

BIOENSAYO PARA EL ESTUDIO DE ANTIBIOSIS EN *Brachiaria* spp. SOBRE EL SALIVAZO DE LOS PASTOS, *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae)

Guillermo Sotelo¹
Stephen L. Lapointe
Miguel S. Serrano

RESUMEN

La antibiosis detectada en accesiones del pasto *Brachiaria* spp. condujo a desarrollar un sistema de alimentación de insectos para estudiar los mecanismos de antibiosis que se expresan sobre varias especies de cercópidos que son los mayores limitantes de la producción de pastos en América tropical. Se desarrolló una metodología para enraizar tallos de *Brachiaria* con una solución hidropónica en cilindros de acetato. Las raíces crecieron a lo largo del cilindro y atravesaron una cámara donde se ubicó un huevo próximo a eclosionar o una ninfa del cercópido *Aeneolamia varia* (Fabricius). El cilindro se colocó dentro de un tubo de ensayo de policarbonato, donde se puede suministrar agua o solución nutritiva o cualquier sustancia a probar. La planta toma la solución por las raíces y el insecto la adquiere al alimentarse de los vasos del xilema. Este sistema permite la observación directa y constante de las ninfas durante su desarrollo sin tener que manipularlas. Con este sistema, la sobrevivencia de *A. varia*, de huevo hasta adulto, sobre *B. ruziziensis* CIAT 654 fue del 100% y la duración de los 5 instares ninfales fue de $33 \pm 1,4$ días, equivalente a lo obtenido en materos en el invernadero. La hormona juvenil (JH-III) administrada en solución a las raíces no tuvo efecto significativo sobre el insecto. En cambio, la Ecdysona produjo una muda temprana a bajas concentraciones (0,05 - 0,5 - 5,0 y 50 ppm) y produjo mortalidad y deformaciones a 100 ppm.

SUMMARY

A new feeding system for rearing cercopids on accessions of *Brachiaria* spp. was developed to study the effect of substances supplied to the plant roots in a hydroponic arrangement. The system consisted of a mylar cylinder inserted into a polycarbonate test tube. The mylar cylinder enclosed the root system of a grass plant and provided a feeding chamber for the cercopid nymphs. The system developed resulted in excellent survival, development time, and dry weight of adults of *A. varia* compared with *A. varia* reared on susceptible accessions of *Brachiaria* spp. in a glasshouse. It was demonstrated that the cercopid can ingest substances translocated by the plant xylem. Ecdysone (20-hydroxyecdysone) was administered in solution to the roots of *B. ruziziensis* CIAT 654. At 50 ppm, ecdysone stimulated the molt of IV instar nymphs within 24 hours. At 100 ppm, ecdysone caused the death of all nymphs and several were malformed. Juvenile hormone (JH-III) at 100 ppm did not have a significant effect on development of *A. varia*.

INTRODUCCIÓN

Especies de cercópidos conocidas como "salivazo" o "mión de los pastos" (Homoptera: Cercopidae) son el mayor limitante biótico en la utilización de gramíneas forrajeras del género *Brachiaria* en América tropical. Fuentes de resistencia (antibiosis) en *Brachiaria* spp. a cercópidos han sido identificadas y caracterizadas por medio de un bioensayo que utiliza plantas sembradas en macetas e infestadas con el insecto (Ferrufino y Lapointe 1989; Lapointe et al. 1992). La resistencia se

expresa por una reducida supervivencia de las ninfas. Además, en algunas accesiones como *B. brizantha* cv. Marandú, se presentan una prolongación del período ninfal y una disminución del peso de aquellos adultos que alcanzan a emerger. Sobre ciertas accesiones de *B. jubata*, el insecto presenta malformaciones asociadas con la muda (Lapointe et al. 1992).

