

ISSN-0120-0488

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 30 • Número 1 • Enero-Junio 2004

Tarifa Postal Reducida No. 239 - Vence Dic. 31 / 2005



Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA

Volumen 30 No. 1 Enero-Junio 2004

Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

JUNTA DIRECTIVA SOCOLEN 2002- 2004

Presidente
Miguel S. Serrano

Vicepresidente
Eduardo Flórez D.

Secretario
Fernando Cantor R.

Tesorero
Adriana Sáenz A.

Vocales Principales

Graciela Pinzón

Amanda Varela

Francisco Serna

Vocales Suplentes

María Teresa Almanza

Edison Torrado

Aura Cecilia Burgos

Coordinadora de Biblioteca Claudia Inés Martínez
Revisor Fiscal de Socolén Ariel Palomino Ulloa

Editora

Paulina Muñoz

Profesor Honorario Universidad Nacional de Colombia

Comité Editorial
Alex E. Bustillo P.
Centro Nacional de
Investigaciones de Café
"Pedro Uribe Mejía"
(Cenicafé)

Daniel Rafael Miranda E.
Universidad Industrial
de Santander

César Cardona M.
Centro Internacional de
Agricultura Tropical (CIAT)

Ingeborg Zenner de Polanía
Corporación Universitaria de
Ciencias Aplicadas y
Ambientales (UDCA)

Aristóbulo López-Avila
Corpoica

Rodrigo Vergara
Universidad Nacional de
Colombia, Sede Medellín,
Departamento de
Ciencias Agronómicas

Sergio Orduz
Corporación para
Investigaciones
Biológicas (CIB),
Unidad de Biotecnología
y
Control Biológico

Comité Científico

Alejandra Bravo
Universidad Nacional
Autónoma de México,
Instituto de Biotecnología

Amanda Varela
Pontificia Universidad
Javeriana, Departamento
de Biología

Fernando E. Vega
USDA-ARS
Insect Biocontrol Lab.,
Maryland

Daniel C. Peck
Cornell University, New
York State Agricultural
Research Station,
Department of Entomology

Martha Lucía Quiñones
Universidad de Antioquia,
Programa de Estudio y
Control de Enfermedades
Tropicales (PECET)

Peter Baker
CABI Bioscience, UK

Fernando Cantor
Universidad Militar
Nueva Granada

Fernando Fernández
Universidad Nacional de
Colombia, Instituto de
Ciencias Naturales

Fernando Montealegre Z.
University of Toronto,
candidato a Ph. D.

Luko Hilje
CATIE, Costa Rica

Marta Wolff
Universidad de Antioquia,
Instituto de Biología

Jorge E. Peña
University of Florida, IFAS,
Trop. Res. & Educ. Ctr.,
Homestead

Stephen L. Lapointe
USDA-ARS
Horticultural Research
Lab., Florida

Sociedad Colombiana
de Entomología
A. A. 11366 Bogotá, D. C.
Teléfono 2218706 Fax 2219263
<http://www.socolen.org.co>

Se acepta canje
Ask for exchange
E-mail:
publicaciones@socolen.org.co

Licencia Mingobierno
002274/81

Tiraje 500 ejemplares

**Edición digital
e impresión**
Editorial Guadalupe Ltda.
E-mail: ediguada@yahoo.es
Teléfono 2690788 Bogotá

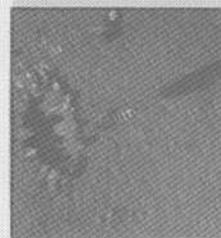
La Revista Colombiana de Entomología forma parte del Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas de Colciencias (Categoría B) y aparece reseñada en CAB INTERNATIONAL, en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (Latindex), en Chemical Abstracts, y en BIOSIS: Zoological Record.

SOCOLEN no se responsabiliza de las ideas emitidas por los autores.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir los artículos o los resúmenes, sin la previa autorización escrita del editor.

La persona interesada en poseer un impreso de un artículo puede solicitarlo al autor cuya dirección aparece en el pie de página del mismo.

REVISTA COLOMBIANA
DE ENTOMOLOGIA



Portada
"Mandaçaia
vs. uruçú"

Fotografía
Juan M. Rosso
1º puesto
Concurso
de Fotografía
Entomológica
"Luis Felipe
Mosquera"
XXX Congreso,
Cali, julio 2003

Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): uso de activadores de patogenicidad

Effect of entomopathogenic fungi on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): use of pathogenicity activators

KARIM RAYMOND C.¹, FABIOLA ROJAS B.¹, EFRAÍN BENAVIDES O.², ALBA MARINA COTES³, LAURA VILLAMIZAR³, VANIA RONDEROS J.⁴, PAOLA GARCÍA M.⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 1-6 (2004)

Resumen. En sistemas artrópodo-patógeno se ha demostrado la bondad del uso de activadores de patogenicidad para favorecer el crecimiento, esporulación y adherencia de hongos entomopatógenos sobre artrópodos. El objetivo del trabajo fue estudiar la actividad biocontroladora de dos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Mt019 y Mt020) sobre la garrapata *Boophilus microplus*, examinando el uso de activadores de patogenicidad empleados durante la fase de cultivo del hongo. Se utilizó un diseño completamente al azar que evaluó tres tratamientos aplicados por aspersión: cultivo en agar tradicional (EM), medio más activador de patogenicidad inespecífico (S) y este mismo medio adicionado de un activador específico para la garrapata (SA). La unidad experimental fue un grupo de diez teleoginas (cinco réplicas) y la concentración del hongo fue constante a 10^8 conidios ml^{-1} . El análisis de resultados se basó en los parámetros IEC (Índice de Eficiencia de la Conversión) y ER (Eficacia Reproductiva), que indican la capacidad reproductiva de la garrapata y del PCIEC (Porcentaje de Control de IEC) y del PCONER (Porcentaje Control del ER), asociados con la eficacia del hongo. Se demostró efecto de los activadores de patogenicidad en los dos hongos evaluados; siendo el valor del IEC inferior ($p < 0,01$) en los grupos con activador. En el caso de ER los valores en grupos con activador fueron inferiores, pero no significativos estadísticamente. El grado de control (PCIEC y PCONER) fue significativamente superior ($p < 0,01$) en los dos tratamientos con activador en ambos parámetros para los dos aislamientos de hongo. Se concluye que el uso de activadores de patogenicidad durante la fase de cultivo es un proceso que asegura un mejor efecto biocontrolador de los hongos sobre la garrapata.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*. Control biológico. Virulencia. Oviposición.

Summary. In arthropod-pathogen systems, the value of using pathogenicity activators to improve growth, sporulation capacity and adherence of entomopathogenic fungi to arthropods has been demonstrated. The objective of the work was to study the biocontrol activity of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Mt019 and Mt020) on the tick *Boophilus microplus*, by examining the use of pathogenicity activators used during the fungal culture phase. A completely randomized design was used, testing three treatments applied by aspersion: culture on traditional agar (EM), media plus unspecific pathogenicity activator (S) and the same media with a tick-specific activator (SA). The experimental unit was a group of ten engorged ticks (five replicates) and fungal concentration was constant at 10^8 conidia ml^{-1} . Analysis of the results was based on the parameters IEC (Conversion Efficiency Index) and ER (Reproductive Efficacy), indicators of reproductive capacity of the tick and PCIEC (Percentage Control of IEC), and PCONER (Percentage Control ER), associated with fungal efficacy. There was an effect of pathogenicity activators on the two fungi evaluated; the IEC value was lower ($p < 0,01$) in groups with activator. In the case of ER, values were lower for groups with activator but not statistically significant. Control levels (PCIEC and PCONER) were significantly higher ($p < 0,01$) in the two treatments with activator for both parameters in the two fungal isolates. It was concluded that the use of pathogenicity activators during the culture phase is a process that ensures a better biocontrol effect of fungi on ticks.

Key words: *Metarhizium anisopliae*. Biological control. Virulence. Oviposition.

Introducción

La garrapata común del ganado *Boophilus microplus* es el ectoparásito que provoca las pérdidas económicas mayores en el sector ganadero del mundo. Se distri-

buye en Centro y Sudamérica, Asia, Australia, el sur de Florida, Tanganyika, Mozambique y Madagascar (Shaw 1966). Datos notificados por la FAO, en 1984 (Betancourt *et al.* 1992), indican que la infestación por garrapatas y los costos

involucrados en su control, significan una pérdida mundial para la ganadería bovina de cerca de U.S. \$7.3 cabeza/año. En las condiciones colombianas, se ha calculado que las pérdidas asociadas con las garrapatas y moscas para la ganadería ascien-

- 1 Estudiantes de Bacteriología (Tesisistas). Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, D. C. E-mails: lisa70k@hotmail.com, fabbyross@hotmail.com
- 2 Autor para correspondencia: Médico Veterinario, M. Sc., Ph. D. Investigador Principal. Programa de Salud Animal, Centro de Investigación en Salud Animal. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. A. A. 39144. Bogotá, D. C., Colombia. E-mail: ebenavid@andinet.com
- 3 Respectivamente, Ph. D. Fitopatología. Investigadora Principal. E-mail: acotes@corpoica.org.co; Química Farmacéutica, M. Sc. Investigadora. E-mail: laurafernandav@yahoo.es. Laboratorio de Control Biológico CORPOICA, C. I. Tibaitatá.
- 4 Investigadores principiantes. Programa de Salud Animal, Centro de Investigación en Salud Animal. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.

den a 76.713 millones de pesos anuales (Benavides 2001). El daño se asocia de forma directa tanto con la capacidad hematófaga de estos artrópodos, como con la transmisión de agentes causantes de enfermedad; también existen pérdidas indirectas relacionadas con los costos del control.

El uso de acaricidas ha sido la principal estrategia para el control de garrapatas; sin embargo, éstas han desarrollado resistencia a todos los ingredientes activos existentes en el mercado, como arsenicales, clorados, organofosforados, diamidinas, piretroides sintéticos y lactonas macrocíclicas, impidiendo su control efectivo en el ámbito mundial (Benavides *et al.* 1999); por este motivo se ha fomentado un gran interés en la evaluación, desarrollo y uso de métodos alternativos de control parasitario, que minimicen la utilización de pesticidas. Dentro de las principales alternativas que se han propuesto se incluyen, el desarrollo de planes de aplicación estratégica o táctica del pesticida intentando disminuir la intensidad de aplicación de los acaricidas, la rotación de praderas, el empleo de animales resistentes a los parásitos y la aplicación de vacunas antigarrapatas. Se ha sugerido que estas alternativas sean integradas bajo Programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), los que investigan sobre la factibilidad del uso de diferentes métodos no químicos de control y están basados en estudios de dinámica poblacional (Walker *et al.* 1988). Dentro de estas alternativas para el control se destaca el uso posible de hongos entomopatógenos (Camacho *et al.* 1998).

Investigaciones con hongos entomopatógenos demuestran que las diferentes condiciones de cultivo tienen un efecto sobre la virulencia de los conidios (Lane y Trinci 1991). Incorporar varios componentes cuticulares de insectos al medio de cultivo de los hongos entomopatógenos produce un aumento significativo de la virulencia de dichos microorganismos, incrementando la actividad biológica, efecto posiblemente debido a la activación de sistemas enzimáticos en los hongos, los cuales son determinantes en su actividad biocontroladora sobre el insecto (Bidocha y Khachatourians 1991).

Se encontró que adicionar activadores de patogenicidad al medio de cultivo de *Metharizium* spp., cuando éste entra en contacto con la cutícula del insecto, estimula la producción de enzimas extracelulares de actividad sinérgica que degradan los componentes cuticulares (Clarkson y Charnley 1996). Villamizar *et al.* (2001) demostraron que la incorporación al medio de cultivo de un homogeneizado de alas y patas de langosta y de salvado de trigo, incrementó significativamente la actividad biocontroladora de *Metharizium anisopliae* sobre *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae), además establecieron una correlación positiva entre la actividad de la enzima quimioelas-

tasa proteasa PR1 y la virulencia de los conidios de *M. anisopliae*.

Para el desarrollo del presente trabajo se consideró como aspecto prioritario la búsqueda de alternativas que mejorasen el desempeño de los biocontroladores, teniendo en cuenta que en un trabajo previo, Hernández y Moreno (2001) seleccionaron las cepas de *M. anisopliae*, Mt019 y Mt020 por su mayor actividad biocontroladora contra *Bo. microplus*, pero también debido a los avances alcanzados en la definición de nuevos métodos de aplicación de los hongos (aspersión *vs.* inmersión). Por otra parte, trabajos realizados en el laboratorio de ectoparásitos del CEISA evaluaron cambios en las técnicas de incubación de las garrapatas adultas, luego de realizados las exposiciones al hongo, perfeccionando el manejo del bioensayo.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el evaluar el efecto de la adición de compuestos potencialmente activadores de patogenicidad al medio de cultivo del hongo, sobre la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* contra la garrapata *Bo. microplus*, utilizando una prueba de evaluación *in vitro*.

Materiales y Métodos

El trabajo consistió en el desarrollo de una prueba *in vitro* donde el diseño experimental fue completamente al azar, con cinco réplicas por tratamiento, siendo la unidad experimental de diez individuos por caja de Petri. Además se emplearon dos controles: a) control tratado (individuos asperjados únicamente con Tween 80 al 0,1%; y b) control absoluto (individuos no asperjados). Después del ensayo, las cepas de los hongos se mantuvieron a temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ$), HR 80% ($\pm 10\%$) y un foto periodo de 24 h luz.

Hongos entomopatógenos

Cepas. Se evaluaron dos accesiones del hongo *M. anisopliae* codificadas como Mt019 y Mt020, que fueron suministradas por el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA. El criterio para la elección de éstas fue la evidencia de mayor efectividad contra la garrapata *Bo. microplus* como se detectó en estudios previos sobre el tema (Hernández y Moreno 2001).

Proceso de reactivación de las cepas. Los hongos se reactivaron sobre 10 garrapatas adultas ingurgitadas, las que fueron infectadas mediante un proceso de inmersión en 20 ml de suspensión fúngica, manteniéndose a temperatura de 25°C durante 10 días. El hongo fue aislado a partir de algunos individuos que presentaron completa esporulación, mediante pasaje sobre el medio Saboureaud - Rosa de Bengala (S.R.B.), cuya composición por litro es de 2 g sacarosa, 6,4 g agar agar, 3 g neopeptona, 1,6 g gelatina, 0,15 g rosa de bengala.

Garrapatas

Cepas. Se trabajó con garrapatas adultas ingurgitadas (teleoginas) de la cepa denominada Palma de Vino II - 02, suministrada por el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Ectoparásitos del Programa de Salud Animal de CORPOICA; esta cepa se considera resistente a compuestos organofosforados, piretroides sintéticos y endectocidas, y se aisló en el año 1999 en Valledupar, Cesar; desde entonces se ha mantenido como colonia de laboratorio mediante pasajes sobre terneros susceptibles.

Teleoginas. Las garrapatas adultas se obtuvieron a partir de infestación artificial de un bovino susceptible mantenido en una unidad de aislamiento ubicada en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Salud Animal de CEISA (Ciudad Universitaria, Bogotá, D. C.). La recolección de individuos se realizó a partir del día 21 post infestación.

Desarrollo del bioensayo

Para la ejecución del bioensayo se emplearon 400 garrapatas adultas ingurgitadas de *Bo. microplus*: 200 para el bioensayo con la cepa Mt019 y 200 para el ensayo con la cepa Mt020. El hongo crecido en cada medio de cultivo se consideró como un tratamiento, al igual que ambos controles. Cada tratamiento estuvo compuesto por cinco réplicas.

El bioensayo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA - Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca), mientras los controles se trabajaron en el Laboratorio de Salud Animal en CORPOICA- CEISA, para minimizar la posibilidad de exposición al hongo. Se requirieron 50 especímenes por tratamiento, pesándose grupos de 10 individuos que se adhirieron a cajas de Petri con ayuda de cinta doble faz. El inóculo se preparó a partir de las cepas de *M. anisopliae*, previamente reactivadas en el medio S.R.B.; después de diez días de crecimiento, se realizó un precultivo líquido en caldo Saboureaud que se mantuvo en agitación constante durante 48 h; luego de lo cual el cultivo líquido se utilizó para inocular dos bandejas que contenían una matriz sólida de producción; una de ellas fue suplementada con un activador de patogenicidad inespecífico (S), la otra fue adicionada de un activador específico (SA). La concentración del activador específico fue de $3,3 \times 10^{-3}$ g cm⁻² y éste fue disperso sobre el activador inespecífico. También se realizó el cultivo del hongo sobre el medio tradicional extracto de malta (EM) en una tercera bandeja.

Después de diez días del crecimiento y esporulación del hongo sobre el medio de cultivo se realizó una suspensión fúngica a partir de cada uno de éstos, que contenía una concentración de 1×10^8 esporas ml⁻¹; para verificar la concentración requerida se realizó un recuento de los conidios en la

cámara de Neubauer. El hongo se aplicó a las garrapatas mediante la aspersión de 0,4 ml de la suspensión a cada unidad experimental por medio de atomizadores que dispensaban un tamaño de gota que varió entre 150 - 250 μm . Luego de este proceso, las cajas de Petri se ubicaron en recipientes plásticos que contenían toallas de papel absorbente humedecido y permanecieron recubiertas con fibra de polietileno, por un período de 14 días.

Se realizó un registro visual diario del inicio de la postura de las garrapatas y del día en que fue evidente la esporulación del hongo sobre las teleoginas. El día catorce después del inicio del ensayo se retiró la totalidad de la oviposición por unidad experimental para ser pesada en una balanza analítica y después ubicada en viales de vidrio con tapón de gasa, para permitir la ventilación de los huevos y observar su eclosión.

Parámetros evaluados

Con los datos obtenidos se calculó el Índice de Eficiencia de la Conversión (IEC), un parámetro cuantitativo utilizado para determinar la conversión del peso de una hembra ingurgitada (Benavides *et al.* 1989). Este parámetro se calculó dividiendo el peso de los huevos producido por unidad experimental sobre el peso de las teleoginas, de acuerdo con la siguiente expresión (Drummond *et al.* 1971):

$$\text{IEC} = \frac{\text{Peso de los huevos de la Unidad Experimental}}{\text{Peso de las hembras de la Unidad Experimental al inicio del ensayo}}$$

Posteriormente, se confinaron los viales en cámara húmeda por catorce días más, registrando el inicio de la eclosión de larvas a partir de los huevos. Entonces, se calculó el Porcentaje de Eclosión de larvas realizando un conteo de cascarones mediante la ayuda de un estereoscopio. Con estos datos se determinó la Eficiencia Reproductiva o ER; cuyo cálculo se realizó acorde con la fórmula (Drummond *et al.* 1971; Benavides *et al.* 1989):

$$\text{ER} = \left(\frac{\text{IEC} \times \text{Porcentaje de Eclosión} \times 20.000}{20.000} \right)$$

donde 20.000 es una constante y equivale al número de larvas obtenidas de un gramo de huevos

La Eficiencia Reproductiva (ER) de cada grupo de garrapatas tratado se comparó con la ER de los grupos control. Este parámetro, el Porcentaje de Control del ER denominado PCONER, se determinó, tal como se describe abajo. Del mismo modo se calculó el PCIEC, el cual es el Porcentaje de Control del IEC:

$$\text{PCONER} = \left\{ \frac{\text{ER Grupo control} - \text{ER del tratado}}{\text{ER Grupo Control}} \right\} \times 100$$

$$\text{PCIEC} = \left\{ \frac{\text{IEC Grupo control} - \text{IEC Grupo tratado}}{\text{IEC Grupo Control}} \right\} \times 100$$

Análisis estadístico

Los datos crudos del ensayo se estructuraron en una hoja de cálculo en EXCEL, la que se utilizó para la determinación de los diversos parámetros. La información obtenida para cada parámetro se sometió a un análisis de estadística descriptiva para cada hongo y tratamiento, incluyendo el cálculo de promedio, varianza y desviación estándar; además de la estadística no paramétrica (mediana y cuartiles). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza de una vía (Bailey 1981), mediante el paquete estadístico Xlstat (<http://www.xlstat.com/indexfr.html>). En este programa, una vez establecido mediante una prueba de Fischer que el tratamiento afecta las variables, los promedios de cada grupo son comparados entre sí mediante una prueba de rangos múltiples de Bonferroni.

Resultados y Discusión

Producción de masa fúngica

Al cultivar los aislamientos en el medio con activador específico y con activador inespecífico, se evidenció que los conidios de la cepa Mt019 presentaron un color verde de una tonalidad más clara que los de la cepa Mt020, el crecimiento de ambos aislamientos fue abundante con presencia de un micelio firme, con alta esporulación. El crecimiento micelial para ambos aislamientos se observó a los cinco días y los conidios se evidenciaron a partir del día décimo. En cuanto al crecimiento sobre el medio Extracto de Malta, la aparición de micelio en las dos cepas ocurrió al sexto día y los conidios se apreciaron a partir del día doce.

Después de realizado el bioensayo, para las garrapatas que fueron asperjadas con la suspensión de la cepa Mt019, el hongo presentó un crecimiento parcial muy difuso con evidencia únicamente de conidios; las teleoginas mostraron un aspecto seco. En contraste con lo anterior, el crecimiento de la cepa Mt020 sobre las teleoginas fue abundante y presentó tanto micelio como conidios. El promedio de días de crecimiento del hongo después del bioensayo, fue de 6 presentándose con ambas cepas una inhibición de la oviposición a partir del día tres.

Efecto sobre los parámetros reproductivos de la garrapata

Al analizar el parámetro IEC de Mt019 (Tabla 1) se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, formándose tres grupos estadísticos; en el primero, en el que se ubicaron los valores menores para la variable, estaban los tratamientos S, con un valor de IEC de 0,018, y SA, con un IEC de 0,047; en el segundo grupo estadístico, con un IEC de 0,141 estaba el tratamiento EM y por último se ubicaron los controles. La evaluación del parámetro IEC para la cepa Mt020 presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos y controles; S y SA se agruparon estadísticamente con valores de 0,006 y 0,040 respectivamente; mientras que S y EM con un valor de 0,118 conformaron el segundo grupo; el tercer grupo lo constituyeron los controles, que para este bioensayo tuvieron los mismos valores tanto para el aislamiento Mt019 como para el Mt020 (C = 0,340, CA = 0,393) (Tabla 1).

Estos resultados demuestran el efecto benéfico del uso de los activadores de patogenicidad durante la fase de cultivo del hongo; tanto cuando se usó el activador específico, como con el inespecífico, el valor del IEC fue significativamente menor, a cuando se aplicó el hongo cultivado en medio sintético y éstos a su vez estadísticamente inferiores a los IEC de los controles. El valor menor del IEC indica que hubo una menor postura por parte de las garrapatas; es decir, que cuando se cultivó el hongo con los dos activadores, el efecto del microorganismo sobre la oviposición de las garrapatas fue mayor que cuando se aplicó el hongo cultivado

Tabla 1. Comparación del efecto sobre el IEC de garrapatas *Boophilus microplus* (cepa Palma de Vino) de las accesiones Mt019 y Mt020 del hongo *Metarhizium anisopliae* cultivadas por métodos tradicionales (EM) o utilizando activadores de patogenicidad inespecíficos (S) o específicos (SA). Análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Bonferroni. Promedios acompañados de diferente letra, difieren significativamente ($p < 0,05$)

Mt019			Mt020		
Tratamiento	Promedio	Agrupamiento estadístico	Promedio	Agrupamiento estadístico	
SA	0,018	A	0,006	A	
S	0,047	A	0,040	A	B
EM	0,142	B	0,118	B	
C	0,340	C	0,340	C	
CA	0,393	C	0,393	C	
Coeficiente de determinación $R^2 = 0,9470$			Coeficiente de determinación $R^2 = 0,9727$		

en medio extracto de malta, sugiriendo un aumento de la actividad biocontroladora de los activadores tanto específico, como inespecífico sobre las dos cepas de *M. anisopliae*, sin observarse diferencias entre los niveles de control alcanzados para los dos potenciales inductores de virulencia. Este aumento de la virulencia del hongo cultivado en presencia de los activadores, podría atribuirse a una estimulación por parte de estos sustratos en alguno de los pasos determinantes en el mecanismo de acción del biocontrolador.

Los potenciales inductores de virulencia podrían haber producido un incremento en la capacidad de germinación de los conidios, aumentando la posibilidad de infección de la garrapata, tal como lo señalaron Villamizar *et al.* (2001), quienes observaron un aumento en la capacidad de germinación de los conidios de *M. anisopliae* cuando éste fue cultivado en presencia de algunos potenciales inductores de virulencia y dicho aumento en la germinación estuvo directamente relacionado con un aumento en la patogenicidad de los conidios. Por otro lado, los inductores pudieron aumentar la capacidad de producción de enzimas como la proteasa PR1 y las quitinasas que facilitan el proceso de penetración por parte del microorganismo y cuya actividad puede ser mejorada cuando se adicionan determinados sustratos al medio de cultivo, como lo indicaron Villamizar y Cotes (2001), quienes hallaron un aumento en la virulencia de *M. anisopliae* contra la langosta llanera, cuando se adicionó al medio de cultivo un homogeneizado de alas y patas de langosta o salvado de trigo. Para la bacteria *Serratia* sp. también se encontró un aumento en la actividad enzimática y biocontroladora contra la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, cuando la bacteria se cultivó en presencia de un homogeneizado de larvas de la polilla y de salvado de trigo (Bosa *et al.* 2001).

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, fueron publicados por Bidocha y Khachatourians (1991) quienes determinaron que sustancias encontradas en la cutícula de *M. sanguinipes* principalmente proteínas ricas en alanina, prolina

y amionoácidos hidrofóbicos, incrementaron la germinación conidial en el hongo *Beauveria bassiana* y la subsecuente penetración hifal, aumentando la actividad biocontroladora.

Para el parámetro ER, en el cual se determina no sólo la capacidad de postura de la garrapata, sino la eclosionabilidad de los huevos (Tabla 2), los tratamientos S y SA no presentaron diferencias estadísticas entre sí, sugiriendo nuevamente que los dos activadores empleados en este estudio, tienen el mismo efecto inductor de patogenicidad sobre *M. anisopliae*. El tratamiento EM no presentó diferencias estadísticas con los tratamientos S, SA y los control, con asociaciones estadísticas independientes hacia ambos extremos. Sin embargo, los resultados numéricos indi-

can que los conidios provenientes del cultivo en medio extracto de malta son menos virulentos que los cultivados en los medios con activador. Los valores para el ER de la cepa Mt019 producida en los diversos tratamientos fueron superiores a los obtenidos con la cepa Mt020, lo que sugiere que el aislamiento Mt020 es más virulento que el Mt019.

Efecto biocontrolador

El efecto biocontrolador definitivo de cada hongo y cada tratamiento se examinó mediante los parámetros PCIEC y PCONER. Para su cálculo se utilizó el valor de IEC y ER obtenido en cada réplica, el cual fue cotejado contra el valor promedio de estos parámetros obtenido en todos los controles. Para el PCIEC en Mt019 (Fig. 1), el

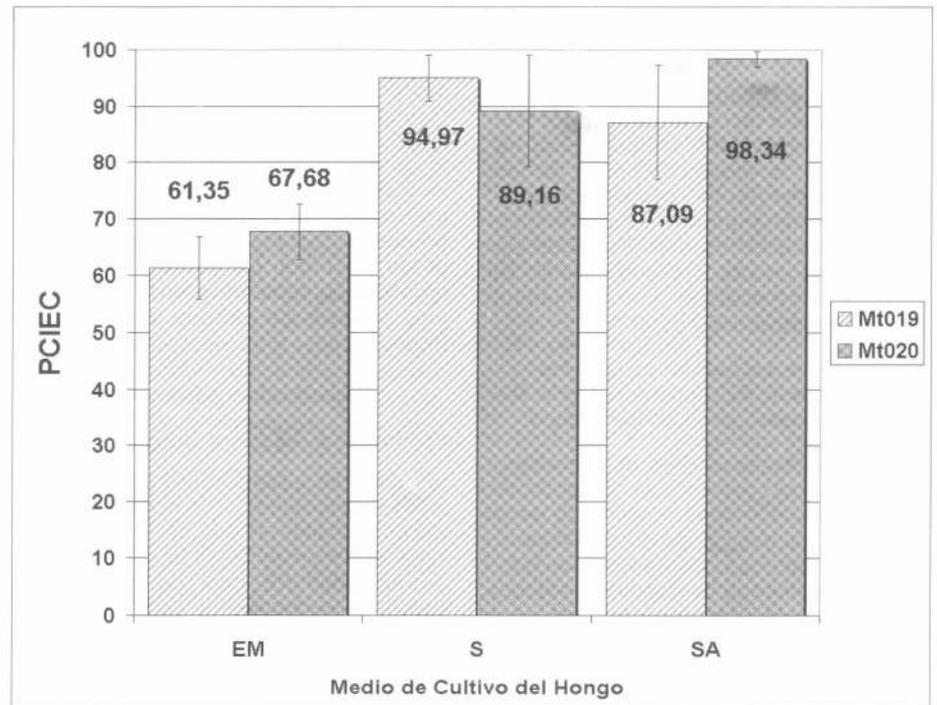


Figura 1. Efecto patogénico de las cepas de *M. anisopliae* Mt019 y Mt020 sobre el parámetro PCIEC de garrapatas *Bo. microplus*, al ser cultivado en el medio tradicional (EM), medio con activador de patogenicidad inespecífico (S), o medio con activador inespecífico adicionado de activador específico (SA). Para ambos hongos existió diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo sin activador y los tratamientos con activador. Las barras de error indican la desviación estándar.

Tabla 2. Efecto sobre la Eficiencia Reproductiva (ER) de garrapatas *Boophilus microplus* de la accesión Mt019 del hongo *Metarhizium anisopliae* al ser cultivado en el medio tradicional (EM), medio con activador de patogenicidad inespecíficos (S), o medio con activador inespecífico adicionado de activador específico (SA). Promedios acompañados de distinta letra, difieren significativamente ($P < 0,05$); Prueba de Bonferroni

Tratamiento	Mt019		Mt020	
	Promedio	Agrupamiento estadístico	Promedio	Agrupamiento estadístico
S	240,97	A	30,44	A
SA	586,30	A	384,18	A
EM	2533,16	A	1218,24	A
C	4516,78	B	4516,78	B
CA	4551,01	B	4551,01	B
Coeficiente de determinación $R^2 = 0,5773$			Coeficiente de determinación $R^2 = 0,6197$	

nivel de control en el tratamiento sin activador (EM) fue de 61,35%; la adición de los activadores de patogenicidad incrementó significativamente ($P < 0,05$, prueba de Bonferroni) el grado de control hasta 87,09% para medio SA y hasta 94,97% en el medio S; no encontrándose diferencias entre los dos últimos. Similar situación se observó con el hongo Mt020, los valores de PCIEC fueron: SA= 98,34% y S= 89,16%; valores significativamente superiores del obtenido con el hongo cultivado en EM siendo de 67,68%. Estos resultados confirman nuevamente que para las dos cepas utilizadas en el estudio, los activadores sí tuvieron un efecto inductor de la virulencia contra la garrapata *Bo. microplus*, siendo factible su utilización en medios de producción masiva para producción industrial, que permitan obtener biomasa de alta calidad para el desarrollo de bioplaguicidas.

La figura 2 presenta los valores de PCONER alcanzados para ambos hongos con y sin activadores. En el caso del hongo Mt019 con el activador inespecífico (S) el PCONER fue del 94,68%, este valor no fue diferente estadísticamente del índice obtenido con el activador específico (SA= 87,06%). Estos tratamientos presentaron diferencias ($p < 0,05$) respecto al PCONER del hongo crecido en EM (44,13%). En cuanto a la accesión Mt020, ésta presentó mejor efecto entomopatógeno con relación a la cepa

Mt019, cuando ambas se cultivaron sin activador (EM= 73,13%), pero la adición de los activadores de patogenicidad al medio incrementó significativamente el efecto biocontrolador (SA= 99,32%; S= 91,52%), no siendo estos últimos valores significativamente distintos entre sí.

Si se tiene en cuenta que el parámetro PCONER combina el efecto del biocontrolador sobre la postura de la garrapata (IEC) y sobre la capacidad de la eclosión de los huevos, cotejando los valores obtenidos contra los controles; los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los activadores, además de tener un efecto significativo sobre la actividad biocontroladora de los conidios de *M. anisopliae*, pudieron haber potencializado los efectos subletales del hongo entomopatógeno, de la misma manera como lo describieron Hernández y Moreno (2001), quienes observaron disminución en la oviposición y eclosión de huevos de la garrapata *Bo. microplus* cuando fue tratada con conidios de *M. anisopliae*, *Be. bassiana* y *Verticillium lecanii*. Este efecto también fue descrito para el trip de la flor de las leguminosas, *Megalurothrips sjostedti*, cuando al inocular larvas del insecto con conidios de *M. anisopliae*, en los adultos sobrevivientes se observó una disminución en las fecundidad, porcentaje de eclosión de huevos y longevidad (Ekesi y Maniania 2000).

Conclusiones

- Utilizando un modelo *in vitro* de evaluación, aplicando por aspersión el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus*, el aislamiento denominado Mt020 presentó un mayor efecto biocontrolador; tanto en el parámetro PCIEC (Porcentaje de Control del Índice de Eficiencia de la Conversión) como en el PCONER (Porcentaje de Control de la Eficiencia Reproductiva), en comparación con el aislamiento Mt019.

- El presente trabajo permitió concluir que la utilización de activadores de patogenicidad en el medio de cultivo, tanto inespecíficos como específicos, aumenta notablemente la actividad biocontroladora de *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Boophilus microplus*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus sentimientos de gratitud hacia un sin número de personas que de una u otra manera colaboraron en el éxito de este trabajo, particularmente al auxiliar Aldemar Zúñiga por el manejo de animales experimentales en CEISA y a todos los profesionales y estudiantes del Laboratorio de Control Biológico del programa MIP en Tibaitatá. Este estudio fue financiado con recursos del convenio CORPOICA - Ministerio de Agricultura, recursos de inversión 2001.

Literatura citada

- BAILEY, N. T. J. 1981. Statistical methods in biology. Second Edition. Hodder y Stoughton Ltd. 216 p.
- BENAVIDES O., E. 2001. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta Fedegan N° 69, julio - agosto, (Anexo coleccionable "Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en explotaciones ganaderas 6"), p. 52-63.
- BENAVIDES O., E.; ROMERO N., A.; RODRÍGUEZ B., J. 1999. Situación actual de resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas (Primera entrega). Carta FEDEGAN 59: 17-22.
- BENAVIDES O., E.; GONZÁLEZ, L. R.; MARTÍNEZ, R. H.; PARRA, G. D.; VILLAR, C. C. 1989. Espectro de sensibilidad a acaricidas de una colonia de la garrapata *Boophilus microplus* establecida en el piedemonte Llanero. Revista ICA 24 (1): 24-31.
- BETANCOURT, J. A.; GARCÍA, O.; ROQUEME, L.; NAVARRETE, M. 1992. Distribución y niveles de infestación por garrapatas en bovinos de Córdoba, Noroeste de Sucre y Noroeste de Antioquia. Colombia. Revista ICA 27 (1): 63-76.
- BIDOCHA, M.; KHACHATOURIANS, G. 1991. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology 5: 165-173.
- BOSA, C. F.; COTES, A. M.; LUQUE, J. E. 2001. Efecto de la composición del medio de

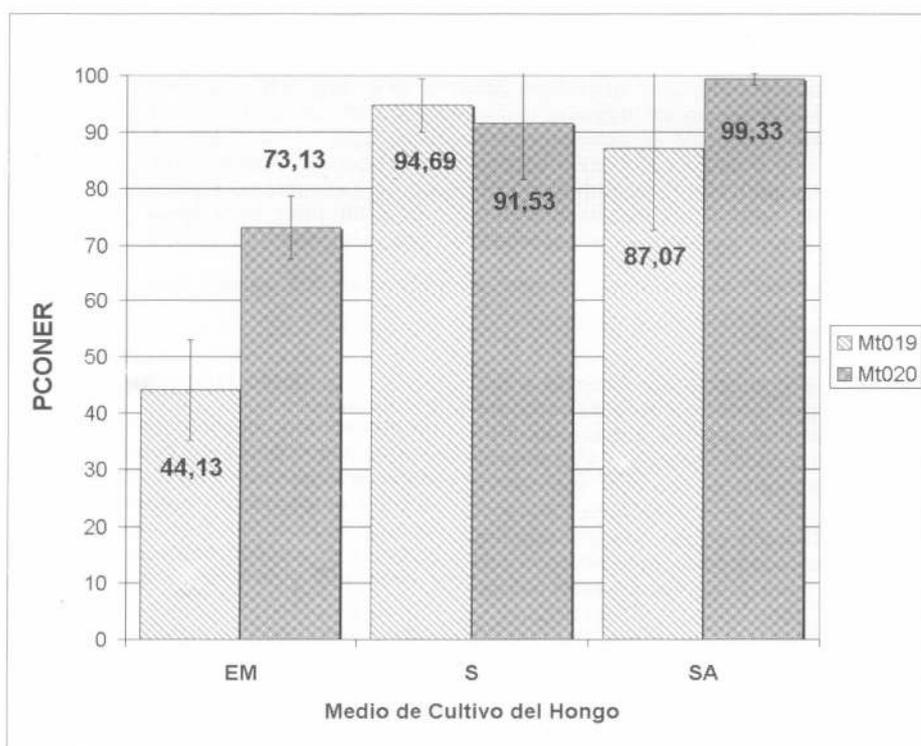


Figura 2. Efecto patogénico de dos accesiones de *M. anisopliae* Mt019 y Mt020 sobre el parámetro PCONER de la garrapata *Bo. microplus*, al ser cultivado en el medio tradicional (EM), medio con activador de patogenicidad inespecífico (S), o medio con activador inespecífico adicionado de activador específico (SA). Para ambos hongos existió diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo sin activador y los tratamientos con activador. Las barras de error indican la desviación estándar.

- cultivo, los pases sucesivos y la actividad enzimática de *Serratia* sp., sobre su actividad biocontroladora hacia *Tecia solinovora* Povolny. Resúmenes. XXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 44-45. Pereira.
- CAMACHO, E.; NAVARRO, G.; RODRÍGUEZ, R.; MURILLO, E. 1998. Efectividad del *Verticillium lecanii* sobre la fase parasítica de la garrapata *Boophilus microplus*. (Acari: Metastigmata: Ixodidae). Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 67-68.
- CLARKSON, J.; CHARNLEY, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology 4 (5): 197-202.
- DRUMMOND, R. O.; GLANDEY, W.; WHETSTONE, T.; ERNEST, S. 1971. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. Journal of Economic Entomology 64: 686-688.
- EKENSI, S.; MANIANIA, N., K. 2000. Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. Entomologia Experimentalis et Applicata 94: 229-236.
- HERNÁNDEZ, F.; MORENO, R. 2001. Evaluación de la actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos sobre dos cepas de la garrapata *Boophilus microplus*. Trabajo de grado para optar al título de Médico Veterinario. Universidad de La Salle. Facultad de Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia. 156 p.
- LANE, B.; TRINCI, A. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. Mycological Research 95 (7): 829-833.
- SHAW, R. D. 1966. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* and an assessment of its resistance spectrum. Bulletin of Entomological Research 56 (4): 389-405.
- VILLAMIZAR, L.; COTES, A.; URIBE, D. 2001. Relación entre la actividad enzimática y la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera (Orthoptera: Acrididae). Revista Colombiana de Entomología 27 (3-4): 107-114.
- VILLAMIZAR, L.; COTES A. 2001. Efecto de las condiciones de cultivo sobre factores determinantes en el mecanismo de acción de *Metarhizium anisopliae*. Resúmenes. XXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 44. Pereira.
- WALKER, A. R.; BENAVIDES O., E.; BETANCOURT E., A. 1988. Manejo integrado de plagas para el control de garrapatas. Carta Ganadera 25 (8): 52-57.

Recibido: Abr. 22/ 2003

Aceptado: Jul. 30/ 2003

Hongos asociados con termitas y termiteros en plantaciones de eucalipto

Fungi associated with termites and their nests in eucalyptus plantations

ANA ISABEL GUTIÉRREZ G.¹, YAMILÉ SILDARRIAGA O.² SANDRA URIBE S.³,
FABIO PINEDA G.⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 7-13 (2004)

Resumen. La región de San Sebastián de Buenavista, Magdalena (Colombia), se caracteriza por ser una de las más importantes en la producción de madera derivada de cultivos de eucalipto. Actualmente se han registrado pérdidas económicas grandes en las empresas madereras que operan en San Sebastián por el daño causado por termitas. Estas pérdidas alcanzan aproximadamente el 83,6% de la producción en el área de estudio. Las medidas de control realizadas son pocas empleándose fundamentalmente insecticidas químicos. En la región no se han realizado estudios de reconocimiento de las termitas que atacan los eucaliptos ni de los microorganismos asociados a ellas. Estos estudios son importantes ya que algunos microorganismos entomopatógenos pueden estar regulando las poblaciones de termitas en condiciones naturales, o tener utilidad potencial como agentes de control microbiológico. En este trabajo se registran los géneros de termitas presentes en la reforestadora y los hongos asociados a los termiteros y sustratos cercanos. Las termitas encontradas corresponden a los géneros *Microcerotermes*, *Amitermes* y *Coptotermes*. En total se obtuvieron 252 aislamientos de hongos correspondientes a 31 géneros y 29 especies. Los aislamientos fúngicos se agruparon en categorías de acuerdo con su origen. Se resaltan aquellos reconocidos como entomopatógenos o registrados previamente en asociación con termitas. Entre los hongos más importantes se encuentran: *Aspergillus* spp. (33,3%), *Fusarium* spp. (21%), *Penicillium* spp. (7,9%), *Trichoderma* spp. (6,8%), *Paecilomyces* spp. (4,8%) y *Entomophthora* spp. (2,4%).

Palabras clave: Hongos entomopatógenos. *Paecilomyces lilacinus*. Control microbiológico. Termitas.

Summary. The region of San Sebastián of Buenavista, Magdalena (Colombia), is characterized for being one of the most important producers of lumber derived from eucalyptus plantations. At present, large economic losses have been registered for lumber companies operating in San Sebastián due to the damage caused by termites. These losses reach approximately 83,6% of the production in the study. The control measures carried out are few, mainly using chemical insecticides. In this region, studies have not been conducted on recognizing the termites that attack eucalyptus nor on the microorganisms associated with them. These studies are important because some microorganisms may be regulating termite populations under natural conditions, or have potential as microbiological control agents. In this paper we report the genera of termites present in eucalyptus and the fungi associated with their nests and nearby substrates. The termites found belong to the genera *Microcerotermes*, *Amitermes* and *Coptotermes*. A total of 252 fungal isolates corresponding to 31 genera and 29 species were obtained. The fungal isolates were grouped into categories according to their origin. We identify those isolates recognized as entomopathogens or previously reported in association with termites. Among the most important fungi were *Aspergillus* spp. (33,3%), *Fusarium* spp. (21%), *Penicillium* spp. (7,9%), *Trichoderma* spp. (6,8%), *Paecilomyces* spp. (4,8%) and *Entomophthora* spp. (2,4%).

Key words: Entomopathogenic fungus. *Paecilomyces lilacinus*. Microbiological control. Termites.

Introducción

Las termitas son insectos sociales con un sistema de castas que incluye obreros, soldados y alados. Las formas aladas se constituyen en reyes y reinas; estas últimas pueden colocar de 2.000 a 3.000 huevos por día, lo cual indica su capacidad reproductiva alta (Watson y Gay 1991).

Estos insectos son altamente perjudiciales para la industria forestal, agrícola, textil y maderera; afectan gravemente la economía y la ecología de un país (Garcés 1997). Las termitas se alimentan de estructuras maderables, árboles deciduos, plantas leñosas, cartón y papel. El daño que ocasionan se debe principalmente a que su dieta alimenticia se basa en lignina

y celulosa (Hoyos 1974; Pérez-Arbélaez 1994). Estos insectos poseen una comunidad microbiana en el tracto intestinal que ayuda a digerir los componentes duros de la madera liberando la celulosa que las nutre (Grady 1997). *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae: Leptospermoideae) es una especie ampliamente distribuida en la zona intertropical que posee múltiples aplica-

- 1 Bióloga. Investigador asociado al Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: anisa@matematicas.udea.edu.co
- 2 Autor para correspondencia: Licenciada en Biología y Química. M. Sc. Profesor de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín, Colombia. Fax: 2330120. E-mail: ysaldar@matematicas.udea.edu.co
- 3 Ingeniera Agrónoma. M.Sc. Ph. D. Profesora posgrado de Entomología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. E-mail: Suribe@perseus.unal.med.edu.co
- 4 Licenciado en Biología y Química. M. Sc. Profesor de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: fpgutier@matematicas.udea.edu.co

ciones tanto en arboricultura forestal como en la obtención de sustancias antimicrobianas y en la industria maderera. Así mismo, en la producción de papel y en la desecación de terrenos (Hoyos 1974; Lamprecht 1990; Pérez-Arbelaez 1994). Las plantaciones de *Eucalyptus* colombianas se han visto afectadas significativamente por termitas tanto en los semilleros como en plantaciones adultas (Garcés 1997). En la reforestadora San Sebastián no se han calculado con precisión los daños económicos. No obstante, se calculan porcentajes por encima del 50% para algunas parcelas. El daño más significativo se ha presentado en *Eucalyptus tereticornis*, especie que ocupa un área de 1.360 hectáreas en la plantación total del área donde se realizó el estudio (1.700 hectáreas, datos sin publicar).

Entre las familias de termitas que afectan eucaliptos se encuentra Rhinotermitidae, que construye los nidos alrededor de la madera y sobre la superficie de los árboles a través de un sistema de galerías y la Termitidae, que construye sus nidos como montículos sobre el suelo y en los árboles (Grace 1989). Por lo tanto, estos sustratos han sido considerados fuente ideal para la búsqueda y el aislamiento de microorganismos asociados a termitas con potencial como agentes de control microbiano. El control de las termitas ha sido realizado de forma general mediante compuestos preservantes de madera como creosotas, químicos como chlordano, metil bromuro, malatión, deltametrina, preparaciones comerciales de diclorodifeniltricloetano (DDT) y hexacloruro de benceno (Yoshioba *et al.* 1991; Valerio *et al.* 1998). Dichos compuestos además de ser tóxicos persisten en la naturaleza por periodos de tiempo prolongados. También se han utilizado métodos alternativos como el control biológico. Éste incluye el uso de depredadores y patógenos. Entre los patógenos se encuentran principalmente virus, bacterias, nemátodos y hongos (Coppel y Liang 1987; Madrigal 1989; Hassan 1990; Logan *et al.* 1990; Zoberi y Grace 1990; Milner *et al.* 1992; Alves *et al.* 1995; Zoberi 1995; Milner *et al.* 1998a y b). Los hongos que atacan las termitas en condiciones naturales y otros a los cuales pueden ser susceptibles se consideran una alternativa importante para el control biológico de las mismas. En estudios *in vitro* se ha demostrado que hongos como *Aspergillus flavus*, *Entomophthora* sp. (Espero 1984), *Beauveria bassiana* (Zoberi y Grace 1990) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Chai 1995) poseen niveles importantes de patogenicidad para termitas. Además, se ha registrado el hongo *Metarhizium anisopliae* atacando, en condiciones naturales, termitas como *Reticulitermes flavipes* (Zoberi 1995) y *Coptotermes formosanus* (Sajap y Kaur 1990). Para el caso particular de termitas, la selección de hongos promisorios como agentes de control biológico debe incluir no sólo características propias del hongo como su capacidad de adaptación y sobrevivencia (en el suelo,

en el termitero o en un cebo que lo contenga), sino también, aspectos de la biología de las termitas. Entre los más importantes están la limpieza que se hacen los individuos cuando son infectados con hongos, la remoción y entierro de los cadáveres y la presencia de secreciones de defensa producidas por las termitas (Sajap y Kaur 1990; Delate *et al.* 1995; Zoberi 1995; Madrigal 1999, Fernández 2001). Adicionalmente, los criterios básicos derivados de pruebas *in vitro* como porcentaje de mortalidad, DL50, TL50 y mortalidad intrínseca son de gran importancia. En Colombia existen pocos estudios sobre el reconocimiento de hongos entomopatógenos asociados a termitas y en particular a termitas que atacan el eucalipto. En este trabajo se realizó el reconocimiento de termitas de la reforestadora y de hongos asociados a ellas. Este puede considerarse como punto de partida para la selección e implementación del uso de hongos con potencial como agentes de control microbiológico de termitas que puedan incluirse en programas de manejo integrado en las áreas afectadas.

Materiales y Métodos

Origen de los aislamientos

La zona de muestreo está localizada en la municipalidad de San Sebastián de Buenavista (departamento de Magdalena), con una extensión de 7.000 hectáreas. Esta región comprende tres fincas: Los Álamos, El Enredo y Santa María. San Sebastián se encuentra ubicada en la zona de vida bosque seco Tropical (bs-T) caracterizada por tener una temperatura promedio de 28,8°C, una precipitación media anual de 1.787 mm y una altitud de 25 msnm (Borror *et al.* 1996; Espinal 1990). El trabajo se realizó en la finca los Álamos, que tiene una extensión de 1.700 hectáreas, con plantaciones de *Eucalyptus tereticornis* (80%), *E. camaldulensis* y *E. urophylla* (20%).

Colección de termitas

Se localizaron las áreas de la finca con mayor incidencia de daño registrado por termitas de acuerdo con la reforestadora y se escogieron al azar siete parcelas de 40 x 40 m muestreándose en promedio 20 árboles por parcela. Las termitas se colectaron de la superficie y cavidades internas de los árboles (tanto jóvenes como adultos) y de troncos atacados que se encontraban en el suelo. La recolección se realizó usando pinces y pedazos delgados de madera. Las termitas se colectaron con su respectivo sustrato: fragmentos de termitero, hojas y suelo. Posteriormente, se depositaron en recipientes plásticos de 16 x 12 cm de diámetro tapados con muselina y sellados con plástico transparente, envueltos en bolsas oscuras dándoles condiciones apropiadas para el transporte al laboratorio. También se colectaron termiteros completos. Las termitas se mantuvieron en recipientes plásticos dentro de una cámara climatizada (WTBbinder 78532, Tuttlingen

/ Germany) con temperatura controlada (26±0,5°C), humedad relativa (80±5% HR) y en oscuridad o en el invernadero del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia (HR 60%, 24,4°C).

Las termitas colectadas fueron identificadas en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, en el laboratorio de Entomología por Jhon Albeiro Quiróz G. y Ana Isabel Gutiérrez G. del Grupo de Micología, Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia. La identificación se llevó a cabo con las claves taxonómicas de Constantino (1999), Bach (1997), Nickle y Collins (1988, 1992), Watson y Gay (1991), Nutting (1990) y Weesner (1987).

Aislamiento de hongos

Los hongos se aislaron de termitas muertas (Tm), termitas vivas (Tv) colocadas vivas directamente sobre un medio para el crecimiento de hongos, fragmentos de termitero (Ft), madera (M), hojas de eucalipto (He), suelo (S), y troncos secos de eucalipto (Tse). Las muestras se colocaron en cajas de Petri estériles, utilizando papel filtro Watman No. 1 húmedo o con una mota de algodón humedecida con agua destilada estéril para observar el desarrollo de los hongos en estos sustratos. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (22-26°C). Todos los sustratos fueron transferidos, por triplicado, a cajas de Petri con los medios de cultivo Malta Extracto Agar (MEA), Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y Papa Dextrosa Agar (PDA) (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England).

