salviniae*

Una vez obtenidos los adultos sanos, se colocan en recipientes de plástico previamente acondicionados con papel humedecido y hojas frescas de *Salvinia molesta*. Los recipientes se cubren con tapa, a la cual se le practican pequeñas perforaciones para permitir la aireación. De esta forma los insectos se transportan al lugar donde se requiera liberarlos.

2.4.1 Precauciones para la liberación

- Debido a que en México existen diferentes especies de *Salvinia* y que el *Cyrtobagous salviniae* es específico de *Salvinia molesta*, es de suma importancia verificar que la especie de *Salvinia* que se desea controlar corresponda a molesta (ver descripción de la especie en el apartado 1.1 “Clasificación taxonómica de *Salvinia molesta*”, párrafo 2, y su imagen en las figuras 4 y 5).
- Liberar los insectos en áreas donde las plantas de *Salvinia* no se dispersarán en, por lo menos, dos meses.
- Cuidar que los animales no tengan acceso a los sitios de liberación.
- No liberar en tiempo de heladas.
- Después de la liberación no asperjar insecticidas, herbicidas u otro químico.
- No liberar en lugares donde se utilice maquinaria para el control de malezas acuáticas (cosechadoras, trituradoras, etc.). En caso de que estén en funcionamiento, liberar en áreas alejadas donde no se vayan a aplicar dichos métodos.

2.5 Monitoreo

Después de aproximadamente 45 días de haber liberado en campo a los insectos, se sugiere realizar un primer monitoreo, tanto para determinar el establecimiento o no del insecto, como el efecto de éste sobre la maleza. El monitoreo consistirá en efectuar las siguientes evaluaciones:

2.5.1 Cobertura (espacio que ocupa la maleza en el espejo de agua)

Antes de llevar a cabo cualquier acción de control es necesario cuantificar el área infestada, para de este modo evaluar con certeza el grado de eficacia y eficiencia del agente de control utilizado. Con tal fin, se puede recurrir a los siguientes puntos:

- Recabar información de levantamientos topográficos del lugar para conocer el área total que abarca el espejo de agua. La cobertura de la maleza puede ser determinada a través de la medición del área infestada. Si el área infestada es más o menos rectangular, utilizar la fórmula: $\text{área (ha)} = \text{largo} \times \text{ancho} / 10,000$; si es más o menos triangular, utilizar la fórmula: $\text{área de triángulo (ha)} = \frac{1}{2} \text{base} \times \text{altura} / 10,000$; si es circular, utilizar la fórmula: $\text{área del círculo (ha)} = 3.1416 \times \text{radio}^2 / 10,000$.
- Si el área infestada es irregular, utilizar el método de figuras geométricas. Para ello se requiere un plano con escala donde se ubicarán los puntos de referencia, es decir, aquellos sitios del cuerpo de agua desde donde se puedan tomar medidas de uno a otro punto. El área infestada se divide en figuras geométricas sencillas y se toman las dimensiones de cada lado de la figura establecida. Se calcula el área de cada figura y se suma cada una de ellas para obtener el área total.
- La determinación de la cobertura podrá también efectuarse con la ayuda de GPS (*Global Positioning System*), de imágenes de satélites o fotografías aéreas.

2.5.2 Determinación de la biomasa (peso fresco o seco de la planta por unidad de área)

Se coloca un cuadro de madera u otro material en el sitio infestado, las plantas que se encuentran dentro del cuadrado se extraen, se dejan escurrir durante 5 min y se pesan.

2.5.3 Determinación de la densidad de la maleza (número de plantas que existen en una determinada área).

Utilizando el mismo cuadrado descrito anteriormente, se cuenta el número de plantas ubicadas dentro del cuadrado. La determinación de la biomasa se realiza de acuerdo con la fórmula establecida por Brower y Zar (1977):

$$\text{Densidad} = \text{número de plantas} / \text{unidad de superficie}$$

2.5.4 Determinación del número de adultos de *Cyrtobagous salviniae* por metro cuadrado

2.5.4.1 De acuerdo con las técnicas descritas, determinar el estado sanitario de las colonias liberadas

Las evaluaciones tendrán que ser realizadas, por lo menos, una vez al mes durante las cuatro estaciones el año. Los sitios de muestreo se

determinarán de acuerdo con lo accesible del sitio infestado. El número de sitios de muestreo y de cuadros de muestreo dependerá de la magnitud de la infestación.

