

Patogenicidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae)

Pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* on eggs and nymphs of *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae)

Guillermo L. Arango ¹
Celina Torres ²
Stephen L. Lapiente ¹

Resumen

Se evaluó la patogenicidad de tres cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin sobre huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) bajo condiciones controladas. También se evaluó, al variar la fecha de aspersión del hongo con relación al momento de eclosión de los huevos. El estado de huevo de *A. varia* se trató con el hongo en condiciones de laboratorio, utilizando cajas de petri con papel filtro humedecido; no hubo efecto patogénico de las tres cepas de *M. anisopliae*. La eclosión promedia fue de $96,0 \pm 3,2\%$ para los huevos tratados con el hongo y $98,0 \pm 1,6\%$ para los huevos testigo. Para evaluar el efecto sobre las ninfas se asperjaron las tres cepas de *M. anisopliae* al suelo de los materos sembrados con *Brachiaria ruziziensis*, donde se crió el insecto. Las tres cepas fueron igualmente patogénicas sobre las ninfas de *A. varia*, causando una mortalidad promedio de $46,1 \pm 22,5\%$ y en el testigo ésta fue de $20,9 \pm 13,4\%$. Hubo un efecto significativo de la época de aplicación del hongo sobre la sobrevivencia de las ninfas. Al hacerlo 8 días antes de la eclosión de los huevos, causó una mortalidad del $58,5 \pm 20,6\%$. Al aplicarlo al momento de la eclosión, la mortalidad fue del $45,7 \pm 14,5\%$ y cuando se aplicó 8 días después de la eclosión, la mortalidad fue del $34,1 \pm 24,6\%$. La mortalidad promedia en el testigo de esta prueba fue del $20,9 \pm 13,8\%$. Este estudio indica que *M. anisopliae* puede

ser utilizado más eficientemente en el control de *A. varia* si se aplica con anterioridad a la época de aparición de las ninfas del insecto.

Palabras claves: *Metarhizium anisopliae*, *Aeneolamia varia*, Hongos entomopatógenos, Patogenicidad.

Summary

The pathogenicity of three strains of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin was tested with eggs and nymphs of *Aeneolamia varia* (Fabricius). Eggs of *A. varia* that were sprayed with the fungus in petri dishes with moist filter paper were unaffected by the three strains. Mean eclosion of treated eggs was $96.0 \pm 3.2\%$ compared with $98.0 \pm 1.6\%$ for the untreated control. To test the pathogenic effect against nymphs, the three strains were sprayed on the soil of pots planted with stems of *Brachiaria ruziziensis* infested with *A. varia*. The three strains were equally pathogenic toward the nymphs resulting in a mean mortality of $46.1 \pm 22.5\%$ compared with $20.9 \pm 13.4\%$ for the check. There was a significant effect of the date of application on nymphal mortality. Nymphs reared in pots sprayed 8 days before egg eclosion suffered $58.5 \pm 20.6\%$ mortality. Nymphs reared in pots sprayed on the same day of the eclosion suffered $45.7 \pm 14.5\%$ mortality. Nymphs reared in pots sprayed 8 days after eclosion suffered $34.1 \pm 24.6\%$ mortality. Mortality in the untreated control was $20.9 \pm 13.8\%$. This study indicates that *M. anisopliae* should be applied before the presence of the insect nymphs for a more efficient control.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Aeneolamia varia*, Entomopathogenic fungi, Pathogenicity.

Introducción

La salivita o mión de los pastos, *Aeneolamia varia* (Fabricius), es un cercópido de gran importancia en la producción ganadera. Este insecto ocasiona graves daños en numerosas especies de pastos, también en cultivos de arroz, maíz y caña de azúcar en América tropical (Guagliumi 1962). Las ninfas de este insecto inician y completan su desarrollo en las raíces de estas gramíneas hospedantes, chupando la savia hasta que se convierten en adulto. El daño está en relación con la cantidad de ninfas presentes por planta. Algunas especies de hongos entomopatógenos se han reportado en Venezuela y Colombia atacando a *A. varia* en sus estados de ninfa y adulto (Guagliumi 1962; Jiménez 1978). El *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Hyphomycetos) viene siendo utilizado hace muchos años en el programa de control de cercópidos plagas en caña de azúcar y pastos en Brasil, cubriendo miles de hectáreas (Ferron 1988).