Para dilucidar los mecanismos de antibiosis hacia cercópidos presentes en plantas resistentes, se propuso desarrollar un sistema de alimentación que permita la fácil observación y manipulación de las ninfas durante su desarrollo y el control de nutrientes u otros factores que podrían ser administrados a la planta. Este artículo describe una técnica para criar ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) sobre raíces de plantas en un sistema hidropónico. Para probar la hipótesis de que sustancias administradas a la planta por medio de una solución hidropónica puedan tener efecto sobre ninfas de cercópidos que se alimentan del xilema de la planta, se probó el efecto de la ecdisona (20-hidroxyecdisona) y de la hormona juvenil (JH-III) sobre el desarrollo de ninfas de *A. varia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general de la unidad del bioensayo

La unidad tal como se muestra en las Figuras 1 y 2, consiste en una planta de *Brachiaria* sp. sembrada en un cilindro de acetato y sostenida por

¹Entomólogos. Programa Pastos Tropicales, CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia

arena de cuarzo estéril en la parte superior. En la parte media del tubo se colocan un par de espumas plásticas separadas 2,5 cm para formar una cámara donde se ubican ninfas de *A. varia* para que se alimenten de las raíces que atraviesan la cámara y que llegan a la base del cilindro. Esta unidad se coloca dentro de un tubo de ensayo de policarbonato. En el fondo se añaden 15 cc de agua, de solución nutritiva, o de la sustancia a evaluar. La planta absorbe sustancias por las raíces y el insecto las adquiere al alimentarse de los vasos del xilema. El efecto sobre el insecto se cuantifica midiendo la duración de cada uno de los instares ninfales y la supervivencia al estado adulto.

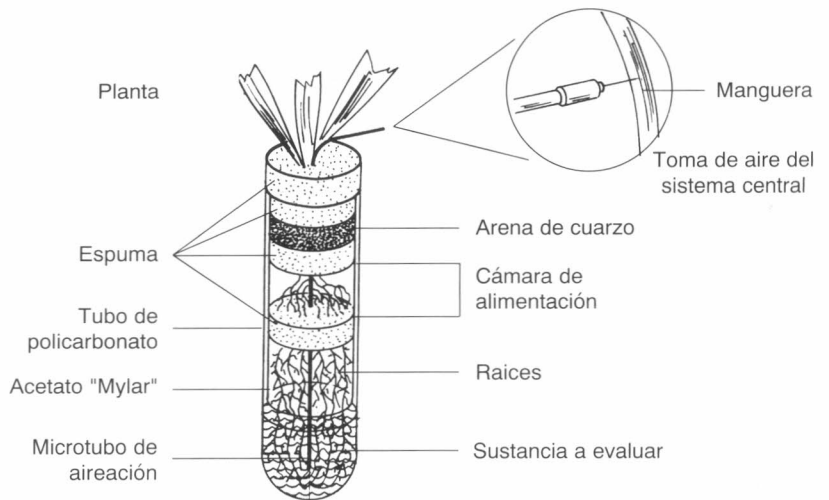


Figura 1. Dibujo esquemático de la unidad experimental y sus componentes.

Descripción de la técnica

Se utilizó un cilindro de acetato tipo "mylar", el cual no es tóxico para insectos, de 12 cm de largo por 2.6 cm de diámetro. Los primeros 3 cm del cilindro se llenaron con arena de cuarzo esterilizada y allí se colocó una planta de *B. ruzizensis* CIAT 654, de 15 días de edad, con una longitud de raíces entre 10 y 12 cm. Inmediatamente debajo de la arena se colocó la primera espuma plástica que forma la cámara donde se aloja el insecto. Se dejó un espacio de 2,5 cm y se colocó la segunda espuma. Las raíces de la planta se colocaron a través de las espumas plásticas para proporcionar los sitios donde se han de fijar las ninfas. Para permitir la manipulación de los insectos se hicieron dos perforaciones laterales de 2 cm², y estas se cubrieron con otro cilindro removible del mismo material.