De los hongos obtenidos se hicieron aislamientos puros a partir de cultivos monospóricos siguiendo la técnica descrita por Calle (2000). Se realizaron microcultivos de los hongos purificados y se estudiaron las características tanto macroscópicas como microscópicas de los hongos. Se identificaron las especies de los hongos según criterios morfológicos y de cultivo, siguiendo las claves de: Barnett (1967), Nelson *et al.* (1983), Samson *et al.* (1984), Vélez (1989), Pardo (1990), Goettel e Inglis (1997), Humber (1997), Papierok y Hajek (1997). Los hongos aislados se conservan en el Laboratorio de Micología, Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia.

Resultados y Discusión

En total se obtuvieron 252 aislamientos de hongos, los cuales corresponden a 31 géneros y 29 especies. Las termitas sobre las cuales se realizaron los aislamientos fueron identificadas como *Microcerotermes silvestri*, *Amitermes silvestri* (Termitidae) y *Coptotermes Wasmann* (Rhinotermitidae).

En la figura 1 se indica la frecuencia de los principales aislamientos fúngicos encontrados, la cual se calculó como: número de aislamientos del hongo en las termitas y diferentes sustratos / número total de hongos x 100. De acuerdo con esta figura, los hongos encontrados con mayor frecuencia

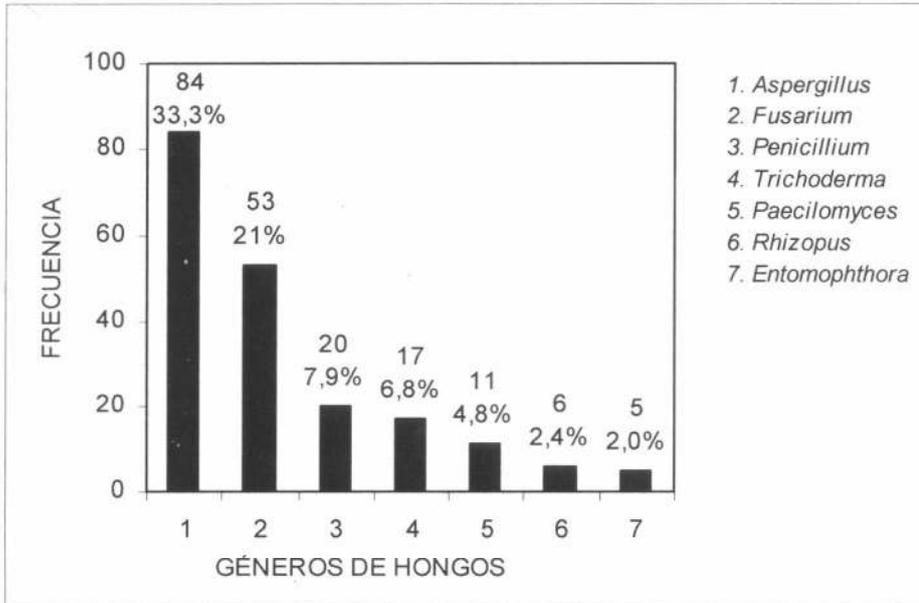


Figura 1. Frecuencia de géneros de hongos aislados de termitas y de diferentes sustratos.

fueron: *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*), *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*) y *Penicillium*. (*Penicillium* sp. y *P. verrucosum*). Aunque menos frecuentes *Trichoderma* spp. y *Paecilomyces lilacinus* merecen especial consideración como agentes de control biológico. Así mismo, *Entomophthora* spp. por su reconocido efecto como entomopatógeno.

En las tablas 1 y 2 aparecen discriminados los géneros y especies de hongos de acuerdo con su fuente de aislamiento; es decir, de las termitas o directamente de los sustratos como suelo, madera, troncos de eucalipto y fragmentos de termitero. Así mismo, se menciona el medio de cultivo utilizado con éxito para el mejor aislamiento, crecimiento e identificación de los hongos en el laboratorio. Géneros como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Penicillium* y *Paecilomyces* fueron aislados tanto de termitas como de los termiteros y uno o más sustratos. Esto da cuenta de su asociación a las termitas y a los sustratos cercanos a ellas en las condiciones propias del área de estudio. Dichos hongos aparecen como de especial interés y potenciales candidatos para posteriores pruebas de patogenicidad en el laboratorio y campo.

De acuerdo con el presente estudio y estudios de patogenicidad previos realizados por otros autores, es probable que estos hongos estén regulando las poblaciones de termitas en condiciones naturales en las plantaciones de eucalipto en la reforestadora San Sebastián. Tanto *Entomophthora*, como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Paecilomyces* habían sido encontrados previamente en condiciones naturales o de laboratorio asociados a termitas (Espero 1984; Khan et al. 1990a; Khan et al. 1991; Khan et al. 1994; Chai 1995). *In vitro* se ha encontrado que termitas ex-

puestas a superficies tratadas con dosis de *Entomophthora* tan bajas como $1,4 \times 10^3$ esp/ml presentaron porcentajes de mortalidad del 95% en 2,5 días (Espero 1984). Las termitas infectadas perdieron locomoción y su cuerpo se tornó amarillento. Después de la muerte el cuerpo del insecto se oscureció y fue cubierto de micelio y esporas consideradas como nueva fuente de inóculo. *Entomophthora* es un controla-

dor importante en ambientes naturales bajo condiciones cálidas y húmedas. No obstante, su uso como insecticida biológico se dificulta por sus niveles infectivos bajos en condiciones moderadas de humedad y por su producción masiva compleja (Douglas et al. 2001).

En cuanto al género *Fusarium*, *F. avenaceum* había sido registrado previamente como patógeno de la termita subterránea *Coptotermes formosanus* en condiciones de laboratorio (Chai 1995). Aunque este es un hongo entomopatógeno facultativo generalista, dada la obtención de varios aislamientos nativos de la zona de San Sebastián en el presente estudio, valdría la pena realizar pruebas de patogenicidad para evaluar la infectividad en laboratorio y campo. A pesar de que este hongo presenta limitaciones para aplicaciones inundativas por la producción de toxinas y la patogenicidad de algunas especies para plantas y animales, se ha recomendado para aplicaciones localizadas como lo que sería el uso de cebos en el control de termitas.

El hongo *Paecilomyces* es ampliamente reconocido como hongo entomopatógeno por causar la enfermedad llamada muscardina amarilla. Entre las especies entomopatógenas han sido descritas *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, *P. javanicus*, *P. ramosus*, *P. cinnamomeus* y *P. lilacinus* (Tanada y Kaya 1993). Esta última se ha registrado de forma natural infectando termitas (Khan et al. 1990a, Khan et al. 1991). En el presente estudio *P. lilacinus* se encontró en una frecuencia alta (Fig. 2).

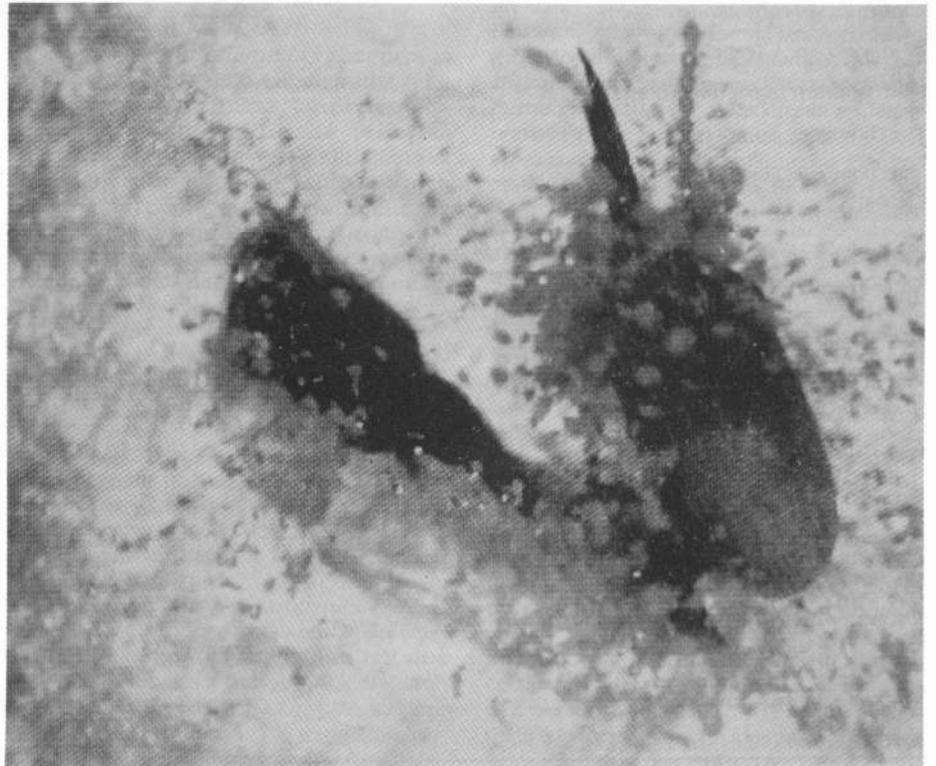


Figura 2. Termita (soldado) cubierto de micelio por el hongo *Paecilomyces lilacinus*. Fotografía Felipe Cardona, U. de A.

Tabla 1. Crecimiento de hongos Ascomycetes y Anamórficos aislados de los diferentes sustratos en medios de cultivo

Fuentes de campo, laboratorio y medios de cultivo																
Aislamiento de hongos	Tm-Tv			PDA	He			S			M-Tse			Ft		
	PDA	MEA	SDA		PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA
<i>Acremonium</i> sp., Link												X	X			
<i>Acrostalagmus</i> sp.												X	X			
<i>Aspergillus</i> sp., Micheli ex Link		X	X			X	X		X	X		X	X		X	
<i>Aspergillus candidus</i> , Link						X	X					X	X			
<i>Aspergillus flavus</i> , Link												X	X			
<i>Aspergillus fumigatus</i> , Fries		X	X													
<i>Aspergillus glaucus</i> , (Wiggers) Link															X	
<i>Aspergillus niger</i> , Van Tieghem		X	X			X	X					X	X			
<i>Aspergillus ochraceus</i> , Wilhelm		X	X													
<i>Aspergillus tamarii</i> , Kita												X	X			
<i>Byssochlamys</i> sp., Westling												X	X			
<i>Cladosporium</i> sp., Link												X	X		X	
<i>Curvularia</i> sp., Boedijn												X	X			
<i>Chalaropsis</i> sp., Peyron												X	X			
<i>Discosia</i> sp., Lib												X	X			
<i>Eurotium rubrum</i>												X	X			
<i>Eurotium amstelodami</i> , Hangin												X	X			
<i>Eurotium herbariorum</i> , (Wiggers) Link														X	X	
<i>Fusarium moniliforme</i> , Sheldom						X	X					X	X			
<i>Fusarium oxysporum</i> , Schlechet emend, snyd & Hans												X	X			
<i>Fusarium</i> sp., Link						X	X		X	X		X	X	X	X	
<i>Fusarium sporotrichoides</i> Sherb																
<i>Humicola</i> sp., Traaen												X	X			
<i>Microsporium gypseum</i> , (Bodin) Guiart et Grikorakis												X	X			
<i>Paecilomyces</i> sp., Bainier												X	X			
<i>Paecilomyces lilacinus</i> , (Thom) Samson									X	X		X	X			
<i>Penicillium</i> sp., Link		X	X									X	X			
<i>Penicillium chrysogenum</i> , Tom						X	X					X	X			
<i>Penicillium expansum</i> , Link												X	X			
<i>Penicillium paraherquei</i> , Abe ex G. Smith												X	X			
<i>Penicillium verrucosum</i> , Dierckx		X	X													
<i>Pestalotia</i> sp., De Notaris												X	X			
<i>Rhizoctonia</i> sp., De Candolle		X	X			X	X					X	X			
<i>Scopulariopsis</i> sp., Bainier												X	X			
<i>Trichoderma</i> , sp., Persoon		X	X									X	X			
<i>Trichoderma harzianum</i> , Rifai aggr.												X	X			
<i>Trichoderma viride</i> , aggr. Senu Rifai.									X	X						
<i>Trichophyton</i> sp., Malmstem									X	X						
<i>Tritirachium</i> sp., Limber												X	X			
<i>Verticillium</i> sp., Nees von Esenbeck												X	X			

Fuentes de aislamiento: Tv = Termitas vivas, Tm = Termitas muertas, S = Suelo, M = Madera, Tse = Tronco seco de eucalipto, He = Hojas de eucalipto, Ft = Fragmento de termitero. Medios de cultivo: PDA = Agar papa dextrosa, MEA = Agar extracto de malta, SDA = Agar sabourad dextrosa

Tabla 2. Crecimiento en los medios de cultivo de Zygomycetes aislados de los diferentes sustratos

Aislamiento de hongos	Fuentes de campo, laboratorio y medios de cultivo														
	Tv-Tm			He			S			M y Tse			Ft		
	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA	PDA	MEA	SDA
<i>Absidia corymbifera</i> , (Cohn) Sacc. & Trotter											X	X			
<i>Allomyces javanicus</i> , Kniep											X	X			
<i>Cunninghamella</i> sp., Thaxter											X	X			
<i>Entomophthora</i> , sp., Fresenius											X	X			
<i>Entomophthora muscae</i> , (Cohn) Fresenius											X	X			
<i>Mucor</i> sp., Micheli ex Fries				X	X		X	X			X	X			
<i>Mucor circinelloides</i> , V. Tieghem f. circinelloides											X	X			
<i>Mucor hiemalis</i> , wehmer f. hiemalis											X	X			
<i>Mucor plumbeus</i> , Bon											X	X			
<i>Mucor racemosus</i> , Fresenius											X	X			
<i>Plasmodiophora</i> sp., Woronin				X	X										
<i>Pythium</i> sp., Pringsheim							X	X							
<i>Rhizopus</i> sp., Ehrenberg							X	X							
<i>Rhizopus stolonifer</i> , Ehrenb. ex Fr.	X	X		X	X						X	X			
<i>Rhizopus arrhizus</i>											X	X			
<i>Syncephalastrum</i> sp., Schroet.											X	X			
<i>Zygorhynchus</i> sp., Vuillemin											X	X			

Fuentes de aislamiento: Tv = Termitas vivas, Tm = Termitas muertas, S = Suelo, M = Madera, Tse = Tronco seco de eucalipto, He = Hojas de eucalipto, Ft = Fragmento de termitero. Medios de cultivo: PDA = Agar papa dextrosa, MEA = Agar extracto de malta, SDA = Agar Sabouraud dextrosa.

Goettel e Inglis (1997) señalan que esta especie parece ser más frecuente en regiones cálidas como la región en la cual se encuentran los eucaliptos afectados por termitas. Adicionalmente, es típicamente aislada de suelos, lo cual la convierte en un candidato potencial como biocontrolador en el área de San Sebastián de Buenavista (Magdalena) en especial para las termitas subterráneas como *Coptotermes* encontradas en el presente estudio.

El efecto patogénico de otras especies de *Paecilomyces* como *P. caterniannulatus*, *P. farinosus* y *P. variotus* ha sido probado en condiciones de laboratorio sobre termitas utilizando como inóculo suspensiones acuosas de 6×10^7 esp/ml aplicadas a una termita cebo. *P. fumosoroseus* fue el más efectivo mostrando una infectividad del 86,7% (Chai 1995).

El hongo más abundante en el presente estudio fue *Aspergillus*. Muchas de las especies de este hongo son saprofitas, lo cual probablemente explica el porcentaje alto y frecuencia de su hallazgo (Fig. 1). No obstante, en condiciones naturales *Aspergillus* ha sido encontrado infectando un amplio rango de insectos (Tanada y Kaya 1993; Ulloa y Herrera 1994). En el presente estudio, tanto en el laboratorio como en el invernadero donde se establecieron algunas colonias, se registraron altos porcentajes de mortalidad de termitas causados por *Aspergillus*. El efecto patogénico sobre las termitas fue verificado *in vitro*. Previamente, algunos autores registraron *A. ochraceus* causando mortalidades altas para termitas en condiciones de laboratorio. En pruebas *in vitro* se obtuvieron mortalidades del 70% sobre termitas cuando éstas se trataron por as-

persión con concentraciones de $1,4 \times 10^3$ esp/ml. *A. niger* causó también altas mortalidades sobre termitas *Microtermes unicolor*, *Microcerotermes championi* y *Heterotermes indicola* cuando fueron puestas a caminar sobre cultivos del hongo durante diferentes tiempos. Observándose porcentajes de mortalidad del 100% a los 10, 20 minutos después de la exposición (Khan et al. 1994).

El hongo *Cunninghamella*, encontrado en el presente estudio en sustratos relacionados con las termitas, fue previamente registrado en nidos de termitas *Reticulitermes flavipes* (Ramakrishnan et al. 1999). Este hongo ha sido también reconocido como entomopatógeno de huevos y larvas de Diptera en condiciones de laboratorio y huevos de reptiles en condiciones naturales (Vallejo et al. 1996).

En cuanto a las especies del género *Penicillium* se encontraron *Penicillium* sp., el de mayor frecuencia, seguido por *P. verrucosum* y *P. chrysogenum*, *P. paraherquei* y *P. expansum*. *Penicillium* es quizá el hongo más ubicuo de todos, con gran cantidad de especies (Samson et al. 1984; Ulloa y Herrera 1994). En condiciones de campo se ha evaluado la diseminación del hongo *Penicillium verrucosum* en termiteros de *Anacanthotermes ahngerianus* encontrándose persistencia del mismo en las condiciones ambientales evaluadas (Tanada y Kaya 1993; Samson et al. 1984 Lj[utikova 1990). Esto sugiere el potencial de algunos de los aislamientos del presente estudio para evaluaciones posteriores. Del hongo *Verticillium*, conocido como entomopatógeno para algunas especies de insectos, se encontró

un sólo aislamiento que corresponde al 1,39% del total de hongos aislados.

Entre los hongos ambientales y saprofitos aislados se encontraron *Mucor* (*M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. hiemalis* y *M. plumbeus*), *Syncephalastrum* y *Zygorhynchus*. Del género *Rhizopus* se hallaron especies como *Rhizopus stolonifer* y *Rhizopus arrhizus*. Además, *Absidia corymbifera*, *Pythium*, *Allomyces javanicus*, *Acrostalagmus*, *Acremonium*, *Byssosclamyces*, *Discosia*, *Tritirachium*, *Chalaropsis*, *Plasmodiophora*, *Eurotium*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia* y *Cladosporium*. Estos hongos son saprofitos y viven en el suelo o en lugares húmedos (Samson et al. 1984; Ulloa y Herrera 1994).

En conclusión, de las especies de hongos aislados se encontraron ocho entomopatógenos, los cuales se han señalado previamente para termitas (Espero 1984; Khan et al. 1990a; Lj[utikova 1990; Khan et al. 1991, 1994; Chai 1995; Ramakrishnan et al. 1999). Entre los hongos más promisorios como agentes de control microbiológico para termitas en la reforestadora está *Paecilomyces* spp. De acuerdo con Wright et al. (2001), *Paecilomyces fumosoroseus* y *P. javanicus* son útiles para controlar infestaciones de termitas subterráneas, particularmente de la familia Rhinotermitidae entre la cual se encuentra el género *Coptotermes* registrado atacando *Eucalyptus tereticornis* en el presente estudio. Propágulos del hongo como blastosporas y conidias, que pueden ser cultivadas de forma fácil y económica e incorporadas en formulaciones, han sido utilizados con éxito para proteger árboles vivos, estructuras de madera y otros materiales celulósicos susceptibles a la infestación y daños.

Existen diferencias de opinión respecto a la utilidad de aislamientos originarios de los insectos a los cuales se dirigen las aplicaciones de dichos hongos como medida de control. Algunos autores sugieren un aumento en la efectividad cuando los aislamientos provienen de otros hospederos o cuando han sido reactivados sobre el insecto a controlar (Khan *et al.* 1990b; González *et al.* 1993). En este sentido los aislamientos encontrados en el presente estudio directamente sobre las termitas y que poseen características de adaptación a las condiciones climáticas y ecológicas del área, deberán seleccionarse cuidadosamente en pruebas de laboratorio y campo, antes de poder recomendarse como elementos de un manejo integrado de termitas. No obstante, su presencia asociada a las termitas en los eucaliptales de la reforestadora los convierte en candidatos potenciales como agentes biocontroladores. Así mismo, es importante considerar aquellos aislados a partir de los sustratos, para los cuales debe verificarse la patogenicidad aún cuando se hayan registrado previamente afectando termitas. Entre los criterios de selección más importantes de los aislamientos, se encuentran los mencionados previamente en la introducción como mortalidad intrínseca de las termitas, dosis letal 50 (DL50) y tiempo letal 50 (TL50), entre otros.

El reconocimiento de los hongos asociados a las termitas en condiciones naturales y de laboratorio constituye un elemento básico como punto de partida para el control microbiológico de las mismas. No obstante, la inclusión de aislamientos derivados de otros insectos con actividades importantes de patogenicidad comprobada y efectividad en campo, debería considerarse en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de la reforestadora San Sebastián por su hospitalidad y colaboración; al profesor Abel Díaz Cadavid M.Sc por el análisis de distribución y frecuencia de los hongos, a la profesora Gloria Machado por la revisión del manuscrito, a Mónica Zuluaga, Beatriz Betancur, Carmén Vásquez, Inés Elena Giraldo y Beatriz Cardona por el soporte técnico y trabajo de campo y a la Corporación de Patologías Tropicales, al Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al CODI de la Universidad de Antioquia por el apoyo y financiación de esta investigación.

Literatura citada

- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO, A.; STIMAC, J. L.; PEREIRA, R. M. 1995. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Cornitermes cumulans* em pastagens. Ecosistema Faculdade de Agronomia "Manoel Carlos Gonçalves" 20: 50-57.
- BACH, C. 1997. Claves para familias de termitas presentes en Colombia: alados y soldados. Seminario. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
- BARNETT, H. L. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis (U.S.A.). 225 p.
- BORREROS, S. 1996. Diccionario Geográfico de Colombia. Tomo 3. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Bogotá (Colombia). p. 1404-1405.
- CALLE, J. 2000. Vers un contrôle Microbiologique des populations Colombiennes de Triatominae, insectes vecteurs de la maladie de Chagas. Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la Université Paris V.-René Descartes, Facultad de Medicina, Necker. 141 p.
- CHAI, Y. Q. 1995. Preliminary studies on the pathogenicity of some entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. Chinese Journal of Biological Control 11 (2): 68-69.
- CONSTANTINO, R. 1999. Clave para as Familias de Cupins que Ocorrem no Brasil. Papéis Avulsos de Zoologia 40 (25): 408-448.
- COPPEL, H. C.; LIANG, M. C. 1987. Rhabditoid nematodes associated with subterranean termites. Forestry Research Notes Nº 274, 5 p.
- DELATE, K. M.; GRACE, J. K.; TOME, H. M. 1995. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the Formosan subterranean termite (Isopt., Rhinotermitidae). Journal of Apply Entomology 119: 429-433.
- DOUGLAS, G.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: T.M. Butt; C. Jackson; N. Magan (eds.) Fungi as biocontrol agents. CAB International, 2001: 25-69.
- ESPERO, L. V. 1984. Survey of entomogenous fungi associated with termites (Philippines). Scientific Journal 6 (1): 23-24
- ESPINAL, L. S. 1990. Geografía ecológica de Colombia. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 61-62.
- FERNÁNDEZ, C. R. 2001. Susceptibilidad de *Plutella xylostella* a diferentes aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su efecto adicional sobre otros lepidópteros asociados a la producción de colífor. Tesis (Magister en Entomología). Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias. 92 p.
- GARCÉS, J. E. 1997. Generalidades sobre las principales plagas insectiles en plantaciones forestales de Colombia (Guía de campo). Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias y Ciencias Agropecuarias, Posgrado en Entomología. p. 293- 311.
- GOETTEL, M.; INGLIS, G. D. 1997. Fungi Hyphomycetes. En: L. Lacey (ed.) Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS, Academic Press, Great Britain. p. 213-249.
- GONZÁLEZ, G. M. T.; POSADA, F. F. J.; BUSTILLO, P. A. E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé 44 (3): 93-102.
- GRACE, J. K. 1989. A modified trap technique for monitoring *Reticulitermes* subterranean termite populations (Isoptera: Rhinotermitidae). Pan-Pacific Entomologist 65: 381-384.
- GRADY, W. 1997. Toronto's war on termites. Canadian Geografic 117 (5): 46.
- HASSAN, F. A. 1990. Important insects pests of Casuarina in Egypt. En: Advances in casuarina research and utilization. Proceeding of the Second International Casuarina Workshop. El Cairo (Egypto). p. 102-109.
- HOYOS, J. 1974. Árboles cultivados de Venezuela. Monografía Nº 20. Sociedad de Ciencias Naturales. Lasalle, Caracas. p. 148-149.
- HUMBER, R. A. 1997. Fungi Identification En: L. Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS, Academic Press (Great Britain). p. 153-185.
- KHAN, K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. 1990a. Testing entomopathogenic fungi against the common agro-forestry termites. En: G.K. Veeresh; B. Mallick; C.A. Viraktamath (eds.) Social insects and the environment. p. 636.
- KHAN, K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. 1990b. Influence of successive sub-culturing and maintenance of virulence of mycopathogens on termites En: G.K. Veeresh; B. Mallick; C.A. Viraktamath (eds.) Social insects and the environment. p. 637-638.
- KHAN, K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. 1991. Mycopathogens for biological control of *Odontotermes brunneus* Hagen. Journal of Biological Control 5: 32-35.
- KHAN, K. I.; JAFRI, R. H.; AHMAD, M. 1994. Pathogenicity of *Aspergillus niger* against various species of termites. Punjab. Univ. Journal of Zoology 9: 9-14.
- LAMPRECHT, H. 1990. Silvicultura en los trópicos. Los ecosistemas forestales en los bosques tropicales y sus especies arbóreas. Posibilidades y métodos para un aprovechamiento sostenido. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) Cooperación Técnica-República Federal de Alemania. Eschborn. p. 276-288.
- L[J]UTIKOVA, L. I. 1990. Entomogenous fungi as control agents for termite *Anacanthotermes ahngerianus* Jacobs (Isoptera, Hodotermitidae). En: G.K. Veeresh; B. Mallick; C.A. Viraktamath (eds.). Social insects and the environment. p. 634-635.
- LOGAN, J. W. M.; COWIE, R. H.; WOOD, T. G. 1990. Termite (Isoptera) control in agriculture and forestry by non-chemical methods: a review. Bulletin of Entomological Research 80 (3): 309-330.
- MADRIGAL, A. 1989. Reconocimiento de insectos dañinos en plantaciones forestales de la Costa Atlántica Colombiana. Sociedad Colombiana de Entomología. Miscelánea 12: 1-24.
- MADRIGAL, A. 1999. Notas sobre control biológico de plagas. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 1-13.

- MILNER, R. J. 1992. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. En: Biological control of locust and grasshoppers: proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou. Republic of Benin. p. 200-207.
- MILNER, R. J.; STAPLES, J. A.; LUTTON, G. G. 1998a. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. Biological control: theory and applications in pest management 11 (3): 240-247.
- MILNER, R. J.; STAPLES, J. A.; HARTLEY, T. R.; LUTTON, G. G.; DRIVER, F.; WATSON, J. A. L. 1998b. Occurrence of *Metarhizium anisopliae* in nests and feeding sites of Australia termites. Mycol-res [Cambridge University Press, Cambridge] 102: 216-220.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park (U.S.A.), p. 70-145.
- NICKLE, D. A., COLLINS, M. S. 1988. The Termite Fauna (Isoptera) in the Vicinity of Chamela, State of Jalisco, México. Folia Entomológica Mexicana 77: 85-122.
- NICKLE, D. A.; COLLINS, M. S. 1992. The termites of Panama (Isoptera). En: D. Quintero y A. Aiello (Eds.) Insects of Panama and Mesoamérica. Selected Studies. Oxford University Press. p. 208-242.
- NUTTING, W. L. 1990. Insecta: Isoptera. En: D.L. DiDall (ed.) Soil Biology Guide. New York. p. 997-1032.
- PAPIEROK B.; HAJEK, A. E. 1997. Fungi Entomophthorales. En: L. Lacey (ed.) Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS, Academic Press (Great Britain). p. 187-212.
- PARDO, V. M. 1990. Manual práctico de Micología Agrícola. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuaria. 97 p.
- PÉREZ-ARBELAEZ, E. 1994. Plantas útiles de Colombia. Editorial Victor Hugo, Medellín. p. 502-505.
- RAMAKRISHNAN, R.; SUITER, D. R.; NAKATSU, C. H.; HUMBER, R. A.; BENNETT, G. W. 1999. Imidacloprid-Enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) Susceptibility to the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Environmental Entomology 28 (5): 1125-1132.
- SAJAP, A. S.; KAUR, K. 1990. Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus infection in the termite, *Coptotermes curvignathus*. Pertanika 13 (3): 331-334.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; OORSCHOT, A. N. 1984. Introduction to food-borne fungi. Second edition. Central Bureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands, Academy of Arts and Sciences. 247 p.
- TANADA, Y.; KAYA H. K. 1993. Insect pathology. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich (U.S.A.). p. 359-361.
- ULLOA, M.; HERRERA, T. 1994. Etimología e Iconografía de Géneros de Hongos. Cuadernos 21. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 300 p.
- VALERIO, J. R.; SANTOS, A. V.; SOUZA, A. P.; MACIEL, C. A. M.; OLIVEIRA M. C. M. 1998. Chemical and mechanical control of mound-building Termite species (Isoptera: Termitidae) in pastures. Ann. Soc. Entomol. 27 (1): 125-131.
- VALLEJO, L. F.; URIBE, S.; VÉLEZ, I. V. 1996. Identificación de hongos patógenos para *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniasis. Revista Colombiana de Entomología 22 (1): 13-17.
- VÉLEZ, H. 1989. Curso avanzado de hongos oportunistas. Diagnóstico de laboratorio de los agentes más comunes. Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina, Laboratorio de Micología. Bayer Farma. 203 p.
- WATSON J. A. L., GAY, F. J. 1991. Isoptera (Termites). En: The Insects of Australia. Vol II. Csiro, Cornell University Press, Ithaca, New York. p. 330-347.
- WEESNER, F. M. 1987. Order Isoptera. En: F. W. Stehr (ed.) Immature Insects. Vol I. Kendall/Hunt Publishing Company, Department of Entomology Michigan State University, U.S.A. p. 132-139.
- WRIGHT, M. S.; CONNICK, W. J. Jr.; JACKSON, M. A. 2001. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U. S. Patent Application S/N 09/989, 287.
- YOSHIOBA, S.; FUSE, G.; ENOKI, A. 1991. Termiticidal efficacy of organophosphates (I) Degradation of organophosphates in soil. Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kinki University 24: 29-36.
- ZOBERI, M. H. 1995. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Mycologia 87 (3): 354-359.
- ZOBERI, M. H.; GRACE, J. K. 1990. Isolation of the pathogen *Beauveria bassiana* from *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 16 (3): 289-296.

Recibido: Sep. 04 / 2002

Aceptado: Feb. 20 / 2003

Transformación de *Beauveria bassiana* cepa Bb9112 con los genes de la proteína verde fluorescente y la proteasa *pr1A* de *Metarhizium anisopliae*

Transformation of *Beauveria bassiana* strain Bb9112 with the genes from the green fluorescent protein and the protease *pr1A* of *Metarhizium anisopliae*

CARMENZA E. GÓNGORA B.¹

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 15-21 (2004)

Resumen. Con el propósito, en un futuro, de producir cepas mejoradas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, se desarrolló un sistema de transformación del hongo basado en la resistencia al herbicida glufosinato de amonio, conferida por el gen *bar*. Se transformó la cepa *B. bassiana* Bb9112, caracterizada por su resistencia a luz UV, con el plásmido pBarGPE1, en el cual se clonó previamente el gen marcador que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La selección de las colonias transformantes se hizo en medio mínimo conteniendo 25 µg/ml del herbicida glufosinato de amonio. La expresión de la proteína GFP se confirmó por observaciones al microscopio de luz UV en los protoplastos transformados y el micelio regenerado de estos protoplastos luego de la transformación. Pruebas de patogenicidad indicaron que no existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de patogenicidad de la cepa no transformada y las cepas transformadas con estos genes. Con el fin de aumentar la patogenicidad de la cepa Bb9112 contra la broca del café, se realizó la transformación de ésta con el plásmido pBarGPE1-*pr1A*, que contiene un gen de proteasa tipo subtilisina (*pr1A*) aislado de *Metarhizium anisopliae*. En la cepa transgénica la presencia del gen *pr1A* se identificó por PCR. La expresión de la proteína se confirmó por isoelectrofoque y actividad enzimática.

Palabras clave: Entomopatógeno. Gen marcador. Gen de selección. Patogenicidad. Broca del café.

Summary. In order to produce an improved strain of the entomopathogen *Beauveria bassiana*, fungus transformation system was developed based on resistance to the herbicide glufosinate ammonium, conferred by the *bar* gene. *B. bassiana* strain Bb 9112, characterized by its resistance to UV light, was transformed with the plasmid pBarGPE1, previously cloned with the marker gene coding for green fluorescent protein (GFP). Transformed colonies were selected in a minimal medium containing 25 µg/ml of the herbicide glucosinate ammonium. The expression of the protein GFP in the transformed protoplasts and the mycelium regenerated from those protoplasts was confirmed by UV light microscopy. Pathogenicity tests indicated no significant differences in percent pathogenicity between the transformed and non-transformed strains. In order to increase the pathogenicity of Bb9112 against the coffee berry borer, it was transformed with the plasmid pBarGPE1-*pr1A* containing a subtilisin - protease gene (*pr1A*) isolated from *Metarhizium anisopliae*. In the transgenic strain the presence of the *pr1A* gene was identified by PCR. The expression of the protein was confirmed by isoelectrofocuss and enzymatic activity.

Key words: Entomopathogen. Marker gene. Selection gene. Pathogenicity. Coffee berry borer.

Introducción

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* ha sido ampliamente usado como controlador biológico de insectos (Ferron 1978). Sin embargo, los experimentos de control biológico empleando hongos entomopatógenos han originado frecuentemente resultados inconsistentes y la tardanza en producción de mortalidad en comparación con insecticidas químicos ha detenido el desarrollo comercial de estos productos. Debido a esto, las consideraciones de la sostenibilidad de un hongo entomopatógeno con propósitos comerciales inevitablemente conlleva a mejorar su desempeño como biocontrolador.

En el caso del ecosistema cafetero colombiano, *B. bassiana* juega un papel importante en el control de *Hypothenemus hampei*; este hongo se encuentra infectan-

do naturalmente la broca del café en casi todas las regiones de Colombia y experimentos llevados a cabo en Cenicafe, han demostrado que el control del insecto en campo es posible empleando dosis de $1 \times 10^{8-12}$ esporas por árbol, las cuales causan 80-90% de mortalidad en los insectos (Posada 1998). Sin embargo, el uso de esta concentración de esporas es costoso y una de las formas de reducir el costo de estas dosis altas es aumentar la virulencia y patogenicidad de las cepas de *B. bassiana*. De esta manera, sería posible reducir la dosis de esporas requerida para controlar el insecto. Por otra parte, la mortalidad del insecto se obtendría más rápidamente, disminuyendo así el daño que causa el insecto a los frutos.

El primer paso para la producción de un hongo mejorado, a través de transformación genética, es el desarrollo de métodos eficientes de transformación y la manera

más apropiada de evaluar los métodos de transformación genética de un organismo es el uso de genes marcadores y genes de selección. Los genes marcadores codifican enzimas que no están presentes en las cepas no transgénicas; su expresión puede ser visualizada fácilmente sin el requerimiento de ensayos costosos o complicados enzima- sustrato. Las mediciones cuantitativas de los niveles enzimáticos son posibles y fáciles. La actividad específica de las proteínas no compete con otras enzimas presentes en las células y no interfiere con el metabolismo normal del organismo. Los genes de selección confieren resistencia a sustancias tóxicas, codificando productos que permiten la supervivencia de los organismos transformantes en medios tóxicos, que generalmente contienen antibióticos o herbicidas. Sólo los organismos transformantes tienen la habilidad de sobrevivir en estos medios.

¹ Ph. D. Disciplina de Entomología, Cenicafe, Plan Alto, Chinchiná, Caldas, Colombia. Tel.: 68-506550 Ext. 332. E-mail: Carmenza.gongora@cafedecolombia.com

La transformación de *B. bassiana* con genes de selección y marcadores no sólo permitirá la identificación eficiente de las cepas transformadas, sino que también facilitará el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad de estas cepas en condiciones de laboratorio y campo. En laboratorio, un requerimiento clave en el estudio de la interacción entomopatógeno-hospedero es la habilidad de detectar el hongo dentro del tejido del insecto. Cepas transformadas conteniendo genes de selección o marcadores proveerán una nueva herramienta de detección y los medios para monitorear el desarrollo del hongo y la interacción con el hospedero. En el campo, estos genes permitirán la recuperación e identificación de cepas del hongo asperjadas en el campo, lo cual conllevará al entendimiento de los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en el medio ambiente.

Como genes de selección, el gen *bar* se ha usado en sistemas de transformación de hongos entomopatógenos. El gen aislado de *Streptomyces hygroscopicus* confiere resistencia a los herbicidas bialafós y glufosinato de amonio. Los herbicidas en cuestión, contienen como ingrediente activo fosfinothricin, un análogo de ácido glutámico, el cual inhibe la actividad de la enzima glutamina sintasa, la cual causa muerte de las células por acumulación de amonio. El gen *bar* codifica la enzima fosfinothricin acetiltransferasa, la cual inactiva fosfinothricin al acetilarlo (Avalos *et al.* 1989).

Como gen marcador, el cDNA que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie *et al.* 1994), ha sido exitosamente expresada en un amplio número de organismos. Esta proteína aislada de *Aequorea victoria*, la cual confiere bioluminiscencia a invertebrados acuáticos del orden Cnidaria, está compuesta de 238 aminoácidos. El uso amplio de esta proteína se debe a su fácil identificación: oxígeno y luz azul o ultravioleta son los únicos requerimientos para visualizar la proteína. GFP ha sido expresada en hongos basidiomicetes como es el caso de *Ustilago maydis* (Spelling *et al.* 1996), y hongos filamentosos como *Aureobasidium pollulans* (Vanden Wymelenberg *et al.* 1997), *Cochliobolus heterostrophus* (Maor *et al.* 1998), y los entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* (Cantone y Vandenberg 1999) y *Metarhizium anisopliae* (Inglis *et al.* 2000) y no se ha manifestado que tenga efectos negativos en el hongo o interfiera con sus procesos patogénicos.

La literatura menciona la transformación de *B. bassiana* con genes de selección como es el caso del gen de β tubulina resistente a (MBC) aislado de *Neurospora crassa*, la cual confiere resistencia al fungicida 1,2 benzimidazol carbamato (MBC) (Pfeifer, y Khachatourians 1992). De igual forma, Daboussi *et al.* (1989) demuestran la transformación del hongo con el gen *nia* D. Thorvilson y San Francisco (2001) registran el uso del gen β

glucoronidasa (GUS) como gen marcador en un sistema de transformación de *B. bassiana*. Sin embargo, hasta ahora no se ha indicado la transformación de este hongo con GFP, *bar* o genes involucrados en procesos de patogenicidad.

Luego del desarrollo de un sistema eficiente de transformación, el siguiente paso consiste en la producción de cepas con incremento en su patogenicidad. St. Leger y colaboradores (1996) han clonado varios genes que están involucrados en los procesos de infección y patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*. Uno de los genes que se expresan cuando el insecto es atacado, codifica una proteasa tipo subtilisina denominada *Pr1A*, la cual solubiliza la cutícula proteínica del insecto, permitiendo la penetración de las hifas del hongo en el insecto y el acceso a los nutrientes necesarios para su crecimiento.

La transformación de *M. anisopliae* con *pr1A* (St. Leger *et al.* 1996, 1997) resultó en el desarrollo de un hongo entomopatógeno mejorado genéticamente. Cuando la cepa fue transformada y copias adicionales del gen codificando esta proteasa fueron insertadas en el genoma del hongo, la cepa resultante produjo la proteína durante el proceso de infección y colonización del insecto, y ésta fue también secretada por el hongo en la hemolinfa del insecto *Manduca sexta*. La presencia de esta proteína en la hemolinfa, activó en éste el sistema inmunológico de fenoloxidasas. El efecto tóxico combinado de *pr1A* junto con los productos de la reacción de fenoloxidasas causó, en los insectos expuestos al hongo transformado, una reducción del 25% en el tiempo de muerte y reducción de 40% en el consumo de alimento, comparado con los insectos infectados con el hongo no transgénico. Además, los insectos infectados con el hongo transformado mostraron una rápida mecanización y los cadáveres resultantes fueron un sustrato pobre para la esporulación del hongo.

El objetivo de este estudio fue llevar a cabo la modificación genética de *B. bassiana* empleando vectores de transformación para hongos, que contienen como marcadores selectivos el gen *bar* y el gen marcador que codifica GFP y la proteasa *pr1A*. Las cepas obtenidas serán usadas para realizar, en condiciones de laboratorio, el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad hongo vs. insecto y dilucidar los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en condiciones de campo. Este estudio permitirá investigar el mantenimiento, estabilidad, proliferación y los efectos patogénicos de *B. bassiana* a través del uso de estos genes. Se cree que los genes marcadores selectivos no deben tener efecto alguno sobre la patogenicidad del hongo a menos que debido al sitio de inserción en el genoma, puedan interferir con algún gen involucrado en los procesos de patogenicidad. Este trabajo permitirá dilucidar esta afirmación.

Materiales y Métodos

Ingeniería de los vectores de transformación

El vector de transformación pBarGPE1 (Pall 1993) se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center, Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center. El plásmido se extrajo y purificó de cultivos de *E. coli*.

El gen de la proteasa tipo subtilisina *pr1A* de *M. anisopliae* var. *acridum*, identificada en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (USA) con el número de acceso [AJ251925.1](#) se obtuvo del Dr. Ray St-Leger, Departamento de Entomología, University of Maryland, College Park, MD, USA. El gen había sido previamente clonado en el sitio múltiple de clonación del vector pBluescript SK (pBS) (Stratagene, La Jolla) entre los sitios de restricción *EcoRI* y *Xho I*. El plásmido se amplificó y el gen *pr1A* se separó del plásmido pBS por digestión con las enzimas de restricción *Sma I* y *BamH I*. Luego fue ligado en el sitio múltiple de clonación del vector pBarGPE1 bajo el control del promotor de *gpdA* y la región terminadora del gen *trpC* (ambos provenientes de *Aspergillus nidulans*), generándose el vector de transformación pBarGPE1-*pr1A*. Células competentes de *E. coli* se transformaron con la solución de la ligación, las colonias bacterianas que contenían el plásmido recombinante se identificaron y el plásmido se amplificó y secuenció. Los resultados de la secuencia mostraron que el gen estaba correcto.

El gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) se clonó en el vector pBarGPE1 de la misma manera descrita para la proteasa *pr1A* y fue obtenido del Dr. Ray St-Leger.

Cepa de *Beauveria bassiana*

La cepa de *B. bassiana* Bb9112 aislada en Caldas, Colombia, de un lepidóptero de la familia Geometridae, se escogió para desarrollar los trabajos de transformación debido a que mostraba una patogenicidad superior al 85% contra la broca del café y resistencia a luz U.V.

Producción de protoplastos

Esporas obtenidas a partir de un cultivo del hongo crecido en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) por 15 días a 27°C, se resuspendieron en 10 ml de Tween estéril al 0,02%. Con esta suspensión se inocularon 100 ml de Líquido Sabouraud Dextrosa (LSD) suplementado con 0,1% de extracto de levadura. El cultivo creció a 27°C y 120 rpm por 36 h. El micelio se recuperó por filtración a través de una capa de miracloth estéril y se lavó con agua desionizada estéril. El micelio se incubó por 3h, en agitación lenta en 20 ml de una solución 1,2 M sorbitol y 50 mM MES, que contenía 0,8% Novozyma 234 y 0,3% B-glucuronidasa. La presencia de protoplastos se verificó por observaciones al

microscopio. La solución de micelio y protoplastos se filtró, a través de una capa de miracloth estéril y los protoplastos se precipitaron por centrifugación a 2.000 *gpm* y 4°C, posteriormente se lavaron 2 veces por resuspensión y centrifugación en 20 ml de solución osmótica STC (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 20 mM CaCl₂). Finalmente, los protoplastos se resuspendieron a una concentración de 1x10⁸ protoplastos/ml de STC, obteniéndose 1 a 5 ml de protoplastos en total.

Transformación de *Beauveria bassiana* con los vectores pBarGPE1-*pr1A*, pBarGPE1-GFP

La transformación del hongo con pBarGPE1-*pr1A*, y pBarGPE1-GFP se hizo usando una solución de 200 µl de protoplastos a 1 x 10⁸ protoplastos/ml. A ésta se adicionaron 50 µg de DNA plasmídico en un volumen de 50-100 µl, se incubó en hielo por 30 min. Luego, se agregaron 50 µl de polietilenglicol₃₀₀₀ (PEG) al 60%, en STC y se incubó en hielo por 10 min. Finalmente, se adicionó 1 ml de la solución de PEG y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La solución se resuspendió en 4 ml RM (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄ y 0,3% NaNO₃), para obtener un volumen final de 5 ml de transformantes. Estos 5 ml de transformantes se dividieron en 2 tubos falcon de 50 ml conteniendo cada uno 2,5 ml; a cada tubo se le adicionaron 47,5 ml de RM líquido con Bacto-agar al 1%, a una temperatura de 35°C. 10 ml de esta solución se sirvieron en cajas de Petri. Estas cajas, con los protoplastos transformantes en medio mínimo, se incubaron por 18 a 24 h y luego se cubrieron con 10 ml de RM con Bacto-agar al 1% y glufosinato de amonio a una concentración final de 25 µg/ml [Finale (5% ingrediente activo) AgrEvo USA. Wilmington DE].

Evaluación de las colonias de *B. bassiana* transformadas

Identificación de los genes de transformación por PCR. En las colonias transformantes, se identificó la presencia de los genes *bar*, *pr1A* y GFP, por amplificación usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las cepas se aislaron y crecieron en medio LSD con adición de 0,1 % de extracto de levadura y glufosinato de amonio. El micelio se recuperó por filtración al vacío, se lavó y maceró en nitrógeno líquido. La extracción de DNA se llevó a cabo siguiendo el método de Jürgen *et al.* (1999).

Los genes se amplificaron con reacciones de PCR en un volumen de 50 µl, conteniendo 500 ng de ADN fúngico, 1X PCR buffer, 25 pmoles de iniciadores, 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 2,0 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerasa. Ciclo de PCR: 94°C x 5 min, 94°C x 1 min, 55°C x 1 min, 72°C x 1 min, (40 ciclos), 72°C x 5 min.

Las secuencias de los iniciadores que se usaron para la amplificación fueron:

```
Gen bar: 5'-3' ATGCGCCAGAACGACGCC. 3'-5' GCAGGACCGGACGGGGCG
Gen pr1A: 5'-3' TCTTCTACTCTTCTCCCA. 3'-5' TTAGGCACCGTTGTAGGCA
GFP: 5'-3' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
3'-5' TTAAGTGTACAGCTCGTCCATGCCG
```

Las reacciones de PCR, se corrieron en geles de agarosa al 1% y tras observación bajo luz UV se determinó la presencia de las bandas con un tamaño molecular correspondientes al esperado para cada gen.

Identificación de las proteínas *pr1A* en las cepas transformadas

Medición de la actividad enzimática proteolítica por espectrofotometría.

Los niveles de proteasas totales producidas por las colonias transformadas y no transformadas se cuantificaron a través de ensayos de actividad enzimática. Para esto, las colonias se sembraron en medio ASD. Inóculos de esporas procedentes de colonias transformadas y no transformadas, obtenidos de un cultivo de 15 días, se recolectaron y con éstas, se inocularon 50 ml de medio mínimo esterilizado (0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄, 50% agua de grifo) suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo (Sigma) y 50 ml de medios básicos suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo más 1% de N-Acetil glucosamina (Sigma). Los cultivos se incubaron en agitación a 120 rpm por 72 h; 200 µl de una muestra del cultivo se tomaron cada 12 h. La actividad proteolítica se evaluó usando como sustrato el péptido succinil-(alanina) 2-prolil-fenilalanina (Sigma) (St.Leger *et al.* 1987). Para esto, a 90 µl de 0,1 M Tris HCL a pH 8,0 se adicionaron 10 µl de la muestra libre de solutos y 8 µl del sustrato al 1 mM in DSO. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro a 405 DO.

Identificación de proteasas por isoelectroenfoque (IEF)

La presencia de las proteínas y su actividad proteolítica también se determinó a través de separación de las proteínas por electroforesis de isoelectroenfoque (IEF) y degradación de gelatina (Bidochka y Khachatourians 1994). Para esto, las cepas de *B. bassiana* transformadas y no transformadas crecieron en medio mínimo líquido, suplementado con 1% (p/v) de quitina de caparazón de cangrejo o quitina al 1% (p/v) más N- acetilglucosamina al 1% (p/v) durante 48 horas. 25 ml del medio de cultivo se concentraron por ultracentrifugación usando unidades de ultrafiltración Centricon con membranas de exclusión de 10kDa (Amicon). Se preparó un gel de poliacrilamida al 5% más anfolitos 3/10 Bio-lyte al 2%. 2 ml de las muestras concentradas se aplicaron sobre el gel y se separaron por isoelectroenfoque usando una cámara mini-IEF-cell modelo 111 (Bio-Rad). La separación se llevó a cabo a 100 V por 15 min, seguido de 200 V por 15 min y 450 V por 1 h. La presencia de las proteasas se

visualizó al poner en contacto el gel con una película para radiografía, la cual está recubierta de una capa de gelatina.

Pruebas de patogenicidad cepas transformadas con la proteína verde fluorescente

Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad, con las cepas transformadas con la proteína verde fluorescente. Las cepas transformadas crecidas en medio ASD más glufosinato de amonio a una concentración de 25 µg/ml y las cepas control no transformadas se sometieron a control de calidad, de tal manera que se evaluaron las siguientes características: 1) germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 h, 2) porcentaje de pureza mayor del 90%. La germinación, la pureza y viabilidad, así como las pruebas de patogenicidad (15 individuos por tratamiento con 4 repeticiones) se determinaron siguiendo el método descrito por Vélez *et al.* (1997).

Resultados y Discusión

Cepas transformadas con la proteína verde fluorescente

Luego de la transformación, se observó la solución de protoplastos putativamente transformados bajo el microscopio y se detectó la presencia de protoplasto verde fluorescente (Fig. 1). De 5-10 días luego de la transformación, las colonias putativamente transformadas empezaron a desarrollarse en el medio selectivo (Fig. 2). Inicialmente, dos colonias crecidas en medio mínimo con 25 µg/ml del glufosinato de amonio, que mostraron fluorescencia verde bajo el microscopio de luz-UV, fueron subcultivadas en SDA. El crecimiento de las colonias se siguió diariamente. Cuan-

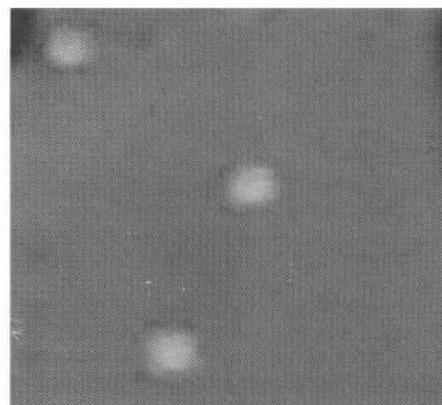


Figura 1. Expresión de GFP en protoplastos transformados de *Beauveria bassiana* Bb 9112 con el plásmido pBarGPE-GFP. Microscopía con luz UV (40x).

do se observó la esporulación de los cultivos, las esporas se subcultivaron en medio fresco. Los subcultivos se hicieron por 3 generaciones. En la tercera generación, se aisló el DNA genómico del micelio y una amplificación por PCR de los genes *bar* y GFP se realizó usando iniciadores específicos para cada uno de éstos. Ambos genes se amplificaron por PCR en las cepas transgénicas pero no en el tipo silvestre Bb9112 (Fig. 3). En las cuatro cepas transformadas, identificadas como T1-1, T1-2, T2-2 y T2-3, el gen GFP se amplificó por PCR (Fig. 4). En el micelio de las 4 cepas, la expresión de la proteína GFP se confirmó por observaciones al microscopio de luz UV. Sin embargo, el grado de expresión de la proteína verde fluorescente no es el mismo en todo el micelio y en algunos casos

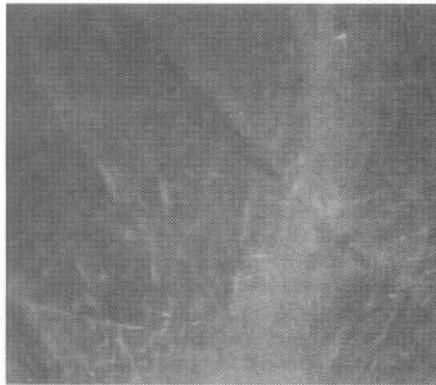


Figura 2. Expresión de GFP en una colonia transformada de *Beauveria bassiana* Bb 9112 con el plásmido pBarGPE-GFP. Microscopía con luz UV (2,5x).