LITERATURA CITADA

- Arredondo. H. C. B., 1993, "El control biológico y sus metodologías", *Memorias Taller de Control Biológico de Plagas Agrícolas*, Centro Nacional de Referencia, Tecomán, Colima, México, pp. 20-28.
- Brower E., y Zar J.H., 1977, *Field and Laboratory Methods for general Ecology*, EUA, WMC Brown Company Publishers.
- Bonnet, A. L. M., 1995, "Contribution a l'étude des hydropteridees: recherches sur *Salvinia auriculata* Aubl.", *Annals de Sciences Naturelles Botanique et Biologie Vegetale*, 16: 529-601.
- Cilliers, C. J., 1991, "Biological Control of Water Fern, *Salvinia molesta* (Salviniaceae), in South Africa Agricultur.", *Ecosystems and Environment* 37: 219- 224.
- Croxdale, J. G., 1978, "*Salvinia* Leaves, I. Origin and Early Differentiation of Floating and Submerged Leaves", *Canadian Journal of Botany*, 56: 1982-1991.
- Croxdale, J. G., 1979, "*Salvinia* Leaves, II. Morphogenesis of the Floating Leaf", *Canadian Journal of Botany*, 57: 1951-1959.
- Croxdale, J. G., 1981, "*Salvinia* Leaves, III. Morphogenesis of the Submerged Leaf", *Canadian Journal of Botany*, 59: 2065-2072.
- De Clerck-Floate, R.; P. Plue y T. Lee, 2000, "Lessons Learned during the Design of Arthropod and Pathogen Quarantine Facility", N. R. Spencer (ed.), *Proc. X Int. Symp. Biol. Contr. Weeds*, 4-14 July, 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, pp. 437-447.
- Fischer, T. W. y L. A. Andrés, 1999, "Quarantine: Concepts, Facilities and Procedures", T. S. Bellows y T. W. Fischer (eds.), *Handbook of Biological Control*, Academic Press, San Diego, California, pp. 103-124.
- Forno, I. W. y K. L. S. Harley, 1979, "The Occurrence of *Salvinia molesta* in Brazil", *Aquat Bot.*, 6:185-187.
- Forno, I. W., 1983, "Native Distribution of the *Salvinia auriculata* Complex and Keys to Species Identification", *Aquatic Botany* 17: 71-83.

- Forno, I. W.; D. P. A. Sands y W. Sexton, 1983, "Distribution, Biology and Host Specificity of *Cyrtobagous singularis* Hustache (Coleoptera:Curculionidae) for the Biological Control of *Salvinia molesta*", *Bulletin of Entomological Research*, 73: 85-95.
- Forno, I. W. y A. S. Bourne, 1984, "Studies in South America of Arthropods on the *Salvinia auriculata* Complex of Floating Ferns and their Effects on *S. molesta*", *Bulletin of Entomological Research*, 74: 609-621.
- Julien, M. H. y A. S. Bourne, 1986, "Compensatory Branching and Changes in Nitrogen Content in the Aquatic Weed *Salvinia molesta*", *Response to Disbudding. Ecology*, 70: 250-257.
- Julien, M. H. y A. S. Bourne, 1988, "Effects of Lead-feeding by Larvae of the Moth *Samea multiplicalis* Guen. (Lep., Pyralidae) on the Floating Weed *Salvinia molesta*", *J. Appli. Entomol.*, 106: 518-526.
- Julien, M. H. y M. W. Griffiths, 1998, *Biological Control of Weeds, a World Catalogue of Agents and their Target Weeds*, 4th ed., CAB International, Oxon, UK.
- Martínez, J. M., 2003, "Prevention and Control of *Salvinia molesta* in Mexico", *Proceedings of the Giant Salvinia Task Force Steering Committee Meeting, Blythe, California, 24 June*.
- Mitchell, D. S y Thomas P.A., 1972, "Ecology of Water Weeds in the Neotropics", *Technical Papers in Hydrology*, UNESCO, Paris. 50 p.
- Mitchell, D. S. y N. M. Tur. 1975, "The Rate of Growth of *Salvinia molesta* (*S. auriculata* auct.), Laboratory and Natural Conditions", *Journal of Applied Ecol.*, 12: 213-225.
- Mitchell, D. S.; T. Petr y A. B. Viner, 1980, "The Water Fern *Salvinia molesta* in the Sepik River", Papua, New Guinea, *Environmental Conserv.*, 7: 115-122.
- Norambuena, H.; S. Escobar y F. Rodríguez. 2000, "The Biocontrol of Gorse, *Ulex Europæus*, in Chile: a Progress Report, N. R. Spencer (ed.), *Proc. X Int. Symp. Biol. Contr. Weeds*, 4-14 July, 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, USA, 955-961.
- Poinar, G. O. y G. M. Thomas, 1984, *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites*. Plenum Press, Nueva York. 392 pp.
- Room, P. M., 1983, "Fallin-apart as a Lifestyle- the Rhizome Architecture and Population Growth Weed *Salvinia molesta* and Simulations of Biological Control", *J. Ecol.*, 71: 349-365.
- Room, P. M. y M. H. Julien, 1995, "*Salvinia molesta* D.S. Mitchell, Groves", R. H., R. C. H. Shepherd y G. Richardson (eds.), *The Biology of Australian Weeds*, Volume 1, Melbourne, Australia, pp. 217-230.