En estudios de laboratorio se ha encontrado que *A. varia* es más susceptible al *M. anisopliae* cuando la ninfa es menor de 15 días de edad (Avila de Moreno y Umaña 1988). El presente estudio se realizó para evaluar el efecto patogénico de tres cepas de *M. anisopliae* sobre los huevos y las ninfas de *A. varia* utilizando diferentes épocas de aplicación sobre estas.

Materiales y Métodos

Producción de conidias

En este estudio se utilizaron las cepas del hongo *M. anisopliae*: CIAT 1822 (Colombia), CIAT 1760 (Brasil), ambas procedentes de la colección existente en la sección de Fitopatología de Forrajes Tropicales del CIAT en Palmira (Valle) y la cepa VI (Venezuela), producida comercialmente para el control de *A. varia* en caña de azúcar y pastos. Estas cepas se reprodujeron en el medio de cultivo agar+avena (AA) adicionado de cloranfenicol al 1% como bactericida. Se emplearon cajas de petri de vidrio (10x1,5 cm), las cuales se colocaron a incubar a 28°C y 60% de humedad relativa durante 12 días. El crecimiento del hongo se

¹ Biólogo y Entomólogo, respectivamente. Sección de Entomología de Forrajes, CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia.

² Ing. Agrónomo, Sección de Fitopatología de Forrajes, CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia.

revisó para el conteo de conidias por cepa y se hizo una prueba de germinación. Esta prueba consistió en tomar alícuotas de suspensiones de agua con conidias del hongo, las cuales se depositaron en trozos de papel celofán (1x1 cm) guardado en cajas de petri con agar, y este material se dejó bajo condiciones ambientales de laboratorio (T=22°C; H.R. 60%) por 24 horas, y después se hizo un recuento total de las esporas tanto germinadas como sin germinar. La germinación se determinó por la presencia de una formación alargada en la conidia, conocida como tubo germinativo. Se hicieron 10 conteos por cepa.

El inóculo, para la aplicación sobre las ninfas, se obtuvo de cajas sembradas como se describió anteriormente. Las conidias obtenidas en el cultivo se mezclaron con 40 ml de agua destilada por caja. En promedio se utilizaron 20 cajas por cepa. A las suspensiones resultantes se les adicionó 0,05 ml/l de Twin 40 (surfactante) para homogenizar la distribución de conidias al momento de las aplicaciones.

Cría del insecto

Los insectos utilizados en este estudio procedían de la colonia de *A. varia* manejada por la sección de Entomología de Forrajes del CIAT (Lapointe et al. 1989a). Inicialmente se obtuvieron huevos cerca de la eclosión para infestar materos plásticos de 12,5x12,5 cm con plantas de *Brachiaria ruziziensis* Germ. et Evrard. CIAT 645 en suelo esterilizado y sembradas según la técnica de cría en la colonia, en donde la raíz de la planta está expuesta. Además se utilizó una tapa de aluminio para cubrir el matero, con la cual se logra mantener una alta humedad relativa y proporciona oscuridad que estimula el crecimiento de las raicillas secundarias que son los sitios de alimentación preferidos por las ninfas (Lapointe et al. 1989b).

Patogenicidad hacia huevos

Este experimento consistió en aplicar la suspensión de conidias de las tres cepas: CIAT 1822, CIAT 1760 y VI. Inicial-

mente, el inóculo se aplicó al estado de huevo del insecto utilizando cajas de petri de vidrio con papel filtro (No. 2) humedecido hasta la saturación. Se colocaron 50 huevos por caja y se aplicó 1 ml de una suspensión de $3,3 \times 10^5$ conidias/ml, utilizando una pipeta graduada. Para cada cepa se hicieron 6 repeticiones. Estas cajas se conservaron a condiciones ambiente (T=22°C; H.R. 60%), durante el tiempo que duró la incubación (aproximadamente 12 días). Se evaluó el número de huevos eclosionados, sin eclosionar y huevos afectados.