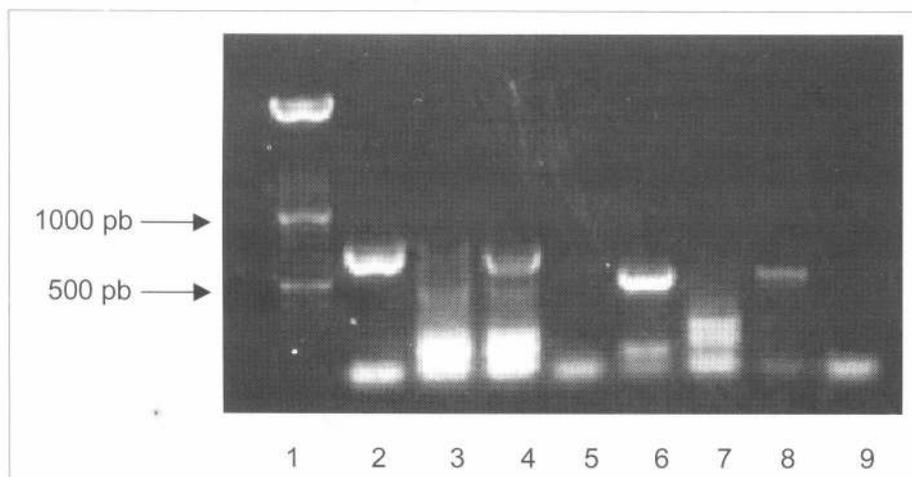


Figura 3. Separación en agarosa de los productos de PCR de los genes GFP y *bar* amplificados en cepas de *B. bassiana* transformadas con pBarGPE1-GFP. Una banda de 742 pb indica la presencia del gen GFP. Una banda de 537 pb indica la presencia del gen *bar*. Líneas 2 a 5 contienen las muestras amplificadas con los iniciadores para GFP. Línea 1 fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular XIV (Boehringer). Línea 2 contiene la reacción del plásmido pBarGPE1-GFP. Línea 3 fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea 4 fue cargada con la reacción de una cepa transgénica. Línea 5 fue cargada con la solución maestra sin DNA. Líneas 6 a 9 contienen muestras amplificadas con iniciadores del gen *bar*. Línea 6 fue cargada con la reacción de pBarGPE1-GFP. Línea 7 fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea 8 fue cargada con la reacción de una cepa transgénica. Línea 9 fue cargada con solución maestra sin DNA.

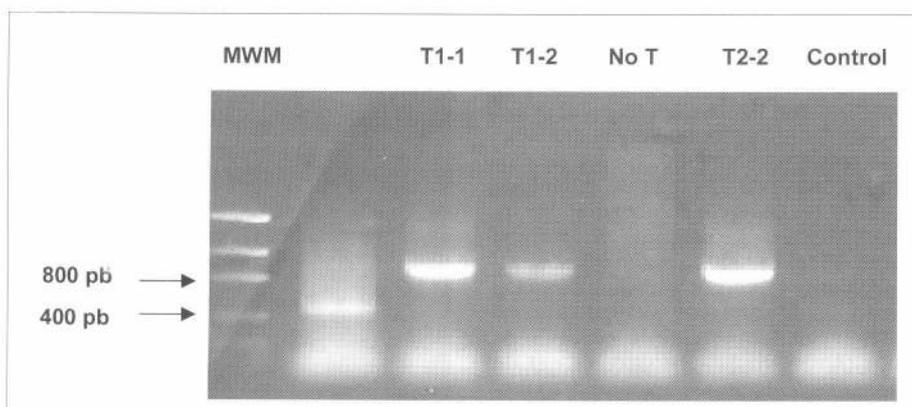


Figura 4. Separación en agarosa de los productos de PCR de los genes GFP en cepas de *B. bassiana* transformadas con pBarGPE1-GFP. Una banda de 742 pb indica la presencia del gen GFP. Línea MWM fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular (Low DNA Mass ladder) (Gibco). Línea T1-1, T1-2 y T2-2 contiene la amplificación de cepas transformadas. Línea NT fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea Control fue cargada con la solución maestra sin DNA.

se observan partes de micelio y esporas que no expresan la proteína; esto se puede deber a vejez del micelio, o a que los cultivos no son puros. Por esta razón, se ha iniciado un proceso de producción de cultivos monoespóricos a partir de estas cepas transformantes, con el propósito de producir cultivos puros que expresen la proteína de una manera uniforme. Estos cultivos están siendo sometidos a pruebas de control de calidad y patogenicidad sobre la broca del café.

Patogenicidad de las cepas que expresan la proteína verde fluorescente

Se realizaron pruebas de patogenicidad por duplicado en diferentes épocas del año, evaluando las diferencias estadísticas entre las cepas Bb9112 no transgénicas y dos cepas transformadas con la proteína GFP, cepas T1-1 y T2-2. Los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3. El análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%, y la prueba de Tukey, mostró que no existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café causado por *B. bassiana* Bb9112 y las cepas transformadas. Tampoco se observaron diferencias con respecto al tiempo de mortalidad ni el comportamiento de las cepas. Esto indica que la inserción de los genes se produjo en lugares en el genoma que no interfieren con genes involucrados en los procesos de patogenicidad del hongo. En el caso de estudios preliminares, Thorvilson y San Francisco (2001) muestran que las cepas transformadas con el gen GUS fueron menos efectivas en matar a los insectos en condiciones de laboratorio; los autores aseguran que esto se puede deber al sitio de inserción del gen GUS en el genoma del hongo, el cual puede interferir con algún gen involucrado en la patogenicidad. En el presente estudio, el proceso de transformación con los genes marcadores no afectó los procesos patogénicos de las cepas.

Las cepas obtenidas en este estudio, transformadas con GFP pueden usarse en laboratorio para estudios de la interacción entomopatogéno-hospedero, ya que sería fácil la detección del hongo dentro del tejido del insecto. Por otra parte, se demuestra que estos genes no interfieren con los procesos patogénicos del hongo. Al nivel de campo, estas cepas marcadas permitirían monitorear el desarrollo del hongo y la interacción con el hospedero. En las pruebas de campo, la identificación de estos genes permitirá la recuperación de cepas asperjadas, lo cual conllevará al entendimiento de los procesos de transmisión, infectividad y persistencia del hongo en el medio ambiente.

Cepas transformadas con la proteasa *pr1A*

Después de obtener transformantes expresando GFP, se realizó la transformación con el plásmido pBarGPE-*Pr1A*. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a

Tabla 1. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T1-1 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	8,33	5	6,22
Bb9112-T1-1	88 A*	1,6	8	6,02
Testigo	0 B*	18,0	3,3	0

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

Tabla 2. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T1-1 y T2-2 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	10	8	5,12
Bb9112-T1-1	88 A*	1,6	8	5,40
Bb9112-T2-2	88 A*	5	10	5,18
Testigo	6,66 B*	30	1,66	10

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

Tabla 3. Resultados de patogenicidad de *B. bassiana* Bb9112 y Cepa T2-2 sobre *H. hampei*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad por <i>B. bassiana</i>	Porcentaje de mortalidad por otras causas	Porcentaje de mortalidad por contaminación	Tiempo de mortalidad
Bb9112	80 A*	8,3	5	6,03
Bb9112-T2-2	76,7 A*	11,6	6,6	6,22
Testigo	0 B*	18,0	3,33	0

* Tratamientos identificados con la misma letra no difieren estadísticamente.

25 µg/ml de glufosinato de amonio. De 5 a 10 días luego de la transformación, diez colonias se aislaron de los medios selectivos y tres de estas colonias (*pr1A-1*, *pr1A-2* y *pr1A-3*) se seleccionaron para la identificación de la proteína *Pr1A*.

La actividad enzimática de las muestras se observa en la figura 5. Todas las cepas incluyendo el control (Bb9112 no transformado) produjeron una proteasa similar a la *Pr1A* de *M. anisopliae* durante el crecimiento en el medio con quitina, la cual induce la producción de *Pr1A*. Sin embargo, solamente las cepas transformadas produjeron proteasas cuando se cultivaron en el medio que contenía quitina más N-Acetil-glucosamida. En este medio, la N-Acetil-glucosamida reprime la síntesis de proteasa tipo *Pr1A* en cepas no modificadas. El resultado del experimento, implica que el *pr1A* se incorporó en el genoma de los transformantes y la proteína se sintetizó y secretó constitutivamente. Cuando se analizó por isoelectroenfoque y se identificó la actividad proteolítica, los medios de cultivo suplementados con 1% de quitina o 1% de la quitina más 1% de N-Acetil-glucosamina, donde habían crecido el hongo control y el transformado (*pr1A-2*), se encontró que la mayor cantidad de proteasas la produjo la cepa *Pr1A-2* creciendo en medio con quitina y N-Acetil glucosamina. Este resultado confirma la

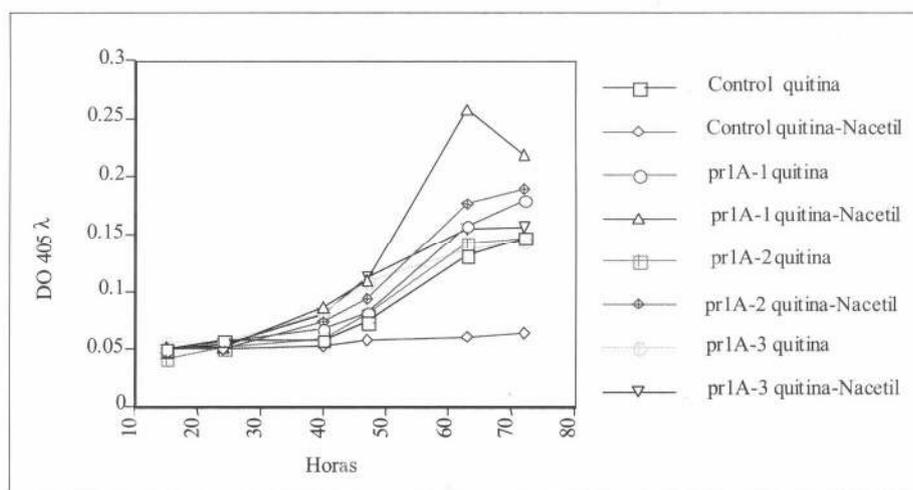


Figura 5. Actividad enzimática de *pr1A* a diferentes tiempos en la cepa Bb 9112 (control) y 3 cepas transformadas con pBarGPE1-*pr1A* en medio mínimo suplementado con quitina o quitina más N-acetil glucosamida.

transformación de la cepa y la producción constitutiva de la proteasa (Fig. 6).

La cepa *Pr1A-1* se subcultivó y luego de dos generaciones, el ADN genómico se aisló del micelio. Iniciadores específicos se usaron para la amplificación de los genes *bar* (no se muestra los datos) y *pr1A* (Fig. 7). Ambos genes se amplificaron en la cepa

transgénica pero no en el tipo silvestre 9112. La presencia del gen *pr1A* amplificado por PCR también se observa en las cepas *Pr1A-2* y *Pr1A-3* (Fig. 8). Se tienen 3 cepas transformadas con este gen.

La transformación de *B. bassiana* con los genes *bar-GFP* y *bar-pr1A* demuestra que se cuenta con un método de transforma-

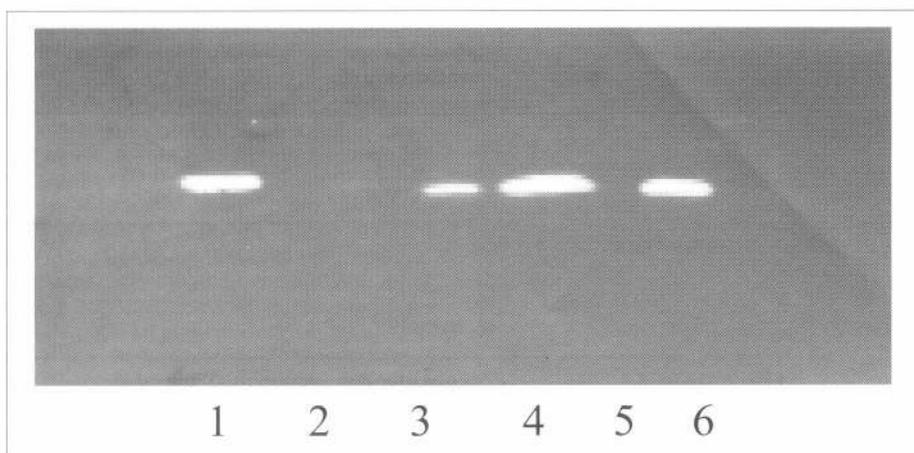


Figura 6. Actividad proteolítica del filtrado del cultivo de *B. bassiana* (Las proteasas presentes en el gel de isoelectroenfoque degradan la gelatina de la película, y se observa un halo transparente que indica actividad proteolítica específica de proteasa). Cepa Bb 9112 en medio básico suplementado con quitina (Línea 1 y 5) y medio básico suplementado con quitina más N-Acetil Glucosamida (Línea 2 y 6). Cepa *pr1A-2* transformada con pBarGPE1-*pr1A* en medio básico suplementado con quitina (Línea 3) y medio básico suplementado con quitina más N-Acetil Glucosamida (Línea 4).

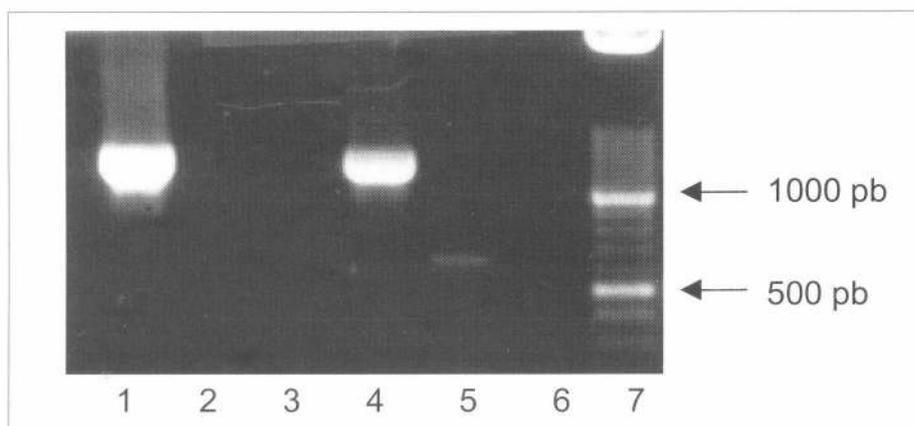


Figura 7. Separación en agarosa del gen *pr1A* amplificado por PCR. Una banda de 1189 pb indica la presencia del gen. Línea 1 contiene la reacción de PCR del plásmido pBarGPE1-*pr1A*. Línea 2 fue cargada con la reacción del plásmido pBarGPE-GFP. Línea 3 fue cargada con la reacción de la cepa no transformada 9112. Línea 4 contiene la reacción de la cepa *pr1A-1*. Línea 5 contiene la reacción de una cepa transformada con pBarGPE-GFP. Línea 6 contiene solución maestra sin DNA. Línea 7 contiene 500 ng de ADN marcador de peso molecular XIV (Boehringer).

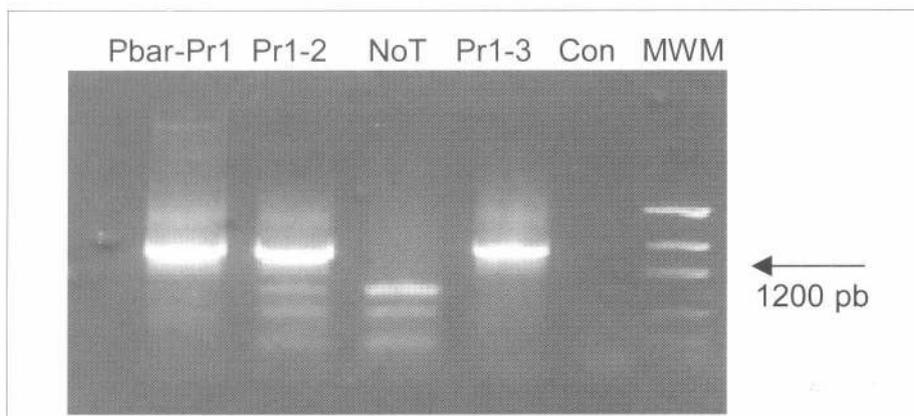


Figura 8. Separación en agarosa del gen *pr1A* amplificado por PCR. En cepas de *B. bassiana*. Una banda de 1189 pb indica la presencia del gen. Línea Pbar-Pr1 contiene la reacción del plásmido pBarGPE-GFP. Líneas pr1-2 y pr1-3 contiene la reacción de las cepas transformadas *pr1A-2* y *pr1A-3* respectivamente. Línea NoT fue cargada con la reacción de una cepa no transformada. Línea Con fue cargada con la solución maestra sin DNA. Línea MWM fue cargada con 500 ng de DNA marcador de peso molecular (Low DNA Mass ladder) (Gibco).

ción confiable y la selección con el gen *bar* es adecuada. Hasta el momento este es el primer trabajo que muestra el uso de estos genes para la transformación de *B. bassiana*.

Conclusiones

- Se logró llevar a cabo la modificación genética del hongo. Se cuenta con un método de transformación eficiente para *Beauveria bassiana*.

- El gen de selección (*bar*) y el gen marcadores GFP no afectan el grado de patogenicidad ni el comportamiento de las cepas de *B. bassiana* contra la broca del café.

- Estas cepas transgénicas se pueden usar para el seguimiento de los procesos de infección y patogenicidad sobre la broca del café en condiciones de laboratorio y campo. El siguiente paso es hacer el control de calidad de estas cepas y las pruebas de patogenicidad sobre la broca del café.

Agradecimientos

La autora agradece al Dr. Ray St. Leger por permitir el uso de los genes y a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y Colciencias por el apoyo financiero dado a este trabajo.

Literatura citada

- AVALOS, J.; GEEVER, R. F.; CASE, M. E. 1989. Bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Current Genetics* 16: 369-372.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 7-13.
- CANTONE, F. A.; VANDENBERG, J. D. 1999. Use of the green fluorescent protein for investigation of the *Paecilomyces fumosoroseus* in insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 193-197.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- DABOUSSI, M. J.; DJEBALLI, A.; GERLINGER, C.; BLAISEAU, P. L.; BOUVIER, I.; CASSAN, M.; LEBRUN, M. H.; PARISOT, D.; BRYGOO, Y. 1989. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 15:453-456.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogen fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- INGLIS, P. W.; ARAGÃO, F. J. L.; FRAZÃO, H. B.; MAGALHÃES, VALADARES-INGLIS, P. M. C. 2000. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glutofosinate ammonium. *FEMS Microbiology Letters* 191: 249-254.
- JÜRGEN, W.; LENGELER, K. B.; KOTHE, E. An instant preparation method for nucleic

- acids of filamentous fungi. <http://www.fgsc.net/fgn43/wendlan.html>. Fecha último acceso: Diciembre 1999.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B. A.; SHARON, A. 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research* 102: 491-496.
- PALL, M. L.; BRUNELLI, J. P. 1993. A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genetics Stock . Fungal Genetics News Letter* 40: 49-62. <http://www.fgsc.net/fgn/pall.html>. Fecha último acceso: Diciembre 1999.
- PFEIFER, T. A.; KHACHATOURIANS, G. G. 1992. *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 376-381.
- POSADA, F. J. 1998. Production, formulation and application of *Beauveria bassiana* for control of *Hypothenemus hampei* in Colombia. Ascot, University of London. Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biology, 227 p. (Tesis: Doctor of Philosophy).
- SPELLING, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular General of Genetics* 25: 503-509.
- ST. LEGER R. J. 1987. Characterisation of cuticle-degrading enzymes produced by the entomopathogens *Metarhizium anisoplae*. *Archives of Biochemistry and Biophysical* 253: 221-232.
- ST. LEGER, R. J.; JOSHY, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science* 93: 6349-6354.
- ST.LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends in Biotechnology* 15: 83-95.
- THORVILSON, H.; SAN FRANCISCO, M. 2001. *Beauveria bassiana* as a Biocontrol Agent Against the Red Imported Fire Ant. <http://fireant.tamu.edu/research/Progress Reports/October2001/Thorvilson1.pdf>. Fecha último acceso: Agosto 2001.
- VANDEN WYMELENBERG, A. J.; CULLEN, D.; SPEAR, R. N.; SCHOENIKE, B.; ANDREWS, J. H. 1997. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *Biotechniques* 23: 686-690.
- VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Boletín Técnico Cenicafé* 17: 4-13.

Recibido: Jun. 30/2002

Aceptado: Mar. 06/2003

Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con triflumuron

Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with triflumuron

CARMEN A. VÁSQUEZ P.¹, YAMILÉ SALDARRIAGA O.², FABIO PINEDA G.³

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 23-27 (2004)

Resumen. El uso combinado de insecticidas químicos y biológicos presenta una alternativa prometedora y racional para el control de insectos plaga de importancia agrícola y médica. Se evaluó la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, cepas Inra 297, Cenicafé Bb 9205, y UdeA₁₃, con el insecticida Starycide S.C. 480 Bayer[®] (triflumuron), inhibidor de la síntesis de quitina en insectos. Se probaron combinaciones de las tres concentraciones de cada cepa de *B. bassiana* (3×10^5 , 1×10^7 , 3×10^8 conidios/ml) y triflumuron (0,05; 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Como control se tomó la suspensión fúngica solamente. Para la evaluación de la compatibilidad de los dos agentes, se realizó una prueba de germinación conidial en medio de cultivo sólido (Sabouraud dextrosa agar) y la de crecimiento micelial en medio de cultivo líquido. La germinación conidial se observó a las 24 y 48 h y el crecimiento micelial a los siete días. En el análisis estadístico se utilizaron como variables el número de conidios germinados y no germinados y el peso del micelio seco. La presencia de triflumuron no inhibió ni la germinación conidial ni el crecimiento micelial de *B. bassiana*, demostrando la compatibilidad. Sin embargo, la germinación conidial y el crecimiento micelial en presencia de triflumuron varió en las tres cepas evaluadas.

Palabras clave: Control de insectos. Insecticida. Control integrado. Compatibilidad de hongos e insecticidas.

Summary. The combined use of chemical and biological insecticides presents a promising and rational alternative to control insect pests of agricultural and medical importance. The compatibilities of the Inra297, Cenicafé Bb9205 and UdeA₁₃ strains of the fungus *B. bassiana* with the insecticide Starycide S.C. 480 Bayer[®] (triflumuron), a chitin synthesis inhibitor in insects, were evaluated. Combinations of three concentrations of each strain of *B. bassiana* (3×10^5 , 1×10^7 and 3×10^8 conidios/ml) and triflumuron (0,05; 0,025 and 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were tested. The fungus suspension was used as a control. The compatibility of the two agents was evaluated based on conidial germination in a solid medium (Sabouraud dextrose agar) and mycelial growth in a liquid medium. Conidial germination was observed at 24 and 48 h and mycelial growth at 7 days. The germinated and non-germinated conidia and dry mycelium weight were the variables used in statistical analysis. The presence of triflumuron inhibited neither conidial germination nor mycelial growth of *B. bassiana*, demonstrating the compatibility. However, both conidial germination and mycelial growth in the presence of triflumuron varied among the three fungal strains that were evaluated.

Key words: Insect control. Insecticide. Integrated control. Compatibility of fungi and insecticides.

Introducción

El hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, es uno de los más promisorios en control biológico de ciertos grupos de insectos de importancia en la salud humana y en la economía agrícola. Uno de los aspectos importantes de su efectividad en el control de insectos plaga es la posibilidad de su integración con agentes químicos, maximizando su potencial y disminuyendo el impacto ambiental que el control químico como tal pueda ocasionar (Ramarajah *et al.* 1967; Rivera 1993).

Müller (1965) realizó estudios en el este de Europa donde probó el sinergismo en-

tre *B. bassiana* e insecticidas con resultados no muy claros. Fargues (1973) probó combinaciones de *B. bassiana* con DDT y no encontró una predisposición significativa de la larva del coleóptero de la papa de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) a la micosis por el hongo. Igualmente, Telenga *et al.* (1968) y Goral y Lappa (1974) usaron combinaciones del hongo e insecticidas en el control de dicho insecto. Fargues (1975) utilizó la combinación de insecticidas azinphos-ethyl y carbaryl y *B. bassiana* encontrando que la combinación no fue tan efectiva como utilizando el químico solo. Estudios realizados por Ramarajah *et al.* (1967), Cadatal y Gabriel (1970), Olmert y Kenneth (1974), Gardner *et al.*

(1979), Clark *et al.* (1982), Anderson y Roberts (1983) y Aguda *et al.* (1984) han indicado que los insecticidas pueden inhibir el crecimiento de *B. bassiana*. Anderson *et al.* (1989) probó *B. bassiana* en combinación con carbaryl, fenvalerate, anamectin, triflumuron y thuringiensen encontrando compatibilidad de estos químicos con el hongo. Por otra parte, Rivera *et al.* (1994) probaron el efecto de los insecticidas endosulfan, clorpirifos, fenitrotion, diazinon PM, diazinon EM, malation, isazofos y pirimifosmetil sobre el hongo entomopatógeno *B. bassiana* en el manejo de la broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), demostrando el efecto fungistático de los insecticidas sobre el aislamiento, el cual aumenta con el tiempo.

- 1 Bióloga, aspirante a Maestría. Investigador Asociado al Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: avasquez@matematicas.udea.edu.co
- 2 Autor para correspondencia: Licenciada en Biología y Química. M. Sc. Profesora de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín, Colombia. Fax: 2330120. E-mail: ysaldar@matematicas.udea.edu.co
- 3 Licenciado en Biología y Química. M. Sc. Profesor de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: fpgutier@matematicas.udea.edu.co

Ibarra y Varela (2002) evaluaron la compatibilidad de varios aislados de hongos biocontroladores entre ellos *Beauveria bassiana* con plaguicidas de uso común en la práctica agrícola como carbofurán y malatión como insecticidas, benomil (Benlate) y bis, ditiocarbamato de zinc (Manzate) como fungicidas; encontrando en general que los aislados presentaron una inhibición mayor con los insecticidas (en ambas concentraciones) que con los fungicidas. Con respecto a los plaguicidas, benomil inhibió considerablemente a todos los aislados. Los insecticidas redujeron ligeramente todos los aislados.

El triflumuron, (benzoylphenylurea) es un inhibidor de la síntesis de quitina e insecticida altamente selectivo, que interfiere en la formación de la quitina al no dejar incorporar el N-acetil-D-1-glucosamina en la ruta metabólica. Es una sustancia química de toxicidad baja para organismos acuáticos, aves y mamíferos, además, es un producto exclusivamente larvívoro (Colwell y Schaeffer 1981; Howard y Wall 1995; Ortiz 1995).

El objetivo de este trabajo fue evaluar en laboratorio la germinación, desarrollo y crecimiento de *B. bassiana* en presencia de triflumuron, un inhibidor de la síntesis de quitina de insectos. De esta forma, se planteó como hipótesis observar efectivamente la compatibilidad entre los dos productos, y obtener una germinación, crecimiento y desarrollo del hongo entomopatógeno normal o mejor que si el hongo estuviera sólo.

Materiales y Métodos

Hongo entomopatógeno

Las cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* utilizadas en este estudio fueron: INRA 297, donada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de Francia, la cual se aisló de un heteróptero en Polonia; la cepa UdeA₁₃ aislada de *Rhodnius pallescens* Barber (Hemiptera: Reduviidae) capturado en la región de San Onofre (Sucre), Colombia y la cepa Bb9205 donada por Cenicafé, aislada de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). Estas cepas se mantuvieron en Agar Sabouraud dextrosa (Oxoid Ltd, Basinstoke, Hampshire) a 25°C durante 10 días para producir los conidios. Los conidios se cosecharon utilizando una barra de vidrio y una solución acuosa estéril de 0,5% de Tween 80 como diluyente para dispersar y mantener su uniformidad. Todas las suspensiones se diluyeron en agua destilada estéril, se homogenizaron en un vortex Heidolph Reax control a 2.500 rpm (Germany 09441/707-124) y se contaron en la cámara de Neubauer. Se seleccionaron concentraciones de 3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml con base en estudios previos realizados por Romaña (1992) y Arroyave (1995), quienes mostraron la capacidad infectiva alta y el efecto letal en breve tiempo de dichas concentraciones sobre los insectos triatóminos.

Insecticida

El insecticida utilizado fue Starycide[®] S.C. 480 Bayer (triflumuron): 2 cloro-N-[[[4-(trifluorometoxy)phenyl] aminoCarbonyl] benzamide (C.A), conocido comunmente como SIR 8514, sintetizado en Alemania por el departamento de investigación química de la Bayer en 1975. En Medellín el producto fue obtenido de la comercializadora IVANAGRO. Comercialmente triflumuron se presenta como una suspensión concentrada: 480 g/l. A partir de esta concentración inicial se prepararon concentraciones de 0,05; 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, las cuales se eligieron para el ensayo con base en los estudios previos realizados por Vásquez *et al.* (2002). Bayer recomienda para el control de insectos o larvas de insectos utilizar de Starycide[®] o triflumuron 100 ml en 100 litros de agua, con el cual se pueden fumigar alrededor de 20 casas (Pflanzenschutz 1980).

Bioensayos

Germinación de los conidios en medio de cultivo sólido. En un elermeyer de 250 ml se prepararon 150 ml de Saboraud dextrosa agar (SDA), se esterilizaron en el autoclave durante 15 min y se le adicionó ácido láctico al 0,1% para evitar contaminación bacteriana. Se tomaron portaobjetos estériles a los cuales se les adicionó 0,2 ml de SDA acidificado formando sobre éstos una película fina y delgada. Sobre estas placas a una distancia de 0,5 cm se depositaron dos alícuotas de 0,1 ml de cada una de las concentraciones 3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml de *B. bassiana* con cada una de las dosis (0,05; 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de triflumuron. Los portaobjetos se dejaron en cajas de Petri estériles con papel de filtro Wattman no.1 estéril y húmedo y se incubaron durante

24 h y 48 h a 27°C. El control consistió en una suspensión de conidios de *B. bassiana*, en agua destilada estéril y 0,5% de Tween 80. En cada ensayo se utilizaron 216 portaobjetos para las cuatro repeticiones por tratamiento.

Porcentaje de germinación. Las mezclas de *B. bassiana* y triflumuron se tiñeron con azul de lactofenol a las 24 y 48 h de incubación. En la evaluación, un conidio se consideró germinado cuando el tubo germinativo superó el diámetro del conidio. El porcentaje de conidios germinados se determinó mediante la siguiente fórmula: por cada lectura en un campo del microscopio de luz con el objetivo de 40X, (contando tres campos macroscópicos por alícuota) se contó el total de conidios germinados y no germinados para determinar luego el porcentaje de germinación (% germinación = total de conidios germinados / total de conidios germinados y no germinados X 100) (Rivera 1993).

Crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo líquido completo. Para cada concentración del insecticida a probar se prepararon 100 ml de medio de cultivo líquido completo compuesto por glucosa 20 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; KCL 0,5 g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 1 ml (1% solución); Oxoid agar 15 g y ácido láctico al 0,1%.

Se utilizó la técnica de Storey y Gardner (1986) y Clark *et al.* (1982) modificada, la cual consistió en distribuir el medio líquido completo en 4 frascos, cada uno con 15 ml del medio. Se inocularon con 0,1 ml de las concentraciones 3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml de cada una de las cepas INRA 297, Bb9205 y UdeA₁₃ y con cada una de las dosis de triflumuron (0,05;

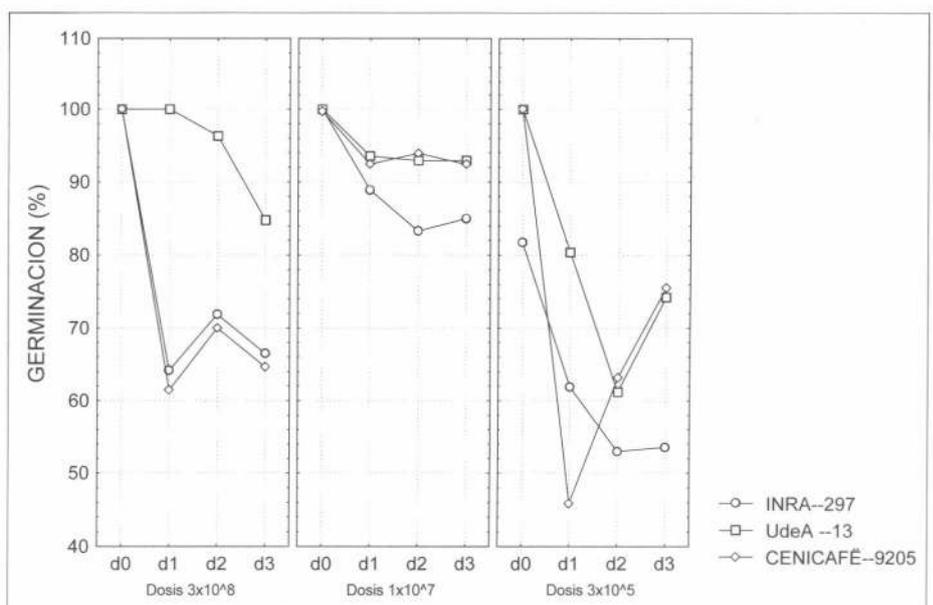


Figura 1. Porcentaje de germinación de *B. bassiana* con triflumuron a las 24 h. Interacción dosis de triflumuron, concentración y cepas de *B. bassiana*. d0. Controles, d1. 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, d2. 0,0250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, d3. 0,050 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (dosis triflumuron). Concentraciones *B. bassiana*: a. 3×10^8 , b. 1×10^7 , y c. 3×10^5 conidios/ml.

0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento en las tres concentraciones. A los controles sólo se les adicionó el hongo en las tres concentraciones. Los frascos se agitaron a 1.500 rpm en (ORS200 Boekel Grant) durante siete días a 25-26°C. Después de la agitación, el contenido de cada frasco se filtró al vacío obteniendo el micelio completo mediante una barra de vidrio y se lavó consecutivamente con agua destilada estéril, filtrándolo con una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm . Lo obtenido se secó en un horno (Memmert GmbH Co. KG8540 Germany) durante una h a 50°C y luego se pesó el micelio utilizando una balanza analítica Chyo JK-180, obteniendo finalmente un peso promedio, (a partir de las cuatro repeticiones realizadas) que se utilizó para el análisis de los resultados.

Análisis estadístico

La compatibilidad del insecticida triflumuron con *B. bassiana* se midió mediante el porcentaje de germinación de conidios a las 24 y 48 h. Los porcentajes se compararon utilizando análisis de varianza multifactorial, considerando como factores de evaluación la cepa del hongo, la concentración de conidios y la dosis del insecticida. La compatibilidad también se analizó mediante el crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo líquido, obteniendo como respuesta el peso seco en gramos de la unidad experimental. Estos datos se compararon, igualmente, mediante análisis de varianza multifactorial. Las comparaciones múltiples de los valores promedios se establecieron con el método de Neuman-Keuls. Se consideró $\alpha = 95\%$ como nivel de significación de las pruebas estadísticas y se utilizó el programa STATISTICA 98 (Statsoft Inc., Tulsa, U.S.A.) para el procesamiento de la información.

Resultados

Respuesta de germinación conidial de *Beauveria bassiana* en presencia de triflumuron a las 24 y 48 h en medio de cultivo sólido

El porcentaje de germinación de conidios fue diferente para los tres factores en estudio. El análisis de varianza mostró interacciones significativas para dichos factores ($p < .001$) a las 24 h. Según la figura 1, la cepa UdeA₁₃ fue la que presentó mayor porcentaje de germinación en las concentraciones 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml y un poco menor para 3×10^5 conidios/ml (95,5, 94,8 y 78,9 respectivamente). En cambio, la cepa INRA-297 fue la segunda en porcentaje de germinación para las concentraciones 3×10^8 y 3×10^5 conidios/ml y la de menor porcentaje para la concentración 1×10^7 conidios/ml. Por otra parte, todas las dosis del triflumuron (0,05; 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) presentaron porcentajes de germinación inferiores a los del control que estuvieron cerca del 100%. La concentración de 3×10^5 conidios/ml en presencia de triflumuron en cualquiera de las dosis evaluadas fue la

Tabla 1. Promedio del porcentaje de germinación (DE: desviación estándar) de las diferentes cepas de *Beauveria bassiana* en presencia de triflumuron a las 24 h

Dosis de triflumuron ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Concentración <i>B. bassiana</i> (Conidios/ml)	Cepas de <i>B. bassiana</i> Porcentaje germinación (DE)			n
		UdeA ₁₃	INRA 297	Bb 9205 Cenicafé	
Control	3×10^5	100 (0,0)	81,70 (27,25)	100 (0,0)	24
	1×10^7	100 (0,0)	100 (0,0)	99,70 (0,80)	24
	3×10^8	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	24
0,0125	3×10^5	80,37 (12,56)	61,87 (26,34)	45,84 (37,63)	32
	1×10^7	93,56 (8,96)	88,90 (20,67)	92,43 (6,63)	32
	3×10^8	100 (0,0)	64,15 (16,64)	61,43 (20,52)	32
0,0250	3×10^5	61,18 (13,09)	53,00 (28,22)	63,15 (32,44)	32
	1×10^7	92,93 (9,66)	83,31 (19,75)	93,93 (6,06)	32
	3×10^8	96,34 (7,7)	71,87 (22,52)	69,96 (16,04)	32
0,050	3×10^5	74,21 (21,03)	53,56 (34,59)	75,53 (29,46)	32
	1×10^7	92,90 (8,16)	85,00 (17,97)	92,40 (10,65)	32
	3×10^8	84,78 (21,40)	66,50 (15,36)	64,62 (18,61)	32

Tabla 2. Crecimiento micelial en medio de cultivo líquido de las cepas de *B. bassiana* independiente de la concentración con las dosis de triflumuron evaluadas

Cepas <i>B. bassiana</i> Conidios/ml	Dosis triflumuron ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Peso promedio en g (DE)	n
Bb 9205 Cenicafé	Control	0,114 (0,044)	9
	0,0125	0,119 (0,034)	15
	0,0250	0,119 (0,035)	15
	0,050	0,096 (0,063)	15
INRA-297	Control	0,447 (0,075)	9
	0,0125	0,254 (0,103)	15
	0,0250	0,303 (0,048)	15
	0,050	0,289 (0,013)	15
UdeA ₁₃	Control	0,488 (0,039)	9
	0,0125	0,438 (0,122)	15
	0,0250	0,466 (0,018)	15
	0,050	0,472 (0,145)	15

DE = Desviación estándar.

que presentó la menor germinación (Tabla 1).

A las 48 h las concentraciones de *B. bassiana* 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml habían germinado el 100% para todas las cepas del hongo y dosis de triflumuron. En la menor concentración de *B. bassiana* (3×10^5 conidios/ml) la germinación fue del 100% para las cepas INRA-297 y UdeA₁₃ y del 95,5% para la cepa Cenicafé 9205.

Crecimiento micelial de *Beauveria bassiana* en medio de cultivo líquido después de siete días de sembrado el inóculo

El análisis de varianza mostró significancia para la interacción dosis de triflumuron y cepas de *B. bassiana* ($p = 0,0009$). Esta

interacción posiblemente se puede explicar debido a que la cepa INRA 297 tuvo un peso promedio para el control de 0,447 g significativamente mayor que para las otras dosis de triflumuron evaluadas (Tabla 2). La prueba de comparaciones múltiples permite concluir diferencias en los pesos promedios de las cepas en el orden Cenicafé Bb9205, INRA-297 y UdeA₁₃ con pesos promedios de 0,11; 0,32 y 0,47 g respectivamente. No hubo diferencias significativas entre concentraciones del hongo ($p = 0,74$).

Discusión

Los investigadores Fargues (1973, 1975) y Anderson *et al.* (1989) probaron el hongo entomopatógeno *B. bassiana* con dife-

rentes insecticidas observándose compatibilidad entre el hongo *B. bassiana* y el insecticida triflumuron, resultados que concuerdan con los descritos en este trabajo, con una confiabilidad del 95%.

Triflumuron es recomendado por Bayer para ser utilizado en domicilios para el control de insectos bajo la dosificación de 0,48 µg/µl, concentración que viene dada para 100 litros de diluyente. Las dosis de triflumuron evaluadas en este estudio fueron bajas (10 veces por debajo de las recomendadas comercialmente) y presentaron compatibilidad con las diferentes cepas de *B. bassiana*, y aunque se encontraron diferencias significativas en las respuestas entre las diferentes concentraciones y cepas del hongo con las dosis de triflumuron, no hubo inhibición parcial o total en la germinación ni en el crecimiento de *B. bassiana*.

Los resultados de no inhibición mostraron que la germinación, crecimiento y desarrollo del hongo *B. bassiana* es directamente proporcional a la dosis de triflumuron utilizada en este trabajo. En la medida que se aumentó la dosis del químico la sensibilidad del hongo aumentó y por lo tanto, su germinación, crecimiento y desarrollo fueron más lentos.

Las diferencias significativas que se observaron fueron más a nivel de las concentraciones de *B. bassiana* y del comportamiento de las diferentes cepas evaluadas, en donde se encontró que la cepa UdeA₁₃ fue la menos sensible a la acción del triflumuron, especialmente a la concentración más alta probada 3x10⁹ conidios/ml.

Anderson *et al.* (1989) evaluó la compatibilidad de triflumuron con *B. bassiana* donde utilizó como parámetro de evaluación las unidades formadoras de colonia. En el presente trabajo los parámetros de evaluación fueron diferentes, (como ya se mencionó en metodología), los resultados fueron similares a los de Anderson en cuanto a compatibilidad de los dos productos.

El triflumuron posee unas características químicas particulares como insecticida de nueva generación (inhibidor de la síntesis de quitina en insectos), entre ellas presenta una toxicidad más baja que la de otros químicos como los organoclorados y carbamatos; posiblemente este hecho y la utilización de dosis bajas respecto a las ofrecidas comercialmente para el control de insectos domiciliarios (larvas especialmente) permitió que *B. bassiana* fuera compatible con él en todas las concentraciones evaluadas.

Una de las orientaciones de la lucha integrada de insectos consiste en aplicar simultáneamente gérmenes entomopatógenos con un plaguicida. Este método combina los procedimientos químicos tradicionales y los procedimientos biológicos, técnica ampliamente experimentada en Rusia, utilizando dosis variables de insecticidas que alteran el estado fisiológico

del insecto y establecen consecuentemente una intoxicación que predispone a la infección por el agente entomopatógeno (Telenga *et al.* 1968; Ferron 1970) siempre y cuando exista la compatibilidad de ambos.

Los resultados obtenidos en este trabajo en medio de cultivo líquido mostraron un buen crecimiento micelial independiente de la concentración aplicada del hongo entomopatógeno, contrariamente a Clark *et al.* (1982) quienes probaron algunos plaguicidas como mancozeb, metiram, CGA48988 y chlorothalonil los cuales generaron inhibición, total, fuerte y parcial sobre *B. bassiana*, respectivamente. Sin embargo, en este mismo estudio, permethrin no inhibió el crecimiento de *B. bassiana* y sus curvas de crecimiento presentaron similitud con los controles. Ramarajah *et al.* (1967) al evaluar *B. bassiana* con DDT, folidol, malation, endrin y BHC, mostró una estimulación a la germinación; resultados similares a los obtenidos con triflumuron en este trabajo, en donde *B. bassiana* presentó una mayor esporulación al compararla con los controles.

Rivera (1993) evaluó la compatibilidad de *B. bassiana* con fungicidas (ciproconazol, hexaconazol, triadimefon, oxiclóruo de cobre), insecticidas (endosulfan, fenitrotion, pirimifos-metil, dicrotofos), en sus dosis comerciales, dosis media y 1/10 de la dosis comercial, encontrando que los fungicidas ejercieron una inhibición mayor sobre el crecimiento del hongo que los insecticidas. Los insecticidas a concentraciones menores de la dosis comercial presentaron un efecto menor sobre *B. bassiana*, resultados similares a los obtenidos en la evaluación con triflumuron.

De las tres cepas evaluadas, Cenifafé Bb9205, INRA-297 y UdeA₁₃, la última mostró ser la más compatible con el triflumuron en todas las concentraciones probadas. Como se muestra en la tabla 1, las concentraciones alta y media de *B. bassiana* en cualquiera de las cepas estudiadas, dieron una germinación alta.

Al comparar lo obtenido en la prueba de germinación conidial en medio de cultivo sólido y líquido se encontró similitud en cuanto al comportamiento de la cepa UdeA₁₃, sin embargo, en el medio de cultivo líquido la cepa UdeA₁₃ en presencia de la dosis de triflumuron más alta (0,05 µg/µl) presentó mayor crecimiento micelial confirmando así la alta compatibilidad y resistencia de esta cepa al insecticida.

Después de evaluar la germinación del hongo *B. bassiana* a las 24 y 48 h bajo la acción del triflumuron se observó que éste tiene un efecto fungistático más que fungicida, pues presentó germinación conidial y crecimiento micelial hasta las 48 h.

La humedad y la temperatura jugaron un papel primordial en la germinación y esporulación del hongo, debido a que los

hongos entomopatógenos y en general los hongos requieren de temperaturas que oscilan entre 25-30°C y humedades relativas del 80% (Tanada y Kaya 1993). Posiblemente pruebas en campo variarían los resultados no sólo por la fluctuación de las condiciones ambientales, sino por otros factores tales como la formulación del hongo, y la técnica de aplicación utilizada. Estudios en campo seguramente aportarán resultados variables e interesantes que ayudarán a tener mayor información sobre la germinación, crecimiento y desarrollo del hongo en presencia de un químico como triflumuron.

Conclusiones

- Las cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* presentaron compatibilidad con triflumuron (insecticida regulador de crecimiento de insectos) a dosis bajas. Lo cual podría considerarse como un elemento más, en la alternativa que ofrece el control integrado en el manejo de vectores transmisores de enfermedades.

- En los tratamientos de *B. bassiana* las cepas UdeA₁₃ e Inra-297 con triflumuron mostraron una germinación alta y por consiguiente resistencia al insecticida.

- De las tres cepas evaluadas, UdeA₁₃ fue menos sensible al efecto de triflumuron sobre su germinación, crecimiento y desarrollo.

- En la evaluación de la compatibilidad de triflumuron con *B. bassiana*, en medio de cultivo líquido, no se encontraron diferencias importantes con respecto a la germinación conidial en medio de cultivo sólido; sin embargo, fue más práctica la prueba en medio de cultivo sólido que en medio de cultivo líquido.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los profesores Jaime Calle, Abel Díaz del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por el aporte de material biológico, y el análisis estadístico de los resultados respectivamente. A los biólogos del Grupo de Investigación en Micología y Control biológico del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia que contribuyeron en la ejecución del proyecto. Al CODI de la Universidad de Antioquia, a la Corporación de Patologías Tropicales, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Instituto de Biología, por la financiación y el apoyo en la ejecución de esta investigación.

Literatura citada

- AGUDA, R. M.; SAXENA, R. C.; LITSINGER, J. A.; ROBERTS, D. W. 1984. Inhibitory effects on insecticides on entomogenous fungi *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* IRR. News 9 (6): 16-17.
- ANDERSON, T. E.; ROBERTS, D. W. 1985. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera:

- Chrysomelidae), control. *Journal of Economical Entomology* 76:1437-1441.
- ANDERSON, T. E.; HAJEK, A. E.; ROBERTS, D. W.; PREISLER, H. K.; ROBERTSON, J. L. 1989. Colorado Potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects of Combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economical Entomology* 82 (1): 83-89.
- ARROYAVE, E. 1995. Susceptibilidad de algunas especies de Triatomíneos al hongo entomopatogénico *Beauveria bassiana*. Trabajo de grado. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. Medellín. p 40.
- PFLANZENSCHUTZ N. 1980. *Bayer* 33 (51).
- CADATAL, T. D.; GABRIEL, B. P. 1970. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. *Philippines Entomology* 1: 379-395.
- CLARK, R. A.; CASAGRANDE, R. A.; WALLACE, D. B. 1982. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11: 67-70.
- COLWELL, A. E.; SCHAEFER, C. H. 1981. Effects of the insect growth regulator BAY 8514 on pest Diptera and non-target aquatic organisms. *Canadian Entomology* 113: 185-191.
- FARGUES, J. 1973. Sensibilité des larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae) a *Beauveria bassiana* Vuill. (Fungi Imperfecti, Moniliales) en présence de doses réduites d'insecticide. *Annales de Zoología. Ecología Animal* 5: 231-246.
- FARGUES, J. 1975. Etude expérimentale dans la nature de l'utilisation combinée de *Beauveria bassiana* et d'insecticides a dose réduite contre *Leptinotarsa decemlineata*. *Annales de Zoología. Ecología Animal* 7: 247-264.
- FERRON, P. 1970. Augmentation de la sensibilité des larves de *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabacidae) a *Beauveria tenella* (Delaer). Siemaszko au moyen de quantités réduites de HCH. *Proc. IV th Coll. Insect Pathology, College Park*. p. 66-79.
- GARDNER, W. A.; SUTTON, R. M.; NOBLET, R. 1979. Evaluation of the effects of six selected pesticides on the growth of *Nomuraea rileyi* and *Beauveria bassiana* in broth cultures. *Journal Ga Entomological Society* 14: 106-113.
- GORAL, V. M.; LAPP, N. V. 1974. The effect of beaverine and some insecticides on Colorado potato beetle populations. *Zakhyst Rosl. Resp. Mizhvid. Temat. Nauk. Zb.* 20: 51-60.
- HOWARD, J.; WALL, R. 1995. The Effects of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on the *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Bulletin of Entomological Research* 85 (1): 71-77.
- IBARRA, A. M.; VARELA, A. 2002. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones Colombianas. *Revista Colombiana de Entomología* 28 (2): 129-137.
- MÜLLER, K. E. 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schadlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Paul Parey, Berlin.
- OLMERT, I.; KENNETH, R. G. 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3: 33-38.
- ORTIZ, C. 1995. Review of Chemical Methods for Arthropod Control. *Bayer A.G.* p. 20.
- RAMARAJAH, URS.; N. V.; GOVINDU, H. C.; SHIVASHANKARA, K. S. SHASTRY. 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 398-403.
- RIVERA, M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19 (4): 151-158.
- RIVERA, M. A.; BUSTILLO, P. A.; MARIN, M. P. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 20 (4): 209-214.
- ROMAÑA, C. 1992. Recherches sur les potentialités des Hyphomycetes entomopathogenes (Fungi Imperfecti) dans la lutte microbiologique contre les Triatominae (*Heteroptera*). These de l'université de Montpellier I. 134 p.
- STOREY, G. K.; GADNER, W. A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. *Applied Environmental Microbiology* 52: 1-3.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Avonovich. Printed Unites States of America. p. 359-361.
- TELENGA, N. A.; SIKOURA, A. I.; SMETNIK, A. I. 1968. Emploi du produit biologique Beauverine combiné a des insecticides dans la lutte contre le dory phore (en russe). *Zascht. Rast* 4: 3-23.
- VÁSQUEZ, P. C.; SALDARRIAGA, Y.; GÓMEZ V., W. A.; PINEDA, F. 2002. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) a la acción de triflumuron. *Revista Colombiana de Entomología* 28 (1): 13-16.