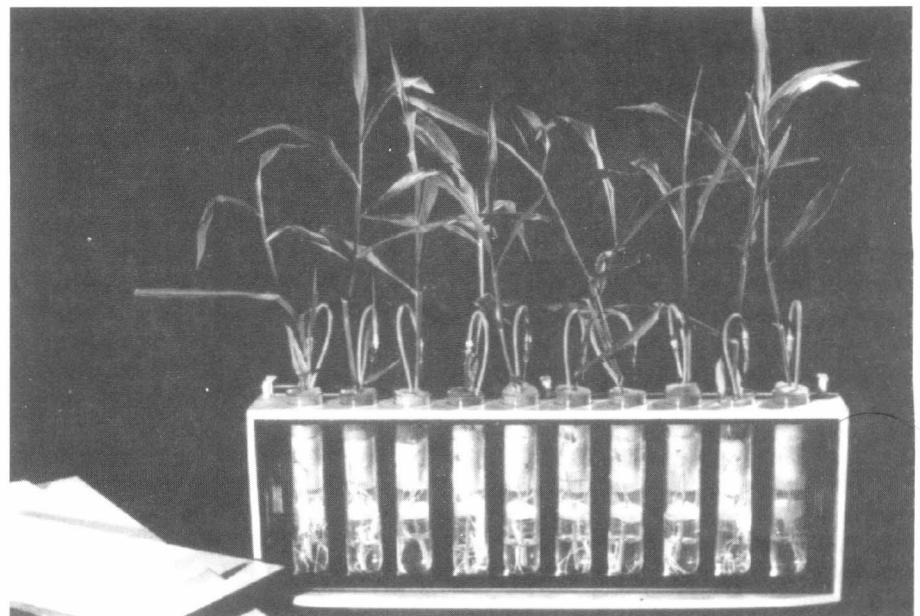


Figura 2. Gradilla con 10 unidades experimentales instaladas al sistema de aireación. Las paredes laterales están removidas para facilitar la observación.

La unidad anterior se introdujo en un tubo de ensayo de policarbonato, de 16,5 cm de largo y 3,0 cm de diámetro. A este tubo se le conectó una manguera plástica de 0,3 cm de diámetro que permitió burbujear aire a baja presión hasta el fondo del tubo para estimular el crecimiento radicular y mantener una temperatura constante (Fig. 1). La manguera se conectó a un

compresor de aire a baja presión (80 psi) y a un filtro de carbón activado para evitar la contaminación. Después de pasar el filtro, el aire pasó por un doble serpentín (tubo largo enroscado para el enfriamiento de la destilación) que permite que el aire tome la temperatura del agua corriente que lo irriga. En esta forma, el burbujeo del aire por los tubos mantuvo dentro de los tubos una temperatura constante de 27°C.

Diez unidades experimentales compuestas por cilindros de acetato dentro de los tubos de policarbonato se colocaron en una gradilla de madera de 16 cm de alto por 51 cm de largo y 6 cm de ancho que los cubrió completamente (Fig. 2). La gradilla se pintó de negro en su interior para proporcionar la oscuridad necesaria para el desarrollo radicular. Las paredes laterales de la gradilla son removibles y permi-

ten la observación de los insectos. Cada gradilla estuvo conectada por mangueras plásticas al sistema central de aireación (Fig. 2).

Diseño experimental

Se utilizaron plantas de *B. ruzizensis* CIAT 654, un material muy susceptible al ataque del salivazo. La propagación se hizo empleando material vegetativo proveniente de parcelas mantenidas en CIAT, en Palmira (Valle). Los tallos traídos del campo se trataron con una solución de dos fungicidas (ethilenebisdisthio carbamato y benomyl al 2%) durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron en un tubo de ensayo de policarbonato con 80 ml de solución nutritiva hidropónica (Coljap Industria Agro-Química S.A., Bogotá) con 2 y 5 ml por litro, de elementos mayores y menores, respectivamente, durante 15 días hasta que las raíces alcanzaron una longitud de 10 a 12 cm. Durante los experimentos, la nutrición de las plantas se hizo cada tres días aplicando 1 ml de la solución nutritiva en la base de los tallos.

Los experimentos se realizaron en un invernadero de vidrio, en la estación del CIAT, en Palmira. La temperatura promedio fué de $24,8 \pm 1,2^\circ\text{C}$. y la humedad relativa del $92 \pm 2\%$. En todos los experimentos se usó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones.

Se midió la duración de los instares ninfales, la supervivencia del estado adulto y el peso seco de los machos y las hembras que emergieron. La infestación y evaluación diaria de los tubos se realizaron en una cámara de aislamiento. Se hicieron evaluaciones morfológicas sobre las ninfas que murieron, para detectar anomalías. Los datos se sometieron al análisis de varianza (SAS 1982) y la prueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan 1955).