Efecto de la cepa y el momento de aplicación sobre la mortalidad de ninfas

Para la aplicación de las suspensiones sobre las ninfas se utilizó un aspersor De Vilvis^R adaptado a un compresor con una presión de 12 PSI (libras por pulgada cuadrada). Las aspersiones se dirigieron al suelo circundante a la raíz de la planta. La suspensión tenía una concentración de $3,3 \times 10^5$ conidias/ml. Para cada tratamiento se emplearon seis materos y cada matero se infestó con 10 huevos de *A. varia* cerca de la eclosión. Se aplicaron 4 ml de suspensión por matero.

En el primer tratamiento, el hongo se aplicó ocho días antes de la infestación con los huevos. El segundo tratamiento consistió en la aplicación del hongo en el momento de la eclosión de los huevos, y el tercer tratamiento consistió en aplicar el hongo ocho días después del establecimiento de las ninfas en la planta. Cada tratamiento tuvo su respectivo testigo, en el cual sólo se aplicó agua destilada. Todos los materos se mantuvieron en una casa de vidrio (invernadero) a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y $80 \pm 5\%$ de humedad relativa.

Las evaluaciones se hicieron diariamente después de la aplicación, registrando el número de ninfas vivas y ninfas muertas. Las ninfas muertas se retiraron y llevaron al laboratorio para analizarlas y determinar la presencia del hongo. Estas evaluaciones se llevaron a cabo hasta que terminó el desarrollo de las ninfas, o sea hasta la emergencia de los adultos. Se utilizó un diseño factorial (3 cepas x 3 fechas de

aplicación) completamente al azar con 6 repeticiones en el cual cada matero constituyó una repetición. Se realizaron análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan 1951) para el promedio del porcentaje de emergencia de adultos por matero.

Resultados

Las conidias de las tres cepas evaluadas mostraron un alto porcentaje de germinación: la VI con 90,9%, la CIAT 1822 con 87,7% y la CIAT 1760 con 85,2% (Tabla 1), pero no se encontraron diferencias significativas entre las cepas.

Con ninguna de las cepas se encontró patogenicidad del hongo sobre el estado de huevo de *A. varia*. La eclosión con la cepa CIAT 1760 fue de $95,0 \pm 3,6\%$, para la CIAT 1822 de $95,6 \pm 4,2\%$, para la VI de $97,0 \pm 1,9\%$ y para el testigo de $98,0 \pm 1,6\%$ (Tabla 2).

En el experimento sobre la patogenicidad hacia ninfas no hubo interacción entre cepa y fecha de aplicación del hongo ($P > F = 0,42$. ANOVA). Tampoco hubo un efecto significativo de la cepa ($P > F = 0,84$ ANOVA). Se encontró que las tres cepas fueron igualmente patogénicas (Tabla 3) y que hubo un efecto significativo de la época de aplicación del hongo sobre la sobrevivencia de las ninfas ($P > F = 0,0001$).

La patogenicidad del hongo fue mayor cuando se aplicó 8 días antes de la infestación con huevos (8DA) cuando alcanzó un $58,5 \pm 20,6\%$ de mortalidad, siendo mayor que los otros dos tratamientos. Cuando el hongo se aplicó en el momento de la eclosión (OD), la mortalidad fue del $45,7 \pm 14,5\%$ y para el tratamiento 8 días después de la infestación (8DD) fue de $34,1 \pm 24,6\%$. La mortalidad en el testigo fue de $20,9 \pm 13,4\%$ (Fig. 1).

Discusión

El estado de huevo de *A. varia* no fue afectado por la acción de *M. anisopliae*. El estado de ninfa de este insecto pasa por cinco instares y presenta mayor mo-

Tabla 1. Germinación de las conidias de tres cepas de *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio (T=28°C ; H.R.=60%). CIAT, Palmira (Valle).