Recibido: Dic. 15/2002

Aceptado: Sep. 10/2003

Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero*

Pathogenicity of different fungal entomopathogens for the control of *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) under greenhouse conditions

IRINA ALEÁN C.¹, ANUAR MORALES R.², CLAUDIA MARÍA HOLGUÍN A.³, ANTHONY C. BELLOTTI⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 29-36 (2004)

Resumen. En Colombia existe un complejo de ocho especies de moscas blancas asociadas al cultivo de yuca. La especie predominante es *Aleurotrachelus socialis* Bondar la cual constituye el 92% de la población total y ocasiona pérdidas en rendimiento hasta del 79% en campos experimentales. Con el propósito de ofrecerle a los cultivadores de yuca una opción diferente al control químico con el cual se reduzcan los costos y el impacto ambiental, se evaluó la patogenicidad de varios aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, sobre los diferentes estados ninfales y huevos de *A. socialis*, para determinar el estado de desarrollo más susceptible, seleccionar el aislamiento más promisorio y con éste la concentración letal media (CL₅₀). Así mismo, se evaluaron diferentes formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos sobre el estado de desarrollo más susceptible de *A. socialis*. Con respecto a la mortalidad se encontraron diferencias significativas entre las especies de hongos utilizadas y el testigo. Se seleccionó el aislamiento CIAT 215 de *V. lecanii* como el más promisorio por presentar la mortalidad más alta sobre los estados de desarrollo de *A. socialis* (67,3%). Como estado más susceptible se determinó el de huevo próximo a eclosionar. Sobre este estadio se evaluó el aislamiento CIAT 215 en siete concentraciones y se determinó que la CL₅₀ fue de 1,4x10⁷ conidios/ml con límites de confianza de 3,6x10⁵-1,5x10⁹ conidios/ml. Los productos formulados evaluados presentaron porcentajes de mortalidad inferiores al 50%; sin embargo, mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo.

Palabras clave: Mosca blanca de la yuca. *Verticillium lecanii*. Concentración letal media (CL₅₀). Hongos formulados. Control biológico.

Summary. A complex of eight whitefly species associated with cassava exists in Colombia. The predominant species *Aleurotrachelus socialis* Bondar, which constitutes 92% of the total population and causes yield losses of up to 79% in field experiments. In order to offer cassava growers an alternative to chemical control to reduce costs and environmental degradation we assessed the pathogenicity of various strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith on different nymphal stages and eggs of *A. socialis* in order to determine the most susceptible developmental stage, select the most promising isolate and identify the lethal concentration (CL₅₀). We also evaluated different commercial formulations of entomopathogenic fungi on the most susceptible developmental stage of *A. socialis*. We observed differences in mortality between the fungal species used and the control treatment. The *V. lecanii* strain CIAT 215 was selected as the most promising because it presented the highest mortality to *A. socialis* developmental stages (67,3%). The most susceptible stage were eggs close to hatching. We tested the strain CIAT 215 in seven concentrations on this stage and determined that the CL₅₀ was 1,4x10⁷ conidia/ml with a confidence interval of 3.6x10⁵-1.510⁹ conidia/ml. The evaluated commercial formulations caused mortality of less than 50%, however, they were still statistically different than the control treatment.

Key words: Cassava whitefly. *Verticillium lecanii*. Median lethal concentration. Formulated fungi. Biological control.

Introducción

Las moscas blancas son la mayor plaga del cultivo de yuca en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, pues además de alimentarse vorazmente de la savia de la planta, son eficientes vectores de virus (Bellotti *et al.* 2002).

Existe un gran complejo en el Neotrópico, donde quince especies de moscas blancas han sido identificadas alimentándose en yuca: *Aleurodicus dispersus* Russell, *Aleuronodus* sp., *Aleurothrixus aepim* (Goeldi), *Aleurotrachelus socialis* Bondar, *Bemisia argentinifolia* (*Bemisia tabaci* biotipo B), *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Bemisia*

tuberculata Bondar, *Paraleyrodes* sp., *Tetraleurodes* sp., *Trialeurodes variabilis* (Quaintance), *Trialeurodes abutiloneus*, (Bellotti 2002), *Aleuroglandulus malangae* Russell, *Tetraleurodes ursorum* (Cockerell) (Castillo 1996), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (CIAT 2000) y *Bemisia afer* Priesner & Hosny (CIAT 2001).

1* Apartes del Trabajo de Grado del primer autor. Estudiante de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. E-mail: irinaalean@hotmail.com

2 Asistente de Investigación. Bioecología del Salivazo. Entomología de Forrajes, CIAT. Cali-Valle. E-mail: an.morales@cgjar.org

3 Asistente de Investigación. MIPE. Entomología de Yuca, CIAT. Cali-Valle. E-mail: claudia_holguin@hotmail.com

4 Autor para correspondencia: Líder del proyecto MIPE y Entomología de Yuca, CIAT. A. A. 6713, Cali, Colombia. E-mail: a.bellotti@cgjar.org

En el norte de Sur América (Colombia, Venezuela y Ecuador) *A. socialis* es la especie predominante causante de considerables daños al cultivo; también se encuentra en Brasil aunque en menor proporción donde no produce daño económico (Farias 1994).

La importancia económica de los daños causados por las moscas blancas radica en que afectan el rendimiento de raíces de yuca y la disponibilidad de estacas para la siembra. Las pérdidas en rendimiento muestran que existe una correlación negativa entre la duración del ataque y la producción de raíces. Ensayos en campo realizados por CIAT - CORPOICA Nataima, Tolima, registraron en Colombia pérdidas en rendimiento hasta del 79% (Bellotti y Vargas 1986). Dichas pérdidas son producidas directamente por la disminución de la savia circulante por el floema de la planta e indirectamente por la mielecilla excretada por el insecto, la cual sirve como medio de crecimiento al hongo saprófito *Capnodium* sp., conocido comúnmente como fumagina (Byrne et al. 1990; Byrne y Bellows 1991). Este hongo puede tener un efecto adverso en la fotosíntesis, al impedir la llegada de la luz a la superficie foliar (Bellotti y Vargas 1986).

El control químico de las moscas blancas es generalmente muy difícil por su morfología y características autoecológicas (sustancias cerosas como un componente de la cutícula, la colonización en el envés de la hoja y el desarrollo rápido de altas poblaciones). Además, las moscas blancas representan un grupo de insectos con la habilidad de desarrollar poblaciones que son altamente resistentes a plaguicidas químicos (Landa 1992). Los agricultores reaccionan frente al ataque del insecto con el uso indiscriminado de insecticidas, generando una serie de efectos negativos para el equilibrio ambiental y la salud de hombres y animales.

El control microbiológico se presenta como una buena alternativa dentro del manejo integrado del cultivo. De los microorganismos que causan enfermedades a los insectos, incluyendo bacterias, hongos, virus y nemátodos, sólo los hongos entomopatógenos han sido registrados como los capaces de infectar a los insectos pertenecientes a la familia Aleyrodidae, a través de la penetración de su cutícula (Fransen 1990).

En Colombia y otros países se han realizado estudios con hongos entomopatógenos sobre varias especies de moscas blancas, donde se demuestra el potencial de los hongos para controlar este insecto plaga. La mayoría de los estudios publicados han evaluado sobre ninfas de los primeros estadios de mosca blanca los hongos entomopatógenos *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces* spp. y *Verticillium lecanii*; solamente Osborne et al. (1990) utilizaron ninfas de IV instar. García (1996) evaluó varias cepas nativas de *V. lecanii* sobre ninfas de

II instar de *Trialeurodes vaporariorum* y obtuvo con la cepa codificada como C26 una mortalidad del 90%. En ensayos específicos sobre *A. socialis*, Sánchez y Bellotti (1997) evaluaron diferentes especies de hongos entomopatógenos sobre ninfas de IV instar de *A. socialis* y establecieron una cepa de la especie *B. bassiana* como la más virulenta, con una mortalidad del 95%; posteriormente se evaluó esta cepa sobre ninfas de I, II y III instar de *A. socialis* y se determinó el segundo instar como el más susceptible por presentar la mortalidad más alta (55%).

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos en el control de la mosca blanca de la yuca *A. socialis*. Los objetivos específicos fueron (1) Evaluar la patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *B. bassiana*, *V. lecanii* y *P. fumosoroseus* sobre huevos y ninfas de *A. socialis* bajo condiciones de invernadero, (2) Establecer el estado de desarrollo de *A. socialis* más susceptible a los hongos entomopatógenos, (3) Determinar la concentración letal cincuenta y noventa (CL_{50} y CL_{90}) del aislamiento más virulento sobre *A. socialis*, (4) Realizar el control de calidad de diferentes formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos existentes en el mercado nacional y (5) Evaluar la patogenicidad de estas formulaciones comerciales utilizadas para controlar otras especies de moscas blancas sobre *A. socialis*.

Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el laboratorio y cuarto de cría de Bioecología y MIP del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), localizado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca, a 1.000 msnm.

El material vegetal utilizado para evaluar los aislamientos de hongos entomopatógenos sobre huevos y ninfas de *A. socialis* correspondió a plantas de yuca de 30-40 días de siembra de la variedad CMC 40, sembradas en potes plásticos con suelo estéril

de 1 kg, los cuales se mantuvieron en casa de malla a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 50-60%.

Los adultos de *A. socialis* utilizados en los diferentes ensayos fueron tomados de la colonia establecida en CIAT desde 1992, sobre plantas de yuca de la variedad CMC 40, mantenidas en invernadero a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 60-70%.

Reactivación de los hongos entomopatógenos

Entre 1996 y 1999 se realizaron varias exploraciones de campo en diferentes zonas yuqueras del país con el fin de coleccionar hongos entomopatógenos asociados a las moscas blancas presentes en el cultivo. De los aislamientos colectados se escogieron 6, los cuales se encontraban almacenados en el cepario del CIAT en la técnica de papel filtro seco a una temperatura de -20°C (Tabla 1). Estos hongos se sembraron en medio PDA y posteriormente se reactivaron sobre adultos de *A. socialis*. Para la reactivación, de la colonia se tomaron 20 adultos con un aspirador bucal y se introdujeron en cajas de Petri de 60 x 15 mm. Las cajas contenían papel filtro húmedo con agua destilada estéril. Sobre estos adultos se inocularon los hongos entomopatógenos aplicando sobre cada individuo veinte microlitros de una suspensión concentrada de conidios. Este procedimiento se realizó con cada uno de los aislamientos nativos. Los insectos se dejaron en estas condiciones por un período de cinco días, después de este período, los adultos con presencia de micelio se sembraron en medio de cultivo PDA.

Una vez purificados los hongos se les realizó un pase sobre "agar insecto" al 0,5%; para la preparación de este agar se coleccionaron adultos de *A. socialis* de la colonia establecida en CIAT y de campo. Se maceraron y se adicionaron a agar PDA esterilizado previamente a razón de 0,5 g del macerado por cada 100 ml de agar. Se llevó nuevamente a la autoclave a una presión de 100 libras durante 10 minutos, se vertió

Tabla 1. Aislamientos de hongos entomopatógenos colectados de moscas blancas

Aislamiento	Origen	Fecha de colección	Hospedero	Identificación*
CIAT 210	Pradera-Valle	26-Jul-99	<i>T. vaporariorum</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
CIAT 211	Pradera-Valle	14-May-99	<i>T. vaporariorum</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
CIAT 212	Pradera-Valle	10-Jun-99	<i>T. vaporariorum</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
CIAT 215	CIAT	04-Dic-97	<i>A. socialis</i>	<i>Verticillium lecanii</i>
CIAT 216	CIAT	27-Abr-97	<i>A. socialis</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
CIAT 217	CIAT	16-Nov-96	<i>A. socialis</i>	<i>Beauveria bassiana</i>

* Identificación realizada por Richard A. Humber de Plant Protection Research Unit US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, USDA, Ithaca, NY USA.

el agar en cajas de Petri de 60 x 15 mm y sobre éste se sembraron los seis aislamientos. Posteriormente se les realizó otro pase sobre "agar insecto" con macerado de huevos y ninfas de *A. socialis* (Fig. 1) siguiendo el mismo procedimiento anterior.

Determinación del estado de desarrollo más susceptible y selección del aislamiento más promisorio

Para infestar las plantas de yuca, se aspiraron de 20-30 adultos de *A. socialis* y se introdujeron en jaulas pinza ubicadas en las hojas de la planta. Al cabo de 24 h se retiraron los adultos. Este procedimiento se realizó 4, 7, 14 y 23 días después con el fin de obtener todos los estados de desarrollo del insecto en el momento de la aplicación.

La aplicación de los hongos sobre las ninfas y huevos de *A. socialis* se realizó con un microaspersor, a una presión de salida de 10 PSI. El cubrimiento se evaluó sobre una tira de papel hidrosensible. El volumen asperjado por tratamiento fue de $4,0 \pm 0,5$ ml de suspensión. Después de la aplicación las plantas se llevaron a un cuarto de cría a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 80-90%.

La evaluación se realizó con un microscopio estereoscópico a emergencia de adultos. Se contabilizaron exuvias, ninfas vivas y ninfas muertas con y sin evidencias de micosis. Las ninfas muertas sin evidencia de micosis se ubicaron en cajas de Petri con papel filtro húmedo por 4-5 días para determinar la presencia o no del hongo.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento. Como unidad experimental se consideró cada hoja de la planta sobre la cual se colocó una jaula pinza y en la que sólo se dejaron 30 ninfas o huevos de *A. socialis*. Los controles consistieron en agua destilada estéril y agua destilada estéril más Tween 80 al 0,05%. Esta misma metodología se empleó para determinar la concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90}) y evaluar las formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos.

Se seleccionó como el aislamiento más promisorio aquel que produjo los niveles más altos de infección sobre todos los estados de desarrollo del insecto y como estado más susceptible el que presentó el porcentaje de mortalidad más alto frente a los demás estados evaluados.

Concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90})

Después de tener el estado de desarrollo más susceptible a los hongos entomopatógenos, se evaluó sobre éste el aislamiento más promisorio en las concentraciones 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , $5,0 \times 10^6$, 1×10^7 , $5,0 \times 10^7$ conidios/ml, además del testigo. Los datos obtenidos en las evaluaciones se sometieron a un análisis Probit para calcular la CL_{50} y CL_{90} .

Evaluación de productos comerciales

Se evaluaron seis formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos en la dosis recomendada por cada casa comercial sobre el estado de desarrollo de *A. socialis* más susceptible a los aislamientos nativos (Tabla 2). Así mismo, se les realizó

Tabla 2. Formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos evaluadas

Formulado	Ingrediente activo	Presentación
<i>P.f</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Polvo mojable (producción en arroz)
<i>V.l</i> (a)	<i>Verticillium lecanii</i>	Polvo mojable (microtalco estéril)
<i>B.b</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Polvo mojable (microtalco estéril)
<i>V.l</i> (b)	<i>Verticillium lecanii</i>	Polvo mojable (microtalco estéril)
<i>V.l</i> (c)	<i>Verticillium lecanii</i>	Microglobulizado
<i>V.l</i> (d)	<i>Verticillium lecanii</i>	Polvo mojable (microtalco estéril)

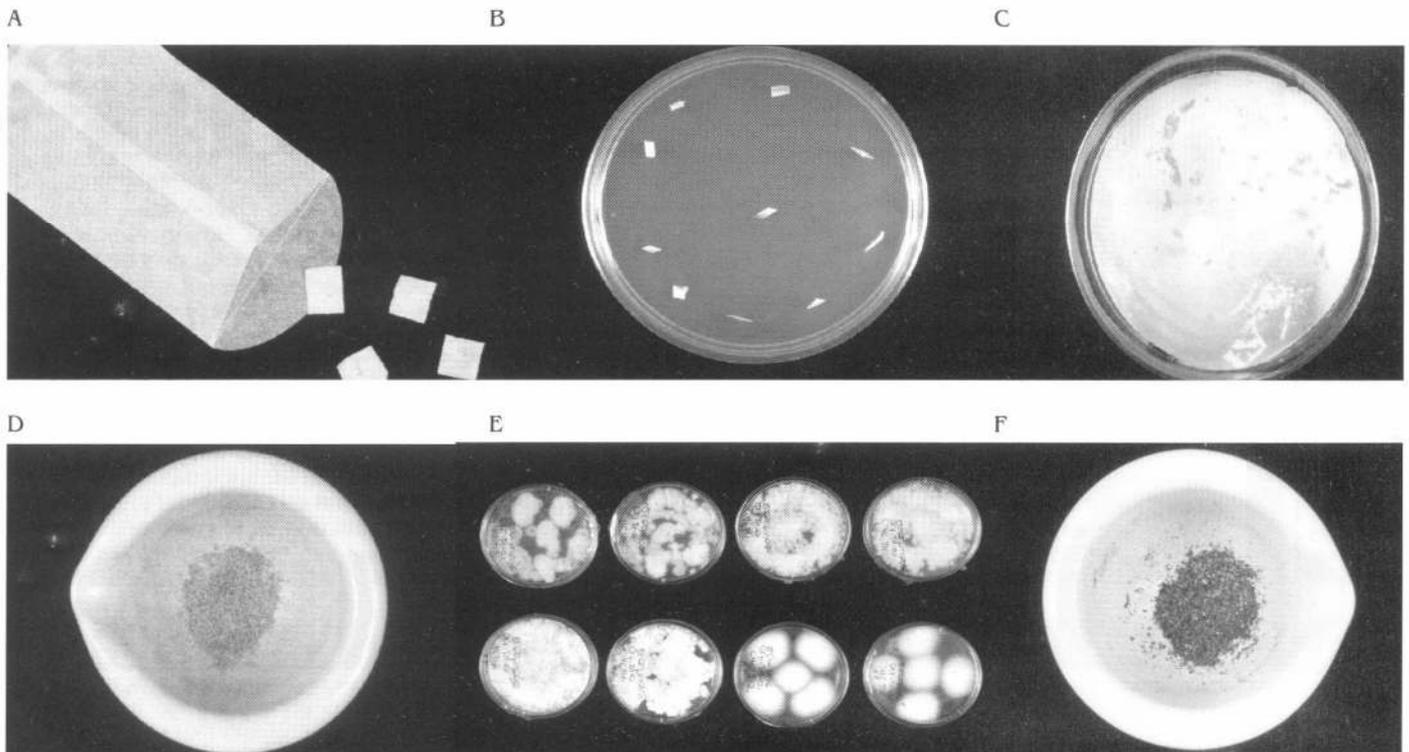


Figura 1. Metodología de reactivación de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos. (A) Conservación en papel filtro seco. (B) Siembra en PDA. (C) Inoculación sobre adultos de *A. socialis*. (D) Adultos de *A. socialis* recolectados para "agar insecto". (E) Huevos y ninfas de *A. socialis* recolectados. (F) Aislamientos reactivados. (Fotografía: Juan Carlos Quintana).

un control de calidad según la metodología establecida por Cenicafé (Vélez *et al.* 1997). Se determinaron los valores para conteo de conidios, viabilidad de éstos a las 24 h, pureza, pH y humectabilidad de los productos formulados. Además se evaluó la patogenicidad de estas formulaciones en la dosis recomendada por cada casa comercial sobre el estado de desarrollo más susceptible.

Resultados y Discusión

Estado de desarrollo más susceptible y aislamiento más promisorio

De los seis aislamientos nativos evaluados sobre los diferentes estados de desarrollo de *A. socialis*, el aislamiento CIAT 215 de *V. lecanii* presentó los porcentajes de mortalidad más altos, superiores al 50%, so-

bre todos los estados de vida del insecto y una mortalidad de 67,3% en promedio (Fig. 2). Este fue seguido por el CIAT 212 de *P. fumosoroseus* y CIAT 217 de *B. bassiana* con 48,5 y 47,2% de mortalidad, respectivamente. Los testigos presentaron una mortalidad promedio del 16%, inferior a todas las cepas evaluadas (Fig. 2). Estos resultados no coinciden con los señalados por Sánchez y Bellotti (1997) quie-

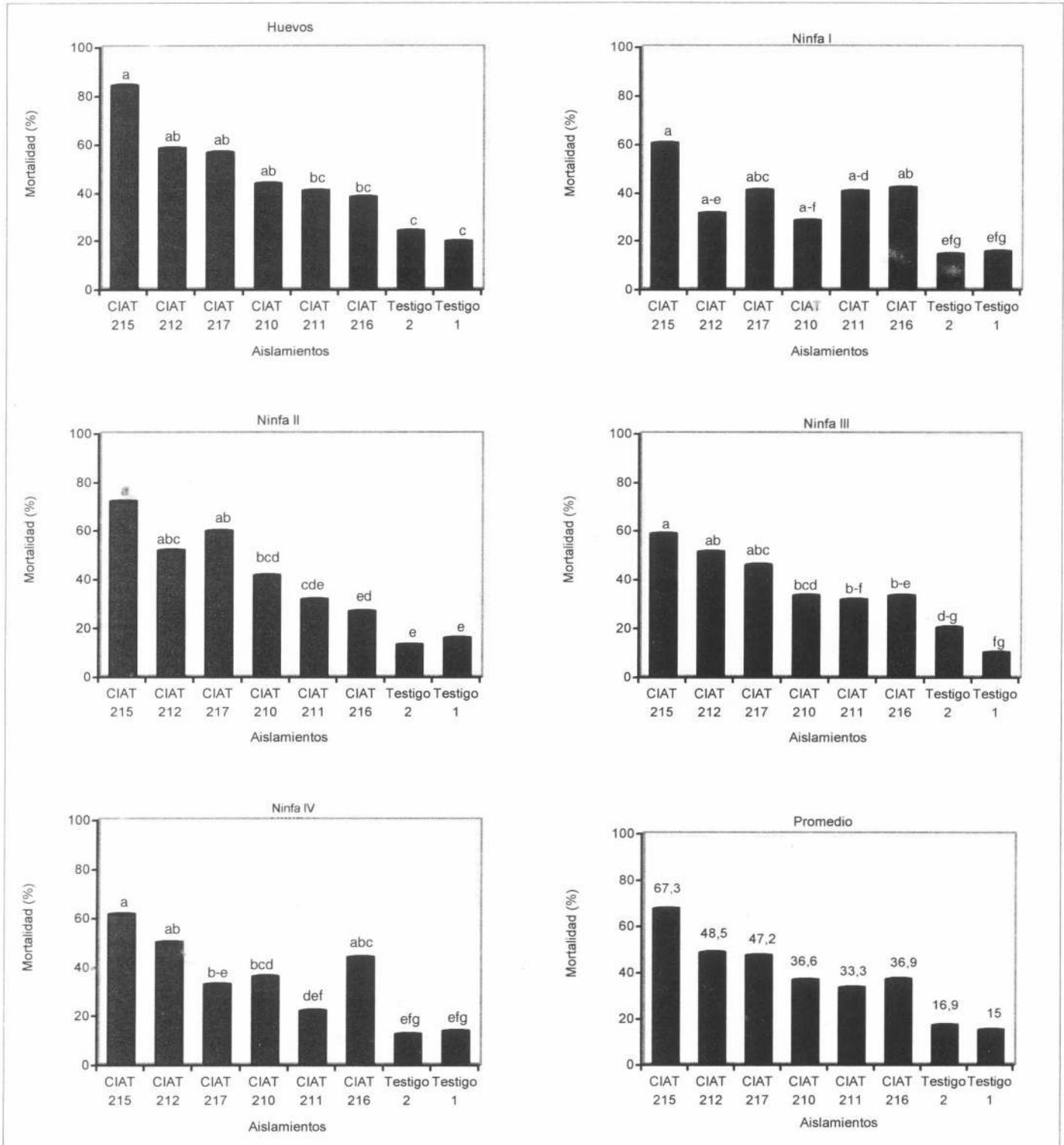


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre los diferentes estados de desarrollo de *A. socialis*. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 5% (Prueba de Tukey).

nes evaluaron diferentes cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Fusarium* sp. y *V. lecanii* sobre ninfas de cuarto ínstar de *A. socialis* y determinaron una cepa de *B. bassiana* como la cepa más virulenta.

De los cinco estados de desarrollo de *A. socialis* evaluados, el aislamiento CIAT 215 de *V. lecanii* presentó los porcentajes de mortalidad más altos sobre huevos próximos a eclosionar 84,1% y ninfas de II ínstar 72,0% ($F = 129,56$, $Pr > 0,0001$). Aunque no se presentaron diferencias significativas entre estos dos estados de desarrollo, se seleccionó el de huevos próximos a eclosionar como el más susceptible dado que éstos porcentualmente presentan una mayor mortalidad y no han iniciado el daño a la planta. Los demás estadios exhibieron mortalidades de 61,5% para ninfas de IV ínstar, 60,4% ninfas de I ínstar y 58,5% ninfas de III ínstar (Fig. 3). Debido a las características morfológicas de esta mosca blanca que secreta una sustancia cerosa de color blanco, que podría confundirse con el micelio del hongo, se realizó la evaluación a emergencia de adultos, contabilizando las pupas que presentaban aberturas. Se puede afirmar que la aplicación sobre huevos próximos a eclosionar ocasionó una mayor mortalidad; sin embargo, en las evaluaciones hechas al estereoscopio se observaron todos los estados de desarrollo de *A. socialis* afectados por el hongo (Fig. 4). No obstante, Sánchez y Bellotti (1997) determinaron el segundo ínstar de *A. socialis* como el estado de desarrollo más susceptible a la cepa Bb 9501 de *B. bassiana*. De otra parte, Fransén (1990) mostró que *V. lecanii* infectaba tanto a ninfas como adultos pero no a huevos de *T. vaporariorum*. Así mismo, informó que las ninfas de segundo ínstar fueron las más susceptibles. Sin embargo, Morales y Cardona (1996) determinaron a los primeros estados de desarrollo de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* como los más susceptibles a diferentes especies de hongos entomopatógenos, siendo los huevos próximos a eclosionar el estado ideal para hacer la aplicación por su tasa de mortalidad alta, determinada por la emergencia baja de adultos.

Concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90})

Para el aislamiento CIAT 215 (*V. lecanii*), a mayor concentración del inóculo se presentó mayor mortalidad de huevos próximos a eclosionar de *A. socialis* (Fig. 5). El análisis Probit mostró que la CL_{50} del aislamiento CIAT 215 se alcanzó con una concentración de $1,4 \times 10^7$ conidios/ml con límites de confianza de $3,6 \times 10^5 - 1,5 \times 10^9$ conidios/ml. La CL_{90} se estimó que sería una concentración de $2,3 \times 10^{12}$ conidios/ml con límites de confianza de $9,5 \times 10^9 - 4,1 \times 10^{21}$ (Tabla 3). Estos resultados plantean la necesidad de utilizar concentraciones muy altas de hongos en campo para obtener niveles óptimos de control.

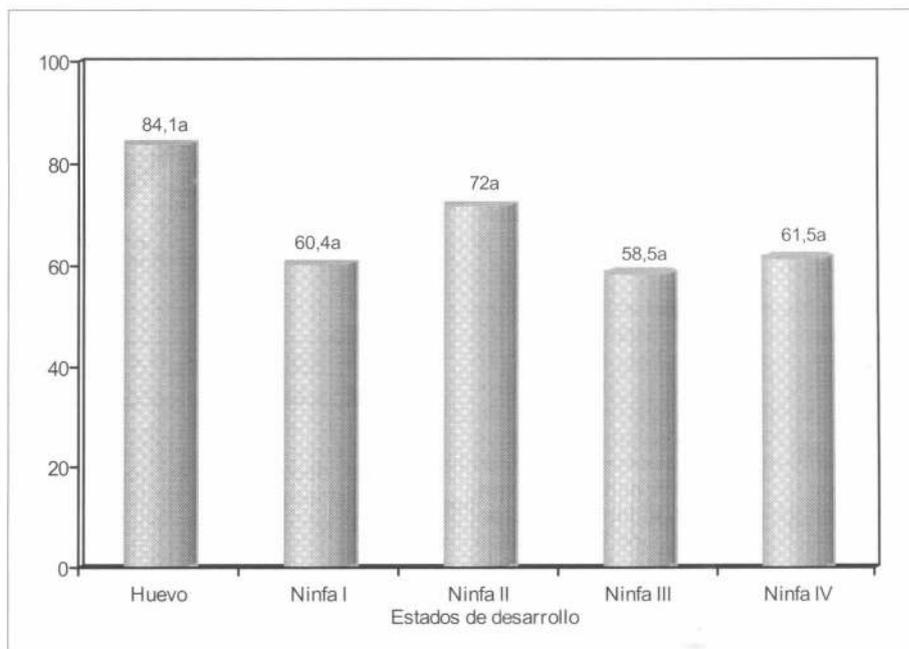


Figura 3. Porcentaje de mortalidad del aislamiento CIAT 215 *Verticillium lecanii* sobre huevos y ninfas de *Aleurotrachelus socialis*. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 5% (Prueba de Tukey).

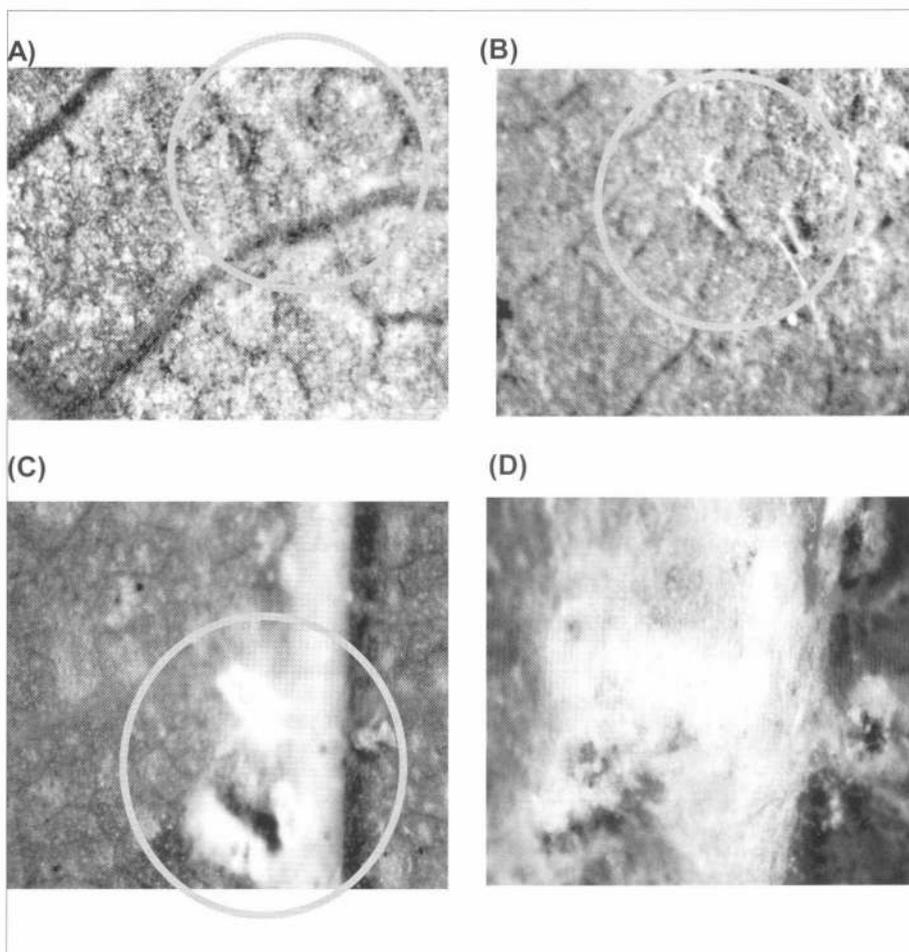


Figura 4. Presencia de micelio de *Verticillium lecanii* sobre los estados de desarrollo de *A. socialis*. (A) Huevos; (B) Ninfas de I ínstar; (C) Ninfas de II ínstar; (D) Ninfas de III y IV ínstar (Fotografía: José María Guerrero).

Control de calidad y evaluación de productos comerciales

En el recuento de propágulos de los productos formulados, hubo una concentración menor a la cantidad de conidios registrada en la etiqueta (Tabla 4). En el mejor de los casos el contenido de conidios por gramo de formulado fue el equivalente al 40% de las conidios que especifica la formulación.

En la prueba de viabilidad a 24 h, después de siembra en placas de agar agua, se observó que sólo el formulado *P. f.* presentó una viabilidad del 95%; en los otros productos la viabilidad fue inferior al 50% (Tabla 4). Una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 h, ya que al asperjar en el campo el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales (Vélez et al. 1997).

En la prueba de pureza los formulados de *V. lecanii* (*V.l.b* y *V.l.c*) no presentaron el crecimiento de las colonias del ingrediente activo (Tabla 4); por el contrario mostraron contaminación por los hongos *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. Sólo tres formulaciones presentaron una pureza mayor al 95% (*P.f.*, 98%, *V.l.a* y *B.b.* 100%).

El intervalo óptimo de pH para una formulación comercial según Vélez et al. (1997) es de 5,5 y 7,0. De las formulaciones evaluadas sólo los productos *V.l.a* y *V.l.d*, se encuentran en este rango con un pH de 5,54 y 5,59, respectivamente. Los dos productos con mayor contaminación y menor viabilidad (*V.l.b* y *V.l.c*) presentaron un pH de 4,80 y 4,87. Estos productos son de la misma casa comercial en diferentes presentaciones. Es posible que el inerte empleado estuviese contaminado y esto afecte la germinación de las esporas del hongo considerado como ingrediente activo.

Los formulados que mostraron mejor humectabilidad son *V.l.b Pf.* y *V.l.a* con 1,3, 2,0 y 4,0 minutos, respectivamente, los

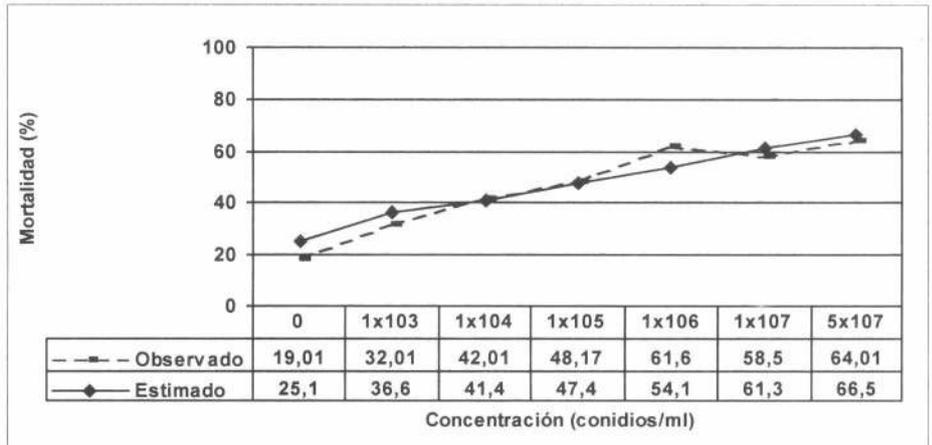


Figura 5. Mortalidad de huevos próximos a eclosionar de *A. socialis* a diferentes concentraciones del aislamiento CIAT 215 (*Verticillium lecanii*).

Tabla 3. Determinación de la concentración letal media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀) del aislamiento CIAT 215 (*Verticillium lecanii*)

N	CL ₅₀ (LC)*	CL ₉₀ (LC)	b ± EEM	χ ²	P > χ ²
2146	1,4x10 ⁷ (3,6x10 ⁵ - 1,5x10 ⁹)	2,3x10 ¹² (9,3x10 ⁹ - 4,1x10 ²¹)	0,24 ± 0,05	12,6	0,01

* Límites de confianza al 95%

formulados de *V.l.d* y *B.b.* no presentaron humectación o es muy lenta; al momento de la aplicación éstos podrían formar grumos y ocasionar taponamiento de las boquillas (Tabla 4).

Después de realizar el control de calidad se evaluaron las diferentes formulaciones comerciales sobre huevos próximos a eclosionar de *A. socialis*. Se encontró que los productos formulados que se evaluaron produjeron porcentajes de mortalidad inferiores al 50%; sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo al 95% de confiabilidad (Fig. 6). Esto indica que los productos evaluados no son adecuados para controlar *A. socialis*. Es probable que

se deba a que dichos productos son recomendados para controlar otras especies de mosca blanca que son menos quitinizadas y no presentan cerosidad alrededor de su cuerpo como es el caso de *A. socialis*.

Se evidencia que la calidad de las formulaciones de hongos entomopatógenos evaluadas no es óptima. Queda la duda si la característica de la formulación es la que afecta la acción entomopatógena del hongo empleado como principio activo y por esto los productos no ejercen un buen control sobre el insecto. Por otra parte, se aprecia el problema de generalizar el control de varias especies de mosca blanca con un sólo aislamiento de hongo entomopatógeno. Es necesario entonces tener en

Tabla 4. Control de calidad de los hongos entomopatógenos formulados evaluados en el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis*

Producto	Conteo de conidios/ml		Viabilidad 24 h (%)	Pureza (%)	pH	Humectabilidad (min)
	Lectura	Según casa comercial				
<i>P.f.</i>	6,6x10 ⁸	2x10 ¹⁰	95	98	5,35	2
<i>V.l. (a)</i>	8,1x10 ⁶	2x10 ⁷	35	100	5,54	4
<i>B.b.</i>	1,9x10 ⁸	2x10 ⁹	40	100	5,14	50
<i>V.l. (b)</i>	1,3x10 ⁸	2x10 ¹⁰	22	0	4,80	1,3
<i>V.l. (c)</i>	9,0x10 ⁷	2x10 ¹⁰	13	0	4,87	*
<i>V.l. (d)</i>	2,0x10 ⁷	2x10 ⁹	40	40	5,59	Ninguna

* La presentación de este producto es un microglobulizado por tal motivo no se le realizó la prueba de humectabilidad

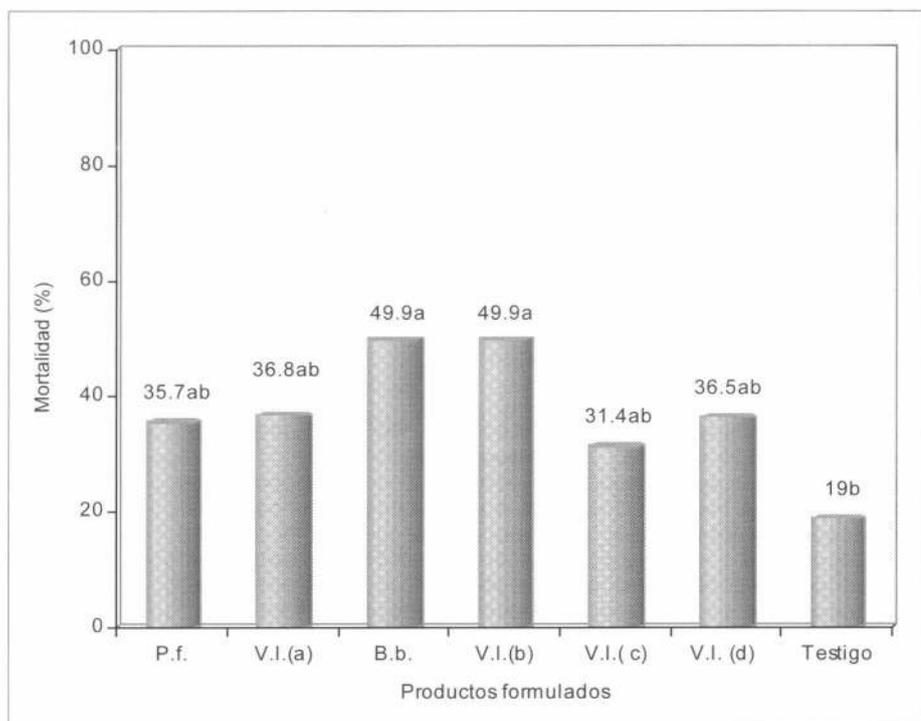


Figura 6. Mortalidad de huevos próximos a eclosionar de *A. socialis* con formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 5% (Prueba de Tukey).

cuenta las especies del complejo que son consideradas plaga en determinados cultivos, para así mismo seleccionar los aislamientos más virulentos y en cada caso dar una recomendación.

Conclusiones

- El aislamiento CIAT 215 de *Verticillium lecanii* fue seleccionado como el aislamiento más promisorio para el control de *A. socialis* por presentar los niveles mayores de infección sobre los diferentes estados de desarrollo del insecto bajo condiciones de invernadero.
- El estado de desarrollo de *A. socialis* más susceptible a los hongos entomopatógenos es el de huevo próximo a eclosionar, esto favorecería el manejo del insecto pues se reflejaría en un menor consumo de la savia elaborada y la disminución de pérdidas en rendimiento.
- El aislamiento CIAT 215 de *V. lecanii* alcanza su CL_{50} a una concentración de $1,4 \times 10^7$ conidios/ml y su CL_{90} a una concentración de $2,3 \times 10^{12}$ conidios/ml.
- Los parámetros de control de calidad evaluados indican que las formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos existentes en el mercado nacional no cumplen con los requerimientos mínimos exigidos por el ICA.
- Los hongos entomopatógenos formulados para otras especies de mosca blanca evaluados sobre huevos próximos a eclosionar de *A. socialis* no presentaron un buen control del insecto plaga ya que

ningún producto produjo una mortalidad superior al 50%.

Recomendaciones

- Evaluar sobre *A. socialis* otras especies de hongos entomopatógenos promisorias como *Aschersonia aleyrodinis* que ha sido señalada parasitando diferentes homópteros entre ellos varias especies de mosca blanca.
- Continuar con las evaluaciones de control de calidad y patogenicidad de otros productos formulados sobre *A. socialis* con el fin de determinar la dosis adecuada para esta especie de mosca blanca.
- Seleccionar el mejor producto comercial formulado a nivel de invernadero para luego ser aplicado en campo.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Dr. R. Humber (USDA) por la identificación de los aislamientos nativos. A Rosalba Tobón, Adriano Muñoz, Oscar Yela y Josefina Martínez por su gran colaboración en el desarrollo de esta investigación. A Jaumer Ricaurte y James Silva por la asesoría estadística. Al Dr. Daniel Peck y María Elena Cuéllar por la revisión del manuscrito.

Literatura citada

BELLOTTI, A. C. 2002. Arthropod Pests (p. 209-235). En: Hillocks, R.; Thresh, J.; Bellotti, A. Cassava Biology, production and utilization. CABI Publishing, London. United Kingdom. 332 p.

BELLOTTI, A.; VARGAS, O. 1986. Mosca blanca del cultivo de yuca: biología y control; unidad audiotutorial. CIAT. Cali Colombia 40 p.

BELLOTTI, A.; ARIAS, B.; VARGAS, O.; REYES, J.; GUERRERO, J. 2002. Insectos y Acaros dañinos a la yuca y su control (p. 160-203). En: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (eds.). La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CLAYUCA. Cali. Colombia. 586 p.

BYRNE, D.; BELLOWS, T. 1991. Whitefly biology. Annual Review of Entomology (United States). 36: 431-457.

BYRNE, D.; BELLOWS, T.; PARRELLA, M. 1990. Whiteflies in agricultural systems (p. 227-262). En: GERLING, D. (ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept Ltd. Hants. United Kingdom. 348 p.

CASTILLO, J. 1996. Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) y sus enemigos naturales sobre cultivos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Colombia. Tesis de Maestría. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. 174 p.

CIAT 2000. Annual Report, PROJECT-PE 1. Integrated pest and disease management in major agroecosystems. CIAT. Cali Colombia 190 p.

CIAT 2001. Annual Report, PROJECT-PE 1. Integrated pest and disease management in major agroecosystems. CIAT. Cali Colombia 211 p.

FARIAS, A. 1994. Flutuação populacional de *Aleurothrixus aepim* em mandioca, em Sao Miguel das Matas, Bahia. Revista Brasileira de Mandioca (Brasil) 13 (2): 119-122.

FRANSEN, J. 1990. Natural enemies of whiteflies: Fungi. (p. 187-205). En: GERLING, D. (ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept Ltd. Hants. United Kingdom. 348 p.

GARCÍA, J. 1996. Evaluación de cepas nativas de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Trabajo de Grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bogotá. 121 p.

LANDA, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist 75 (1): 456-471.

MORALES, A.; CARDONA, C. 1996. Evaluación de diferentes hongos entomopatógenos sobre las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. Informe final Convenio CIAT - AgrEvo S.A. CIAT. Palmira. Colombia. 37 p.

OSBORNE, L.; STOREY, G.; MCCOY, C.; WALTER, J. 1990. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (5, 1990, Adelaide, Australia). Proceedings and Abstracts, p. 386.

SÁNCHEZ, D.; BELLOTTI, A. 1997. Evaluación de la patogenicidad de hongos Hyphomycetes sobre la mosca blanca de la yuca

Aleurotrachelus socialis. Informe final Convenio Cooperativo CIAT-COLCIENCIAS. CIAT Palmira. Colombia. 21 p.

VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. 1997. Téc-

nicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía.

CENICAFE. Chinchiná, Caldas (Colombia). 37 p.

Recibido: Abr. 22/2003

Aceptado: Ago. 28/2003

Efecto de la aplicación de insecticidas químicos en el control de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) en el cultivo de yuca *Manihot esculenta* Crantz

Effect of chemical insecticide application for control of the whitefly *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) in cassava *Manihot esculenta* Crantz

CLAUDIA MARÍA HOLGUÍN A.¹, ANTHONY C. BELLOTTI²

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 37-42 (2004)

Resumen. En los últimos años la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar es la plaga más importante en el cultivo de yuca en Colombia. Con el fin de buscar diferentes alternativas de control dentro de un manejo integrado, se realizaron 3 experimentos en condiciones de campo en Jamundí (Valle del Cauca) en bloques completos al azar con la variedad de yuca Reina. En el primero se evaluó la aplicación foliar de diferentes insecticidas. Los tratamientos correspondieron a imidacloprid 1, buprofezin, carbosulfan, tiametoxan, diafentiuron, piriproxifen e imidacloprid 2. En los otros dos experimentos se buscó retrasar la aparición de la plaga evaluando diferentes dosis, formas y épocas de aplicación de imidacloprid: Remojo de la semilla en la siembra y emergencia de la primera hoja e inmersión de la semilla antes de la siembra, reforzando con aplicaciones foliares. En todos los experimentos se evaluó la población de huevos, ninfas y adultos con base en una escala de población de 1 a 6. La aplicación foliar con tiametoxan, imidacloprid 1 y 2 presentaron los valores de población más bajos para adultos, huevos y ninfas, respecto al testigo. Cuando se utilizó imidacloprid a la siembra en inmersión o remojo de la semilla protegió el cultivo entre 45 y 60 días. A nivel económico para agricultores con áreas grandes de siembra, las ganancias son mayores al utilizar las aplicaciones foliares únicamente. Para agricultores pequeños sólo con un producto es rentable el control químico en forma foliar. Cuando se utilizó desde la siembra el agricultor pequeño no obtuvo ganancias en ninguno de los tratamientos.

Palabras clave: Insecticidas químicos. Cuero de sapo. Relación costo-beneficio.

Summary. In recent years the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar has been the most important pest affecting the cassava crop in Colombia. In order to search for different alternatives in an integrated management program, three experiments were conducted under field conditions in Jamundi (Valle del Cauca) in a complete randomized block design, with the cassava variety Reina. In the first trial the foliar application of different insecticides was evaluated. The treatments corresponded to imidacloprid 1, buprofezin, carbosulfan, tiametoxan, diafentiuron, piriproxifen and imidacloprid 2. In the other two experiments we sought to delay appearance of the pest by evaluating different doses, forms and application periods of imidacloprid: drench of the seed at planting and emergence of the first leaf, and stake immersion, reinforced with foliar applications. In all experiments egg, nymph and adult populations were evaluated based on a population scale of 1 to 6. The foliar application with tiametoxan, imidacloprid 1 and 2 presented the lowest population values for adults, eggs and nymphs compared to the control. When imidacloprid was used at planting and immersion or seed drenching, the crop was protected between 45 and 60 days. At the economic level, for farmers with large planting areas the benefits are greatest by using only foliar applications. For small-scale farmers chemical control is only beneficial with one product in foliar form. When used from planting on, the small-scale farmer gained no benefits from any of the treatments.

Key words: Chemical insecticides. Frogskin. Cost – benefit ratio.

Introducción

La mosca blanca es una especie fitófaga distribuida ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales en todos los continentes y ha sido encontrada en más de 500 especies de plantas hospedadas (López 1986).

Según Caballero (1993), por lo menos 30 especies de mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae) de aproximadamente 1.200 descritas por Bink-Moenen y Mound

(1990), se encuentran en América Central, el Caribe y Colombia. Las especies de distribución mayor y que han alcanzado importancia mayor son *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).

Para el cultivo de yuca, a nivel mundial están registradas 11 especies de mosca blanca (Bellotti *et al.* 1994, 1999). En Colombia, la especie más importante es *Aleurotrachelus socialis* (Bondar), que presenta ataques severos en los departamentos de

Cauca y Tolima, lo mismo en regiones de la costa Atlántica y los llanos orientales. Con menos importancia económica se encuentran las especies *Bemisia tuberculata* (Bondar) y *Trialeurodes variabilis* (Quaintance) (Arias 1995).

Los daños ocasionados por esta plaga pueden ser directos e indirectos. El daño directo lo realizan los adultos y estados inmaduros, los cuales disminuyen la savia de la planta mediante su actividad alimenticia; ataques severos de los adultos retra-

1 Asistente de Investigación. MIPE. Entomología de Yuca, CIAT. Cali-Valle. E-mail: claudia_holguin@hotmail.com

2 Autor para correspondencia: Líder del proyecto MIPE y Entomología de Yuca, CIAT. A. A. 6713, Cali, Valle, Colombia. E-mail: a.bellotti@cgiar.org

san el crecimiento de la planta. El daño indirecto es ocasionado por las ninfas ya que sus secreciones generan hongos sobre las hojas que disminuyen la tasa fotosintética (Bellotti *et al.* 2002 a). De este modo la plaga consigue afectar la producción del material de siembra y la calidad de las raíces cosechadas, reduciendo el rendimiento hasta en un 79 % (CIAT 1986; Arias 1995).

En los últimos 6 años, la población de *A. socialis* se ha elevado considerablemente y se ha vuelto endémica en los departamentos de Cauca y Valle del Cauca, causando efectos graves en la economía de los agricultores de esas zonas. Las poblaciones de esta mosca blanca se han mantenido constantes tanto en épocas secas como en épocas de lluvias (Bellotti *et al.* 2002 a) y han incrementado a medida que aumentan las áreas de siembra de yuca en el país.

La primera reacción del agricultor para manejar este problema ha sido tomar medidas inmediatas de control llevándolo al uso indiscriminado de insecticidas. Pero por ser la yuca un cultivo de ciclo anual, sembrado tradicionalmente en pequeñas plantaciones el control químico resulta muy costoso. Además, las plagas de yuca presentan una gran cantidad de enemigos naturales eficientes, que han permitido que hasta el momento sean controladas biológicamente con éxito. Es por esto que el control químico siempre se ha considerado como último recurso en el manejo de plagas en yuca.