- Sands D. P. A. y R. C. Kassulke, 1985, *Assessment of Paulinia acuminata* (Orthoptera: acrididae) for the *Biological Control of Salvinia molesta* in Australia, Division of Entomology, CSIRO, Long Pocket Laboratories, pp. 11-17.
- Vázquez, M. G., 1991, *Influencia de la estructura de la vegetación sobre las poblaciones larvarias de Anopheles albimanus* Wiedmemann (Diptera: Culicidae) en el sur de Chiapas, México, tesis de licenciatura, Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas, México, p. 31.
- Whiteman, J. B. y P. M. Room, 1991, "Temperatures Lethal to *Salvinia molesta* Mitchell", *Aquatic Bot.*, 40: 27-35.

ANEXO FOTOGRÁFICO

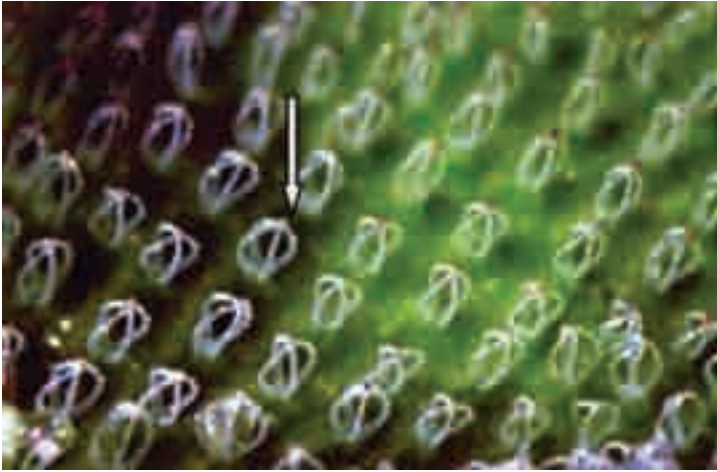


Figura 1. Tricomos (flecha) del complejo *auriculata*.