Cepa	Porcentaje inicial de Conidias	Promedio de Conidias Germinadas	D.E.*	Porcentaje de Germinación
V1	66	60,0	4,3	90,9
CIAT 1822	58	50,9	16,3	87,7
CIAT 1760	77	65,6	12,5	85,2

* D.E = Desviación Estandar

Tabla 2. Eclósión de huevos de *A. varia* tratados con tres cepas de *M. anisopliae* (T=27°C, H.R.=60%). CIAT, Palmira (Valle).

Cepa	Eclósión(%)	D.E*
CIAT 1760	95,0	3,6
CIAT 1822	95,6	4,2
V1	97,0	1,9
Testigo	98,0	1,6

* D.E= Desviación Estándar
N= 300 huevos por cepa.

Tabla 3. Mortalidad de ninfas de *A. varia* causada por tres cepas de *M. anisopliae* (T=27±1°C, H.R.=80±5%). CIAT, Palmira (Valle).

Cepa	Mortalidad(%)	D.E*
Testigo	20,9a**	13,4
V1 44,4b	18,2	
CIAT 1822	46,4b	25,6
CIAT 1760	47,6b	23,7

* D.E.= Desviación Estandar

** Promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas al nivel del 5% (Duncan).

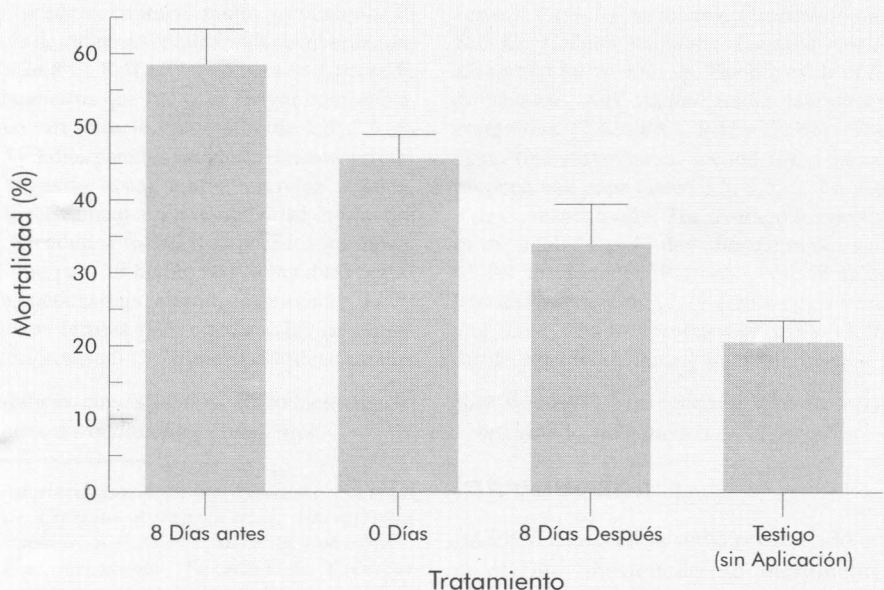


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *Aeneolamia varia* tratadas con tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en tres fechas de aplicación.

vididad en los dos primeros, y es durante este período que el insecto se ubica en los sitios de alimentación sobre las raíces secundarias y que le permite al insecto entrar en contacto con los organismos que se hallan en el suelo, en especial con los agentes patógenos como *M. anisopliae* (Fig. 2), un hongo saprófito con gran capacidad de sobrevivencia y adaptación a este ambiente.

En este estudio, las tres cepas de *M. anisopliae* mostraron el mismo grado de patogenicidad sobre las ninfas de *A. varia*. La aplicación del hongo 8 días antes de aparecer las ninfas mostró una actividad patógena mayor que la aplicación al momento de aparecer las ninfas u 8 días después de aparecer el insecto.