No obstante, características de *A. socialis* como ciclo de vida corto (30 a 35 días dependiendo de la temperatura), tasa de reproducción alta, capacidad de vuelo alta y una capa de cera blanca que recubre la cutícula quitinizada de los estados ninfales han dificultado su manejo, llevando a realizar esfuerzos grandes en la búsqueda de diferentes alternativas de control para esta especie de mosca blanca.

Por tal razón, conociendo las poblaciones altas de la plaga en campo, los estragos que está ocasionando y la necesidad de los agricultores de encontrar alternativas rápidas para el control de mosca blanca en yuca, se optó por probar este método de control. Teniendo en cuenta que los insecticidas utilizados actualmente sobre diferentes especies de mosca blanca nunca han sido probados sobre *A. socialis*. Además el control químico es considerado como una alternativa a corto plazo que utilizada en forma racional hace parte fundamental de un programa de manejo integrado de plagas.

Los objetivos del presente trabajo fueron: Determinar el efecto de diversos insecticidas sobre la población de huevos, ninfas y adultos de *A. socialis*, utilizando diferentes dosis, formas y épocas de aplicación y, establecer si es económicamente rentable, para agricultores con grandes y pequeñas extensiones de yuca, utilizar control químico

ya que están acostumbrados a producir a costos muy bajos.

Materiales y Métodos

Desde el mes de junio del año 2001 hasta junio de 2002, se llevaron a cabo 3 experimentos en condiciones de campo en la finca Agrovelez, ubicada en el municipio de Jamundí (Valle del Cauca) a 975 msnm y con una temperatura promedio de 23°C.

Todos los experimentos se realizaron con la variedad de yuca Reina (CM 6740-7), en un diseño experimental de bloques completos al azar con 4 repeticiones. El número de tratamientos variaba dependiendo del ensayo. Como unidad experimental se utilizaron parcelas de 49 m², con distancias de 1 m entre caballones por un metro entre plantas. Las prácticas culturales fueron las mismas implementadas por los agricultores de la zona y las aplicaciones de insecticidas se realizaron con volúmenes de mezcla de 200 a 600 l/ha dependiendo de la edad del cultivo.

En el primer experimento se evaluó la aplicación foliar de diferentes insecticidas. Los tratamientos correspondieron a imida-

cloprid 1 e imidacloprid 2 (provenientes de diferentes casas comerciales), buprofezin, carbosulfan, tiametoxan, diafentiuiron y piriproxifen en dosis comerciales y un testigo absoluto sin aplicación. En el segundo y tercer experimentos se buscó retrasar la aparición de la plaga evaluando diferentes dosis, formas y épocas de aplicación de imidacloprid: remojo de la semilla en la siembra y emergencia de la primera hoja e inmersión de la semilla antes de la siembra, reforzando con aplicaciones foliares. En ambos ensayos se tenía un testigo absoluto (Tablas 1 y 2).

En los tres experimentos, a partir de los 15 días después de la siembra y hasta los 6 meses de edad del cultivo, se evaluó la población de huevos, ninfas y adultos con base en la escala de población (Tabla 3) sobre 6 plantas seleccionadas al azar por parcela, para así llevar un registro de población y definir el momento de aplicación de los insecticidas. El grado de población seleccionado para ejercer el control químico fue el grado 3, nivel en el cual inician los daños más severos ocasionados por la plaga (Arias 1995). Los datos resultantes de las evaluaciones se sometieron a análisis de varianza por el sistema SAS y cuan-

Tabla 1. Experimento 2. Dosis y forma de aplicación de imidacloprid en campo

Tratamiento	Dosis/ ha	Forma de aplicación
Suspensión concentrada (SC)	0,6 litros	Remojo* a la siembra
Suspensión concentrada (SC)	0,8 litros	Remojo a la siembra
Suspensión concentrada (SC)	0,2 litros	Remojo a la emergencia
Tratamiento semillas (TS)	0,4 litros	Inmersión de estacas
Tratamiento semillas (TS)	0,5 litros	Inmersión de estacas
Presentación granular (Gr)	0,3 kg	Remojo a la siembra
Presentación granular (Gr)	0,4 kg	Remojo a la siembra
Testigo absoluto		

* Aplicación a la base de la planta

Tabla 2. Experimento 3. Dosis y forma de aplicación de imidacloprid en campo

Tratamiento	Dosis/ha	Forma de aplicación
Suspensión concentrada	0,6 litros	Remojo* a la siembra
Suspensión concentrada	0,2 litros	Inmersión estacas
Presentación granular	0,3 Kg	Remojo a la siembra
Presentación granular	0,3 Kg	Inmersión de estacas
Tratamiento semillas	0,4 litros	Inmersión de estacas
Suspensión concentrada	0,2 litros	Remojo a la emergencia
Testigo absoluto		

* Aplicación a la base de la planta

Tabla 3. Escala de población de *Aleurotrachelus socialis* Bondar sobre plantas de yuca

Grado	Adultos-Huevos	Ninfas - Pupas
1	Limpio	Limpio
2	1-50	1-200
3	51-200	201-500
4	201-500	501-2000
5	501-1000	2001-4000
6	> 1000	> 4000

do el valor de F fue significativo se hizo la separación de promedios por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Para el análisis económico se incluyeron los costos incurridos en cada tratamiento en cuanto a insecticidas, mano de obra para la aplicación, cosecha y transporte. Al momento de la cosecha se tomó el rendimiento en las 16 plantas centrales de cada parcela y se registró el precio de venta de la yuca, se observó variación en el precio para agricultores con pequeñas y grandes extensiones del cultivo. Por tal razón, al realizar el análisis económico se tuvo en cuenta el precio de venta de los dos tipos de agricultores y se discriminaron los costos ejercidos por agricultores grandes (más de 5 has), los cuales incurren en costos más altos porque incluyen riego y mayor número de insumos comparado con un agricultor con pequeñas extensiones. Con estos datos se prepararon presupuestos parciales con el fin de calcular los siguientes parámetros por tratamiento: costo variable, costo total, beneficio total, beneficio neto y relación beneficio - costo para agricultores con grandes y pequeñas extensiones de yuca.

En las raíces cosechadas también se observaron síntomas ocasionados por cuero de sapo, una enfermedad probablemente de etiología viral que hace que las raíces de yuca se queden delgadas y leñosas (Calvert y Cuervo 2002). Estas raíces se clasificaron como no comerciales y se contaron para obtener la incidencia de cuero de sapo (%). Posteriormente se realizó un análisis de covarianza para cada experimento teniendo como covariable la enfermedad. Se hizo una comparación entre tratamientos con base en los promedios de rendimiento (ton/ha) corregidos o ajustados por el efecto de cuero de sapo, usando la estimación de promedios por mínimos cuadrados a través de la siguiente ecuación:

$$Rci = Ri - B(Ci - C..)$$

Donde:

Rci= Rendimiento corregido o ajustado

Ri= Promedio del rendimiento para el tratamiento i

B= Coeficiente de regresión lineal en la relación funcional de rendimiento vs incidencia cuero de sapo

Ci= Promedio incidencia cuero de sapo en el tratamiento i

C..= Promedio general incidencia cuero de sapo en el ensayo

Con los valores calculados a través de esta ecuación se procedió nuevamente a realizar el análisis económico.

Resultados y Discusión

Análisis de la población

En el primer experimento, al evaluar la aplicación foliar, todos los insecticidas mani-

festaron eficiencia en el control de adultos, huevos y ninfas de *A. socialis* mostrando diferencias con el testigo y requirieron solamente 3 aplicaciones durante los 6 primeros meses de edad del cultivo, época en la que es crítica el ataque de mosca blanca en yuca (CIAT 1986). Sin embargo, los productos tiametoxan, imidacloprid 1 y 2 fueron los más eficientes, presentando diferencias significativas respecto a los demás tratamientos y el testigo con los valores de población más bajos para los tres estados de la plaga (Tabla 4).

Para una plaga como mosca blanca las ninfas indican la eficiencia del insecticida por ser un estado inmóvil, además los adultos varían por la presión del insecto existente alrededor del cultivo. Al evaluar la población de las ninfas a través del tiempo, cuando se utilizó imidacloprid desde la siembra (experimento 2) (Fig. 1), se encontró que todos los tratamientos protegieron el cultivo hasta los 60 días y se requirieron solamente 2 aplicaciones para mantener bajas

las poblaciones de la plaga a través del ciclo del cultivo. La población menor se obtuvo cuando se utilizó la suspensión concentrada de imidacloprid en remojo a la siembra en las dosis más altas 0,8 y 0,6 lt/ha, considerándose como los tratamientos más eficientes (Fig. 1).

En el experimento 3, realizado con imidacloprid en la siembra, el testigo presentó las poblaciones más altas para adultos, huevos y ninfas y mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos (Tabla 5).

En la figura 2 se observa que la aparición de la plaga ocurrió en general a los 45 días. El comportamiento de las ninfas a través del tiempo fue similar en todos los tratamientos, oscilando entre los grados 2, 3 y 4, lo cual indica que sí hubo control de la plaga. El testigo mostró aumento de la población de ninfas a los grados más altos (5 y 6) (Fig. 2), indicando que sin ningún tipo de control la población de la plaga es mayor. Las poblaciones del expe-

Tabla 4. Efecto de la aplicación foliar de productos químicos sobre poblaciones de huevos, ninfas y adultos de *Aleurotrachelus socialis* Bondar en yuca (experimento 1)

Tratamiento	Adultos ²	Huevos	Ninfas
Testigo	3,65 a ¹	4,06 a	4,33 a
Carbosulfan	3,20 b	3,65 b	4,01 ab
Buprofezin	3,18 b	3,56 b	3,89 ab
Piriproxifen	3,17 b	3,55 b	3,85 ab
Diafenturon	3,15 b	3,51 b	3,58 b
Imidacloprid 1*	2,76 c	2,89 c	2,81 c
Imidacloprid 2	2,64 c	2,78 c	2,72 c
Tiametoxan	2,57 c	2,78 c	2,62 c

1 Prueba de Duncan Números seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente al 5% de significancia

2 Basado en escala de población, 1= No presencia; 2= 1-200 individuos por hoja; 3= 201-500 por hoja; 4= 501-2.000 por hoja; 5= 2.001-4.000 por hoja; 6= >4.000 por hoja

* Provenientes de diferentes casas comerciales

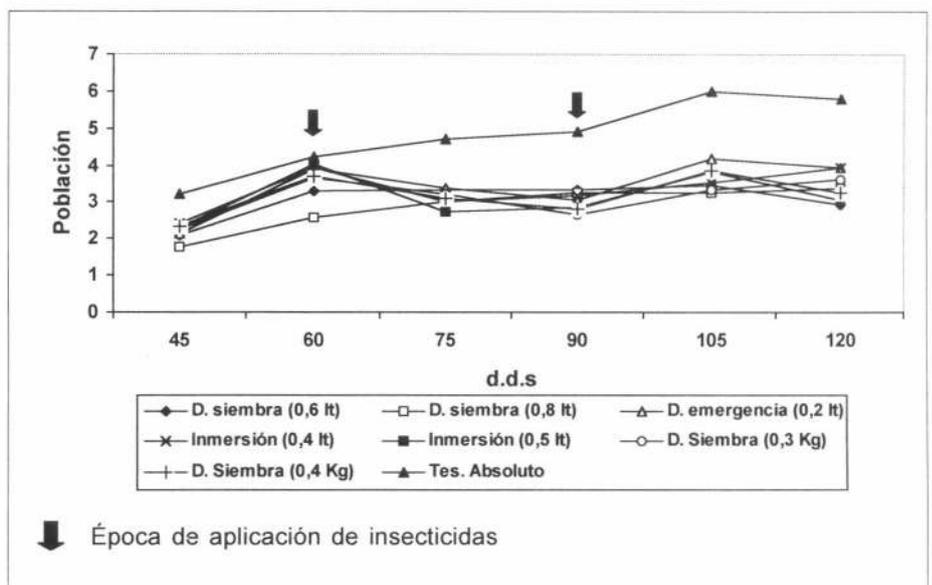


Figura 1. Efecto de imidacloprid a través del tiempo sobre poblaciones de ninfas de *Aleurotrachelus socialis* Bondar (experimento 2).

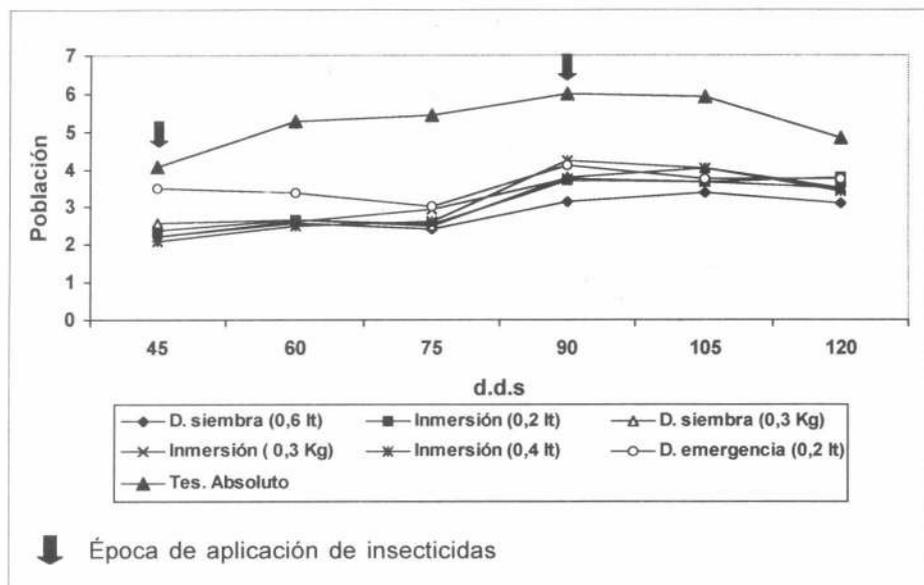


Figura 2. Efecto de imidacloprid a través del tiempo sobre poblaciones de ninfas de *Aleurotrachelus socialis* Bondar en yuca (experimento 3).

Tabla 5. Efecto de imidacloprid sobre huevos, ninfas y adultos de *Aleurotrachelus socialis* Bondar en el Valle del Cauca (experimento 3)

Tratamiento	Dosis	Adultos ²	Huevos	Ninfas
SC - Remojo a la siembra	0,6 litros	3,28 b ¹	3,12 b	2,80 c
SC - Inmersión de estacas	0,2 litros	3,28 b	3,20 b	3,12 bc
Gr - Remojo a la siembra	0,3 Kg	3,38 b	3,42 b	3,18 bc
Gr - Inmersión de estacas	0,3 Kg	3,18 b	3,09 b	3,11 bc
TS - Inmersión de estacas	0,4 litros	3,29 b	3,16 b	3,14 bc
SC - Remojo a la siembra	0,2 litros	3,59 b	3,51 b	3,58 b
Testigo absoluto		4,52 a	4,92 a	5,26 a

1 Prueba de Duncan Números seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente al 5% de significancia.

2 Basado en escala de población, 1= No presencia; 2= 1-200 individuos por hoja; 3= 201-500 por hoja; 4= 501-2.000 por hoja; 5= 2.001-4.000 por hoja; 6= >4.000 por hoja.

rimento 3 en general, fueron similares a las del experimento 2.

Análisis económico

El rendimiento obtenido fue similar para los tres experimentos (Tabla 6). En el ensayo de aplicación foliar (experimento 1) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo absoluto, siendo el rendimiento promedio de 10,3 ton/ha. En el segundo ensayo se obtuvo un promedio similar al anterior, pero el testigo absoluto mostró el valor más bajo respecto a los tratamientos, esto se debe a que presentaron las poblaciones más altas de mosca blanca. En el experimento 3, el rendimiento fue inferior a los anteriores ensayos en todos los tratamientos y el testigo, en promedio de 5,8 ton/ha, a pesar de que la población de mosca blanca mostró un comportamiento semejante en los tres experimentos.

Los rendimientos alcanzados son muy bajos para el cultivo de yuca; sin embargo,

oscilan dentro de la producción promedio mundial que es de 10 a 15 t/ha, con un rendimiento promedio de 9,9 t/año; aunque en Colombia la producción ha llegado a alcanzar las 40 t/ha en condiciones experimentales favorables y en monocultivo (Bellotti *et al.* 1999, 2002 b).

Esta disminución en el rendimiento pudo ocurrir porque la variedad de yuca utilizada es de rendimiento bajo y, por la presencia de la enfermedad cuero de sapo sobre un gran número de raíces cosechadas (Tabla 6).

Para efectos del análisis de costos se consideró el precio de venta de la yuca, se observó variación para agricultores con grandes áreas de siembra respecto a los pequeños. En el caso de los grandes por tener el mercadeo del producto asegurado les compraban a \$330 el kilo. Como en ese momento la producción de yuca era alta a los pequeños agricultores les pagaban en promedio redrojo y raíces comerciales de yuca a \$150.

Con los respectivos precios y costos ejercidos por cada tipo de agricultor, se realizó el análisis económico en los tres ensayos (Tabla 7). Al analizar los costos para agricultores con grandes extensiones, se observó en el experimento 1, cuando se utilizó únicamente la aplicación foliar de los insecticidas, que la relación beneficio - costo fue superior o igual a 1 en casi todos los tratamientos y el testigo. Tiametoxan alcanzó el valor mayor con una relación beneficio - costo de 2,09, lo cual indica que el agricultor gana un peso con 9 centavos, por cada peso invertido.

Cuando el control químico se ejecutó desde la siembra, en el experimento 2, la relación beneficio - costo fue superior a 1 en todos los tratamientos, lo cual indica que en todos los casos el agricultor grande obtiene ganancias; sin embargo, las ganancias son mayores si se utiliza la aplicación foliar únicamente. El testigo presentó un valor inferior a 1 (Tabla 7).

En el experimento 3 la relación beneficio - costo fue inferior a 1 en todos los tratamientos y el testigo, a pesar de que la población de mosca blanca fue similar al ensayo anterior (Tabla 7). Esta situación fue originada porque el rendimiento obtenido en este experimento era el más bajo (Tabla 6).

Para agricultores con pequeñas extensiones de yuca la situación fue diferente (Tabla 7). Al aplicar los insecticidas en forma foliar la relación beneficio - costo fue inferior a 1 en todos los tratamientos y el testigo, exceptuando el tratamiento con tiametoxan cuyo valor fue igual a 1,34. Al utilizar control químico desde la siembra la relación beneficio - costo en los 2 ensayos fue inferior a 1 en todos los tratamientos; sin embargo, los valores son menores en el testigo absoluto, lo cual indica que si no se hace ningún tipo de control de la plaga las pérdidas económicas son mayores.

Con estos resultados podría concluirse que para agricultores con pequeñas extensiones de yuca no es rentable utilizar control químico desde la siembra. No obstante, se debe tener en cuenta que la variedad utilizada es de rendimiento bajo, además todos los tratamientos estuvieron afectados por la presencia de cuero de sapo, enfermedad que afecta también el rendimiento.

Con el fin de descartar el efecto del cuero de sapo sobre los resultados obtenidos, se realizó un análisis de covarianza para cada experimento teniendo como covariable la enfermedad. Al utilizar la ecuación $R_{ci} = R_i - B(C_i - C_{..})$, se encontró un efecto significativo de la enfermedad en el rendimiento. El valor de B estimado fue de 0,2026, 0,08 y 0,09 para los experimentos 1, 2 y 3. De tal manera que un incremento de una unidad en el número de raíces enfermas está asociado con una disminución de 0,2026 unidades de rendimiento para el experimento 1, de 0,08 y 0,09 unidades

Tabla 6. Rendimientos obtenidos e incidencia de cuero de sapo en tres experimentos de control químico sobre *Aleurotrachelus socialis* en Jamundí (Valle del Cauca)

Experimento	Tratamiento	Rendimiento obtenido t/ha	Incidencia Cuero sapo (%)
1	Imidacloprid 1	8,70	36,47
	Buprofezin	10,96	32,26
	Carbosulfan	10,30	20,62
	Tiametoxan	16,25	17,71
	Diafentiuon	7,41	36,02
	Piriproxifen	9,35	24,53
	Imidacloprid 2	11	36,28
	Testigo	8,44	41,01
2	SC - 0,6 lt - Remojo siembra	10,85	22,36
	SC - 0,8 lt - Remojo siembra	11,60	25,61
	SC - 0,2 lt - Remojo emerg.	9,37	17,63
	TS - 0,4 lt - Inmersión	8,55	38,44
	TS - 0,5 lt - Inmersión	9,67	22,81
	Gr - 0,3 Kg - Remojo siembra	10,01	22,46
	Gr - 0,4 Kg - Remojo siembra	11,84	22,32
	SC - 0,2 lt - Remojo emerg.	7,48	28,11
	Testigo absoluto	4,75	19,90
3	SC - Remojo siembra	8,56	44,74
	SC - Inmersión de estacas	4,73	48,95
	SC - Remojo siembra	6,05	45,22
	TS - Inmersión de estacas	6,61	44,91
	TS - Inmersión de estacas	6,76	41,04
	Gr - Remojo siembra	6,13	64,65
	SC - Remojo siembra	3,63	54,85
	Testigo absoluto	4,25	53,38

de rendimiento para los experimentos 2 y 3 respectivamente, ocasionado por la presencia de cuero de sapo. Al implementar la ecuación en cada uno de los tratamientos, dependiendo del caso, incrementaba o disminuía cada valor de rendimiento en las unidades mencionadas (Tabla 8).

Con estos valores calculados se procedió nuevamente a realizar el análisis económico (Tabla 8), se observó un comportamiento similar en los tres ensayos realizados a los originalmente obtenidos. Es así como en el ensayo de aplicación foliar para agricultores con grandes áreas de siembra la relación beneficio - costo fue cercana o superior a 1 en todos los tratamientos y el testigo y, para agricultores pequeños solamente fue superior a 1 en el tratamiento con tiametoxan. En el segundo y tercer experimentos se indica que para agricultores grandes la relación beneficio - costo fue superior a 1 en todos los tratamientos del experimento 2 exceptuando el testigo e inferior a 1 en todos los tratamientos del ensayo 3 y, para agricultores pequeños en ambos experimentos fue inferior a este valor. Lo cual indica que el efecto del cuero de sapo sobre el rendimiento no afectó directamente los beneficios obtenidos.

Los resultados de este trabajo permiten dilucidar que implementar el control químico en el cultivo de la yuca para controlar la mosca blanca *A. socialis*, sí disminuye la población del insecto y retrasa su apari-

Tabla 7. Costos y beneficios obtenidos a un precio de \$330 y \$150 por un agricultor con grandes y pequeñas extensiones de yuca respectivamente, en tres experimentos. (Valores dados en miles de pesos por hectárea)

Experimento	Tratamiento	\$ 330		\$ 150	
		Costo total	Relación B/C	Beneficio neto	Relación B/C
1	Imidacloprid 1	2.635,50	1,09	1.892,20	0,69
	Buprofezin	2.602,70	1,39	1.859,40	0,88
	Carbosulfan	2.549,90	1,33	1.806,60	0,86
	Tiametoxan	2.564,30	2,09	1.821	1,34
	Diafentiuon	2.601,90	0,94	1.858,60	0,60
	Piriproxifen	2.564,30	1,20	1.821	0,77
	Imidacloprid 2	2.630,30	1,38	1.887	0,87
	Testigo	2.396,30	1,16	1.653	0,77
2	SC - 0,6 lt - Remojo siembra	2.915,90	1,23	2.172,60	0,75
	SC - 0,8 lt - Remojo siembra	3.011,10	1,27	2.267,80	0,77
	SC - 0,2 lt - Remojo emerg.	2.725,50	1,13	1.982,20	0,71
	TS - 0,4 lt - Inmersión	2.773,90	1,02	2.030,60	0,63
	TS - 0,5 lt - Inmersión	8.221,80	1,13	2.078,50	0,70
	Gr-0,3 kg - Remojo siembra	2.643,80	1,25	1.900,50	0,79
	Gr-0,4 kg - Remojo siembra	2.810,30	1,39	2.067	0,86
	Testigo absoluto	2.396,30	0,65	1.953	0,43
3	SC - Remojo siembra	2.915,90	0,97	2.172,60	0,59
	SC- Inmersión de estacas	2.677,50	0,58	1.934,20	0,37
	SC - Remojo siembra	2.643,80	0,76	1.900,50	0,48
	TS - Inmersión de estacas	2.595,80	0,84	1.852,50	0,54
	TS - Inmersión de estacas	2.773,90	0,80	2.030,60	0,50
	Gr - Remojo siembra	2.725,50	0,74	1.982,20	0,46
	Testigo absoluto	2.396,30	0,59	1.653	0,39

Tabla 8. Rendimiento corregido y beneficios obtenidos a un precio de \$330 y \$150 por un agricultor con grandes y pequeñas extensiones de yuca respectivamente, en tres experimentos. (Valores dados en miles de pesos por hectárea)

Experimento	Tratamiento	Rendimiento corregido* t/ha	\$ 330 Relación B/C	\$ 150 Relación B/C
1	Imidacloprid 1	11,37	1,42	0,90
	Buprofezin	11,15	1,41	0,90
	Carbosulfan	7,64	0,99	0,63
	Tiametoxan	14,19	1,83	1,17
	Diafenturon	9,21	1,17	0,74
	Piriproxiifen	7,61	0,98	0,63
	Imidacloprid 2	12,55	1,57	1,00
	Testigo	8,67	1,19	0,88
2	SC - 0,6 lt - Remojo siembra	10,58	1,20	0,73
	SC - 0,8 lt - Remojo siembra	11,67	1,28	0,77
	SC - 0,2 lt - Remojo emerg.	8,91	1,08	0,67
	TS - 0,4 lt - Inmersión	9,58	1,14	0,71
	TS - 0,5 lt - Inmersión	9,61	1,12	0,69
	Gr - 0,3 Kg - Remojo siembra	10,05	1,25	0,79
	Gr - 0,4 Kg - Remojo siembra	11,80	1,39	0,86
	Testigo absoluto	4,24	0,58	0,33
3	SC - Remojo siembra	8,58	0,97	0,59
	SC - Inmersión de estacas	4,85	0,60	0,38
	SC - Remojo siembra	5,94	0,74	0,47
	TS - Inmersión de estacas	6,50	0,83	0,53
	TS - Inmersión de estacas	6,50	0,77	0,48
	Gr - Remojo siembra	7,01	0,85	0,53
	Testigo absoluto	3,65	0,50	0,33

* Ajustados con los valores 0,2026, 0,08 y 0,09 calculados con la ecuación $Rci = Ri - B (Ci - C..)$

ción si es utilizado desde la siembra. En términos económicos, para los yuqueros con grandes áreas de siembra es rentable utilizar control químico, obteniendo mayores ganancias si es aplicado foliarmente. Para agricultores con pequeñas áreas de siembra el control químico no es la alternativa más viable, ya que las pérdidas económicas son muy altas en cualquier forma de aplicación, encontrándose solamente un producto rentable para este tipo de agricultor. Este hecho confirma la necesidad de encontrar alternativas más económicas en el control de mosca blanca en yuca, como el control biológico.

Sin embargo, estos resultados pueden cambiar lógicamente, con variación en el precio para los agricultores pequeños principalmente, en la mano de obra y los insumos, o con alteraciones en la eficiencia de los insecticidas como lo afirman Cardona *et al.* (1993). También puede ocurrir variación en los resultados si se utiliza una variedad de yuca de rendimiento más alto y/o con resistencia a la plaga.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Adriano Muñoz por la colaboración, a Carlos Moreno por la asesoría estadística y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la financiación.

Literatura citada

ARIAS, B., 1995. Estudio sobre el comportamiento de la "mosca blanca" *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera:

Aleyrodidae) en diferentes genotipos de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. 181 p.

BELLOTTI, A. C.; BRAUN, A. R.; ARIAS, B.; CASTILLO, J. A.; QUERRERO, J. M. 1994. Origin and management of Neotropical Cassava arthropod pests. *African Crop Science Journal* 2 (4): 407-417.

BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, S. L. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 343-370.

BELLOTTI, A. C.; ARIAS, B.; VARGAS, O.; REYES, J. A.; GUERRERO, J. M. 2002 a. Insectos y ácaros dañinos a la yuca y su control. p. 160-203. En: Ospina, B.; Ceballos, H. (eds.). La yuca en el tercer milenio. Sistemas de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Palmira, Colombia. 586 p.

BELLOTTI, A. C.; ARIAS, B.; VARGAS, O.; PEÑA, J. E. 2002 b. Pérdidas en rendimiento del cultivo de yuca causadas por insectos y ácaros. p. 204-219. En: Ospina, B.; Ceballos, H. (eds.). La yuca en el tercer milenio. Sistemas de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Palmira, Colombia. 586 p.

BINK-MOENEN, R. M.; MOUND, L. A. 1990. Whiteflies: Diversity, biosystematics and evolutionary patterns. p.1-12. En: Gerling D. (ed.). Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. Department of Zoology, The Georges. Wise faculty of life Sciences. Tel Aviv University. Israel. 348 p.

BROWN, J. K. 1993. An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin. *FAO. Plan Protection Bulletin* 39 (1): 5-23.

CABALLERO, R. 1993. Moscas blancas neotropicales (Homoptera: Aleyrodidae): Hospedantes, distribución, enemigos naturales e importancia económica. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Informe Técnico No. 205. CATIE. Serie Técnica. 66 p.

CALVERT, L.; CUERVO, M. 2002. Enfermedades virales de la yuca en América del Sur. p. 262-268. En: Ospina, B.; Ceballos, H. (eds.). La yuca en el tercer milenio. Sistemas de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Palmira, Colombia. 586 p.

CARDONA, C.; RODRÍGUEZ, A.; PRADA, P. C. 1993. Umbral de acción para el control de la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), en habichuela. *Revista Colombiana de Entomología* 19 (1):27-33.

CIAT, 1986. Mosca blanca en el cultivo de la yuca: biología y control. Serie 045C-0405. Auditorial. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 34 p.

LASTRA, R. 1993. Los geminivirus: un grupo de los fitovirus con características especiales. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Informe Técnico No. 71. CATIE. Serie Técnica. 7 p.

LÓPEZ, A. A. 1986. Taxonomy and biology. Cap. 1. En: Cock M. J. W. (ed.). *Bemisia tabaci* a Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography. FAO. CAB International. 171 p.

Recibido: Abr. 22/2003

Aceptado: Ago. 31/2003

Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae)

Characterization of granular biopesticide prototypes based on *Metarhizium anisopliae* for the control of *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae)

PAULA MARIÑO¹, LAURA VILLAMIZAR², CARLOS ESPINEL³, ALBA MARINA COTES⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 43-49 (2004)

Resumen. La especie *Ancognatha scarabaeoides* es un coleóptero cuyas larvas rizófagas pueden causar daños en cultivos de fríjol, maíz, cebolla, arracacha y papa, entre otros. Ocasiona pérdidas entre el 10 y el 80% del total del cultivo. Para su control se utilizan métodos culturales y principalmente métodos químicos, mediante productos altamente tóxicos. Ante los altos costos económicos y ambientales que ocasiona el uso de estos productos, se tiene como alternativa promisoría el uso de insecticidas biológicos a base de hongos entomopatógenos tales como *Metarhizium anisopliae*. Dado que mediante investigaciones previas en Corpoica se seleccionó una cepa de este hongo (Mt 020) con una actividad biocontroladora del 76,6% contra *A. scarabaeoides*, con ésta se desarrollaron tres preformulados de presentación granular para aplicación al suelo. Por esto se tuvo como objetivo determinar sus características físicas, microbiológicas y su actividad biocontroladora. Para tal fin, la cepa se produjo masivamente y se formularon tres granulados (GR1, GR2, y GR3) diferentes entre sí en los que se variaron sus componentes y sus concentraciones. A cada granulado se le determinó el tamaño de partícula, voluminosidad, porosidad, fluidez, humedad y pH; así como la concentración en conidios.g⁻¹ y la viabilidad expresada como UFC.g⁻¹. Los prototipos y el principio activo se almacenaron a tres temperaturas (8, 18 y 28°C) y mensualmente se evaluó la viabilidad del hongo. La actividad biocontroladora se determinó mediante bioensayos realizados en casa de malla. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó el granulado GR1 por tener características físicas adecuadas, con valores iguales o inferiores a los límites óptimos para cada una de ellas. Presentó 0,31% de polvos finos, es decir que el gránulo no es de consistencia frágil; 3,44 ml.g⁻¹ de voluminosidad, lo que establece que no presentará problemas de manipulación; 18% de porosidad, este porcentaje indicaría que el gránulo podría resistir la manipulación sin fracturarse; también se pudo establecer que el producto fluye fácilmente (ángulo de reposo 27,2°), en consecuencia no presentaría problema en el llenado y empaque de cantidades grandes. Posee una humedad de 9,7%, lo que garantiza la reducción de procesos metabólicos, y pH de 5,5. Además, la pérdida máxima de viabilidad a las tres temperaturas presentada durante los seis meses de almacenamiento fue de 20,7% y produjo niveles de mortalidad de la plaga promisorios y estables llegando hasta el 43%.

Palabras clave: Preformulación. Granulado. Chiza. Control biológico.

Summary. The species *Ancognatha scarabaeoides* is a coleopteran whose rhizophagous larvae can cause damage in bean, maize, onion, and potato crops, among others. It causes losses between 10 and 80% of the total crop. Cultural methods and especially chemical methods with highly toxic insecticides are used for its control. Considering the high economic and environmental costs caused by the use of these products, a promising alternative is the use of biological insecticides based on entomopathogenic fungi like *Metarhizium anisopliae*. Giving that in previous research at Corpoica, a strain of this fungus (Mt 020) was selected, due to its biocontrol activity of 76,6% against *A. scarabaeoides* three granular biopesticide prototypes were developed for soil application. Therefore the objective of this work was to determine their physical and microbiological characteristics, and biocontrol activity. For this purpose, the strain was mass produced and three different granulars (GR1, GR2, and GR3) that varied in components and concentrations were produced. For each granular the particle size, voluminosity, porosity, fluidity, humidity and pH were determined; as well as the concentration in conidia.g⁻¹ and the viability expressed as UFC.g⁻¹. The prototypes and the active source were stored at three temperatures (8, 18 and 28°C) and the viability of the fungus was evaluated monthly. The biocontrol activity was measured in bioassays carried out in the screen house. According to the results obtained, the granular GR1 was selected because of its appropriate physical characteristics, which were equal or inferior to the optimal limits established for each of them. It had 0,31% fine powder, which means that the granule is not fragile; 3,44 ml.g⁻¹ of voluminosity establishing that it will not have manipulation problems; 18% porosity, this small percentage indicates that the granule can resist manipulation without fracturing; it was also established that the product flows easily (angle of repose 27,2°), and so it will not present problems in the filling and packing of large quantities. It had 9,7% humidity, which guarantees the reduction of metabolic processes, and pH of 5,5. In addition, the maximum loss of viability at the three temperatures presented over the six months of storage was 20,7%, and it produced promising and stable levels of pest mortality of up to 43%.

Key words: Preformulation. Granular. White grub. Biological control.

1 Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

2 Química Farmacéutica. M. Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C.I. Tibaitatá. E-mail: laurafernandav@yahoo.es

3 B.Sc. Investigador. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. E-mail: cespinel@yahoo.com

4 Autor para correspondencia: Ph.D. Fitopatología. Investigadora Principal. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. Km. 14 vía Mosquera. Teléfono 3443156. E-mail: acotes@corpoica.org.co

Introducción

Dentro de las plagas que causan el daño mayor en extensas zonas de cultivos en diferentes departamentos del país se encuentra la chiza o mojoyoy. Este es un insecto cuyo estado larval ataca el sistema radicular de frijol, maíz, pastos, zanahoria, cebolla, flores, papa, espárragos, entre otros cultivos (Londoño 1998).

El complejo chiza en Colombia abarca un gran número de especies. Las especies de chiza predominantes parecen estar relacionadas con la altura sobre el nivel del mar, es así como a altitudes superiores a 2.500 metros predomina el género *Ancognatha*, con dominancia de la especie *Ancognatha scarabaeoides* Erichson (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en los cultivos de tierra fría y en las regiones altas de clima medio en Colombia (Alvarado 1977). Desde hace algunos años se vienen aumentando los niveles de población de este insecto, lo cual es atribuido al uso indiscriminado de plaguicidas y a cambios en el medio ambiente, que afectan los factores de regulación natural bióticos y abióticos, favoreciendo de este modo el aumento de la población del insecto (Londoño 1998). Las pérdidas ocasionadas por esta especie son considerables, y llegan hasta el 100% en algunos cultivos como fresa, hortalizas y flores (Rodríguez 1997). Para el control de este insecto, se han venido utilizando métodos culturales, tales como la rotación de cultivos y las aradas profundas, sin obtener resultados satisfactorios (Alvarado 1977).

Sin embargo, a nivel nacional, comúnmente se han utilizado plaguicidas químicos, varios de los cuales son productos altamente tóxicos, es el caso de Carbofurán, Diazinon y Hostation, entre otros (Orellana 1983). Estos productos, además de representar costos económicos altos pueden causar problemas de equilibrio en los ecosistemas incidiendo negativamente en el control ejercido por enemigos naturales (Rodríguez 1983). El uso de dichos insecticidas en Colombia tienen un costo aproximado de medio billón de dólares cada año; representando solamente un 5% de la inversión realizada en agentes microbianos de control (Gómez y Villamizar 1996).

Una alternativa promisoría para el control de esta plaga es la utilización de métodos biológicos (Rodríguez 1983), debido a que su uso ha tenido notable impacto en los últimos años especialmente en cultivos perennes. Estas alternativas biológicas incluyen el uso de depredadores, parasitoides y microorganismos entomopatógenos (Londoño 1998).

A nivel mundial se han utilizado con éxito microorganismos entomopatógenos para el control de esta plaga, tales como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y bacterias como *Bacillus popilliae* que causa una enfermedad denominada muerte lechosa (Londoño y Ríos 1997). Por su parte, los hongos entomopatóge-

nos tales como *M. anisopliae* penetran en el hospedero directamente degradando su cutícula y no necesitan ser ingeridos, presentan más especificidad que los químicos, crecen fácilmente en sustratos simples y económicos haciendo factible su producción masiva con costos bajos y, hasta el momento, no se le conocen efectos adversos sobre el ambiente, los animales y el hombre (Galán y Támez 1993).

Existen diferentes tipos de presentación para los bioinsecticidas de aplicación al suelo y su diseño depende de los hábitos y del comportamiento de la plaga objeto de control (Gómez *et al.* 1997). Algunos tipos de formulaciones existentes para dichos bioinsecticidas son: polvos para espolvoreo, polvos humectables, líquidos emulsionables y granulados; estos últimos presentan mayor facilidad en su manipulación y aplicación al suelo, ya que permiten que el producto entre en contacto directo con plagas de hábito rastrero y favorecen la diseminación y persistencia del biocontrolador en el suelo (Gómez *et al.* 1997). Sin embargo, para la formulación de un bioplaguicida de aplicación al suelo destinado al control de plagas tales como *A. scarabaeoides*, se deben tener en cuenta las condiciones ambientales en las cuales se encuentra el cultivo. Por lo tanto, se hace necesario que la formulación garantice la absorción de la humedad del medio ambiente, para facilitar la germinación del microorganismo y conferirle a éste un sustrato adecuado para su establecimiento en el suelo. Igualmente es importante tener en cuenta, que la formulación, especialmente si es un granulado, posea características físicas adecuadas, tales como fluidez, humectabilidad, tamaño de partícula, voluminosidad, humedad y pH (ICONTEC 1992, 1998). Dichas características pueden garantizar la viabilidad del microorganismo en condiciones de almacenamiento y permiten detectar si los granulados presentan problemas, ya sea por su difícil manipulación o por dificultades en los procesos de llenado de los recipientes en que se almacena (Voight y Borns 1979).

En Colombia la producción de bioplaguicidas es realizada en muchos casos en forma artesanal, sin estudios que respalden la utilización de cepas con actividad biocontroladora alta. Algunos de estos productos carecen de una caracterización adecuada que asegure su efectividad y cumplimiento de las especificaciones de la etiqueta; por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar las características físicas, microbiológicas y la actividad biocontroladora de preformulados granulados a base de *M. anisopliae* para el control de la chiza *A. scarabaeoides*.

Materiales y Métodos

En el presente estudio se utilizó la cepa del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Mt020, proveniente de Enviga-

do (Antioquia), aislada directamente de larvas de *Ancognatha scarabaeoides*. Esta cepa fue suministrada por el Centro de Investigaciones La Selva de Corpoica.

Con el propósito de mantener el material biológico, la cepa se incorporó al Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica C.I. Tibaitatá, en viales con Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura de 4°C y antes de ser utilizada en los ensayos biológicos fue reactivada en larvas de tercer ínstar de *A. scarabaeoides*.

Producción masiva del principio activo. La producción masiva del principio activo *Metarhizium anisopliae* (cepa Mt020), para la posterior formulación de los granulados, se realizó en bandejas de aluminio de 20 cm de largo por 14 cm de ancho y 3 cm de profundidad que contenían 34 g de salvado y 150 ml de extracto de arroz. Las bandejas se cubrieron con papel de aluminio y se esterilizaron durante 20 minutos. Posteriormente, cada bandeja se inoculó con 5 ml de una suspensión de *M. anisopliae* que contenía 10^7 conidios. ml^{-1} y se cubrieron con una lámina plástica permeable al gas para evitar posibles contaminaciones y para permitir intercambio de gases, facilitando el crecimiento del hongo. Estas bandejas se incubaron en un cuarto de crecimiento con luz constante y con una temperatura de 25°C durante 15 días. Al cabo de este tiempo el plástico que cubría las bandejas se cambió por toallas de papel, para permitir un mejor intercambio gaseoso con el fin de iniciar el proceso de secado del principio activo, el cual se llevó a cabo en una estufa con corriente de aire a una temperatura de 28°C durante 2 días. Una vez que la biomasa se encontró seca, se molió y fue pasada por una malla de 100 micrómetros para obtener un tamaño de partícula adecuado.

Preparación de los excipientes y proceso de formulación de los granulados. Los excipientes se mezclaron con el principio activo de acuerdo con las composiciones indicadas en la tabla 1. Una vez se obtuvo una masa uniforme, ésta se granuló por extrusión a través de una malla con un tamaño de poro de 1 mm aproximadamente. Posteriormente, los granulados se secaron durante dos días a 28°C en un estufa con corriente de aire; posteriormente, se regranularon para obtener un tamaño de partícula uniforme.

Caracterización física de los granulados. Se evaluaron las propiedades físicas de voluminosidad, fluidez, tamaño de partícula, porosidad, humedad y pH.

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante la técnica de gravimetría (Voight y Borns 1979). La determinación de la voluminosidad se realizó por el método de peso constante - volumen variable (Voight y Borns 1979). Para determinar la porosidad se pesaron 25 gramos de cada uno de los granulados y

Tabla 1. Composición de los granulados a base de *M. anisopliae* evaluados

Granulados	Principio activo	Pasta aglutinante	Diluyente	Coadyuvante
GR1	39,40%	60,20%	---	0,29%
GR2	28,80%	59,30%	11,50%	0,29%
GR3	43,70%	48,60%	7,20%	0,29%

se colocaron en una probeta, se leyó el volumen ocupado por el material (V1) y posteriormente, se apisonó el material levantando la probeta hasta la altura máxima permitida y dejándola caer libremente sobre una base de madera, esta operación se repitió hasta el momento en que no se presentó variación en el volumen dado por la probeta (Vf). La porosidad se calculó utilizando la fórmula matemática: Porosidad = $1 - (a/v)$, en donde *a* es la densidad global de la muestra (W muestra / V1) y *v* es la densidad real de la muestra (W muestra / Vf) (Voight y Borns 1979).

La fluidez se determinó por el método de fluidez estática (Voight y Borns 1979; Helman 1982, ICONTEC 1992). La determinación del porcentaje de humedad se realizó por el método de pérdida de peso por secado (USP XXIII 1995). Para la determinación del pH, se realizó una suspensión 1:10 P/V de cada granulado en agua destilada y se midió el pH con un potenciómetro Cole - Parmer, previamente calibrado (CENICAFÉ 1996).

El diseño experimental de todas las pruebas de caracterización física fue completamente al azar, con tres repeticiones para cada granulado, utilizando una sola réplica a través del tiempo por ser sólo un lote de producción. Con los resultados obtenidos fue posible establecer los límites óptimos de aceptación para cada una de las características de los diferentes granulados.

Caracterización microbiológica de los granulados

Concentración y viabilidad. En la determinación de la concentración expresada como conidios.g⁻¹ de cada uno de los granulados se quiso asegurar la desintegración de los gránulos y una mejor obtención de conidios, por lo que se pesó un gramo de cada uno de los granulados, el cuál fue homogeneizado en 2.000 ml de agua destilada durante un minuto. Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de conidios en cámara de Neubauer.

La viabilidad se determinó realizando diluciones sucesivas en tubos que contenían 9 ml de Tween 80 al 0,1%, posteriormente, se inocularon 0,1ml de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en cajas de Petri que contenían Agar Saboureaud Rosa de Bengala (SBR). Estas cajas fueron incubadas durante 8 días, tiempo después del cual se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC), expresando

finalmente los resultados como UFC.g⁻¹ de granulado.

Estabilidad microbiológica de los granulados. Para evaluar el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre el hongo, se realizó un ensayo de estabilidad de los granulados a tres temperaturas (8, 18 y 28°C) durante seis meses, para lo cual, se almacenaron muestras de 0,1 g de cada granulado y 0,1 g del tratamiento control que consistió en principio activo puro (*Metarhizium anisopliae*), en viales estériles sellados con tapón y agrafe, cada mes de almacenamiento se tomó una muestra y se evaluó la viabilidad de cada uno de los granulados mediante la técnica descrita previamente.

Actividad biocontroladora de los granulados. La evaluación de la estabilidad biocontroladora de cada uno de los granulados sobre el insecto blanco se realizó por medio de un bioensayo realizado bajo condiciones de casa de malla a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 80% en promedio.

El diseño experimental fue completamente al azar, y se utilizaron seis tratamientos, cada uno con tres repeticiones y 11 individuos por repetición. Los tratamientos consistieron en los tres preformulados granulados por evaluar (T1, T2, T3), el hongo sin formular, es decir, el principio activo (T4), el testigo tratado (T5), el cual consistió en una formulación del granulado sin principio activo utilizando todos los excipientes con el fin de verificar que éstos no produjeran la muerte al insecto y el testigo absoluto (T6). Las larvas se recolectaron 15 días antes del inicio del bioensayo; se trasladaron a la casa de malla y se ubicaron en cubetas con suelo y suministro de alimento con el propósito de brindarles un tiempo para su adaptación a las condiciones experimentales.

Cada unidad experimental consistió en una cubeta plástica de 38 cm de largo, 28 cm de ancho y 15 cm de profundidad, en la cual se colocaron 5 kg de suelo tamizado, incorporando la cantidad determinada de cada uno de los granulados para ajustar en cada cubeta el doble de la CL₅₀ (1,58 x 10⁷ conidios.g⁻¹ de suelo) determinada para esta cepa en estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Posteriormente, se ubicaron en cada cubeta 11 larvas de tercer instar de *A. scarabaeoides*, debido que en ensayos previos se estableció este número de insectos como el adecuado para

evitar una sobrepoblación que acarrearía un posible ataque entre ellas. En cada cubeta se ubicó un cespedón de pasto Kikuyo (*Penisetum clandestinum*) como soporte para la alimentación de los insectos durante el bioensayo.

Se realizó el registro de mortalidad de larvas al día seis y al día 12 del inicio del bioensayo y a partir de este último, cada 10 días. Las larvas muertas se sometieron a cámara húmeda, que consistieron en cajas de Petri estériles, que tenían en su base una toalla de papel húmeda, la cual se cambiaba todos los días con el fin de evitar contaminación. Las cajas se mantuvieron a una temperatura promedio de 18°C con el propósito de evidenciar la esporulación típica de este entomopatógeno.

Los resultados netos de mortalidad se corrigieron con el testigo mediante la fórmula de Schneider - Orelli (Ciba - Geygi 1973):

$$\text{Porcentaje de eficacia} = ((b - k) / (100 - k)) \times 100$$

Donde *b* equivale al porcentaje de individuos muertos en el tratamiento y *k* equivale al porcentaje de individuos muertos en el testigo.

Adicionalmente, estos resultados se sometieron a un análisis de varianza y a comparación múltiple de medias de Tukey, con el fin de evidenciar diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos.

Resultados y Discusión

Producción masiva del principio activo. En el medio de cultivo utilizado (salvado - extracto de arroz), el hongo formó un micelio firme y de color blanco que se evidenció a los cuatro días de incubación, el cual se fue tornando verde oscuro a medida que se producía la esporulación, la cual se empezó a observar a partir del décimo día de incubación. Posteriormente, fue tomando una apariencia polvosa y al décimo quinto día de incubación se suspendió la misma, ya que todo el medio estuvo colonizado y con una abundante producción de conidios. Las bandejas fueron secadas y molidas. Una vez se obtuvo el principio activo puro (medio con el hongo), después de los procesos de secado y molido, se determinó la concentración y viabilidad del mismo, siendo la primera de 1,7x10¹⁰ conidios.g⁻¹ y la segunda de 3,5x10¹¹ UFC.g⁻¹. Es importante resaltar que la producción masiva se realizó en salvado de trigo, ya que este sustrato tiene un efecto inductor de la virulencia de *M. anisopliae* (Villamizar 1998).

Caracterización física de los granulados. Se evaluaron las propiedades físicas de voluminosidad, fluidez, tamaño de partícula, porosidad, humedad y pH.

Tamaño de Partícula. En el proceso de producción de los granulados, se tuvieron en cuenta dos etapas indispensables para la obtención de un tamaño de partícula uni-

forme, los procesos de granulación y regranulación.

Los resultados de tamaño de partícula de los granulados fueron obtenidos mediante la técnica de gravimetría (Tabla 2), se analizaron mediante una distribución de frecuencias, encontrándose que para los tres granulados el porcentaje mayor de peso retenido se obtuvo en el tamiz 18 con tamaño de poro de 0,84 mm, con porcentajes de 88,3, 86,5 y 87,1%; para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente; por otra parte, los porcentajes de peso retenido en el tamiz inmediatamente anterior (10), el cual tiene un tamaño de poro de 1,42 mm fueron del 0,22, 0,13 y 0,77% para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente; por consiguiente, estos datos permiten afirmar que la mayoría de las partículas de los tres granulados se encuentran en un rango de tamaño de partícula entre 0,84 mm y 1,42 mm.

Valencia (2000) encontró, para cuatro preformulaciones granulares a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, un tamaño de partícula entre 1,5 mm y 2 mm y al ser evaluada su actividad biocontroladora, los porcentajes de control fueron 100, 100, 96,5 y 89,6%, indicando que dicho tamaño fue adecuado para este tipo de productos. Los granulados de *Metarhizium anisopliae* tienen un tamaño de gránulo menor al obtenido por Valencia, lo cual podría mejorar el cubrimiento y distribución del producto en la aplicación, repercutiendo directamente sobre la actividad biocontroladora. Además, los preformulados granulados de *M. anisopliae* presentaron un tamaño de partícula similar a la del bioplaguicida comercial BIO 1020 (0,8 mm) a base de *M. anisopliae*, indicando que los granulados desarrollados poseen características adecuadas para este tipo de formulaciones de aplicación al suelo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la proporción de polvos finos de cada uno de los granulados, se presentaron porcentajes muy bajos con valores de 0,31, 0,25 y 0,11% respectivamente, para los granulados GR1, GR2 y GR3; indicando que ninguno de los preformulados posee una consistencia frágil en el gránulo, posiblemente debido a que en el proceso de manufactura se utilizó la cantidad y concentración adecuada de agente aglutinante, lográndose una adhesión alta de las partículas. Además, los granulados elaborados mediante la técnica de extrusión manual tienden a presentar una dureza alta y por lo tanto fragilidad baja, por esto, se espera que los granulados no presenten problemas en el producto terminado cuando sea almacenado por períodos de tiempo prolongados, evitándose su compactación en la base, lo que impediría el flujo libre del producto y la utilización total del mismo (Morales 1993).