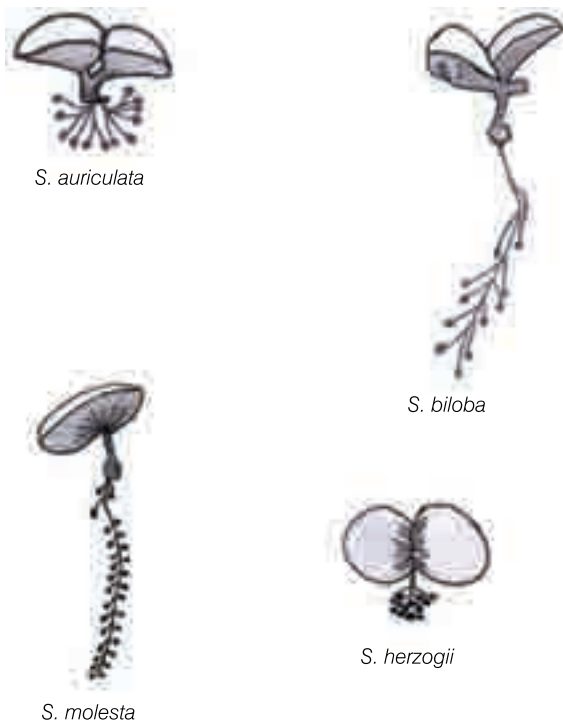


Figura 2. Diferenciación de las especies de *Salvinia* a través del arreglo de sus esporocarpos.

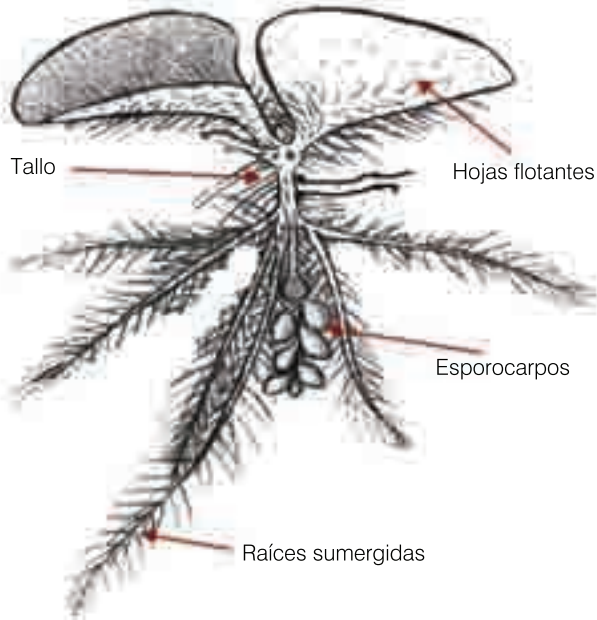


Figura 3. Características de *Salvinia molesta*.



Figura 4. Esporocarpos de *Salvinia molesta* (flechas).

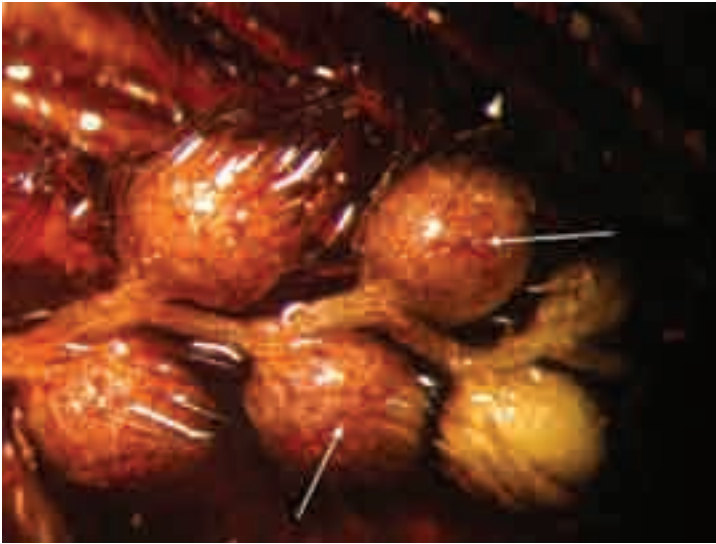


Figura 5. Esporangios de *Salvinia molesta* (flechas) al interior del esporocarpo.



Figura 6. Crecimiento primario (flecha) y secundario (hojas más grandes) de *Salvinia molesta*.



Figura 7. Crecimiento terciario de *Salvinia molesta*.



Figura 8. Barrera flotante para el control de *Salvinia molesta* en canales de riego.



Figura 9. Adulto de *Cyrtobagous salviniae*.

ANEXO 1

El *Manual para la cría masiva de Cyrtobagous salviniae utilizado en el control biológico de Salvinia molesta* se terminó de imprimir el mes de junio de 2005 en los talleres del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Paseo Cuauhnáhuac 8532, Progreso, Jiutepec, Morelos. La edición consta de 75 ejemplares.