Uno de los impedimentos para determinar la eficiencia de *M. anisopliae* a nivel de campo ha sido la falta de conocimiento sobre la relación insecto-patógeno, ya que las aplicaciones se hacen generalmente cuando se detecta la presencia del insecto, cuando el insecto ya está establecido y ha avanzado en su desarrollo y tiene pocas posibilidades de entrar en contacto con el patógeno.

Conclusiones

- No hubo acción patógena de ninguna de las tres cepas de *M. anisopliae* sobre los huevos de *A. varia*.
- La patogenicidad de las tres cepas de *M. anisopliae* sobre las ninfas de *A. varia* fue similar.
- Hubo diferencia entre tratamientos de aplicación de *M. anisopliae* sobre las ninfas de *A. varia*, teniendo en cuenta el momento de aparición de las ninfas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ing. Carlos Zambrano, Productos Biológicos para el Agro S.A., de Venezuela, por suministrar la cepa V1 para este estudio.

Bibliografía

- AVILA DE MORENO, C.; UMAÑA, M.I. 1988. Aspectos de la biología y la patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, sobre *Aeneolamia varia* (Fabricius). Revista ICA (Colombia) v. 23 no. 3, p. 155-161.

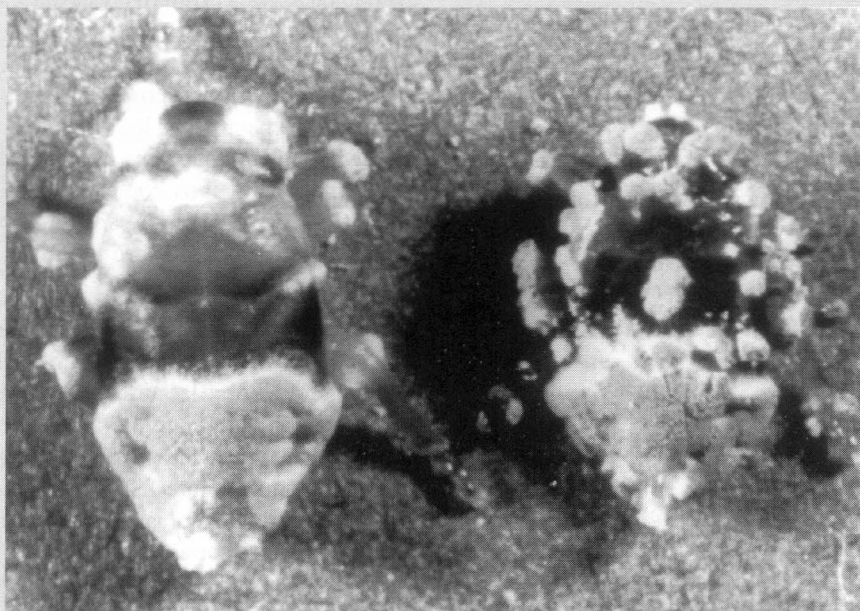


Figura 2. Ninfas de *Aeneolamia varia* infectadas con *Metarhizium anisopliae*

DUNCAN, D.B. 1951. A significance test for differences between ranked treatments in an analysis of variance. *Virginia Journal of Science (Estados Unidos)* v. 2, p. 171-189.

FERRON, P. 1988. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges, H.D. (Ed.). *Microbial control of pest and plant diseases*. 1970-1980. Academic Press, Londres. p.465-481.

GUAGLIUMI, P. 1962. Las plagas de la caña de azúcar en Venezuela. Tomo I. 482p.

JIMENEZ, J.A. 1978. Estudios tendientes a establecer el control integrado de las salivitas de los pastos. *Revista Colombiana de Entomología (Colombia)* v. 4 nos. 1-2, p. 19-33.

LAPOINTE, S.L.; SOTELO, G.; ARANGO, G. 1989a. Improved rearing technique for spittlebugs (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Economic Entomology (Estados Unidos)* v.82 no.6, p. 1768-1770.

—————; —————; SERRANO, M.S.; ARANGO, G. 1989b. Cría masiva de especies de cercópidos en invernadero. *CIAT Pasturas Tropicales (Colombia)* v. 11 no. 3 p. 25-28.