Adicionalmente, la presencia baja de polvos finos en los productos aseguran que una mayor cantidad de los mismos lleguen al sitio blanco, ya que el gránulo por su peso, cae directamente en el sitio de aplicación, mientras que los polvos finos son arrastrados por el viento y además podrían ocasionar obstrucción de las vías respiratorias de las personas que manipulan el producto en su manufactura y aplicación (Valencia 2000).

Voluminosidad. Los granulados GR1, GR2 y GR3 presentaron una voluminosidad adecuada, con valores de 3,44, 3,25 y 3,6 ml.g⁻¹ respectivamente (Tabla 3), ya que no fueron significativamente diferentes del límite máximo para dicho parámetro, el cual debe ser de 3 ml/g para que los materiales no presenten problemas durante la manipulación (Martín 1967). Resultado que permite sugerir que posiblemente ninguno de los tres granulados presentará problemas en los procesos de llenado de los recipientes, mezcla y transporte del producto terminado a escala industrial.

Valencia (2000) obtuvo voluminosidades de 1,68, 1,65, 1,86 y 1,65 ml.g⁻¹ para cuatro granulados a base de *B. bassiana*, debido a que utilizó excipientes y principio activo (arroz esporulado y molido) con voluminosidad baja. Sin embargo, a pesar de haber usado para los granulados de *M. anisopliae* excipientes de baja voluminosidad, el principio activo es un homogeneizado del medio de cultivo esporulado, el cual está constituido en su mayoría por salvado de trigo que por ser un material muy voluminoso pudo ser la causa de que

esta característica estuviera por encima del límite óptimo.

Porosidad. Esta característica es de gran importancia para los granulados, ya que es la medida de los espacios intraparticulares de un sólido y determina su fragilidad.

Los resultados obtenidos en esta prueba fueron de 18, 19 y 25% para los granulados GR1, GR2 y GR3; esto indica que hay una pequeña proporción de espacios entre partículas que forman los gránulos y por lo tanto, se espera que puedan resistir la manipulación sin fracturarse, conservando su tamaño de partícula y sin producir polvos finos que generen pérdidas del producto. El valor óptimo para esta característica es inferior a 30% y los tres granulados se encuentran por debajo de este valor, lo que permitiría deducir que los tres formulados son más compactos, característica deseable para que el producto no sea arrastrado por el viento en el momento de su aplicación.

Fluidez. Los valores de los ángulos de reposo obtenidos para los granulados GR1 y GR3, fueron los menores, siendo éstos de 27,2° y 29,8° respectivamente, y el GR2 presentó un mayor ángulo de reposo con un valor de 30,6° (Tabla 3).

De acuerdo con el valor óptimo para esta característica (< 30°), valor por debajo del cual se considera que un producto posee alta fluidez (Voight y Borns 1979), los resultados obtenidos para los granulados GR1 y GR3 se encuentran por debajo de dicho límite, sugiriendo que los granulados

Tabla 2. Distribución de frecuencias para la determinación del tamaño de partícula de los granulados por la técnica de gravimetría

Tamiz N°	Tamaño de poro	Frecuencia (Peso retenido %)		
	Mm	GR1	GR2	GR3
10	1,42	0,2	0,1	0,7
18	0,84	88,3	86,5	87,1
20	0,63	3,5	7,9	5,2
35	0,59	4,6	5,3	4,9
50	0,27	1,8	1,7	1,4
100	0,25	0,5	0,5	0,4
Finos	< 0,25	0,3	0,2	0,1

Tabla 3. Características de los granulados de *Metarhizium anisopliae*

Características	GR1	GR2	GR3	Valores óptimos
Concentración (conidios.g ⁻¹)	4,8 X 10 ⁹	5,2 X 10 ⁹	6,8 X 10 ⁹	
Viabilidad (UFC.g ⁻¹)	1,5 X 10 ⁹	2,5 X 10 ¹⁰	5,3 X 10 ¹⁰	
Voluminosidad (ml.g ⁻¹)	3,44	3,25	3,6	< 3
Porosidad (%)	18	19	25	< 30
Ángulo de reposo	27,2°	30,6°	29,8°	< 30°
Humedad (%)	9,7	6	3,3	< 10
pH	5,53	5,49	5,51	5-7

fluyen fácilmente y no presentarán problemas cuando sean manipulados en grandes cantidades en los procesos de llenado y empaque principalmente durante una producción industrial, además, la alta fluidez de los formulados favorecería la aplicación del producto por parte del agricultor pues permitiría una manipulación fácil.

Humedad. La humedad residual de un producto granulado, desarrollado a base de un hongo, es de gran importancia ya que influye directamente en la viabilidad del mismo. Los resultados de la prueba de humedad obtenidos para los tres granulados presentaron valores aceptables, siendo éstos del 9,7, 6 y 3,3% para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente (Tabla 3). Aunque el valor de porcentaje de humedad del GR1 es mayor comparado con los otros dos granulados, éste no sobrepasa el valor sugerido para este tipo de productos, el cual es inferior al 10%, para asegurar que se reduzcan al mínimo los procesos metabólicos del microorganismo y así no se produzcan pérdidas considerables de la viabilidad durante el almacenamiento (Valencia 2000).

pH. Los valores de pH para los granulados GR1, GR2 y GR3 fueron de 5,5, 5,4 y 5,5, respectivamente (Tabla 3); valores adecuados para estos productos ya que se encuentran entre 5 y 7, rango óptimo para el buen desarrollo de este tipo de microorganismos (Cenicafé 1996); lo que indica que este parámetro posiblemente no afectará la viabilidad de *Metarhizium anisopliae*.

Caracterización microbiológica de los granulados

Determinación de la concentración. La determinación de la concentración de cada

uno de los granulados expresada como conidios.g⁻¹, se evaluó desintegrándolos en agua destilada y llevando a cabo la cuantificación de conidios en cámara de Neubauer.

Las concentraciones para los granulados GR1, GR2 y GR3 fueron de 4,8 x 10⁹ conidios.g⁻¹, 5,2 x 10⁹ conidios.g⁻¹ y 6,8 x 10⁹ conidios.g⁻¹, respectivamente (Tabla 3). Este resultado indica que a pesar de las diferencias en la composición de los preformulados, todos presentan una concentración similar y adecuada para este tipo de producto, considerando que los productos comerciales a base de hongos entomopatógenos presentan concentraciones que oscilan entre 10⁷ conidios.g⁻¹ y 10¹⁰ conidios.g⁻¹.

Estabilidad microbiológica de los granulados

Uno de los aspectos básicos a evaluar en un bioplaguicida es la estabilidad de la viabilidad del microorganismo cuando éste es almacenado, ya que las condiciones de almacenamiento, pueden afectar dicha característica e influir directamente en la actividad biocontroladora del producto.

Los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad de la viabilidad de *M. anisopliae* a las tres temperaturas de almacenamiento (8, 18 y 28°C) para los tres granulados y para el principio activo (hongo sin formular) mostraron una pérdida de la misma a través del tiempo (seis meses), la cual osciló entre el 16 y el 36% (Fig. 1).

A 28°C, los granulados GR2 y GR3 presentaron pérdidas de la viabilidad del 32,7 y 32,9%, respectivamente; en comparación con el granulado GR1 y con el control

(principio activo) que presentaron pérdidas del 20,7 y 22%, respectivamente. La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un $\alpha=0,05$, no detectó diferencias significativas entre las pérdidas de viabilidad de los granulados y del principio activo, indicando que posiblemente ninguna de las formulaciones o los procesos incluidos en la formulación, confirieron estabilidad a los conidios cuando se almacenaron bajo estas condiciones.

Por otra parte, los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos almacenados a 18°C, mostraron un comportamiento similar al que se obtuvo a 28°C, en que los granulados GR2 y GR3 presentaron pérdidas considerables de la viabilidad del 36,5 y del 33,2% respectivamente; mientras que el granulado GR1 y el control (principio activo) presentaron pérdidas de viabilidad inferiores, las cuales, fueron del 21,9 y del 17%, respectivamente (Fig. 1). La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un $\alpha=0,05$ determinó que no hubo diferencias significativas entre la pérdida de viabilidad de los tres granulados, pero sí entre las del granulado GR3 y el control (principio activo), lo que sugiere que a esta temperatura, algunos de los excipientes utilizados en el granulado GR3 podrían haber afectado la estabilidad del microorganismo bajo estas condiciones de almacenamiento. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre la viabilidad de los granulados GR1, GR2 y el principio activo, se observó que los granulados presentaron una mayor pérdida de la viabilidad, sugiriendo que de igual forma que con el granulado GR1, alguno de los excipientes o de las operaciones involucradas en el proceso de manufactura, tuvieron un efecto negativo sobre la viabilidad del hongo.

La viabilidad a la temperatura de 8°C para los diferentes granulados fue la que presentó mayor estabilidad durante el almacenamiento. Para los granulados GR1, GR2 y GR3 hubo pérdidas de la viabilidad del 16,2, 23,1 y 21%, respectivamente, mientras que para el control (principio activo) ésta fue del 8,7%. El análisis estadístico con un $\alpha=0,05$ no detectó diferencias significativas entre las pérdidas de viabilidad de los tres preformulados y el principio activo, resultado que sugiere que a esta temperatura la viabilidad del microorganismo no se ve afectada por los excipientes o por el proceso de formulación en los tres granulados y dicha pérdida podría deberse a un efecto del tiempo de almacenamiento (seis meses).

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey no detectó diferencias significativas para cada uno de los tratamientos a las tres temperaturas de almacenamiento, este resultado sugiere que la temperatura no tuvo un efecto determinante en la pérdida de viabilidad del microorganismo. Sin embargo, en todos los casos las pérdidas fueron superiores cuando el almacenamiento se realizó a 28°C, seguidas por las pérdidas encontradas a

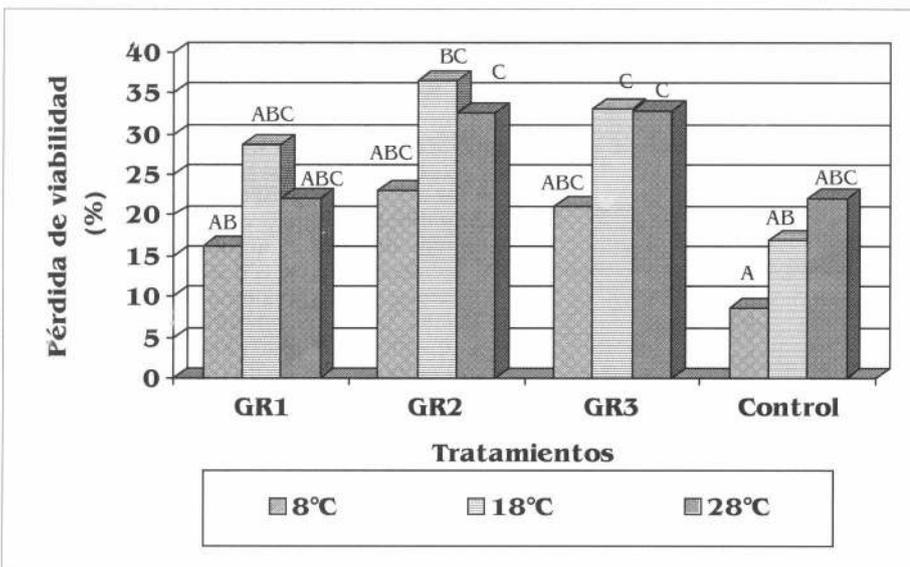


Figura 1. Pérdida de la viabilidad de preformulados a base de *M. anisopliae* bajo condiciones de almacenamiento a tres temperaturas (Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas; Tukey $\alpha=0,05$).

18°C y por último las producidas durante el almacenamiento a 8°C; esto se puede atribuir a que a temperatura ambiente y superiores a ésta, el metabolismo del microorganismo se podría encontrar aún activo y la humedad baja y la falta de nutrientes y oxígeno podrían producir la muerte celular, siendo recomendable a partir de estos resultados, el almacenamiento de los preformulados o del principio activo a 8°C para disminuir las pérdidas de viabilidad.

Resultado similar registró Valencia (2000) con los granulados de *B. bassiana* para el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, en que las menores pérdidas de viabilidad se presentaron después de seis meses de almacenamiento a una temperatura de 8°C, las cuales fueron del 8%, mientras que a 18 y 28°C las pérdidas fueron del 10,6 y 10,1%, respectivamente. Este resultado confirma que la temperatura tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de los microorganismos bajo condiciones de almacenamiento.

Las pérdidas mayores de viabilidad de *M. anisopliae* a las tres temperaturas se registraron en los granulados GR2 y GR3, los cuales tuvieron porcentajes de humedad inferiores al presentado por el granulado GR1. Este factor también podría ser causal de la pérdida de viabilidad, ya que un excesivo secado puede ocasionar una pérdida de agua intracelular y afectar negativamente la estabilidad de la célula, tal como lo encontró Valencia (2000), cuando almacenó un granulado con un porcentaje de humedad muy bajo (2,21%), y encontró pérdida de viabilidad máxima de 17,3%.

Actividad biocontroladora de los granulados

Cuando se realizó la evaluación de la actividad biocontroladora de los granulados, los porcentajes de mortalidad acumulada obtenida 32 días después de iniciado el bioensayo para los tratamientos GR1, GR2, GR3, principio activo y testigo tratado (excipientes) fueron del 42,4, 48,4, 27,2,

27,2 y 30,3%, respectivamente (Fig. 2). Estos porcentajes de mortalidad son bajos si se tiene en cuenta que el bioensayo se realizó en condiciones controladas, por lo que se esperarían porcentajes de control superiores, ya que se le están proporcionando al microorganismo, todas las condiciones para que ejerza su actividad biocontroladora. Sin embargo, en general, los resultados señalados de control de chiza con hongos entomopatógenos son bajos. Londoño y Ríos (1997) cuando evaluaron diferentes cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para el control de dos especies de chizas predominantes en Antioquia, *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata*, obtuvieron porcentajes de mortalidad acumulada del 40% después de 20 días de iniciado el bioensayo.

El porcentaje de mortalidad obtenido en el testigo absoluto para este bioensayo fue del 12,1%; un valor de mortalidad aceptable para ensayos biológicos (CIBA-GEIGY 1973) y posiblemente se puede atribuir a factores tales como el estrés causado por el confinamiento de las chizas en las cubetas y al efecto de las nuevas condiciones ambientales.

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0,2$) determinó que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad ocasionados por los granulados GR1, GR2 y los excipientes con respecto a los resultados obtenidos con el granulado GR3, el principio activo y el testigo, pero no detectó diferencias entre estos últimos. Los porcentajes de mortalidad producidos por los granulados GR1 y GR2 fueron superiores y significativamente diferentes de los producidos por el principio activo por lo que se sugeriría que la formulación potencializa la actividad biocontroladora del microorganismo, posiblemente porque el granulado posee un soporte nutricional que le brinda al hongo la posibilidad de crecimiento. Además, los granulados incluyen en su formulación un acondicionador de humedad que les proporciona una mayor posibilidad de captación de agua

para que el microorganismo pueda activar sus procesos metabólicos rápidamente y por ende desarrollar su actividad biocontroladora con más eficacia.

Se observó que los excipientes tienen actividad sobre el insecto, ya que el porcentaje de mortalidad producido por este tratamiento fue superior y significativamente diferente del obtenido con el principio activo puro y con el testigo absoluto. Esto se podría atribuir a un efecto nocivo del diluyente, el cual es una arcilla que podría tener efecto ligeramente corrosivo sobre la delicada cutícula del insecto, básicamente causando una resequead excesiva de la misma. Este efecto de los excipientes no tendría impacto sobre el hombre, pero posiblemente sí sobre otros estadios larvales de insectos que puedan ser susceptibles al mencionado efecto físico.

En el tratamiento que corresponde al granulado GR3 se presentó una mortalidad inferior y significativamente diferente de la obtenida con los otros granulados. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad para este preformulado no fue estadísticamente diferente del obtenido con el principio activo puro; lo que indicaría que la formulación de este prototipo no mejora la actividad biocontroladora del microorganismo sobre el insecto. A pesar de que este granulado también contiene los excipientes que posiblemente tienen un efecto sobre la chiza, es probable que la concentración de éstos en el prototipo, o las características físicas producidas por su combinación no afecten la actividad biocontroladora del microorganismo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación, se sugiere integrar varios microorganismos en el manejo de poblaciones de chiza y la utilización de otras alternativas de control dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

De acuerdo con las características físicas de cada uno de los granulados, su actividad biocontroladora y su estabilidad en condiciones de almacenamiento, el granulado GR1 presentó los valores más adecuados para cada una de las características físicas, un porcentaje de mortalidad del 42% y pérdidas no considerables en los porcentajes de viabilidad durante el almacenamiento a una temperatura de 8°C. Además, es importante tener en cuenta que el granulado GR1 tiene los menores costos de producción, ya que esta formulación no contiene uno de los excipientes que sí está incluido en los granulados GR2 y GR3, lo que permitiría concluir que el granulado GR1 es el preformulado que exhibe las propiedades más adecuadas para ser optimizado y evaluado en estudios posteriores.

Conclusiones

- Los tres preformulados granulados a base de *Metarhizium anisopliae* presentaron

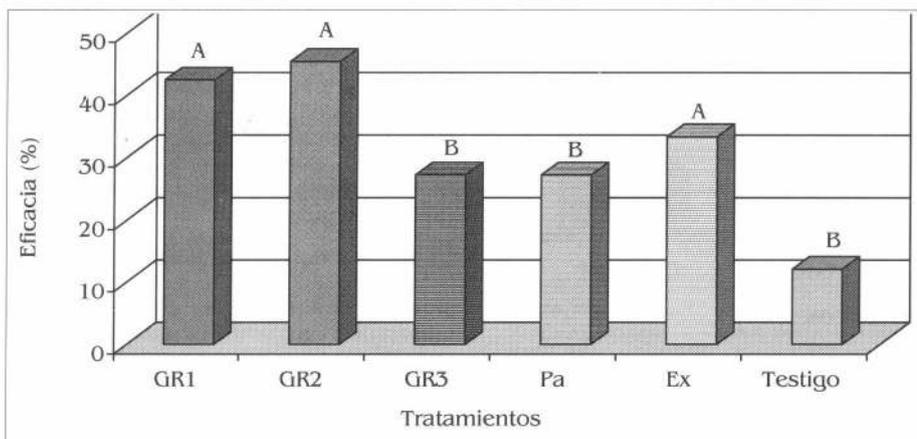


Figura 2. Efecto biocontrolador de preformulados granulados a base de *M. anisopliae* sobre *A. scarabaeoides* (GR = Granulados, Pa = Principio Activo, Ex = Excipientes) (Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas; Tukey $\alpha=0,02$).

características físicas y microbiológicas adecuadas para este tipo de productos.

- Los excipientes utilizados afectaron la estabilidad de la viabilidad del hongo bajo condiciones de almacenamiento a 8, 18 y 28°C.
- La estabilidad de la viabilidad del hongo se afectó en menor medida en la temperatura de almacenamiento de 8°C.
- Los preformulados GR1 y GR2 mostraron actividad biocontroladora promisoría sobre larvas de *A. scarabaeoides*.
- Se seleccionó el granulado GR1 por exhibir los valores óptimos para las características físicas y microbiológicas y una promisoría actividad biocontroladora.

Literatura citada

- ALVARADO, L. 1977. Prácticas culturales en papa. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Programa Tuberosas. Estación Experimental Obonuco. p. 58, 59.
- CENICAFÉ. 1996. Metodología para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Disciplina de Entomología. Chinchiná, Caldas.
- CIBA - GEIGY. 1973. Como realizar un bioensayo. En: Manual de ensayos de campo. p. 2-10.
- GALÁN, L.; TÁMEZ, R. 1993. Estado actual y perspectivas de bioinsecticidas microbianos, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 97-100.
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 1996. Estudio tecnológico para producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control biológico de la langosta de los Llanos Orientales Trabajo de Grado. Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Bogotá. p. 40-44.
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. 1997. Optimización de un preformulado a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Resúmenes XXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 107-108. Pereira.
- HELMAN, H. 1982. Farmacotecnia teórica y práctica. De Continental. México. p. 1687-1720.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. 1992. Productos químicos industriales para uso agropecuario, Plaguicidas granulados. ICONTEC. Norma Técnica 3350. Bogotá. p. 4.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. 1998. Agentes biológicos para el control de plagas, agentes microbianos a base de hongos y bacterias. Producción. ICONTEC. Norma Técnica 4422-1. Bogotá.
- LONDOÑO, M. E. 1998. La chiza o mojoyoy, un modelo de investigación entomológica. Cuarto Seminario Técnico Regional. Medellín. p. 48-55.
- LONDOÑO, M. E.; RÍOS, A. M. 1997. Efecto de diferentes agentes de control biológico sobre *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata* (Coleoptera: Melononthidae). Aconteceres Entomológicos. Grupo GEUN. Universidad Nacional sede Medellín. p. 35-42.
- MARTÍN, A. 1967. Physical Pharmacy. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 611-635.
- MORALES, L. 1993. Formulación de Bioinsecticidas, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 85-89.
- ORELLANA, H. S. 1983. Plaguicidas. La prevención del riesgo en su uso. OPS. México. p. 41-51.
- RODRÍGUEZ, S. D. A. 1983. Programa de entomología. C.I. Tibaitatá Mosquera (Cundinamarca). ICA. Informe de labores 1982 B1983 A. p. 23.
- RODRÍGUEZ, S. D. A. 1997. Biología y manejo de chizas. ICA. Boletín de Sanidad Vegetal 21. Bogotá, p. 5-24.
- USP 23. 1995. United States Pharmacopeia. Convection Rockville.
- VALENCIA, C. 2000. Control de calidad físico, biológico y microbiológico de preformulados a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) utilizados a nivel experimental para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). Trabajo de Grado. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. p. 42-77.
- VILLAMIZAR, L. F. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Tesis. M.Sc. en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p 70-78.
- VOIGHT, R.; BORNES, M. 1979. Tratado de tecnología farmacéutica. Acribia, Zaragoza, España, p. 181-194.

Recibido: Abr. 22 / 2003

Aceptado: Jul. 30 / 2003

Unión de proteínas de *Bacillus thuringiensis* con vesículas de las microvellosidades del tracto digestivo del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae)

Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins with brush border membranes vesicles of the digestive tract of the Andean potato weevil *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae)

WILSON MARTÍNEZ O.¹, JAIRO CERÓN S.²

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 51-56 (2004)

Resumen. La exploración del uso potencial de *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico de plagas requiere estudios básicos acerca de su mecanismo de acción en el insecto blanco seleccionado; de acuerdo con esto, técnicas como el empleo de vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades epiteliales del tracto digestivo de los insectos (BBMV) se han constituido en herramientas valiosas a nivel mundial para estudiar dicho mecanismo en proteínas de *B. thuringiensis*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la unión de las proteínas Cry 3Aa, 3Ba, 3Bb, 3Ca y 7Aa de *B. thuringiensis* a BBMV's obtenidas a partir del tracto digestivo del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache, con el fin de determinar la potencialidad de su uso en el control biológico de este insecto plaga de gran importancia económica en los cultivos de papa en Colombia. El trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. La purificación de las BBMV y el marcaje de las proteínas Cry con biotina se realizó de acuerdo con metodologías estandarizadas por los autores. En los ensayos de unión se determinó que mientras que las proteínas Cry3Aa, 3Bb y 3Ca se unieron a las BBMV de *P. vorax*, las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa no lo hicieron; sin embargo, en ningún caso la unión de las proteínas Cry a las BBMV del insecto se relacionó con actividad tóxica hacia larvas de primer instar del insecto blanco. Así mismo, el análisis por blotting de las proteínas que presentaron unión determinó la presencia de dos posibles proteínas receptoras de 70 y 97 KDa, respectivamente, siendo este el primer registro que se hace para este insecto endémico de la zona andina colombiana.

Palabras clave: Plaga. Proteínas Cry. Unión.

Summary. The use of *Bacillus thuringiensis* as a biological pest control agent requires basic studies related to its mode of action in the selected target insect. Techniques such as the use of brush border membrane vesicles (BBMV) obtained from epithelial gut tissues of insects have become a valuable tools around the world for studying this mechanism in *Bacillus thuringiensis* proteins. The objective of this work was to analyze the binding of Cry3Aa, 3Ba, 3Bb, 3Ca and 7Aa *B. thuringiensis* proteins to BBMV obtained from the digestive tract of *Premnotrypes vorax* Hustache, in order to explore their potential as biological control agents for this economically important pest in Colombian potato crops. This work was carried out in the Instituto de Biotecnología at the Universidad Nacional de Colombia. Purification of BBMV and protein labeling with biotin were carried out according to methods previously standardized by the authors. Binding assays showed that while Cry3Aa, Cry3Bb and Cry3Ca bind to *P. vorax* BBMV, Cry3Ba and Cry7Aa did not; however, binding was never correlated with toxicity to first instars of the target insect. Protein blot analysis showed the presence of two possible binding proteins of 70 and 97 KDa, respectively, being the first report made for this endemic pest of the Colombian Andean zone.

Key words : Pest. Cry proteins. Binding.

Introducción

El control biológico de los organismos que afectan la producción agrícola mundial ha tenido en los últimos años gran auge a causa de la nueva orientación ecológica y sustentable de la agricultura (Orr y Charles 1998). De esta forma, herramientas como los insecticidas de origen microbiano han sido involucradas como un elemento valioso dentro de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) en diferentes

cultivos (Lecuona 1996). Las bacterias son uno de los grupos más estudiados como agentes de control de plagas a nivel mundial, siendo *Bacillus thuringiensis* Berlier (*B. t.*) la más representativa (Lecuona 1996). Los productos desarrollados a base de *B. t.* representan entre el 80-90% del mercado internacional de bioplaguicidas (Van Frankenhuyzen 1993).

La mayoría de estudios con *B. t.* se enfocan al control de plagas del orden Lepidop-

tera; sin embargo, también se han desarrollado trabajos con insectos del orden Coleoptera y Diptera, lo cual ha ampliado las perspectivas de investigación y explotación comercial de esta bacteria (Keller y Langenbrunch 1993). A este respecto, dentro de los logros tecnológicos a nivel industrial se destacan productos desarrollados por multinacionales con la variedad de *B. t. tenebrionis* con actividad reconocida en insectos del orden Coleoptera y plantas transgénicas modificadas con

1 Autor para correspondencia: M. Sc. en Entomología. Laboratorio de Entomología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. A. A. 14490. E-mail: wilmarti@ibun.unal.edu.co

2 Ph. D. en Biotecnología. Director grupo de Biopesticidas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. E-mail: jaceron@ibun.unal.edu.co

genes de *B. t.* que expresan proteínas con actividad tóxica hacia coleópteros plaga (McPherson *et al.* 1988).

Los modelos para el estudio del mecanismo de acción de *B. t.* han sido desarrollados utilizando diversas metodologías, principalmente estudios *in vitro*, para determinar cada uno de los pasos que siguen las proteínas del cristal desde su ingestión hasta causar la muerte del insecto. Se han desarrollado estrategias como el empleo de intestinos aislados de insectos, que permite un sistema modelo para investigar la bioquímica del proceso de intoxicación en más detalle, separándolo de las complejidades presentes en el insecto intacto (Bravo *et al.* 1992a,b). De otra parte, se han generado líneas celulares de insectos (principalmente lepidópteros) lo cual permite identificar los efectos moleculares primarios importantes para la toxicidad de las proteínas de *B. t.* como unión a las proteínas receptoras y respuestas citotóxicas; así mismo, se han empleado vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino del insecto, que corresponden a las membranas plasmáticas de las microvellosidades del lumen conocidas como BBMV, para estudios electro y quimicofísicos como transporte de iones y unión de las toxinas a las proteínas receptoras (Schwab y Culver 1990).

A pesar de que existen algunos inconvenientes en el uso de modelos *in vitro*, relacionados con modificaciones de las condiciones reales en las que actúan las δ endotoxinas de Bt, dichas metodologías son herramientas importantes para un acercamiento al mecanismo de acción de tales proteínas, y específicamente el uso de las BBMV, se ha constituido en una de las técnicas más empleadas para estudios de unión toxina-receptor (Schnepf *et al.* 1998).

En Colombia existe un número importante de plagas agrícolas del orden Coleoptera de impacto económico (Vélez 1997). Dentro de éstas, el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache, es una de las dos plagas más limitantes para este cultivo en el país. Dicho insecto ha permanecido como plaga principal de la papa desde hace más de 50 años cuando apareció en el departamento de Nariño y puede causar pérdidas en la producción de papa hasta de un 90% (Vélez 1997). Se encuentra distribuido en las principales zonas productoras de papa de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Cauca, Caldas y Antioquia y su control se realiza empleando principalmente insecticidas altamente tóxicos (Rivera y Pinto 2001).

En Colombia se hace necesario realizar investigaciones que permitan desarrollar estrategias que se articulen en sistemas de manejo integrado para el control de esta plaga, minimizando el empleo de productos químicos que generan riesgo para la salud de productores y consumidores,

teniendo en cuenta que este tubérculo es uno de los productos de mayor consumo en el país (Pinzón 1993). La implementación de estrategias de control biológico de plagas, como los entomopatógenos tipo *B. thuringiensis*, implica la realización de investigaciones básicas respecto de su mecanismo de acción para determinar la potencialidad de su empleo. Para el caso del gusano blanco de la papa esto también es válido.

De acuerdo con lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo determinar, mediante una metodología de ensayo *in vitro*, si existía unión de proteínas Cry de *B. thuringiensis*, referenciadas como tóxicas para coleópteros, con vesículas del tracto digestivo del gusano blanco de la papa para determinar de forma preliminar el potencial de algunas de estas proteínas para ser utilizadas en el desarrollo futuro de productos tecnológicos que puedan constituirse en nuevas herramientas dentro de un programa de manejo integrado del gusano blanco de la papa en Colombia.

Materiales y Métodos

Purificación de proteínas Cry

Las proteínas Cry evaluadas se obtuvieron de cepas patrón de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Las características de las proteínas de las cepas evaluadas se presentan en la tabla 1.

Las cepas se cultivaron en medio agar Luria Bertani a 37°C por 10-15 días, hasta alcanzar un porcentaje de esporulación superior al 90%. La biomasa se recolectó y lavó con agua destilada-desionizada estéril y subsecuentes centrifugaciones a 4°C, 8.000 rpm por 10 minutos para eliminar residuos del medio de cultivo. El material obtenido fue posteriormente liofilizado durante 12 h y almacenado hasta su uso.

Se realizó purificación de las proteínas mediante solubilización de los cristales en solución buffer de carbonato de sodio pH10 (Na₂CO₃ 100 mM, PMFS 100 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM) por 2 h a 37°C, centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos y filtrado del sobrenadante con membrana de 0,22 mm. Se hizo análisis microscópico para corroborar la ausencia de esporas en las muestras.

Tabla 1. Características generales de las proteínas de las cepas de *B. thuringiensis* empleadas en las evaluaciones de unión con las BBMV's de *P. vorax* y los bioensayos con larvas de primer ínstar del mismo insecto

CEPA	GENES	PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (KDa)*	
			PROTOXINA	TOXINA
3A	cry3Aa	Cry3Aa	70 - 75	66
3Ba	cry3Ba	Cry3Ba	70 - 75	66
3Bb	cry3Bb	Cry3Bb	70 - 75	66
3C	cry3Ca	Cry3Ca	70 - 75	66
7A	cry7Aa	Cry7Aa	130	66

* Pesos aproximados según Quiñones y Quintero (1996).

El fragmento tóxico de las proteínas fue obtenido con procesamiento de las mismas por la enzima Tripsina (Tipo II de páncreas porcino), mediante la observación previa de la cinética del procesamiento para cada una de ellas, la cual se realizó con exposiciones continuas y a diferentes tiempos de las proteínas a la enzima (Bollag y Edelman 1991). Se empleó una proporción enzima: protoxina que osciló entre 2:1 y 10:1 con incubación por 12 h a 37°C. Se corroboró el procesamiento de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La toxina en forma soluble fue dializada posteriormente en buffer borato pH 8,6 durante una noche.

Marcaje de toxinas

Las toxinas de *B. thuringiensis* a evaluar fueron marcadas siguiendo el protocolo de Denolf *et al.* (1993a), con algunas modificaciones. Se realizó marcaje de las toxinas con biotina empleando un kit para marcaje de proteínas (ECL Protein Biotinylation Module, Amersham). El marcaje se realizó en proporción de 20 μ l de biotina por cada 0,6 mg/ml de toxina. Se agitó la mezcla y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizó filtrado en columna Sephadex G25 eluyendo la muestra con solución buffer de fosfatos pH 7,4 y recolectando alícuotas de 500 μ l. Se comprobó el marcaje de la toxina mediante una prueba de dot-blot, empleando conjugado de Streptavidina-peroxidasa y revelando con solución de diaminobencidina. Así mismo se corroboró la integridad de la proteína durante el marcaje, mediante SDS-PAGE al 9%.

Purificación de vesículas

La preparación de las vesículas de las microvellosidades de células epiteliales del tracto digestivo de *P. vorax* (BBMVs) se realizó con la metodología estandarizada por Martínez y Cerón (2003) quienes tomaron como base las metodologías desarrolladas por Wolfersberger *et al.* (1987) y MacIntosh *et al.* (1994).

El método de purificación se inicia con el macerado de 300 larvas de último ínstar del insecto en solución buffer MET pH 7,5 (Manitol 300 mM, Tris 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, PMFS 0,5 mM, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, SBT y neomicina sulfato 1 μ g)

ml); el material obtenido se centrifuga a 3.500 rpm por 15 minutos y se filtra. Se adiciona solución buffer MET y se homogeniza a 2.000 rpm empleando un macerador de tejidos (Potter-Elvehjem Wheaton). El homogenizado se mezcla con $MgCl_2$ 24 mM y se deja en hielo 15 minutos. Se realiza una centrifugación a 4.500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se centrifuga a 16.000 rpm por 30 minutos. La pastilla obtenida se suspende en buffer MET y se repite el proceso descrito una vez más. La pastilla obtenida se suspende en buffer MET, se cuantifica la proteína total presente empleando el método de Bradford (Bollag y Edelstein 1991) y se determina la presencia de las vesículas en el purificado mediante SDS-PAGE en gel al 9% y microscopía electrónica de transmisión. El material restante se almacena en nevera a $-70^\circ C$.

Ensayos de unión proteínas-vesículas

La unión de la toxina con las BBMV del insecto se evaluó mediante la metodología de Denolf *et al.* (1993a), modificada. Se descongeló lentamente una alícuota de vesículas y se centrifugó a 13.000 rpm por 40 minutos. La pastilla se resuspendió en buffer PBS con BSA al 0,1%. Las vesículas se mezclaron con una cantidad adecuada de toxina marcada y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Se realizó centrifugación a 13.000 rpm por 40 minutos y se lavó el pellet con el buffer ya descrito. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió la pastilla en buffer de carga para realizar posteriormente una electroforesis. Una vez separadas las proteínas se procedió a su transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación de la misma toda la noche en solución buffer de bloqueo pH 7,5 (Ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, reactivo de bloqueo 1%). Los geles obtenidos en la electroforesis se colorearon con azul de Coomassie para corroborar el proceso de transferencia. La membrana bloqueada se lavó, se incubó por 1 h con el conjugado de streptavidina-peroxidasa 1:1000 en PBS y se reveló con diaminobencidina. Cada ensayo se realizó por triplicado para corroborar los resultados obtenidos. Se emplearon como muestras control, la toxina marcada sola y las vesículas solas procesadas de la misma forma que las muestras problema. En todos los ensayos de unión de vesículas con proteínas biotiniladas se empleó una concentración de purificado de vesículas de 1 mg/ml.

Análisis de proteínas por blotting

Las proteínas de Bt, que presentaron unión a las vesículas de *P. vorax* en los ensayos iniciales se analizaron con la técnica de blotting (Aranda *et al.* 1996), con el fin de identificar posibles proteínas receptoras de proteínas Cry presentes en purificado de BBMV.

Las proteínas del purificado de BBMV se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 9%. Se realizó transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa durante 30 min a 20 V. La

membrana obtenida se incubó toda la noche en solución buffer TBS (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) y luego se bloquearon los sitios de unión no específica incubándola en buffer TBS + tween 20 0,5% + BSA 3%. Posteriormente, se incubó la membrana por 3 h con la proteína marcada y luego se realizó el revelado incubando inicialmente con el conjugado streptavidina peroxidasa y luego con diaminobencidina en buffer TBS.

Bioensayos

Los bioensayos se realizaron empleando cubos de tubérculos de papa de $0,25\text{ cm}^3$, a los cuales se les aplicaron superficialmente las proteínas de *B. thuringiensis* ya fueran suspendidas o solubilizadas (Martínez y Cerón 2002). Los cubos de papa se dejaron secar al ambiente y posteriormente se colocaron en placas para cultivo de células de 24 pozos, poniendo un cubo por pozo. Se infestó cada cubo de papa con una larva de primer instar de *P. vorax*, obtenidas de una colonia del insecto mantenida en condiciones de laboratorio ($18^\circ C$ en promedio). Las placas se sellaron, taparon y se almacenaron por 7 días hasta la lectura del ensayo. En los bioensayos se empleó la proteína en forma suspendida (cristales), soluble y procesada enzimáticamente, para observar si existía algún efecto del procesamiento sobre la toxicidad de la misma (García *et al.* 2000; Koller *et al.*; 1992; Lambert *et al.* 1992). Las proteínas empleadas en forma soluble fueron solubilizadas en dos condiciones diferentes, ácida (pH 4,1) y alcalina (pH 10,0). Para la solubilización a pH 4,1 se empleó una solución buffer universal. Para la solubilización a pH alcalino se empleó una solución buffer de carbonato de sodio. La solubilización se llevó a cabo para ambos tipos de buffer a $37^\circ C$, durante 3 h en agitación constante. Una vez solubilizado el material, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido, que corresponde a la proteína soluble, se dividió en alícuotas y se almacenó a $0^\circ C$.

En los bioensayos se empleó una dosis de $10\ \mu\text{g}$ de proteína/ cm^2 de dieta. Se utilizó en los ensayos con proteína suspendida un testigo absoluto con el agua destilada empleada en los tratamientos y en los bioensayos con proteína solubilizada testigos relativos con las soluciones buffer empleadas en la solubilización de las proteínas.

El diseño experimental utilizado en todos los bioensayos fue completamente al azar (Martínez y Martínez 1997) con tres repeticiones por tratamiento, empleando 24 larvas por repetición. Los ensayos se hicieron por triplicado en días diferentes. La variable respuesta fue el número de larvas muertas por tratamiento.

Resultados y Discusión

Unión vesículas-proteínas

El mecanismo de acción de *B. thuringiensis* conlleva varios pasos entre los cuales la

unión proteína receptor se considera como uno de los más cruciales para que se ejerza el efecto tóxico sobre un insecto blanco determinado. La unión de proteínas de *B. t.* se presenta de manera general con proteínas receptoras presentes en purificados de BBMV del tracto digestivo de diferentes insectos, como ha sido ampliamente registrado en la literatura internacional (Hofmann *et al.* 1988; Van Rie *et al.* 1989, 1990; Estada y Ferre 1994; Bravo *et al.* 1992a,b; Denolf *et al.* 1993b; Sakai *et al.* 2000).

En el presente trabajo se empleó, para las pruebas de unión, purificado de BBMV obtenido de larvas de gusano blanco de la papa en el cual la presencia de BBMV se corroboró mediante microscopía electrónica de transmisión como se observa en la figura 1.

En los ensayos con la proteína Cry3Aa se observó la unión de dicha proteína con las proteínas presentes en el purificado de vesículas de *P. vorax*. Como se aprecia en la figura 2 se presentó una banda en la línea 3 correspondiente a la muestra de la proteína Cry3Aa biotinilada mezclada con las vesículas del insecto blanco, lo cual indicó que hubo unión entre éstas. Así mismo, se observó la presencia de las bandas esperadas en la línea 1 que contiene la muestra de proteína marcada sola y la no presencia de bandas en la línea 2 que contiene sólo muestra de BBMV. Estas dos últimas muestras mencionadas se emplearon como controles positivo y negativo, respectivamente.

En ensayos similares a los desarrollados en el presente trabajo, García *et al.* (2000), empleando la proteína Cry3A y vesículas de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Tenebrio molitor* (Linné) observaron una

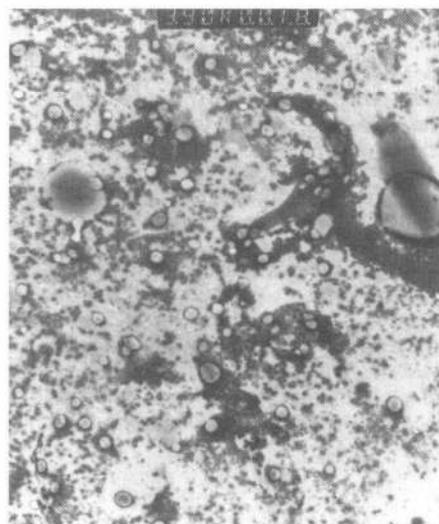


Figura 1. Fotografía en microscopio electrónico que muestra la presencia de vesículas redondas y ovaladas de diferentes tamaños en el purificado de las microvellosidades del tracto digestivo del gusano blanco de la papa *P. vorax*, obtenido a partir de larvas completas de último instar.

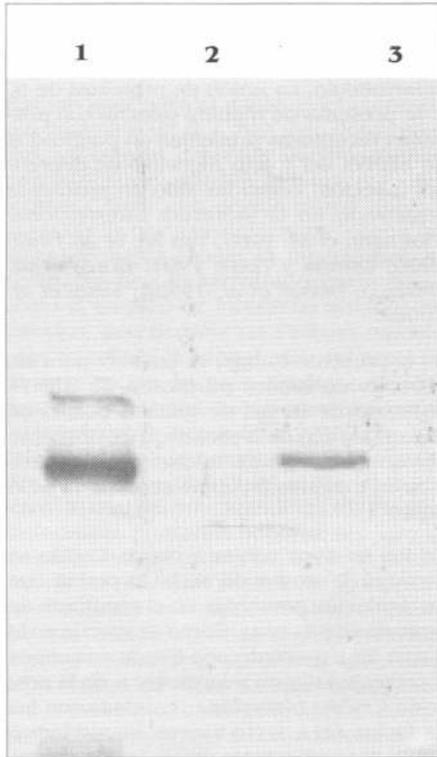


Figura 2. Membrana de nitrocelulosa que muestra el ensayo de unión con la proteína Cry3Aa y las BBMV's de *P. vorax*. Línea 1, proteína marcada con biotina; Línea 2, purificado de las BBMV; Línea 3, proteína Cry3Aa mezclada con el purificado de las BBMV. Nótese la unión de la proteína Cry3Aa con las BBMV's por la presencia de la banda en la línea 3.

unión específica de dicha proteína con las proteínas receptoras del tracto digestivo de ambos insectos en forma similar a la unión observada con las vesículas de *P. vorax*. De igual forma también se ha detectado unión de la proteína Cry3Aa marcada con yodo radiactivo con vesículas de *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber (Slaney *et al.* 1992).

Las proteínas Cry3Bb y Cry3Ca, en forma similar a la proteína Cry3Aa, se unieron a las proteínas de las vesículas de *P. vorax* (Fig. 3, líneas 4 y 5). Igualmente se observaron las bandas correspondientes a las proteínas solas biotiniladas, en las líneas 1 y 2. No se vieron bandas en la línea 3 correspondiente a la muestra de purificado de vesículas.

En el caso de las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa no se evidenció unión a las vesículas de *P. vorax* (Fig. 4). Se observaron las bandas de las dos proteínas marcadas Cry3Ba y Cry7Aa (líneas 1 y 2, respectivamente). No se vieron bandas en la línea 3 correspondiente a las vesículas solas, como se esperaba. Por otro lado, tampoco se detectaron bandas en las líneas 4 y 5, correspondientes a las vesículas mezcladas con las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa, respectivamente.

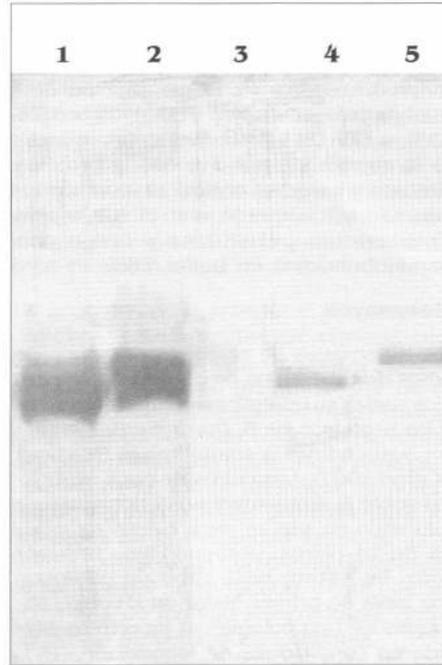


Figura 3. Membrana de nitrocelulosa que muestra el ensayo de unión con las proteínas Cry3Ca y Cry3Bb y las BBMV's de *P. vorax*. Línea 1, proteína Cry3Ca biotinilada; Línea 2, proteína Cry3Bb biotinilada; Línea 3, purificado de las BBMV; Línea 4, Proteína Cry3Ca mezclada con las BBMV; Línea 5, proteína Cry3Bb mezclada con las BBMV. Se evidencia la unión de las proteínas Cry con las BBMV's por la presencia de bandas en las líneas 4 y 5.



Figura 4. Membrana de nitrocelulosa que muestra el ensayo de unión con las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa y las BBMV's de *P. vorax*. Línea 1, proteína Cry3Ba biotinilada; Línea 2, proteína Cry7Aa biotinilada; Línea 3, purificado de las BBMV; Línea 4, Proteína Cry3Ba mezclada con las BBMV; Línea 5, proteína Cry7Aa mezclada con las BBMV. Se evidencia la no unión de las proteínas Cry con las BBMV's por lo ausencia de bandas en las líneas 4 y 5.

En la literatura no se mencionan ensayos de unión de las proteínas Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca o Cry7Aa a vesículas de insectos, por lo tanto los resultados obtenidos son el primer registro que explora la unión de dichas proteínas con el intestino de un insecto del orden Coleoptera. De acuerdo con esto se hacen relevantes los dos tipos de comportamientos de unión observados entre las vesículas de *P. vorax* y las proteínas Cry evaluadas; por un lado, la unión con las proteínas Cry3Aa, 3Bb y Cry3Ca y por otro lado, la no unión con las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa.

Los dos comportamientos mencionados pueden deberse a una conformación distinta de la estructura de las proteínas, específicamente dominios II y III, involucrados en el reconocimiento y unión a los receptores del intestino de los insectos, que las hace expresar diferente afinidad a las vesículas de *P. vorax*. Vale la pena resaltar los comportamientos de unión de las proteínas Cry3Ba y Cry3Bb, que aunque son proteínas con una alta homología según el esquema de clasificación actual, presentan diferente afinidad por las vesículas del insecto blanco, lo cual concuerda con la alta especificidad de las proteínas de *B. t.* por un insecto blanco dado.

En vista de los diferentes comportamientos de unión de las proteínas, se seleccionaron las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca para el análisis por blotting, las cuales fueron las únicas que se unieron al purificado de las BBMV de *P. vorax*.

Análisis de proteínas por blotting

Las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca que presentaron unión con las vesículas de *P. vorax*, se sometieron a análisis por blotting. Los resultados obtenidos en dicho análisis se observan en la figura 5 en donde las líneas 1, 2 y 3 corresponden a las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca, respectivamente.

Las tres proteínas evaluadas presentaron un patrón similar de unión a las proteínas del purificado de BBMV del insecto blanco; sin embargo, se observó que las tres proteínas se unieron en mayor proporción a dos proteínas de aproximadamente 97 y 70 kDa. De acuerdo con esto, dichas proteínas pueden constituirse en dos posibles proteínas receptoras de las proteínas Cry mencionadas. En la literatura no son muchos los registros de proteínas receptoras en insectos. Empleando la misma metodología de análisis de proteínas por blotting, Garczynski *et al.* (1991) identificaron en BBMV de *Manduca sexta* (Linné) una proteína de 120 kDa, que posteriormente se identificó como un posible receptor para la proteína Cry1Ac (Chambers *et al.* 2000) y una proteína de 210 kDa como receptora de la proteína Cry1Ab. Para la proteína Cry1Ac en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith ellos encontraron una posible proteína receptora de 148 kDa y en *Heliothis virescens* (Fabricius) y *Heliothis zea* (Boddie) encontraron varias posibles proteínas receptoras de 155, 120, 103, 90

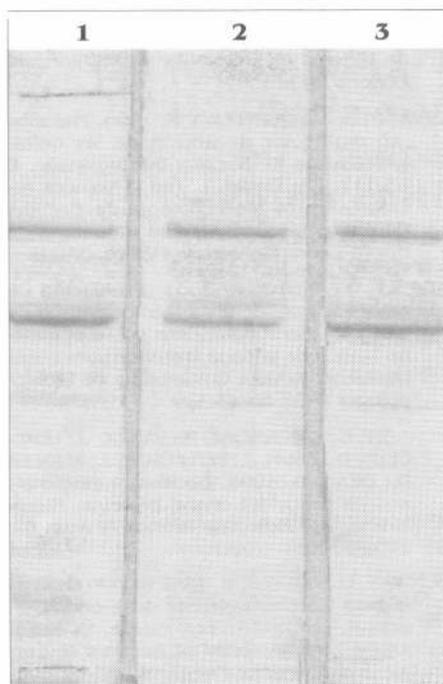


Figura 5. Membranas de nitrocelulosa que muestran el análisis de proteínas mediante la técnica de blotting. Línea 1, proteína Cry3Aa; Línea 2, proteína Cry3Bb; Línea 3, proteína Cry3Ca. Se observan las bandas de 97 y 70 KDa correspondientes a las proteínas del purificado de BBMV's de *P. vorax* receptoras para las 3 proteínas Cry evaluadas.

y 63 KDa. Así mismo se han descrito proteínas receptoras con función aminopeptidasa en *H. virescens*, *Limantria dispar* (Linné) y *Plutella xylostella* (Linné) (Aranda 1996).

En insectos del orden Coleoptera, Belfiore *et al.* (1994) registraron por primera vez una proteína receptora de 144 KDa, presente en el intestino de *T. molitor*, a la cual se une la proteína Cry3A.

De acuerdo con lo anterior, el presente sería el primer registro que se hace de posibles proteínas receptoras de las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca de Bt en el intestino de *P. vorax*, las cuales merecerían una caracterización posterior más detallada.