Experimento 1

Cada una de las 22 unidades experimentales (tubos) se infestaron con un

huevo de *A. varia* próximo a eclosionar. La supervivencia y la duración de los instares ninfales y la supervivencia del adulto en los tubos se comparó con los resultados de la cría de *A. varia* sobre accesiones susceptibles de *Brachiaria* en materos en el invernadero, de acuerdo con la metodología descrita por Lapointe et al. (1989b).

Experimento 2

Esta prueba se realizó para determinar el efecto de dos hormonas involucradas en el proceso de muda: la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona) y la hormona juvenil (JH-III), las cuales se obtuvieron de Sigma Chemical Co., U.S.A.. De la 20-hidroxiecdisona se probaron cinco concentraciones (0,05-0,5-5-50 y 100 ppm) y la hormona juvenil se probó a 100 ppm. Cada tubo se infestó con un huevo de *A. varia*. Cuando las ninfas mudaron al tercer estadio, se colocaron las soluciones de hormonas o, en el caso de dos testigos, agua destilada. Por cada tratamiento se emplearon 10 tubos, para un total de 80 ninfas de *A. varia*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La duración de los instares ninfales de *A. varia* en el nuevo bioensayo fué similar a la obtenida en plantas en

materos. Sobre *B. ruzizensis* CIAT 654 en tubos, se obtuvo un 100% de supervivencia con una duración ninfal de 33.1 \pm 1.4 días. En materos, la duración ninfal sobre *B. ruzizensis* CIAT 655 fué de $36,9 \pm 2,9$, sobre *B. decumbens* CIAT 606 fué de $31,9 \pm 1,7$, y sobre *B. dictyoneura* CIAT 6133 fué de $36,7 \pm 2,4$ días.

El peso de hembras de *A. varia* criadas en los tubos fué de $8,8 \pm 1,5$ mg y el de machos fué de $5,0 \pm 0,7$ mg. En materos, el peso de hembras y machos criados sobre *B. decumbens* CIAT 606 fué de $8,2 \pm 1,2$ y $4,9 \pm 0,8$ mg, respectivamente; sobre *B. dictyoneura* CIAT 6133 fué de $6,9 \pm 0,7$ y $4,5 \pm 0,9$ mg; y sobre la variedad resistente *B. brizantha* cv. Marandú fué de $5,7 \pm 0,9$ y $3,8 \pm 0,4$ mg.

La buena sobrevivencia, la rápida tasa de desarrollo y el alto peso de *A. varia* criado en los tubos indicaron que el nuevo sistema de alimentación provee condiciones indicadas para la cría del insecto desde huevo hasta adulto con baja mortalidad y un crecimiento normal.

La hormona de la muda, ecdisona, disminuyó la duración del cuarto instar en todas las concentraciones utilizadas (Tabla 1). A la concentración de 50 ppm produjo la muda de cuarto a

Tabla 1. Efecto de 20-hidroxiecdisona y la hormona juvenil sobre la sobrevivencia y duración del cuarto y quinto instares ninfales de *A. varia*. Barras son desviación estándar (N=10).

Tratamiento (ppm)	Duración en días		Emergencia de adultos (%)
	Instar IV	Instar V	
Ecdisona			
0,05	$1,5 \pm 0,9$ a ¹	$8,6 \pm 1,1$ a	70
0,5	$1,7 \pm 1,0$ a	$8,7 \pm 0,7$ a	60
5,0	$1,7 \pm 1,3$ a	$8,0 \pm 1,0$ a	80
50,0	$1,0 \pm 0,0$ a	$9,5 \pm 1,2$ a	50
100,0	4,0*	0,0	
Agua	$3,4 \pm 1,9$ b	$9,6 \pm 1,2$ a	70
Hormona juvenil			
100,0	$6,8 \pm 1,2$ a	$8,7 \pm 1,4$ a	70
Agua	$6,6 \pm 0,9$ a	$9,3 \pm 1,6$ a	90

¹ En cada columna, los promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Prueba de Duncan, 0,05).