Bioensayos

Analizando la actividad tóxica obtenida con las proteínas evaluadas y las características de unión a las vesículas del insecto blanco, se observó un aspecto interesante: aunque las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca se unieron a las vesículas de *P. vorax*, estas proteínas no presentaron efecto tóxico sobre las larvas de primer instar empleadas en los bioensayos (Tabla 2). Los resultados obtenidos concuerdan con lo señalado por Slaney *et al.* (1992), quienes encontraron una actividad tóxica baja (9% mortalidad) de la proteína Cry3Aa en larvas de *D. undecimpunctata* a pesar de que observaron unión de dicha proteína con las BBMV de este insecto. Ellos atribu-

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad promedio obtenidos a los 7 días en los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax* y cada una de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* evaluadas. Concentración de proteína total 10 µg/cm² de dieta

	Proteína Soluble		Proteína Suspendida	Proteína Tripsinada
	pH 4,1	pH 10		
Testigo	0,00	4,16	0,00	0,00
Cry3Aa	0,00	9,72	5,55	0,00
Cry3Ba	0,00	8,33	4,16	0,00
Cry3Bb	0,00	8,33	4,16	0,00
Cry3Ca	0,00	4,16	5,55	0,00
Cry7Aa	0,00	9,72	2,77	0,00

yen este comportamiento a una afinidad reducida de la proteína por los sitios de unión en la membrana intestinal del insecto y a un cambio muy leve en la permeabilidad de la misma. Lo anterior puede también ser válido para explicar la poca actividad tóxica de las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca obtenidas en los bioensayos con *P. vorax*, aunque se trate de un insecto diferente.

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que, independientemente de su comportamiento de unión, ninguna de las proteínas evaluadas tuvo un efecto tóxico marcado sobre larvas de primer instar de *P. vorax*. Estos resultados concuerdan con el planteamiento que a pesar que el proceso de unión entre las proteínas y los receptores se dé, la capacidad de causar la muerte del insecto estará determinada por una unión específica saturable y la consiguiente inserción de la toxina en la membrana intestinal del insecto para la formación del poro (Aranda *et al.* 1996). Lo anterior permitiría plantear que la unión establecida entre las proteínas Cry evaluadas y las proteínas receptoras del purificado de las BBMV fue de carácter no específico y reversible, lo cual no permitió que se realizara la inserción del dominio I en la membrana intestinal de *P. vorax* y la consiguiente formación del poro.

Otra posible explicación para los resultados observados radicaría en que a pesar de que hubo unión entre las proteínas tóxicas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca y los receptores del intestino de *P. vorax*, en condiciones *in vitro*, otros factores como la presencia de proteasas en el intestino de los insectos capaces de degradar las proteínas Cry haciéndolas no tóxicas, estarían influyendo en la inactividad de dichas proteínas en los ensayos *in vivo*. Este fenómeno fue descrito por Losevaa *et al.* (2001) quienes realizaron un estudio del efecto de los cambios en la actividad de proteasas en el intestino del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* sobre la proteína Cry3Aa y hallaron que la resistencia de este insecto a dicha proteína se correlacionaba con alteraciones específicas en la actividad de proteasas en el tracto digestivo y una reducción en la unión de las toxinas.

Por otro lado, de acuerdo con ensayos sobre formación de poro con la proteína Cry3Aa en membranas de coleópteros, los cuales han determinado que el pH y la activación de la toxina tienen un papel crítico en este fenómeno (García *et al.* 2000) y después de haber realizado bioensayos con las proteínas Cry en diferentes presentaciones (suspendidas, solubles y tripsinadas) sin obtener actividades tóxicas significativas, se elimina la posibilidad que este tipo de factores hubieran podido interferir en la toxicidad de las mismas.

Conclusiones

- Las proteínas de *B. thuringiensis* Cry3Ba y Cry7Aa no presentaron actividad tóxica hacia larvas de primer instar de *P. vorax*, esto se debió a que el insecto no tiene en su epitelio intestinal proteínas receptoras para dichas proteínas Cry.

- Las proteínas de *B. thuringiensis* Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca no mostraron actividad tóxica hacia larvas de primer instar de *P. vorax*, a pesar de que se observó la existencia de proteínas receptoras para ellas en el purificado de las BBMV del insecto. Esto es atribuible a dos factores: unión vesículas-proteínas de carácter reversible, sin lograrse la internalización de la toxina en la membrana epitelial del tracto digestivo del insecto o presencia de proteasas en el tracto digestivo de *P. vorax* que degradan las toxinas haciéndolas inactivas.

- La evaluación de las proteínas de *B. thuringiensis* por blotting permitió identificar dos posibles proteínas receptoras para las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca en las células epiteliales del intestino de *P. vorax*, siendo este el primer registro que se hace para un insecto coleóptero endémico de la región andina.

- Las proteínas Cry de Bt evaluadas por no tener una alta actividad tóxica hacia el gusano blanco de la papa presentan poco potencial para ser empleadas en el control de este insecto plaga; por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de otras cepas que contengan proteínas diferentes para su evaluación.

Literatura citada

- ARANDA, E. 1996. Análisis de las interacciones *in vitro* e *in vivo* de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* con el epitelio intestinal de diferentes insectos plaga. Tesis de grado Ph. D. en Biotecnología. Universidad autónoma del estado de Morelos, Cuernavaca, México. 100 p.
- ARANDA, E.; SÁNCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 203-212.
- BELFIORE C. J.; VADLAMUDI R. K.; OSMAN Y. A.; BULLA L. E. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* (L.) for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200 (1): 359-364.
- BOLLAG, D.; EDELSTEIN, S. 1991. Protein methods. Wiley and Sons Inc. New York. 250 p.
- BRAVO, A.; HENDRICKX, K.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. 1992a. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 247-253.
- BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. 1992b. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 237-246.
- CHAMBERS, C.; CARROLL, J.; ELLAR, D. 2000. Characterization of the CryIAC-binding carbohydrate epitopes on *Manduca sexta* 120 kDa aminopeptidase. Resúmenes. XXXIII Meeting Society for invertebrate pathology. p. 33. Guanajuato, México.
- DENOLF, P.; JANSENS, S.; VAN HOUTT, S.; PEFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. 1993a. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6): 1821-1827.
- DENOLF, P.; JANSEN, S.; PEFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. 1993b. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6): 1828-1837.
- ESTADA, U.; FERRE, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the Cabbage Looper *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (10): 3840-3846.
- GARCÍA, I.; SÁNCHEZ, J.; RAUSELL, C.; MARTÍNEZ, A.; DE MAAG, R.; REAL, M.; BRAVO, A. 2000. Specific binding and pore formation activity of Cry3A toxin in membranes isolated from *Leptinotarsa decemlineata* and *Tenebrio molitor*. Resúmenes XXXIII Meeting Society for Invertebrate Pathology. p. 33. Guanajuato, México.
- GARCZYNSKI, S.; CRIM J.; ADANG, M. 1991. Identification of putative insect brush border membrane binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (10): 2816-2820.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 85: 7844-7848.
- KELLER, B.; LANGENBRUNCH, G. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*. p. 171-191. En: Johnson, H. (ed.). *Bacillus thuringiensis* An environmental biopesticide: Theory and Practice. Wiley and Sons publishers. London, England. 305 p.
- KOLLER, C.; BAUER, L.; HOLLINGWORTH, R. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. *Biochemical and biophysical research communications* 84 (2): 692-699.
- LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSEN, S.; SOETAERT, J.; PEFEROEN, M. 1992. Novel *B. thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and environmental Microbiology* 58 (8): 2536-2542.
- LECUONA, R. 1996. Control microbiano, utopia o realidad. p. 13-15. En: Lecuona, R. (ed.). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Mariano Mas. Buenos Aires. Argentina. 338 p.
- LOSEVAA, O.; IBRAHIM, M.; CANDASA, M.; KOLLER, N.; BAUER, L.; BULLA, L. 2001. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemical and Molecular Biology* 32 (5): 567-577.
- MACINTOSH, S.; LIDSTER, B.; KIRKHAM, L. 1994. Isolation of brush border membrane vesicles from whole diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 97-98.
- MACPEARSON, S.; PERLAK, F.; FUCHS, R.; MARRONE, P.; LAVRIK, P.; FISCHHOFF, D. 1988. Characterization of the coleopteran specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* Var. *tenebrionis*. *Bio/Technology* 6 (1): 61-66.
- MARTÍNEZ, W.; CERÓN, J. 2002. Evaluación de la toxicidad de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner hacia el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache. *Agronomía Colombiana* 19 (1-2): 89-95.
- MARTÍNEZ, W.; CERÓN, J. 2003. Obtención de vesículas de las microvellosidades del epitelio intestinal del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*. *Revista Colombiana de Biotecnología* IV (2): 33-37.
- MARTÍNEZ, R.; MARTÍNEZ, N. 1997. Diseño de experimentos: Análisis de datos estándar y no estándar. Editora Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia. 479 p.
- ORR, D.; CHARLES, P. 1998. Parasitoid and predators. p. 3-34. En: Rechcigl, J. (ed.) *Biological and biotechnological control of insect pests*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 375 p.
- PINZÓN, M. A. 1993. Calendario de siembras, recolección y proceso de comercialización de la papa en Colombia. IICA Colombia. Bogotá. 80 p.
- QUIÑONES, L.; QUINTERO, R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. p. 63-112. En: Galán, L. (ed.). *Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis**. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 350 p.
- RIVERA, G.; PINTO, L. 2001. Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3 (2): 53-65.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; LERELUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-805.
- SCHWAB, G.; CULVER, P. 1990. In vitro analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action. p. 36-45. En: Hickle, L. (ed.). *Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis**. American Chemical Society. Washington. USA. 306 p.
- SAKAI, H.; OTAKE, K.; ESAKI, M.; KOMANO, T.; YAMAGIWA, M. 2000. Binding of ICP to the BBMV's and midgut epithelia of *Culex pipiens* and *Bombyx mori* larvae. Resúmenes. XXXIII Meeting Society of Invertebrate Pathology. p. 85. Guanajuato, México.
- SLANEY, A.; ROBBINS, H.; LEIGH, E. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry IIIA: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata* Howard Barber. *Insecticidal Biochemical Molecules* 22 (1): 9-18.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. p. 1-35. En: Johnson, H. (ed.). *Bacillus thuringiensis* An environmental biopesticide: Theory and Practice. Wiley and Sons publishers. London, England. 305 p.
- VAN RIE, J.; JANSEN, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *European Journal of Biochemistry* 186: 239-247.
- VAN RIE, J.; JANSEN, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (5): 1378-1385.
- VÉLEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia : bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 482 p.
- WOLFERSBERGER, M.; LUTHY, F.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, V.; GIORDANA, B.; HANOZET, G. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting BBMV's from the larval midgut of the cabbage butterfly. *Compendium of Biochemical Physiology* 86: 301-308.

Dinámica de la captura de *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) y la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en trampas con diferentes tipos de atrayentes en un cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*)

Capture dynamic of *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) and the Guatemalan potato tuber moth *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in traps with different types of attractants in a potato crop (*Solanum phureja*)

JULIO RICARDO GALINDO P.¹, JEANNETTE AMPARO ESPAÑOL A.²

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 57-64 (2004)

Resumen. En el Centro Experimental de Corpoica Tibaitatá se realizó el seguimiento de todo el ciclo de desarrollo de un cultivo de papa criolla para evaluar la dinámica de captura del gusano blanco y la polilla guatemalteca considerando dos períodos: antes y después del aporque. Se utilizaron trampas que se seleccionaron de trabajos anteriores por las capturas altas y su utilidad para evaluar el comportamiento de los insectos de interés. Para el gusano blanco se seleccionaron las trampas de caída tipo malla con partes de la planta de papa como atrayente y las trampas con insectos en grupos de machos y hembras de la misma especie utilizados como atrayentes. Como testigo se incluyeron trampas de costal recomendadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP), para esta misma especie. Cada tipo de trampa reflejó de manera diferente la actividad del insecto y en su conjunto permitieron determinar dos épocas del cultivo, en las cuales los adultos de gusano blanco presentaron una mayor actividad, que fueron la emergencia y la floración del cultivo. Para el caso de polilla guatemalteca se seleccionaron las trampas adherentes de color blanco y las trampas de insectos con hembras de la misma especie como atrayentes. También se llevaron registros de captura de adultos con el empleo de trampas de feromona. Los diferentes tipos de trampas permitieron determinar dos épocas del cultivo, en donde los adultos de polilla guatemalteca presentaron una actividad mayor, que fueron la tuberización y la madurez fisiológica del cultivo.

Palabras clave: Trampas de caída tipo malla. Trampas de insectos. Trampas adherentes. Feromona.

Summary. In the Experimental Center of Corpoica Tibaitatá, a crop of *Solanum phureja* was followed during the entire developmental cycle to evaluate capture dynamics of the potato weevil and the Guatemalan potato tuber moth, considering two periods: before and after hilling. The traps used were selected from previous work that showed high capture and usefulness for evaluating behavior of the insect of interest. For the potato weevil, net pitfall traps that contained parts of the potato plant as attractant, and traps that contained the same insect in group of males and females as attractants, were used. Traps recommended by the Centro Internacional de la Papa (CIP) were used as controls. Each kind of trap reflected insect activity in different ways and together showed two stages of the crop in which adult potato weevils had a greater activity, which were emergence and flowering of the crop. In the case of the Guatemalan potato tuber moth, white sticky traps and traps that contained females of the same insect as an attractant, were used. Adult capture data were also taken from the pheromone traps. The different traps showed two different crop stages in which adult Guatemalan potato tuber moths showed greatest activity, which were tuber initialization and physiological maturity of the crop.

Key words: Net-Pitfall. Insect traps. Sticky traps. Pheromone.

Introducción

El conocimiento del comportamiento de los insectos en el campo permite entender las diferentes relaciones que se dan entre éste y el entorno que lo rodea. Los sistemas de captura con trampas son herramientas empleadas para evaluar el comportamiento de los insectos plaga en lotes de cultivo y su diseño será más eficiente en la medida en que se aproveche el conocimiento que se tiene de los insectos que se van a evaluar. Por lo tanto, el diseñar una trampa

que permita estimar el comportamiento de las poblaciones de insectos no es una tarea fácil y menos aún si los insectos son de hábito nocturno como sucede con las principales plagas que atacan actualmente a la papa: el gusano blanco y la polilla guatemalteca. Investigaciones sobre dinámica poblacional para estos dos tipos de plaga son escasas. De igual manera son pocas las trampas que se han diseñado para el seguimiento de las poblaciones del gusano blanco y la polilla guatemalteca en campo y que han tenido algún éxito a

nivel del agricultor. Calvache (1980) presentó la fluctuación de la población de adultos de gusano blanco de acuerdo con el desarrollo del cultivo en diferentes ciclos desde diciembre de 1978 hasta abril de 1980, pero no especificó que tipo de trampas usó. Salazar (1996) utilizó trampas de refugio tipo costal recomendadas por el Centro Internacional de la papa (CIP) para evaluar los adultos de gusano blanco en campo en el municipio de Motavita (Boyacá). Para el caso de la polilla guatemalteca, Soriano (1998) presentó la fluc-

1 Autor para correspondencia: Programa Nacional de Biometría, Corpoica, Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera. E-mail: rgalindo@corpoica.org.co
2 Programa Nacional de Biometría, Corpoica, Tibaitatá.

tuación de capturas de *T. solanivora* a lo largo del desarrollo del cultivo con el empleo de trampas de feromona (Hernández y León 1998).

Recientemente, Español (2002) apoyada en algunas características del comportamiento del gusano blanco y de la polilla guatemalteca diseñó diferentes tipos de trampas para evaluarlas a través de todo el ciclo de un cultivo de papa criolla. También utilizó algunos diseños de trampa registrados en la literatura. Como resultado, se determinó que las trampas de insectos cebadas con machos y hembras juntos y las trampas de caída tipo malla, que utilizaron el follaje de la planta de papa como atrayente, fueron las que presentaron una captura mayor para el caso del gusano blanco. Para la polilla guatemalteca las trampas de insectos cebadas con hembras únicamente y las trampas pegajosas de color blanco (comercialmente blanco lechoso) fueron las que exhibieron las mayores capturas a través de todo el ciclo del cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados positivos que se obtuvieron con la utilización de estas trampas se planteó una nueva investigación para aprovecharlas en estudios de dinámica y fluctuación de captura de los insectos plaga, para obtener respuestas prácticas que permitan manejar de una forma racional los principales problemas entomológicos que actualmente afectan el cultivo de la papa.

Por lo tanto, el objetivo propuesto para la presente investigación consistió en determinar el comportamiento de captura de los adultos de gusano blanco y de polilla guatemalteca a través de todo el ciclo de desarrollo de un cultivo de papa criolla clon 1 con el empleo de diferente tipo de trampas. El sitio de trabajo fue el Centro Experimental Tibaitatá de CORPOICA, el cual está situado en el Km 14 de la vía Bogotá-Mosquera, a 4° 42' latitud norte, 74° 13' longitud oeste, a una altitud de 2.543 msnm, con una precipitación promedio anual de 639 mm y una temperatura promedio anual de 12,9°C. Las observaciones se realizaron desde la siembra hasta la cosecha en el semestre B del año 2000.

Materiales y Métodos

El lote de papa criolla o parcela experimental para esta investigación se seleccionó teniendo en cuenta los fuertes ataques que se presentaron tanto de polilla como el gusano blanco en ciclos anteriores del cultivo. Para determinar la presencia de adultos de gusano blanco en la parcela experimental se realizó un muestreo una semana antes de la siembra con tres días de intervalo entre cada muestreo, para un total de tres evaluaciones. Se utilizaron 20 costales de fique rectangulares de 46 cm x 36 cm de lado, recomendados por el Centro Internacional de la papa para evaluar las poblaciones de gusano blanco en el campo. En el momento del muestreo la parcela experimental estaba lista para sembrar, y los surcos estaban demarcados.

En la primera y segunda evaluación se determinó que un 15 % de las trampas evaluadas presentaron adultos de gusano blanco. En la última evaluación el 30% de las trampas capturó al menos un adulto de gusano blanco.

Para determinar la presencia de polilla guatemalteca en el lote seleccionado se colocaron trampas de feromona antes de la siembra del cultivo. Se evaluó la captura de polilla en 24 trampas y se obtuvo un promedio de captura / trampa en las tres últimas semanas antes de la siembra de 21, 13 y 12 machos de polilla guatemalteca, en su orden.

Se determinó sembrar papa criolla Clon 1 en un área de 1.000 m², en el lote seleccionado. El cultivo de papa criolla tenía 20 surcos de 50 m de largo distanciados

a 1,20 m y plantas distanciadas a 0,40 m entre sí. Como abono se utilizó 13-26-6 de N,P,K, 5 g por planta. Para la evaluación de los diferentes métodos de captura de los insectos de interés se evitó el uso de insecticidas contra ambas plagas en la parcela experimental. Los datos climatológicos fueron suministrados por la estación meteorológica ubicada en el C. N. I. Tibaitatá.

En esta investigación se evaluaron métodos tradicionales de muestreo y se compararon con trampas que fueron evaluadas y recomendadas por Español (2002) como las más promisorias para ser evaluadas en campo. A continuación se describe cada una de estas trampas.

La trampa de insectos que utiliza 4 parejas de adultos de gusano blanco como atra-

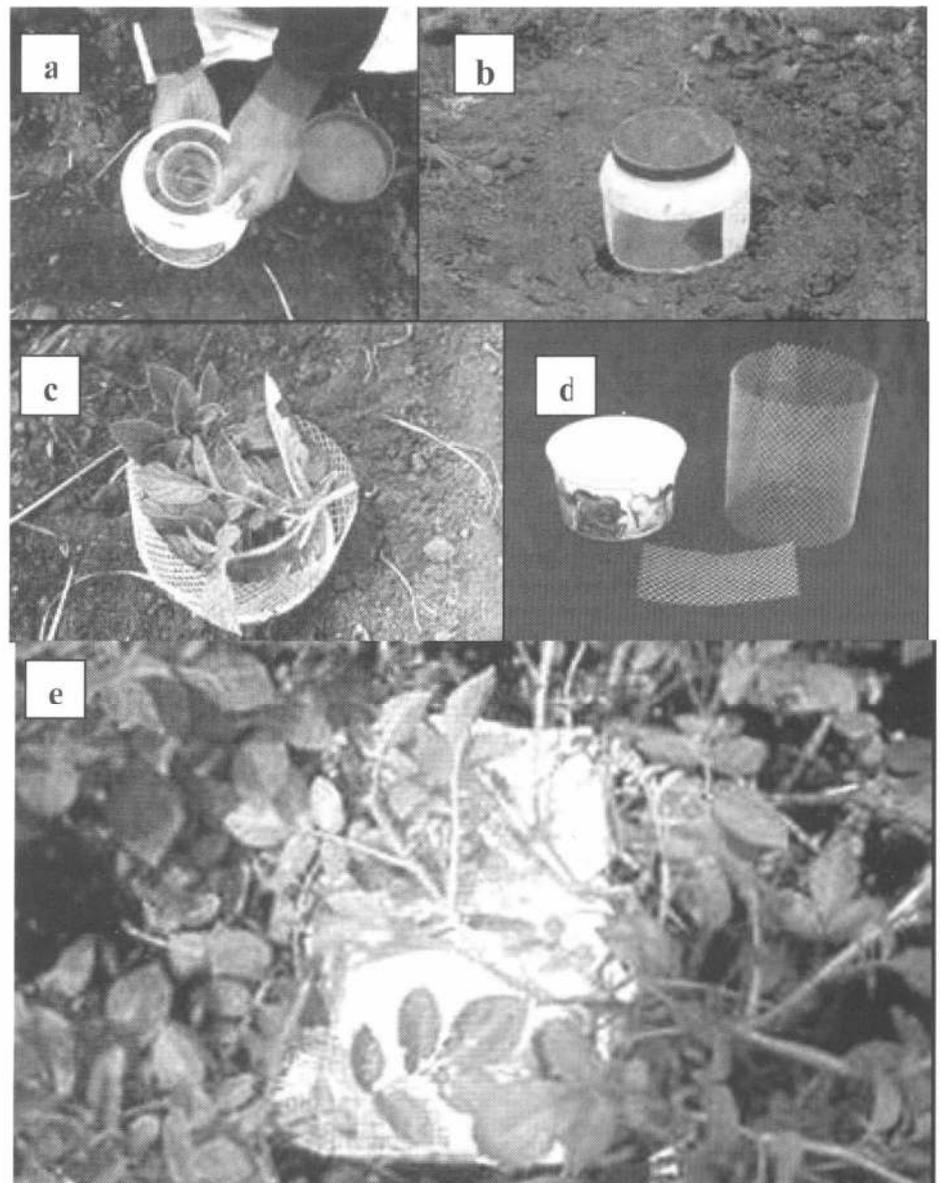


Figura 1. Trampas diseñadas para evaluar gusano blanco en campo. a) Trampa de insectos con el vaso de plástico transparente en donde se colocan los adultos vivos de gusano blanco. b) Montaje de la trampa de insectos en el lote experimental. c) Trampa de caída tipo malla con el follaje de la planta como atrayente. d) Componentes principales de la trampa de malla. e) Trampa de refugio tipo costal.

yente permite la captura de machos y hembras de gusano blanco, debido a la acción de algún tipo de feromona. Consiste de un recipiente plástico cilíndrico, de color blanco, de 16 cm de diámetro y 22 cm de altura, con ventanas laterales de 8 x 16 cm. En el interior del recipiente y sostenido de la tapa, se encuentra un vaso plástico cilíndrico de 7 cm de diámetro y 9 cm de altura, con dos ventanas laterales de 4,5 x 4 cm, cubiertas con tul. En este vaso interior se colocan los insectos que sirven como cebo. Para su funcionamiento se llena de agua el recipiente contenedor hasta un nivel inferior al borde de las ventanas. Los recipientes plásticos se entierran a 10 cm de profundidad, quedando a ras del suelo con el borde inferior de las ventanas laterales. Estas ventanillas se orientan siguiendo la dirección de los surcos (Fig. 1a, b).

La trampa de caída tipo malla permite la captura de machos y hembras de gusano blanco debido posiblemente a la acción de algún tipo de kairomona emitida por el follaje de las plantas. Consiste de un vaso plástico de 11 cm de diámetro y 7 cm de altura, que se ubica dentro y en la base de un cilindro del mismo diámetro y 14 cm de altura, abierto por los extremos, hecho de malla metálica con una trama en rombos de 5 x 5 mm de lado. En la parte superior del cilindro de malla, se encuentra un piso o soporte para los atrayentes vegetales, hecho del mismo material del cilindro. El interior del vaso se llena con agua. La trampa se entierra con el borde del vaso plástico a ras de la superficie del suelo. La forma cilíndrica de la trampa permite que el insecto tenga la misma probabilidad de ser atraído por el sustrato desde cualquier punto alrededor y también permite la entrada libre del adulto por cualquier parte de la trampa. Los insectos atraídos traspasan la malla que conforma el cilindro metálico, caen en el vaso con agua y quedan atrapados (Fig. 1c, d).

El método tradicional evaluado en esta investigación corresponde al recomendado por el Centro internacional de la papa (CIP) para evaluar los adultos de gusano blanco en campo. Consiste de un pedazo de costal de fique rectangular de 46 cm x 36 cm, con un tamaño de malla de 5 x 5 cm que se coloca sobre la superficie del suelo para que le sirva de refugio al insecto. Estas trampas utilizan como atrayente vegetal el follaje de la papa que se coloca debajo del costal. Adicionalmente se aplica sobre las hojas una cucharadita de Furadán® granulado para aniquilar los insectos que lleguen. En el ensayo se utilizaron 3 hojas de papa criolla Clon 1 más una cucharadita de Furadán® granulado. Las trampas de costal de fique se utilizaron como testigos con respecto a las otras trampas (Fig. 1e).

Para el caso de polilla guatemalteca, Español (2002) recomendó la utilización de las trampas de insectos cebadas con hembras de la misma especie y las trampas pegajosas de color blanco lechoso. A continuación se describen los dos tipos de trampa.

Las trampas de insectos, que permiten la captura de machos y en menor cantidad de hembras de polilla guatemalteca, consisten de dos recipientes, uno externo plástico de color blanco de 22 cm de largo x 16 cm de diámetro con dos ventanas laterales de 8 x 16 cm, sostenido a 80 cm del suelo por una estructura de madera en forma de L invertida. El otro recipiente es pequeño y se ubica internamente, colgado de la tapa del recipiente externo. Se trata de un frasco de plástico transparente, de 6 cm de diámetro x 7 cm de largo, con ventanas laterales forradas en tul de 5 cm x 3 cm, en donde se colocan 8 hembras vírgenes que sirven de atrayente. Para la captura de los insectos que llegan atraídos por las hembras se utiliza agua jabonosa en el recipiente externo (Fig. 2a).

Las trampas pegajosas blanco lechosas se diseñaron para atrapar los insectos adultos de polilla en vuelo. Se utiliza como adherente el Biotrapper®. Son láminas plásticas de 15 x 15 cm, las cuales se sostienen con un alambre a una altura de 2 cm del suelo (Fig. 2b).

Finalmente, como método tradicional para la captura de polilla guatemalteca, se utilizó la trampa de feromona, de la cual se dispusieron 4 trampas alrededor de la parcela experimental.

Las evaluaciones de las trampas tanto para gusano blanco como para polilla guatemalteca se realizaron desde el momento de la siembra hasta la cosecha del cultivo. Se realizaron muestreos semanales y los datos de captura se relacionaron con las etapas fenológicas del cultivo y con las condiciones climáticas reinantes durante la ejecución del ensayo. Las trampas empleadas para evaluar gusano blanco se trabajaron bajo un diseño de bloques completamente al azar con 20 repeticiones, mientras que las trampas de insectos diseñadas para polilla guatemalteca se trabajaron bajo un diseño de bloques completamente aleatorizados con 4 repeticiones. Las trampas pegajosas blanco lechosas se trabajaron bajo un diseño de bloques completamente aleatorizados con 20 repeticiones.

Todas las trampas a excepción de las trampas de insectos diseñadas para polilla guatemalteca se evaluaron en dos etapas del cultivo antes y después del aporque. El análisis de los resultados de captura se realizó a través de estadísticas descriptivas.

Resultados y Discusión

Los resultados que se discuten a continuación incluyen el análisis de la captura por tipo de trampa y la comparación de las

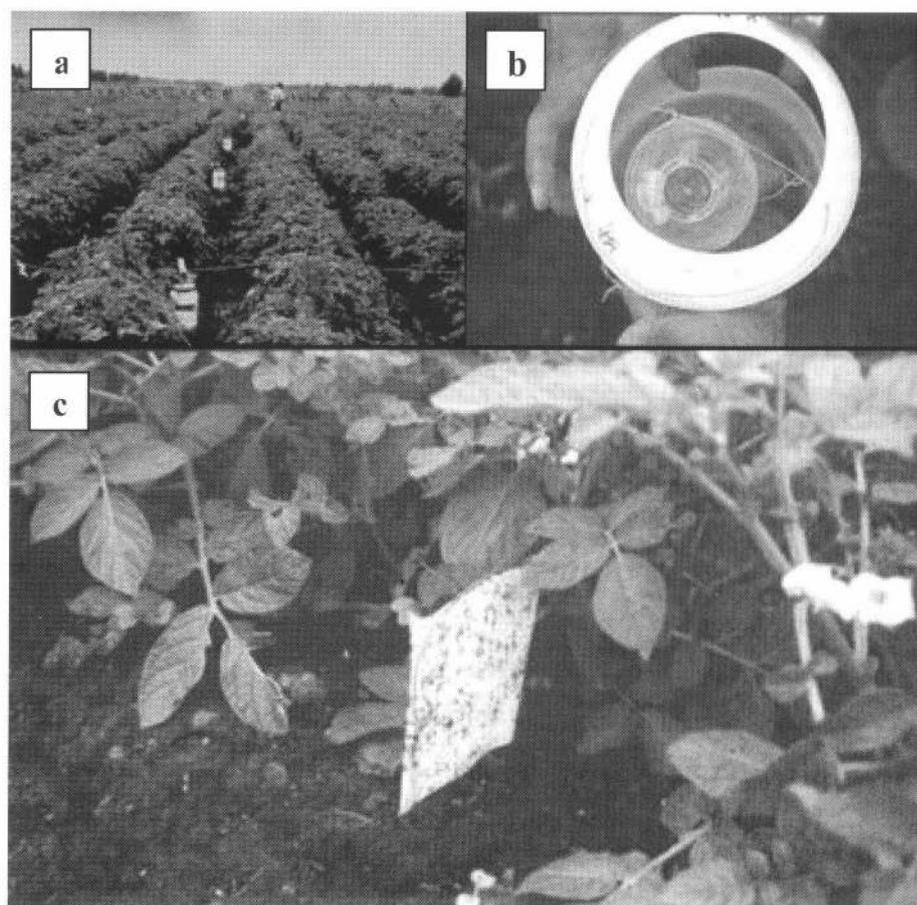


Figura 2. Trampas diseñadas para capturar adultos de polilla guatemalteca en campo. a) Ubicación de las trampas de insectos en la parcela experimental. b) Trampa de insectos con adultos vivos dentro del recipiente transparente. c) Trampa blanco lechosa.

curvas de captura entre los diferentes tipos de trampa. Como la naturaleza de las trampas y su acción son diferentes, la comparación entre ellas no se hace estadísticamente. Cada tipo de atrayente tiene una capacidad particular para atraer una cantidad determinada de insectos, pero no es el interés de esta investigación determinar cuál tipo de trampa atrae un mayor o menor número. Más bien, este análisis pretende obtener una primera aproximación a los ciclos de actividad del insecto y su relación con los cambios de desarrollo del cultivo, para lo cual, cada tipo de trampa puede aportar algo propio en su momento de acuerdo con su naturaleza.

Dinámica de captura para gusano blanco

Antes del aporque se observó una mayor actividad de los adultos de gusano blanco en dos épocas del cultivo, que fueron la emergencia y la floración (Fig. 3). En la emergencia, las trampas de malla que utilizaron el follaje de la planta como atrayente presentaron una mayor captura, lo cual posiblemente está relacionado con la liberación por parte de la planta de algún tipo de compuesto tipo Kairomona, el cual es percibido por los adultos de gusano blanco y los induce a buscar el follaje para realizar actividades probablemente de alimentación o de oviposición necesarias para iniciar nuevas infestaciones. Aunque estos insectos realizan una actividad social, entendida en este trabajo como la capacidad que tienen para interactuar con individuos de su misma especie, agrupándose para realizar cierto tipo de actividades como la búsqueda de sitios de refugio o de apareamiento, este tipo de actividad parece no ser prioritaria en esta etapa del cultivo, de acuerdo con la captura baja registrada en las trampas de insectos y en las trampas de refugio tipo costal.

En la etapa de floración parece que existiera una mayor actividad del insecto, la cual se reflejó en el aumento de adultos de gusano blanco capturados en los tres tipos de trampas evaluadas. Según los resultados de captura, los adultos, además de buscar las plantas para alimentación, u oviposición de acuerdo con la captura alta registrada en las trampas de malla, también intensifican su actividad social, de acuerdo con la captura alta registrada en las trampas de insectos. Adicionalmente, las mayores capturas en las trampas de refugio tipo costal que utilizan al mismo follaje como atrayente sugirieren la necesidad que tiene el insecto para buscar sitios de refugio, aunque no se descarta que las plantas de papa también pueden proporcionar un medio de refugio (Fig. 3).

Con la ayuda de los promedios móviles (Fig. 4), puede observarse con más claridad el incremento de la actividad de los adultos de gusano blanco en la floración del cultivo, en donde las curvas de captura para cada trampa evaluada presentaron tendencias similares.

Este aumento en las capturas de adultos de gusano blanco con los tres tipos de

trampas coincide con los resultados comentados por Calvache (1980), quien mencionó que a medida que las plantas crecen van llegando los insectos al lote, de manera que el período comprendido entre la emergencia de la planta y el aporque es la época en la cual se presentan las mayores poblaciones.

Este aumento de la población de gusano blanco a medida que el cultivo va desarrollándose parece no estar afectado por las condiciones climáticas, en especial por la precipitación. En la figura 5 se observa cómo después de un pico de precipitación la captura de adultos de gusano blanco disminuye pero luego continúa en aumento hasta la finalización de esta fase de evaluación. Estos resultados sugieren que posiblemente la población del insecto no se afecta por la ocurrencia de las lluvias. Salazar (1996) en evaluaciones realizadas en campo y almacén observó que las épocas de emergencia de los adul-

tos no coincidían con las épocas de mayor pluviosidad. Mencionó que la emergencia de los adultos estaba ligada a la presencia de alimento.

Un fenómeno similar se observó con las labores del cultivo como atirradas y desyerbas las cuales aparentemente tampoco afectaron el comportamiento de los adultos de gusano blanco en el campo.

En cuanto a la dinámica de la captura observada después del aporque, los tres tipos de trampa presentaron una disminución en la actividad del gusano blanco traducida en menores capturas del insecto adulto con respecto a la fase anterior (Fig. 6). A los 98 días después de siembra la curva de captura en las trampas de insectos de gusano blanco alcanzó un pico, el cual posiblemente está relacionado con el resurgimiento de una nueva población, según los datos de ciclo de vida obtenidos por Calvache (1980), quien bajo condiciones

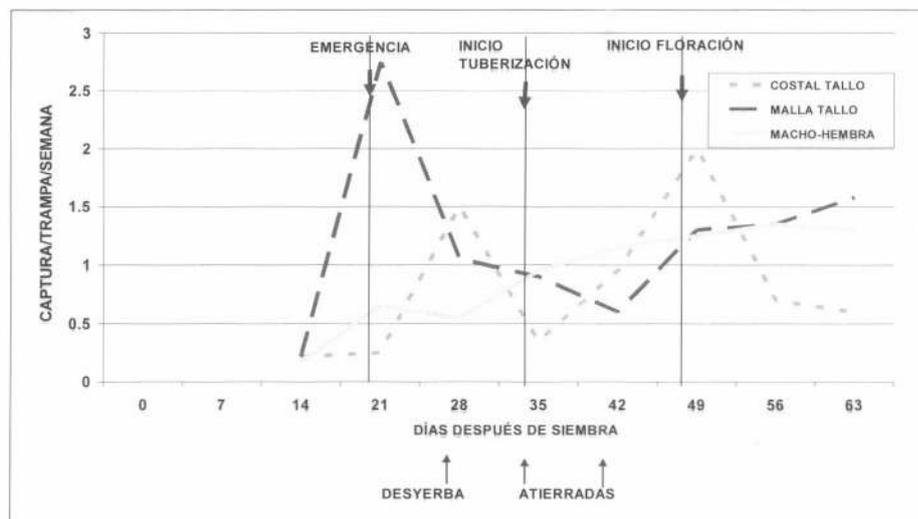


Figura 3. Dinámica de la captura de adultos de gusano blanco antes del aporque, en trampas con diferentes tipos de atrayente en un cultivo de papa criolla Clon 1. CORPOICA. Tibaitatá.

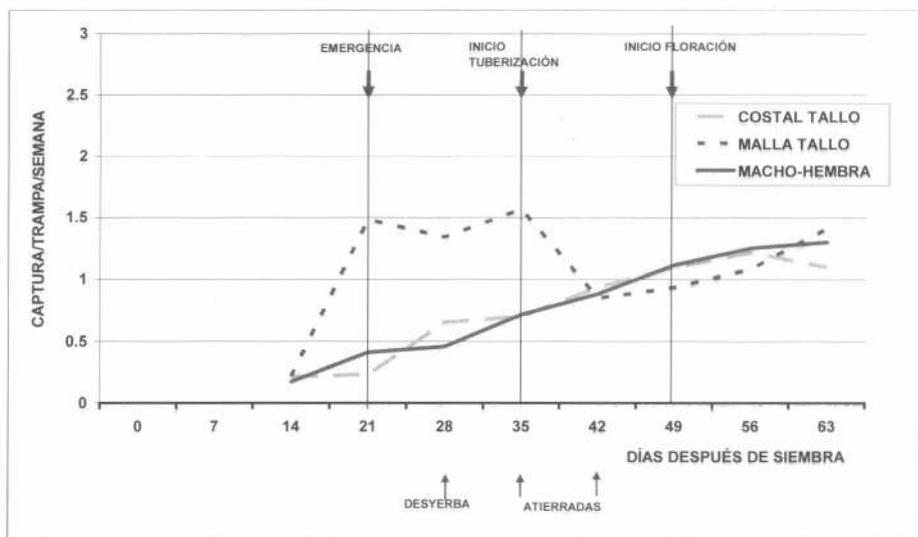


Figura 4. Promedios móviles utilizados para evaluar la tendencia de captura de adultos de gusano blanco con las trampas de insectos, trampas de caída tipo malla y las trampas de refugio tipo costal, antes del aporque (hubo dos atirradas).

de laboratorio en Tibaitatá, registró una duración de ciclo de vida de 85 a 126 días.

Esta nueva población pudo haberse originado a partir de una infestación inicial en la etapa de emergencia del cultivo, registrada en las trampas de caída tipo malla como ya fue mencionado anteriormente. Estas capturas permiten suponer que los adultos de gusano blanco se buscan para aparearse seguramente, mientras que otro tipo de actividades como alimentación y oviposición pasan a un segundo plano.

El comportamiento del insecto también puede estar relacionado con el estado de desarrollo del cultivo. En este momento, el cultivo se encuentra en la madurez fisiológica que se produce aproximadamente entre los 80 y 100 días después de siembra. Las plantas están cercanas al proceso de senescencia, las hojas comienzan a cambiar de color y posiblemente son menos atractivas para que el insecto realice ciertas actividades, reflejándose en las diferentes capturas observadas en los tres tipos de trampa.

Al acercarse la cosecha se observa como el comportamiento de captura sigue cambiando, disminuye la atracción entre los adultos pero aumenta la atracción hacia el follaje fresco que se encuentra en las trampas de malla. Estos resultados posiblemente sugieren que el insecto comienza a moverse o a desplazarse en búsqueda de follaje fresco (Fig. 6).

Es importante observar cómo después del aporque las capturas en las trampas de refugio tipo costal caen considerablemente, con respecto a las otras trampas evaluadas. Al examinar los promedios móviles, los cambios en las tendencias de captura para los diferentes tipos de trampa se observan con mayor claridad (Fig. 7).

La dinámica de captura de adultos de gusano blanco también se relacionó con los registros de precipitación del período de evaluación. Se observó un pico inicial de precipitación a los 105 días después de siembra y uno menor a los 119 días después de siembra. El incremento inicial del período de lluvias coincidió con el pico de captura registrado en las trampas de insectos (Fig. 7). Parece ser que las lluvias disminuyen el número de insectos capturados en las trampas, pero no a la población, la cual permanece presente en el lote experimental a través de todo el período de evaluación. De igual manera la actividad del insecto parece que tampoco es afectada, ya que la atracción entre los adultos prevalece en esta etapa y la búsqueda de follaje fresco para alimentación o para oviposición sigue en incremento hasta el momento de la cosecha.

Este comportamiento en la captura de adultos de gusano blanco registrado con los diferentes tipos de trampa es consistente a través del desarrollo del cultivo en donde la actividad del insecto parece estar más relacionada con ciertas características del cultivo.

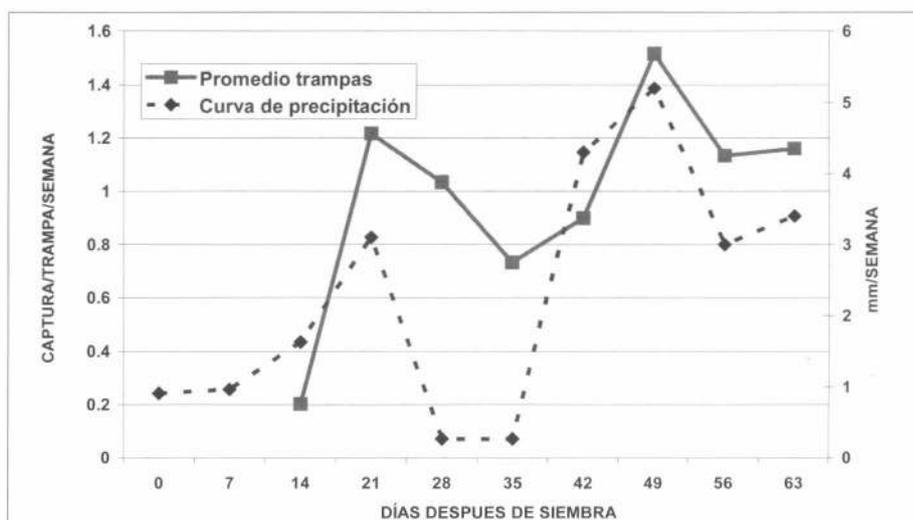


Figura 5. Captura promedio de gusano blanco en diferentes tipos de trampas y comportamiento de la precipitación semanal desde siembra hasta 63 días después de siembra (Datos del Lote 5 de Tibaitatá).



Figura 6. Dinámica de la captura de adultos de gusano blanco después del aporque, para trampas de insectos, trampas de caída tipo malla, y trampas de refugio tipo costal en el lote 5.

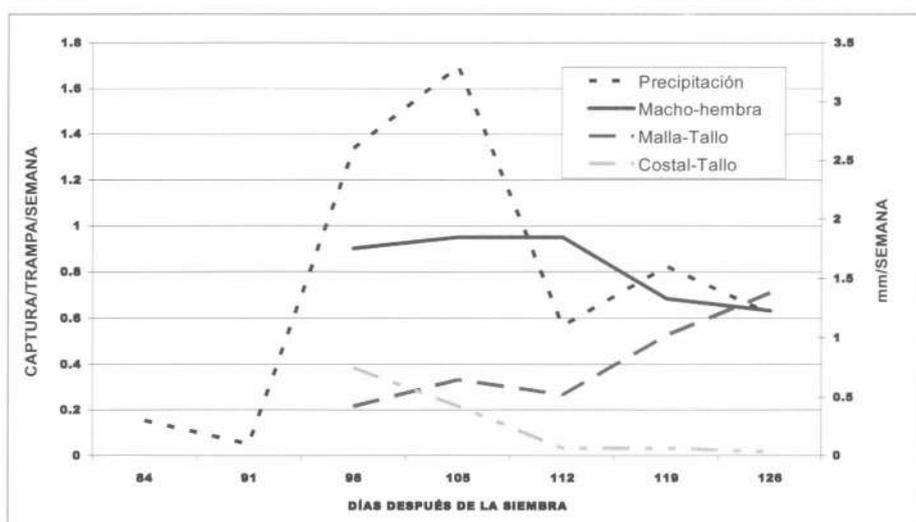


Figura 7. Promedios móviles que permiten observar la tendencia de captura de los adultos de gusano blanco después del aporque y el comportamiento de la precipitación durante este período.

Dinámica de captura para polilla guatemalteca

Antes del aporque las trampas lechosas registraron un aumento brusco en la captura de adultos de polilla guatemalteca, la cual coincidió con la tuberización del cultivo. Después las capturas comenzaron a disminuir hasta la finalización de esta fase de evaluación (Fig. 8). Este cambio puede estar sugiriendo que los adultos de polilla guatemalteca no permanecen en el cultivo sino que son atraídos en la etapa de tuberización por alguna condición especial de las plantas de papa, observación que ya había sido hecha por Soriano (1999) trabajando con trampas de feromona. Él determinó que en la tuberización se presentaba un incremento en las capturas debido a la presencia de una kairomona que era captada por las hembras, las cuales a su vez liberaban una feromona que era percibida por los machos, al igual que la feromona de las trampas, y se obtenía un incremento en la captura en las trampas. También comentó que después de la tuberización las capturas caían.

La coincidencia entre estos dos trabajos sugiere en primer lugar que la época de mayor actividad del insecto se centra específicamente en la etapa de tuberización y segundo que estos dos tipos de trampas sí están registrando la actividad de los adultos de polilla guatemalteca. Sin embargo, las trampas de feromona son una buena herramienta para evaluar las poblaciones en campo pero no en condición experimental, ya que maneja un rango de acción amplio, atrae machos de cultivos vecinos, y no suministra información de la población de hembras existentes en el cultivo. En cambio las trampas blanco lechosas por capturar la población que se encuentra dentro del cultivo, y permitir la captura no sólo de machos sino también de hembras (Español 2002), puede ser considerada como una buena alternativa a emplear bajo un esquema experimental.

En cuanto a las condiciones climáticas, Soriano (1999) realizó un análisis de regresión entre la captura de machos de polilla guatemalteca y la precipitación y determinó que no había relación directa entre estos dos parámetros sino que el comportamiento de la población capturada estaba relacionada con el desarrollo del cultivo y específicamente con la presencia de una kairomona generada por tubérculos en formación y desarrollo. Aunque estas observaciones son válidas para el presente trabajo, también es importante mencionar que la tuberización se presentó en una época seca que pudo favorecer la migración del insecto, la búsqueda de la fuente de emisión de la kairomona y otras actividades propias de su comportamiento (Fig. 8).

En cuanto al viento, otro factor climático que puede afectar las capturas de polilla guatemalteca, no se encontró una clara relación a través del período de evaluación entre la velocidad del viento y las cap-

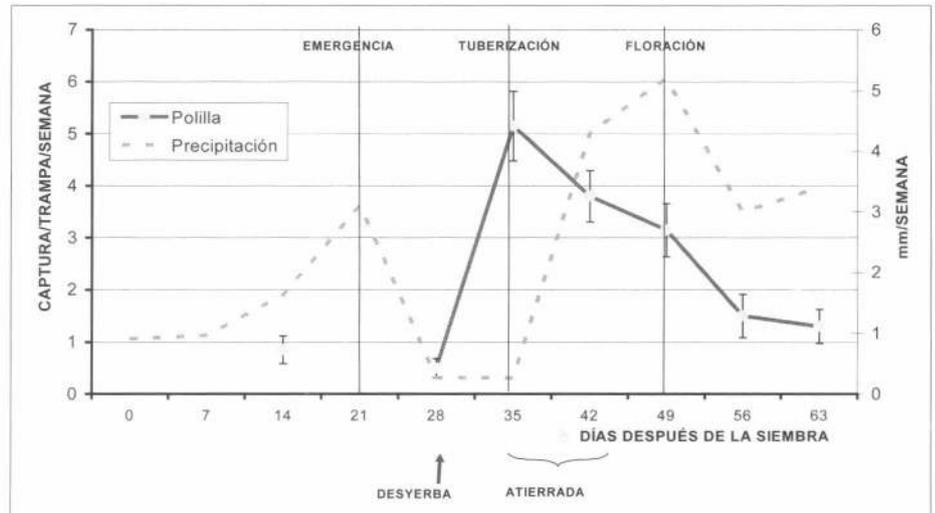


Figura 8. Comparación de la dinámica de la captura de adultos de polilla guatemalteca en trampas lechosas antes del aporque y el comportamiento de la precipitación durante este período. El pico de captura ocurre en un periodo seco.

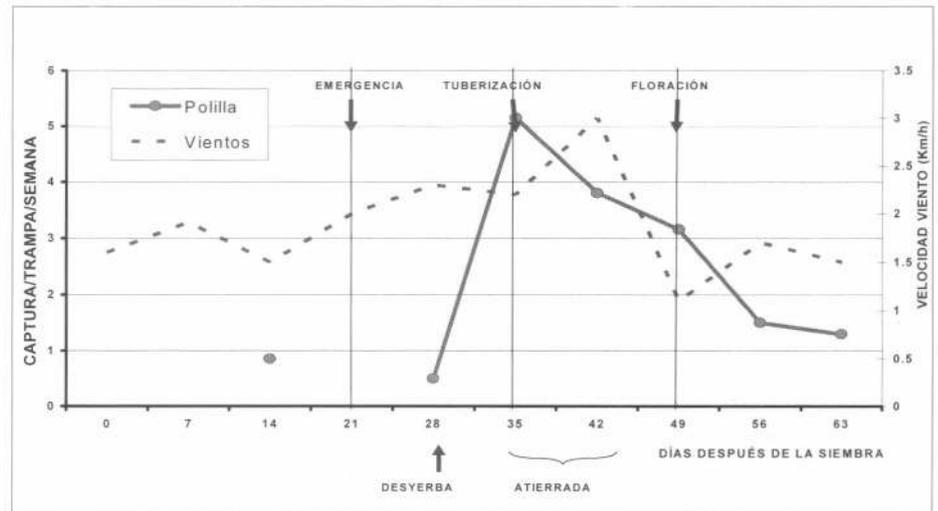


Figura 9. Comparación entre la curva de captura de adultos de polilla guatemalteca en trampas lechosas antes del aporque y comportamiento de los vientos durante este período. Ambas curvas decrecen al finalizar el ciclo.

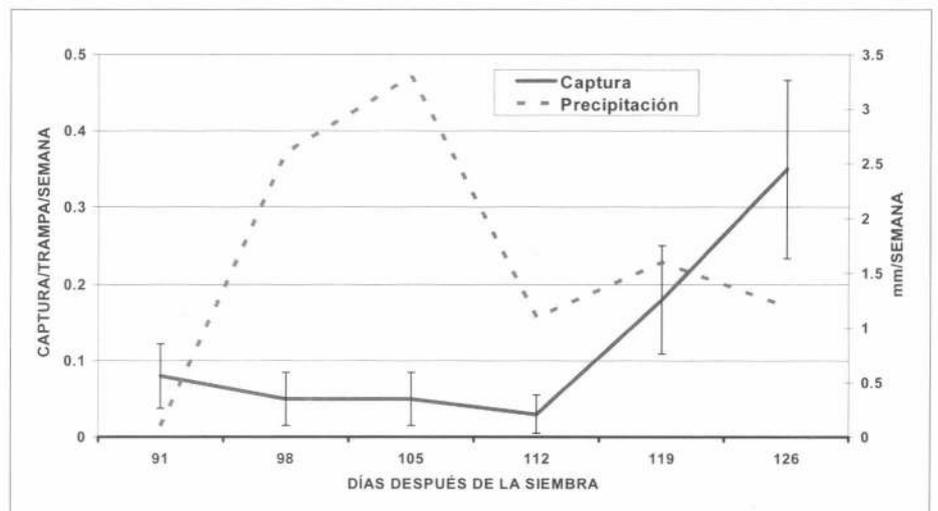


Figura 10. Dinámica de la captura de adultos de polilla guatemalteca en trampas lechosas después del aporque y comportamiento de la precipitación durante este período.

turas, tal como se observa en la (Fig. 9). Sin embargo, sería importante utilizar otro tipo de metodología para evaluar el efecto de la dirección de los vientos sobre el comportamiento de las poblaciones de polilla guatemalteca.