* Un solo dato.

quinto instar de todas las ninfas expuestas en menos de 24 horas. La ecdisona a 0,05; 0,5; 5,0 y 50 ppm no tuvo efecto sobre la duración del quinto instar. La emergencia de adultos expuestos a concentraciones de 0,05; 0,5; y 5,0 ppm de ecdisona fué similar a la del testigo. Hubo una tendencia a mayor mortalidad (50%) en adultos expuestos a 50 ppm de ecdisona. La ecdisona a 100 ppm resultó en la muerte de todas las ninfas y produjo deformaciones en siete de las diez ninfas. Se observaron dos tipos de deformaciones. En cinco casos, la ninfa murió durante la muda con la exuvia abierta pero sin poder emerger. En dos casos, la ninfa murió con los estiletes abiertos y torcidos y por lo tanto no fué capaz de alimentarse.

La hormona juvenil no tuvo efecto significativo sobre la duración del cuarto y quinto instar, por lo menos a la concentración de 100 ppm. Sin embargo, de las dos ninfas muertas, una mostró los estiletes torcidos, y la otra murió durante la muda, con deformaciones. En ningún caso se observó deformación en los testigos (agua).

Aparentemente, la ecdisona estimuló la iniciación del proceso de la muda antes de que la ninfa estuviera fisiológicamente preparada, resultando en deformación y muerte. En este ensayo, el objetivo no fué estudiar en detalle el efecto de hormonas, sino demostrar que una sustancia suministrada a las raíces de la planta en el nuevo sistema de alimentación, pue-

de ser ingerida por el insecto y tener un efecto sobre su desarrollo. Con esta información, será posible iniciar trabajos de mecanismos de resistencia utilizando el bioensayo descrito.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología que permite evaluar la respuesta de cercópidos a sustancias conocidas para estudiar los mecanismos de antibiosis de accesiones de *Brachiaria*. La unidad permite la observación directa del insecto durante su desarrollo sin tener que perturbarlo.
- La sobrevivencia, la duración de los instares ninfales y los pesos de adultos de *A. varia* producidos por el bioensayo en tubos fueron excelentes, equivalentes a los obtenidos en la cría de *A. varia* sobre accesiones susceptibles de *Brachiaria* spp. en materos bajo condiciones de invernadero.
- Se demostró que las ninfas de *A. varia* pueden obtener sustancias que la planta trasloca a través de los vasos del xilema. Ecdisona a 50 ppm, suministrada en solución a las raíces, estimuló la muda en las ninfas de IV instar que se alimentaban sobre la planta. A 100 ppm, la ecdisona causó la muerte de todas las ninfas y produjo malformaciones en algunas de ellas. La hormona juvenil a 100 ppm, suministrada a las raíces, no pre-

sentó un efecto marcado sobre el desarrollo de las ninfas de *A. varia*.

- Se propone usar el sistema descrito para buscar componentes activos en extractos de accesiones resistentes de *Brachiaria* hacia cercópidos.

BIBLIOGRAFÍA

- DUNCAN, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* (Estados Unidos) v.11, p.1-42.
- FERRUFINO, C.A.; LAPOINTE, S.L. 1989. Host plant resistance in *Brachiaria* grasses to spittlebug *Zulia colombiana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* (Holanda) v.51, p.155-162.
- LAPOINTE, S.L.; ARANGO, G.; SOTELLO, G. 1989. A methodology for evaluation of host plant resistance in *Brachiaria* to spittlebug species (Homoptera: Cercopidae). In: *International Grassland Congress*, 16o., Nice (France), October 1989. *Proceedings*. v.82, p. 1764-1766.
- _____; SOTELLO, G.; ARANGO, G. 1989b. Improved Technique for rearing spittlebugs (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v.82, p.1764-1766.
- _____; SERRANO, M.S.; ARANGO, G.L.; SOTELLO, G.; CORDOBA, F. 1992. Antibiosis to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in accesiones of *Brachiaria* spp. *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos)
- SAS Institute Incorporated, 1982. *SAS user's guide: statistics*. 5th. Ed. SAS Institute, Cary, N.C. 956p.