En cuanto a las prácticas culturales como desyerbas y atirradadas no es claro su efecto sobre el comportamiento de captura. Por lo tanto se sugiere realizar nuevos estudios en donde se evalúen con más detalle estas variables.

Después del aporque las capturas de polilla guatemalteca en las trampas blanco lechosas bajaron considerablemente, coincidiendo con un período lluvioso que se presentó en esta época del año (Fig. 10). Cuando el cultivo alcanzó la madurez fisiológica, se observó un aumento en la captura de adultos de polilla guatemalteca que se extendió hasta la cosecha del cultivo. Este aumento, posiblemente corresponde con una entrada tardía de la plaga, similar a la que observó Soriano (1999) en sus ensayos.

Al analizar las condiciones climáticas se observó que el aumento de las capturas de adultos de polilla guatemalteca, posiblemente se vio favorecida por la época seca que se presentó a partir de la madurez fisiológica del cultivo, mientras que el comportamiento de la velocidad del viento mostró un descenso para este mismo período (Figs. 10 y 11).

En cuanto a las trampas de insectos que utilizaron a las hembras como atrayente, las evaluaciones iniciales no se pudieron realizar por problemas metodológicos para mantener los adultos vivos dentro de las jaulas. Las evaluaciones se iniciaron un mes después de sembrado, cuando el cultivo se encontraba en tuberización. El primer aumento en la captura se registró en la floración del cultivo, luego disminuyó considerablemente hasta la madurez fisiológica, en donde se presentó un aumento que se mantuvo hasta la cosecha del cultivo. Estas capturas bajas registradas después de la floración posiblemente estén relacionadas con una menor presencia de la plaga, como también comentó Soriano (1999), y no con pérdidas de la efectividad de la trampa (Fig. 12).

El incremento de la captura observado en la madurez fisiológica se dio en forma brusca tanto en las trampas de insecto como en las trampas lechosas. La manifestación del pico de captura se dio en un período de baja pluviosidad y el efecto de la velocidad del viento no fue claro tal como se observó en la fase anterior (Figs. 12 y 13). Al analizar los resultados se presentaron coincidencias no sólo en el comportamiento de captura entre las diferentes trampas evaluadas, sino también con lo registrado en la bibliografía acerca del tema.

El comportamiento de captura de machos con las trampas de feromona se resume en la figura 14. Se observa como los picos de captura de machos se dieron pun-

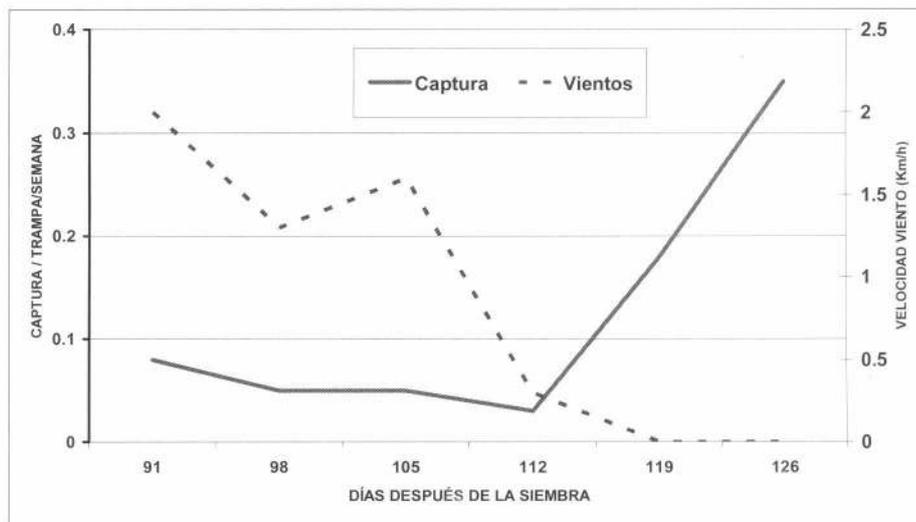


Figura 11. Dinámica de la captura de adultos de polilla guatemalteca en trampas lechosas después del aporque y comportamiento de los vientos durante este período.

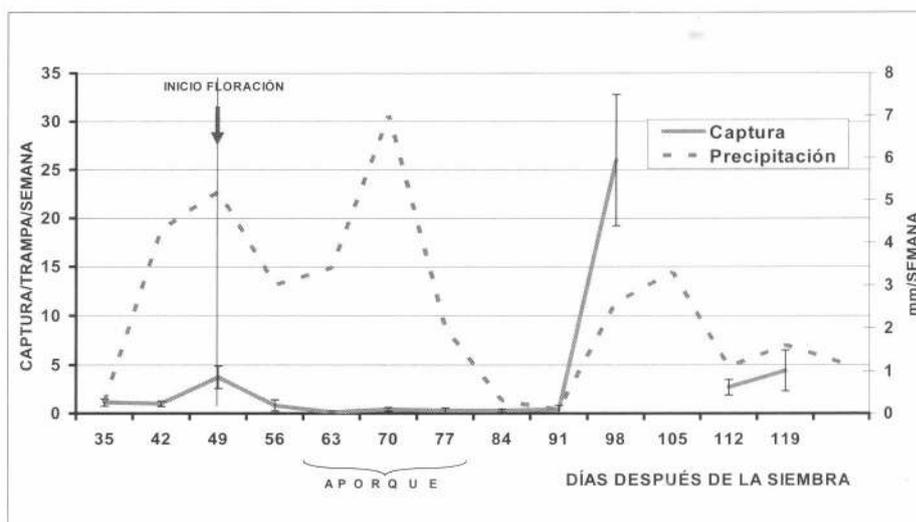


Figura 12. Dinámica de la captura de adultos de polilla guatemalteca en las trampas de insectos, utilizando a las hembras como atrayente, durante el ciclo de cultivo de la papa criolla y el comportamiento de la precipitación durante este período.

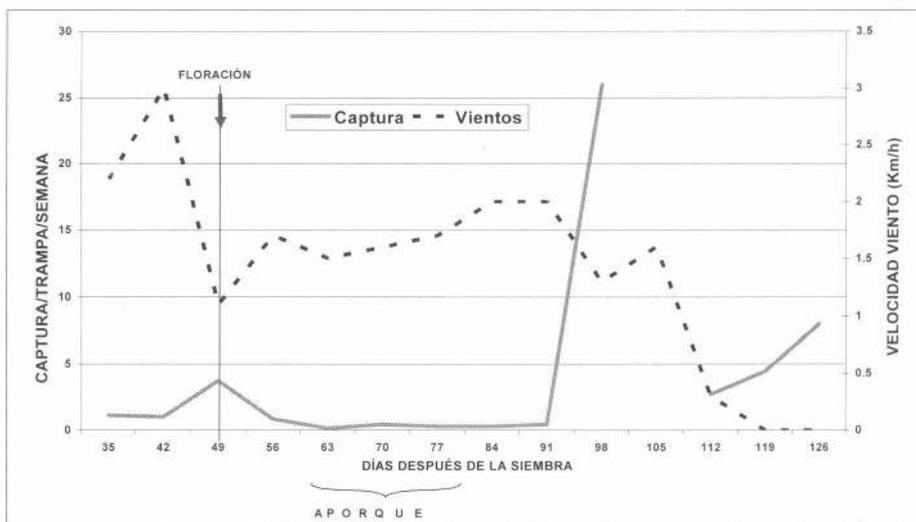


Figura 13. Dinámica de la captura de adultos de polilla guatemalteca en las trampas de insectos, utilizando a las hembras como atrayente, durante el ciclo de cultivo de la papa criolla y el comportamiento de los vientos durante este período.

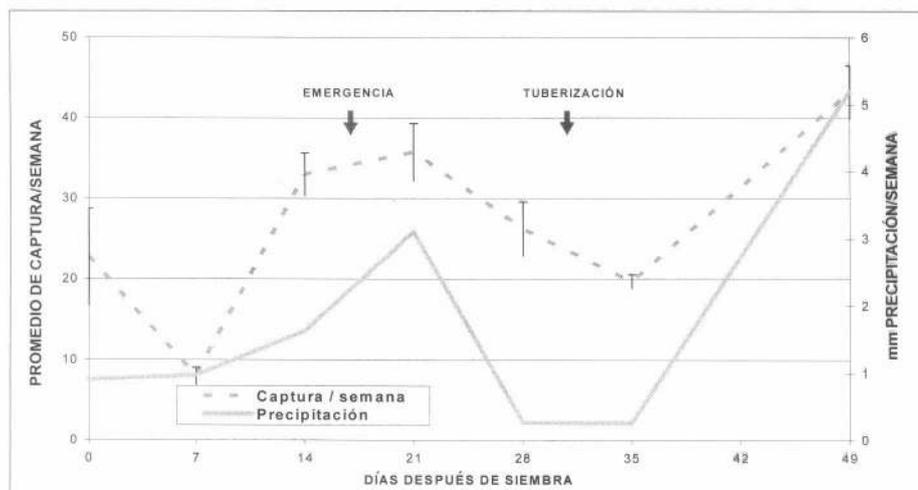


Figura 14. Promedio semanal de captura de machos de polilla guatemalteca en trampas de feromona en un cultivo de papa criolla en el Lote 5, CORPOICA, Tibaitatá

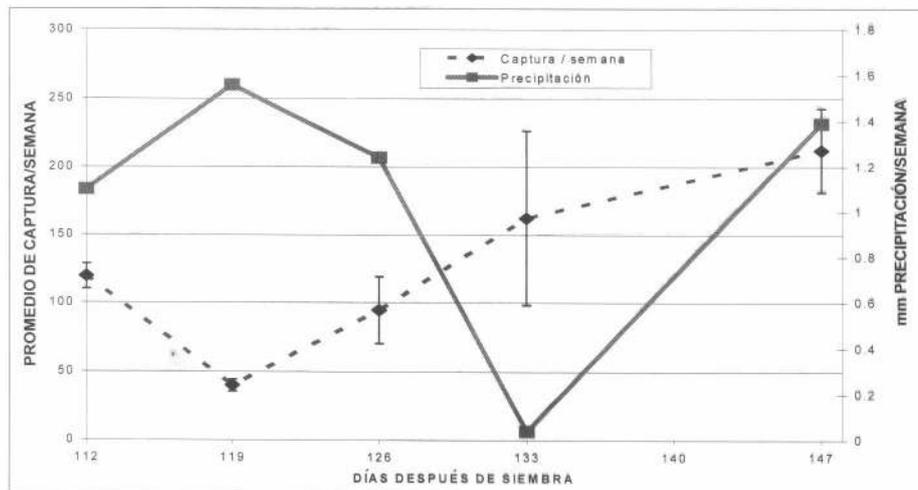


Figura 15. Captura de machos de polilla guatemalteca en las trampas de feromona ubicadas en las esquinas de la parcela experimental en el lote 5, durante el segundo semestre del año 2000

tualmente, característica también observada con los otros tipos de trampa evaluadas. El primer pico se marcó en la emergencia del cultivo, y el segundo se dio a partir de los 35 días después de siembra coincidiendo este último con la tuberización del cultivo. En la etapa de madurez fisiológica aunque no se pudieron tomar algunas lecturas por problemas logísticos, se registraron capturas altas a los 112 días después de siembra que posteriormente decrecen y vuelven a aumentar al inicio de la cosecha a los 126 días después de siembra (Fig. 15). Estos resultados son similares a los presentados por Soriano (1999) con la diferencia de que se obtuvieron mayores capturas al momento de la emergencia.

No es posible determinar con sólo un ensayo la causa por la cual ocurrió un aumento de las capturas al momento de la emergencia del cultivo, pero es importante resaltar que todas las trampas evaluadas presentaron un comportamiento de captura muy similar, que las ubica como una alternativa viable para realizar el se-

guimiento de las poblaciones de polilla guatemalteca en el campo.

Conclusiones

- Para el caso de gusano blanco se pudo determinar que cada tipo de trampa registró de diferente manera la actividad del insecto a través del desarrollo del cultivo, dadas las características o naturaleza de las mismas.

- De acuerdo con los resultados de captura la actividad del insecto parece estar directamente relacionada con el desarrollo del cultivo, y en menor proporción con los períodos lluviosos y labores culturales.

- Con la ayuda de las trampas se determinaron dos épocas del cultivo en donde los adultos de gusano blanco son más activos, en la floración y madurez fisiológica del cultivo. Se sugiere continuar los estudios relacionados con estos tipos de trampas ya que arrojan información importante especialmente para la aplicación de medidas de control. Además, es importante determinar el curso que toma la

población de insectos en la rotación de cultivos.

- Para el caso de polilla guatemalteca se determinó que las trampas evaluadas presentaron un comportamiento de captura similar no sólo entre ellas sino también con lo registrado en la literatura revisada.

- Los resultados de captura suministrados por las trampas coincidieron con trabajos anteriores en donde la mayor actividad del insecto se centró en la tuberización y en la madurez fisiológica del cultivo.

- Se sugiere la utilización de las trampas lechosas y las trampas que utilizan insectos hembra de polilla guatemalteca como atraeyente, para continuar las investigaciones sobre la dinámica de estas plagas, ya que permiten la captura tanto de hembras como de machos y facilitan la evaluación de la población de la plaga dentro del cultivo.

- Aunque los períodos lluviosos parecen no afectar en forma negativa el comportamiento de captura de los adultos de polilla guatemalteca en campo, se sugiere la implementación de ensayos en donde se evalúen la precipitación y el efecto de los vientos.

Literatura citada

CALVACHE, H. 1980. El gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache). p. 12-20. En: Calvache, H.; Alvarado, L. (eds.). El gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) y su control. Instituto Colombiano Agropecuario. ICA. Subgerencia de Investigación. Centro regional de investigaciones "Obonuco". Pasto.

ESPAÑOL, J. A. 2002. Desarrollo de técnicas para la captura, muestreo y seguimiento de la polilla guatemalteca *Tecia solani-vora* (Povolny) y el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) en condiciones de campo. Tesis de M. Sc. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Bogotá. 139 p.

HERNÁNDEZ, L.; LEÓN, A. 1998. Dinámica poblacional y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia solani-vora* (Povolny) en el municipio de Ventaquemada Boyacá. p.12-13. En: Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solani-vora* en Colombia. Memorias. Grupo de investigaciones agronómicas y biotecnológicas, Facultad de Agronomía-Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá. 71 p.

SALAZAR, E. 1996. Ciclo biológico y dinámica poblacional de gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache en el municipio de Molavita (Boyacá). Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. 110 p.

SORIANO, J. 1999. Algunos aspectos para una mejor comprensión de *Tecia solani-vora* (Polilla guatemalteca). Memorias XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 239-246. Bogotá.

Recibido: Abr. 22 / 2003

Aceptado: Ago 15 / 2003

Análisis electroforético de las relaciones evolutivas en las especies de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) del enjambre *martensis*: *D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*

Electrophoretic analysis of the evolutionary relations in *Drosophila* species (Diptera: Drosophilidae) of the cluster *martensis*: *D. martensis*, *D. starmeri* and *D. uniseta*

MARINA ORDÓÑEZ¹, ANGÉLICA ARENAS², LUZ ANGELA BETANCOURT³,
MARÍA MAGDALENA DE POLANCO⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 65-74 (2004)

Resumen. En geles de almidón fue inferida electroforéticamente la variación genética de doce loci isoenzimáticos, entre seis poblaciones alopatricas colombianas del enjambre *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*), provenientes de Santa Marta (departamento del Magdalena), Camarones (departamento de la Guajira) y del desierto de la Tatacoa (departamento del Huila). Esta estimación fue confrontada con una especie filogenéticamente relacionada (*D. buzzatii*) y una distante (*D. melanogaster*). Las divergencias enzimáticas se infirieron a partir de distancias genéticas y los resultados permitieron identificar seis niveles de divergencia taxonómica: Población local ($D = 0,1031$), subrazas ($\bar{D} = 0,1412$), subespecies o razas ($\bar{D} = 0,1870$), especies de un mismo enjambre o cluster ($\bar{D} = 0,7907$), especies de enjambres diferentes ($\bar{D} = 1,0055$) y especies de grupos diferentes ($\bar{D} = 1,4327$). A través de este estudio preliminar, se confirmó la utilidad de los datos electroforéticos como estimadores de divergencia evolutiva y se sugiere un posible ejemplo de especiación alopatrica.

Palabras clave: Especiación alopatrica. Variabilidad alozímica. Niveles divergencia. Simmórficas.

Summary. Starch gel electrophoresis was used to elucidate genetic variation at 12 isoenzyme loci among six allopatric Colombian populations of the cluster *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* and *D. uniseta*), from Santa Marta (Magdalena Department), Camarones (Guajira Department) and from the Tatacoa desert (Huila Department). This estimation was compared to a phylogenetically related (*D. buzzatii*) and distant (*D. melanogaster*) species. The enzymatic divergences were inferred from genetic distances and the results allowed the identification of six levels of taxonomic divergence: Local population ($D = 0,1031$), subraces ($\bar{D} = 0,1412$), subspecies or races ($\bar{D} = 0,1870$), species of a same cluster ($\bar{D} = 0,7907$), species of different clusters ($\bar{D} = 1,0055$) and species from different groups ($\bar{D} = 1,4327$). Through this preliminary study, the utility of electrophoretic data as estimators of evolutionary divergence was confirmed and a possible example of allopatric speciation is suggested.

Key words: Allopatric speciation. Allozyme variability. Levels of divergence. Siblings.

Introducción

El subgénero *Drosophila* se originó en la zona tropical del viejo mundo. La radiación inicial para los linajes del nuevo mundo surgieron a partir de la rama ancestral *virilis/repleta*. Uno de los linajes más conspicuos y que ha presentado sucesivas radiaciones de *Drosophila* es el grupo *repleta*. La característica más notable de este grupo es que las especies utilizan como nicho trófico los cactus en descomposición, condición que le ha permitido establecerse en ambos hemisferios en zonas templadas, desérticas y semiáridas de los trópicos y semi - trópicos (Wasserman 1962; Sánchez 1987; Powell 1997; Castañeda 2000).

Las 89 especies del grupo *repleta* se caracterizan por poseer una cerda en cada punto negro del mesonotum, aspecto que las distingue de los otros. Los estudios morfológicos y citogenéticos han permitido dividirlo en seis subgrupos o complejos: *repleta*, *mercatorum*, *hydei*, *mulleri*, *fasciola* y *buzzatii* (Patterson y Stone 1952; Wasserman 1962, 1967; Ruiz y Wasserman 1993). El subgrupo *buzzatii* está compuesto por los enjambres o clusters *stalker*, *buzzatii* y *martensis*. El enjambre *martensis* está conformado por las especies: *D. martensis* (Wasserman, Wilson en Vilela 1983), *D. uniseta* (Wasserman; Koepfer; Ward en Vilela 1983), *D. starmeri* (Wasserman, Koepfer, Ward en

Vilela 1983) y *D. venezolana* (Ruiz y Fontdevila 1981).

Las especies del enjambre *martensis* son simmórficas y están estrechamente relacionadas, porque comparten una serie de inversiones que les son únicas (Xabcj, 2abmnz7, 5d2). Su ancestro debió presentar un alto polimorfismo, que ha evolucionado a *D. starmeri*. Las demás emergieron de éste fijando sus propias inversiones; muchas de las cuales han permanecido polimórficas en *D. starmeri* (Wasserman 1962; Ruiz y Wasserman 1993; de Polanco 1998; Prada 2002).

Estas especies se encuentran distribuidas en las zonas semiáridas del norte de

1 Autor para correspondencia: M. Sc. Biología. Instituto de Genética. Universidad de Los Andes. Cra. 1 No.18A -10. Tel:3394949 Ext. 2794. Bogotá, Colombia. E-mail: marardon@uniandes.edu.co

2 Bióloga. Universidad del Tolima. Av. 5 No. 17-84. Ibagué, Colombia. E-mail: pitaya01@hotmail.com

3 Bióloga. Universidad del Tolima. Cra. 115 No. 89A-31 Ciudadela Colsubsidio. Bogotá, Colombia. E-mail: canoluzangela@hotmail.com

4 Ph D. Genética. Lab. de Citogenética, Fac. de Ciencias, Universidad del Tolima. Calle 42 con cra 4 Santa Helena. Ibagué, Colombia. E-mail: mmpol@eudoramail.com

Sudamérica (Colombia, Venezuela y Antillas holandesas). Se conoce que ocupan recursos diferenciados (Benado *et al.* 1984). *D. uniseta* utiliza exclusivamente el cactus columnar *Ritterocereus griseus*. *D. martensis* emerge tanto de los columnares como de opuntias; *D. starmeri* prefiere los columnares y ocasionalmente explota los opuntias (Ruiz y Fontdevila 1981; Sánchez 1987).

En Colombia estas especies han sido detectadas en los departamentos de la Guajira, Magdalena, César y Cundinamarca (Ruiz y Fontdevila 1981; Sánchez 1987; Hoenigsberg *et al.* 1987). En el Huila se coleccionaron por primera vez en el desierto de la Tatacoa, por de Polanco (1998).

En el ámbito reproductivo, Rojas (2001) confirma que todas las especies del enjambre *martensis* se comportan como verdaderas. Las poblaciones geográficamente aisladas de la costa norte y el desierto de la Tatacoa tanto en *D. starmeri* como en *D. martensis*, han manifestado divergencias significativas a nivel morfológico y reproductivo (Castañeda 2000; Rojas 2001). En la especie *D. starmeri* la población de Santa Marta presenta mayor polimorfismo cromosómico que las poblaciones de Camarones y Rosalía (Prada 2002). Desafortunadamente en *D. uniseta* no se han realizado estudios comparativos entre las poblaciones de estas dos localidades.

Sin embargo, no se tiene ningún conocimiento sobre la diferenciación enzimática que presentan estas poblaciones alopatricas. En este estudio se pretendió llenar este vacío utilizando geles de almidón para inferir, en doce loci, el grado de divergencia alozimica existente entre ellas, con la intención de aportar evidencia molecular que pueda ser utilizada para descifrar su estado evolutivo.

Materiales y Métodos

Muestras

Se estudiaron tres especies del enjambre *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*), una relacionada a este enjambre, *D. buzzatii* y otra filogenéticamente más distante, *D. melanogaster*. El número de individuos promedio utilizado por especie fue de 18, coleccionados desde 1998 en las poblaciones de Santa Marta y Camarones (costa norte) y en Rosalía (vereda el "Cuzco", desierto de la Tatacoa). La población de *D. melanogaster* proviene de una colección realizada en el año 2001, en la localidad de Rosalía. *D. buzzatii* es una cepa procedente del laboratorio de genética de la Universidad de Barcelona (España) que ha sido mantenida en el Instituto de Genética, de la Universidad de Los Andes desde el año 1996.

Análisis isoenzimático

Sistemas enzimáticos. Se analizaron los siguientes sistemas: α -Esterasa (E.C.3.1.1.2.-EST), α -Glicerol fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.8.-GPD), Deshidrogenasa málica,

(E.C.1.1.1.37.-MDH), Aldehído oxidasa (E.C.1.2.3.1.-AO), Enzima málica (E.C.1.1.1.40.-ME), Peptidasa-S-leucil tiosina (E.C.3.4.13.18.-PEP), Fosfoglucomutasa (E.C.5.4.2.2.-PGM), Fumarasa (E.C.4.2.1.2.-FUM), Isocitrato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.42.-IDH), Fosfogluconato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44.-PGD).

Procedimiento. En esta investigación se compararon las variaciones de diez sistemas enzimáticos que corresponden a doce loci enzimáticos, en geles de almidón al 10%. El estudio electroforético se realizó utilizando los protocolos de corrido y tinción descritos en Sánchez (1987) y Beltrán (1999).

Análisis genético

Las frecuencias alélicas, heterocigosidad, la distancia genética e Identidad Genética de Nei (1978, 1987), se calcularon con el programa PopGene versión 1.31 (Yeh *et al.* 1999). Las relaciones filogenéticas entre los grupos estudiados se establecieron a través del dendograma construido por este programa, que emplea el algoritmo UPGMA. Además, se calcularon los siguientes parámetros:

- el porcentaje de bandas comunes o de similitud ($\%S = \frac{nbs}{nbd+nbs} \times 100$),
- la frecuencia de alelos comunes ($(\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^k \frac{k_i^2}{p_i})$) y comunes ($C = 1 - Q$) como se describe en Zouros (1973) y Nair *et al.* (1971) por parejas de poblaciones y
- el error estándar asociado a la distancia genética de Nei ($E_N = [(1-I)/I]^2$, Zouros 1973)

Resultados y Discusión

Variabilidad enzimática en las especies analizadas

En la tabla 1 se aprecian las frecuencias alélicas de los sistemas analizados los cuales fueron todos polimórficos. Los sistemas enzimáticos que presentaron mayor número de alelos, en el enjambre *martensis*, son la PGD (10 alelos) y α -EST (8 alelos). *D. martensis* y *D. uniseta* exhibieron mayor variabilidad en el sistema MDH y *D. starmeri* en PGD.

Los valores de heterocigosidad de los loci analizados difieren significativamente de los esperados en todas las poblaciones analizadas del enjambre *martensis*, excepto para las enzimas Isocitrato deshidrogenasa (*D. starmeri* - Santa Marta, $X^2 = 5,48$; $df = 3$; $P < 0,05$) y Malato deshidrogenasa (*D. uniseta* - Rosalía, $X^2 = 3,31$; $df = 1$; $P < 0,05$). Los valores de heterocigosidad promedio observada para cada sistema son una tercera parte del valor esperado en todas las poblaciones estudiadas (Tabla 2). Aunque este fenómeno es típico en muchas especies de *Drosophila* (Ayala y

Tracey 1974; Sánchez 1987), se debe tener en cuenta que el número de individuos es relativamente bajo ($\bar{x} = 18$) y que no han sido recientemente coleccionados, por tanto, en el laboratorio estas poblaciones han podido sufrir sucesivos cuellos de botella.

Las especies del enjambre *martensis* presentaron un valor medio de alelos por locus de 3,2 y una heterocigosidad media de 0,1804. El valor medio más alto de alelos por locus lo manifestó *D. starmeri* (3,8) y el más bajo lo mostró *D. uniseta* con 2,4 (Tabla 2). Las poblaciones de *D. martensis* presentan, en general, valores de variabilidad análogos a los de las poblaciones de *D. starmeri* y también mayores que los de *D. uniseta* (especie monófoga). En cierta manera este resultado puede estar reflejando la especificidad de nicho que presenta *D. uniseta*, en contraste con *D. starmeri* y *D. martensis* que son especies polífagas (Barker y Mulley 1976); quizás esta diferenciación enzimática sea una insinuación de la importancia del sustrato utilizado por cada una de las especies.

Las poblaciones de *D. starmeri* de la costa norte (Santa Marta y Camarones) presentaron un valor medio de heterocigosidad mayor (0,1988) que la población de Rosalía en el desierto de la Tatacoa (0,1250). En la especie de *D. martensis* se observó lo contrario, un valor de heterocigosidad mayor en la población de Rosalía que en la población de Santa Marta. Estos resultados reflejan parte de la diferenciación genética que existe entre estas poblaciones alopatricas.

Niveles de identidad intra e inter específico

Identidad genética de Nei (1978, 1987). A partir de los valores de frecuencias alélicas se estimó el nivel de divergencia (Nei 1978, 1987) en las especies estudiadas. El programa PopGene arrojó la matriz de identidad, resumida en tabla 3. Las especies analizadas en este estudio presentaron una diferenciación enzimática que se ajusta al grado de divergencia taxonómica. De tal manera que se observan valores de identidades genéticas de Nei (1978, 1987) que van desde 0,902 hasta 0,1537 ($\bar{I} = 0,4434$). Las poblaciones de *D. starmeri* de Santa Marta y Camarones (costa norte) muestran el valor más alto de identidad genética (0,902), al comparar estas poblaciones con la de Rosalía (desierto de Tatacoa), la identidad promedio se disminuye notablemente ($\bar{I} = 0,8503$). La divergencia es menor en Camarones (0,8712) que en Santa Marta (0,8295). *D. martensis* mostró en estas poblaciones un valor de 0,8654.

Las comparaciones entre las especies del enjambre *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*) aún cuando son morfológicamente similares, dieron un buen índice de divergencia genética entre ellas ($\bar{I} = 0,4559$), el cual se reduce a 0,3682 cuando se comparan especies de

Tabla 1. Variación alélica de 12 sistemas enzimáticos en 8 poblaciones

LOCI	ALELO	<i>D. starmeri</i> Rosalia	<i>D. starmeri</i> Santa Marta	<i>D. starmeri</i> Camarones	<i>D. martensis</i> Rosalia	<i>D. martensis</i> Santa Marta	<i>D. uniseta</i> Rosalia	<i>D. buzzatii</i>	<i>D. melanogaster</i> Rosalia
	N	18	18	19	18	18	18	18	18
AO	98							0,2222	0,6667
	99							0,4167	0,3056
	100	0,5556	0,3066	0,3684	0,1111	0,1111	0,4167	0,3611	0,0278
	101	0,4444	0,6111	0,5526	0,4167	0,1667	0,5833		
	102		0,0833	0,0789	0,3611	0,6667			
	103				0,1111	0,0556			
	Ho	0,0000	0,1111	0,2632	0,1667	0,1667	0,0556	0,0556	0,2778
	He	0,4938	0,5262	0,5526	0,6713	0,5123	0,4861	0,6466	0,4614
	90							0,5833	
	91								0,5278
α-EST	92								0,4722
	93							0,4167	
	97	0,6389	0,3056	0,2895					
	98	0,3611	0,3056	0,5000					
	99		0,1667	0,1053					
	100		0,2222	0,1053	0,2500	0,3333			
	101				0,1944	0,5556			
	102				0,3889	0,0556			
	103				0,1667	0,0556	0,6944		
	104						0,3056		
FUM-1	Ho	0,1667	0,1667	0,0526	0,1667	0,2222	0,1667	0,0556	0,1667
	He	0,4614	0,7361	0,644	0,7207	0,5741	0,4244	0,4861	0,4985
	98								0,0278
	99								0,3611
	100	0,3889	0,1667	0,2105	0,0833	0,1944	0,2778	0,5556	0,6111
	101	0,4167	0,4167	0,4737	0,4722	0,3611	0,3333	0,4444	
	102	0,1944	0,4167	0,3158	0,4444	0,1389	0,3889		
	103						0,3056		
	Ho	0,0556	0,2778	0,2105	0,2778	0,1111	0,0000	0,1111	0,3333
	He	0,6373	0,625	0,6316	0,5725	0,7191	0,6605	0,4938	0,4954
GPD	99		0,3333	0,1316	0,4167	0,5278	0,5278	0,3333	
	100	0,5278	0,2778	0,5789	0,5278	0,4167	0,6111	0,6667	
	101	0,4722	0,1944	0,2895	0,0556		0,3889		
	102		0,1111			0,0556			
	103		0,0833						0,3611
	104								0,6389
	Ho	0,0556	0,2222	0,1053	0,2778	0,0556	0,2222	0	0,1667
	He	0,4985	0,7546	0,5637	0,5448	0,5448	0,4753	0,4444	0,4614
	96	0,1389	0,0556	0,6316					
	97	0,4444	0,3333	0,3684					
IDH	98	0,4167	0,6111						
	99					0,2500	0,0278	0,1111	
	100				0,2500	0,3333	0,5556	0,5556	0,1111
	101				0,7500	0,4167	0,4167	0,2778	0,5833
	102							0,0556	0,3056
	Ho	0,2222	0,3333	0,2105	0,1667	0,0556	0,2222	0,1111	0,1667
MDH-1	He	0,6096	0,5123	0,4654	0,375	0,6528	0,517	0,5988	0,554
	98		0,0833						
	99	0,2222	0,2500	0,3421	0,1944	0,0278	0,2500	0,1944	0,5556
	100	0,2222	0,2778	0,4211	0,6111	0,25	0,4444	0,1389	0,4444
	101	0,2222	0,3333	0,2368	0,1944	0,2222	0,2222	0,2222	
	102	0,3333	0,0556			0,4167	0,0833	0,2222	
	103					0,0833		0,2222	

(Continuación Tabla 1)

	Ho	0	0,2778	0,0526	0,3333	0,2222	0,2222	0,2222	0,1111
	He	0,7407	0,7392	0,6496	0,5509	0,7068	0,6836	0,7948	0,4938
	96				0,2778	0,2778			
	97		0,0278	0,1053	0,5278	0,4444			
	98	0,0833	0,3611	0,1579	0,1111	0,1944			
	99	0,2778	0,3611	0,2632	0,0278	0,0833			0,3056
MDH-2	100	0,3889	0,2500	0,2368	0,0556			0,0278	0,3889
	101	0,2500		0,2368				0,3611	0,3056
	102							0,5000	
	104						0,3611		
	105						0,6389	0,1111	
	Ho	0,2222	0,3333	0,2632	0,2222	0,1667	0,2778	0,2778	0,3333
	He	0,7022	0,6759	0,7825	0,6281	0,6806	0,4614	0,6065	0,6620
	97								0,0278
	98	0,1111	0,1389	0,3684			0,5000		0,3889
	99	0,5833	0,4722	0,4474			0,5000	0,4444	0,5833
ME-1	100	0,3056	0,3889	0,1842	0,3611	0,3333		0,5278	
	101				0,4722	0,5833		0,0278	
	102				0,1667	0,0833			
	Ho	0,0556	0,1667	0,1579	0,2778	0,1667	0,2222	0,2778	0,3889
	He	0,5540	0,6065	0,6302	0,6188	0,5417	0,5000	0,5231	0,5077
	93						0,5556		
	94						0,4444		
	95	0,5278	0,3889	0,1842					0,0556
	96	0,1389	0,3333	0,5526					0,0556
PGM	97	0,2222	0,2500	0,2632					0,2778
	98	0,0556			0,1944	0,2500			
	99	0,0556	0,0278		0,4722	0,3056			0,3333
	100				0,3333	0,4444		0,4444	0,2778
	101							0,5556	
	Ho	0,1667	0,1667	0,1579	0,3333	0,1111	0,1111	0,1111	0,1111
	He	0,6466	0,6744	0,5914	0,6281	0,6466	0,4938	0,4938	0,7284
	92							0,0556	
	93							0,2778	
	94							0,1111	0,0556
	95								0,0556
	96							0,0833	0,0556
PEP-1	97							0,2778	
	98							0,1944	0,3333
	99	0,1111	0,1667	0,2632			0,2500		0,4167
	100	0,3333	0,5000	0,4211	0,4167	0,5833	0,7500		
	101	0,5000	0,3333	0,3158	0,5833	0,4167			0,0278
	103								0,0556
	104	0,0556							
	Ho	0,2222	0,2222	0,2105	0,1667	0,1667	0,1667	0,0556	0,1667
	He	0,6235	0,6111	0,6537	0,4861	0,4861	0,3750	0,7855	0,7022
	93							0,1944	
	94							0,0833	
	95								0,2500
	96							0,1667	0,5000
	97							0,4167	
PEP-2	98			0,0263				0,0278	0,2500
	99	0,3056	0,0556	0,3684	0,1111	0,0833	0,3889		
	100	0,3611	0,6111	0,2105	0,2778	0,3333	0,5000	0,0556	
	101	0,3333	0,3333	0,3947	0,5333	0,5000	0,1111		
	102				0,2778	0,0833			
	103							0,0556	

(Continuación Tabla 1)

	Ho	0,2222	0,1111	0,3158	0,1667	0,1667	0,1667	0,2222	0,1111
	He	0,6651	0,5123	0,6634	0,7222	0,625	0,5864	0,7469	0,625
	99				0,2778	0,1111			
	100				0,3611	0,5278	0,4444	0,7222	
	101				0,2222	0,25	0,5556		
	102				0,1389	0,1111			
	103		0,2778	0,2105					
	104		0,3889	0,3158				0,2778	
PGD	105		0,0278						
	106	0,0833	0,0833	0,0789					
	107	0,3611	0,1111	0,1842					
	108	0,5556	0,1111	0,2105					
	115								0,3333
	116								0,3333
	117								0,3333
	Ho	0,1111	0,2778	0,1053	0,2778	0,3333	0,1111	0	0,2222
	He	0,554	0,7392	0,7715	0,7238	0,6343	0,4938	0,4012	0,6667

enjambres diferentes (*D. buzzatii* vs. especies del enjambre *martensis*) y como es esperado, la identidad más baja se da entre las especies morfológicamente más diferenciadas 0,2462 (*D. melanogaster* vs. las demás). Los valores de identidad genética entre las poblaciones se pueden observar más fácilmente en la figura 1. En donde se destaca, en color negro, el valor de la identidad genética en las poblaciones de la costa norte y en gris las poblaciones de las distintas zonas geográficas para las especies de *D. martensis* y *D. starmeri*.

Porcentaje de similitud (S). Los porcentajes promedios de bandas comunes o de similitud entre las poblaciones estudiadas se calcularon utilizando la ecuación de Nair et al. (1971). Al comparar todas las poblaciones geográficamente aisladas de *D. starmeri* y *D. martensis* se encontró que solo comparten un 78,9% de bandas comunes, denotando que son unidades diferentes. Detallando las diferencias por especie se observó que S decrece de la siguiente manera: 84,44%, entre las poblaciones de Santa Marta y Rosalía (*D. martensis*), 83,33% entre las poblaciones de Santa Marta y Camarones (*D. starmeri*), 76,09% entre Santa Marta y Rosalía (*D. starmeri*) y 71,74% entre Camarones y Rosalía (*D. starmeri*).

Los resultados también permitieron observar que el valor de similitud, como es lógico, disminuye de acuerdo con el nivel evolutivo: 35,75% al comparar especies del mismo enjambre, 23,18% especies de diferentes enjambres y 17,31% especies de grupos diferentes. De manera coherente, los porcentajes de S se aproximan a los valores obtenidos de las identidades genéticas.

Niveles de diferenciación genética intra e inter específica

Distancia genética de Nei (1978, 1987). En la tabla 3 se muestran los valo-

Tabla 2. Número de alelos muestreados (N), alelos promedio por locus (G) y heterocigosidad promedio observada y esperada (Ho y He) en poblaciones del enjambre *martensis* examinadas para 12 sistemas enzimáticos (error estándar en paréntesis)

ESPECIE	POBLACIÓN	N	G	PROMEDIO DE HETEROCIGOSIDAD	
				Ho	He
<i>D. starmeri</i>	Rosalía	36	3,1667	0,1250 (0,0890)	0,5989
<i>D. starmeri</i>	Santa Marta	36	3,8333	0,2222 (0,0850)	0,6427
<i>D. starmeri</i>	Camarones	38	3,4167	0,1754 (0,0850)	0,6333
<i>D. martensis</i>	Rosalía	36	3,1667	0,2361 (0,0675)	0,6035
<i>D. martensis</i>	Santa Marta	36	3,5833	0,1620 (0,0766)	0,6104
<i>D. uniseta</i>	Rosalía	36	2,4167	0,1620 (0,0802)	0,5131
PROMEDIO		3,2639	0,1804	0,6003	

res de distancia genética con sus errores estándar y las identidades genéticas. La distancia menor corresponde a las comparaciones realizadas entre poblaciones de una misma especie: 0,1031 (*D. starmeri*, Santa Marta - Camarones), 0,1870 (*D. starmeri*, Santa Marta - Rosalía), 0,1379 (*D. starmeri*, Camarones - Rosalía) y 0,1446 (*D. martensis*, Santa Marta - Rosalía). La divergencia entre los taxa es congruente con un aumento de los valores de distancia: 0,7907 especies del mismo enjambre, 1,0055 entre diferentes enjambres y 1,4327 entre especies de grupos diferentes.

Frecuencia promedio de alelos comunes (C) y no comunes (Q). En la figura 2 se ilustra la frecuencia de alelos comunes (C) y no comunes (Q). En la cual se puede apreciar la tendencia inversa de estos parámetros, mientras C decrece, Q aumenta de acuerdo con la divergencia taxonómica. En las especies del enjambre *martensis* los valores más altos de C lo exhibieron las poblaciones de una misma especie. En *D. starmeri* las poblaciones de la costa norte (Santa Marta y Camarones) presentaron un valor de C = 0,9474, el cual se disminuye a 0,9168 entre las poblaciones alopatricas Camarones - Rosalía

y a 0,9097 entre Santa Marta - Rosalía. Contrariamente, las poblaciones de *D. martensis* presentaron valores similares a los de la costa norte. El valor de C se disminuye sensiblemente cuando las comparaciones son inter específicas: 0,563 especies del enjambre *martensis* y 0,4161 especies de distintos enjambres y 0,3647 especies de grupos diferentes.

Dendograma

En la topología del árbol generado, se evidencia el valor sistemático de los resultados electroforéticos, los cuales permiten separar claramente las distintas especies. Por un lado el enjambre *martensis* aparece relacionado con la especie evolutivamente más cercana, *D. buzzatii* y como la más distante del grupo surge *D. melanogaster*. Las especies del enjambre *martensis* se pueden diferenciar visiblemente en dos grupos, uno reúne las poblaciones de *D. starmeri* y otro está conformado por *D. martensis* y *D. uniseta*. Además, es apreciable la separación en el árbol, entre las poblaciones de la costa norte y el desierto de la Tatacoa, tanto para *D. martensis* como *D. starmeri*. Contrariamente, las poblaciones de San-

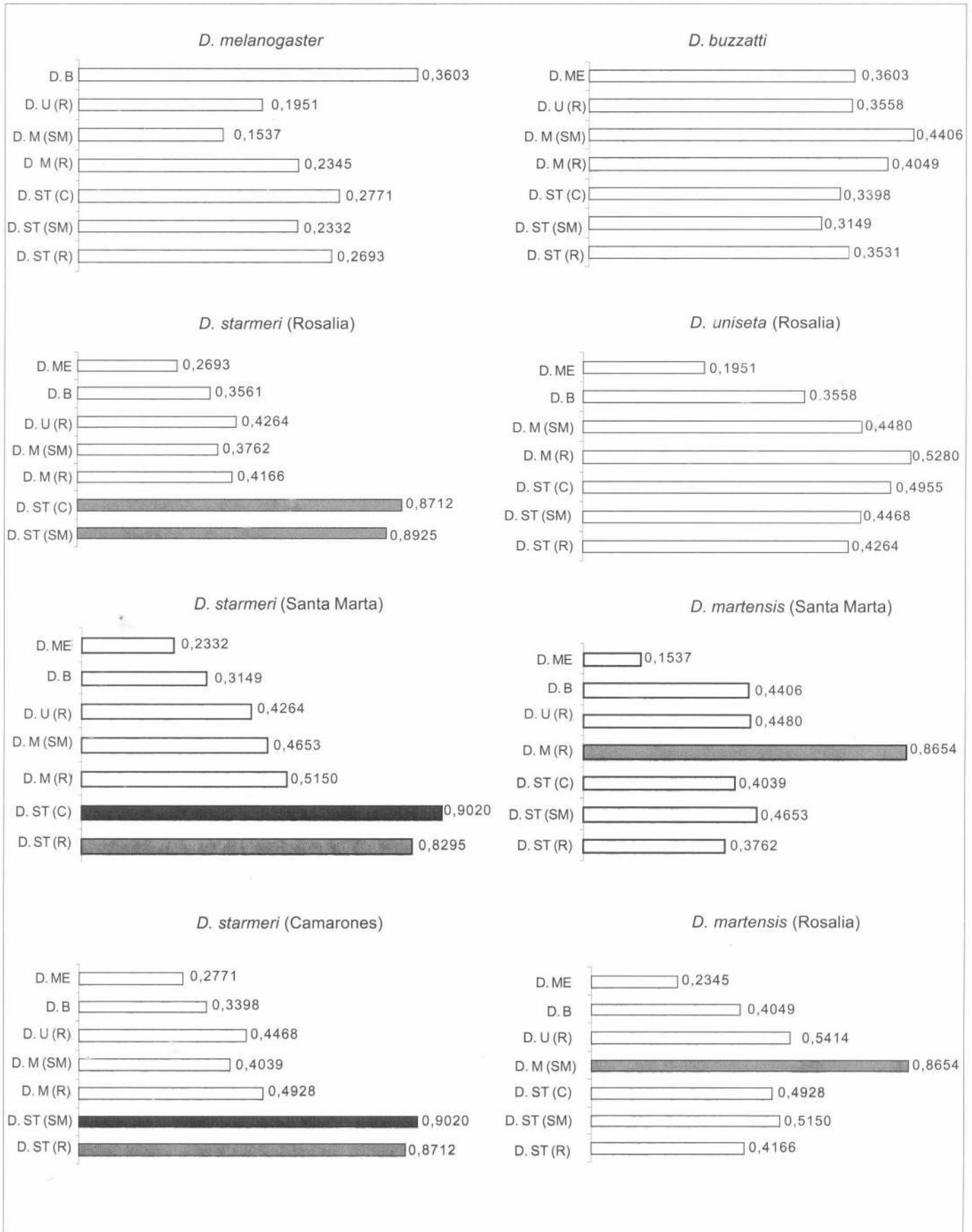


Figura 1. Distribución de Identidades entre las diferentes especies estudiadas para 12 sistemas enzimáticos. D. B. = *D. buzzatii*, D. ST (R) = *D. starmeri* (Rosalia), D. ST (C) = *D. starmeri* (Camarones), D. ST (SM) = *D. starmeri* (Santa Marta), D. M (R) = *D. martensis* (Rosalia), D. M (SM) = *D. martensis* (Santa Marta), D. U (R) = *D. uniseta* (Rosalia)

ta Marta y Camarones (costa norte) en *D. starmeri* aparecen agrupadas (Fig. 3 a).

Las relaciones evolutivas insinuadas anteriormente podrían ser desvirtuadas si la tasa de cambio evolutivo, a la cual se ha

dado la alta variabilidad observada en el segundo cromosoma de estas especies, no es constante (Sánchez 1987; Beltrán *et al.* 1995; de Polanco 1998). Por tal motivo se realizó un fenograma excluyendo los loci ubicados en este cromosoma (Fig. 3 b). La

topología del árbol generado cambió la relación de *D. buzzatii* agrupándola con las especies del enjambre *martensis* y relacionándola más con *D. martensis*, y no con *D. starmeri* como se observó al incluir todos los loci (Fig. 3 a). Vale la pena destacar que las relaciones de las poblaciones alopátricas no se alteran ni en *D. starmeri* ni en *D. martensis*. Este resultado insinúa que los loci que determinan estas diferencias también se encuentran en otros cromosomas.

Los altos valores de errores estándar de las distancias genéticas pueden estar asociados tanto al número bajo de muestreo como de loci analizados. El análisis de las divergencias genéticas de las poblaciones alopátricas en estudio se confrontó con la información de diferenciación a nivel morfológico, reproductivo y citogenético, que éstas han manifestado (de Polanco 1998; Castañeda 2000; Rojas 2001; Prada 2002). Con la matriz de distancia genética de Nei se sugieren los siguientes seis niveles de diferenciación, que se ajustaron al grado de divergencia taxonómica (Tabla 3).

Población local. El par de poblaciones Santa Marta y Camarones (costa norte), en la especie *D. starmeri* exhibió una distancia genética propia de poblaciones locales ($D = 0,1031$). Aunque es ligeramente superior a la informada por Sánchez (1987) para las poblaciones locales venezolanas de la misma especie ($\bar{D} = 0,069$). Esta diferencia puede ser un reflejo de procesos ecológicos propios de cada localidad. Castañeda (2000) comprobó que las po-

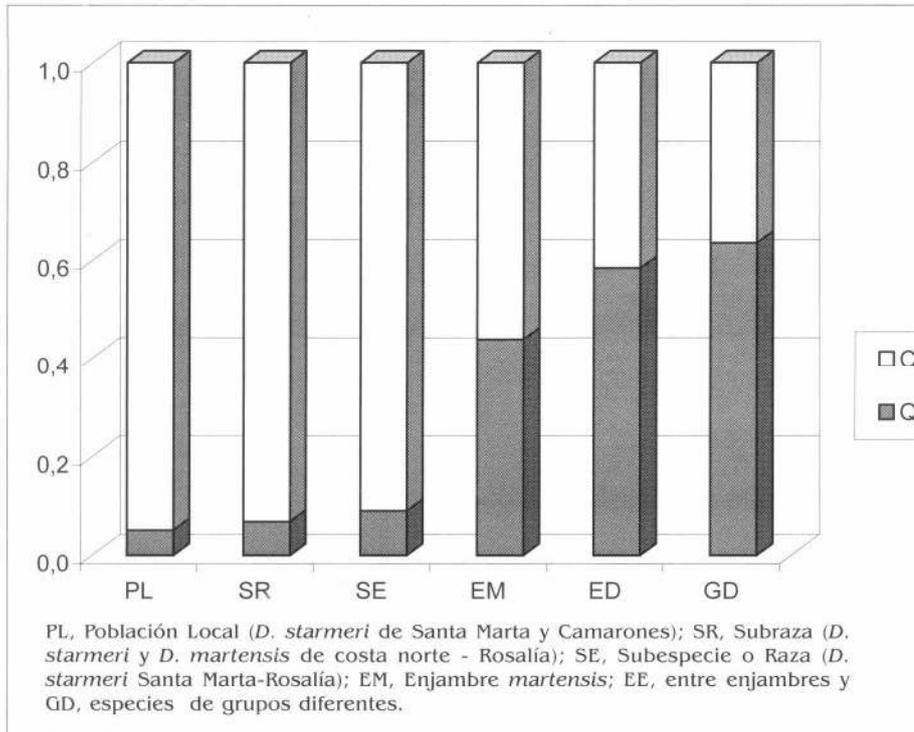


Figura 2. Comparación de frecuencias alélicas promedio de alelos no comunes (Q) y comunes (C).

Tabla 3. Distancias genéticas con sus respectivos errores estándar (bajo la diagonal) y las dentidades genéticas (sobre la diagonal) obtenidas para 12 loci enzimáticos

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	***** 1,0209	0,3603	0,3531	0,3149	0,3398	0,4049	0,4406	0,3558
2	± 0,3846 1,0411	***** 1,3119	0,2693	0,2332	0,2771	0,2345	0,1537	0,1951
3	± 0,3907 1,1554	± 0,4755 1,4558	***** 0,187	0,8295	0,8712	0,4166	0,3762	0,4264
4	± 0,4258 1,0794	± 0,5235 1,2832	± 0,1309 0,1379	***** 0,1031	0,902	0,515	0,4653	0,4468
5	± 0,4024 0,9042	± 0,4663 1,4504	± 0,1110 0,8756	± 0,095 0,6635	***** 0,7077	0,4928	0,4039	0,4955
6	± 0,3500 0,8197	± 0,5216 1,8727	± 0,3416 0,9777	± 0,2801 0,765	± 0,2929 0,9065	***** 0,1446	0,8654	0,528
7	± 0,3253 1,0333	± 0,6774 1,6341	± 0,3717 0,8524	± 0,3095 0,8056	± 0,3507 0,7021	± 0,1138 0,6387	***** 0,8029	0,448
8	± 0,3884	± 0,5863	± 0,3348	± 0,3348	± 0,3212	± 0,2657	± 0,3204	*****

1 = *D. buzzatii*, 2 = *D. melanogaster*, 3 = *D. starmeri* - Rosalía, 4 = *D. starmeri*-Santa Marta, 5 = *D. starmeri*-Camarones, 6 = *D. martensis*-Rosalía, 7 = *D. martensis*-Santa Marta y 8 = *D. uniseti*-Rosalía

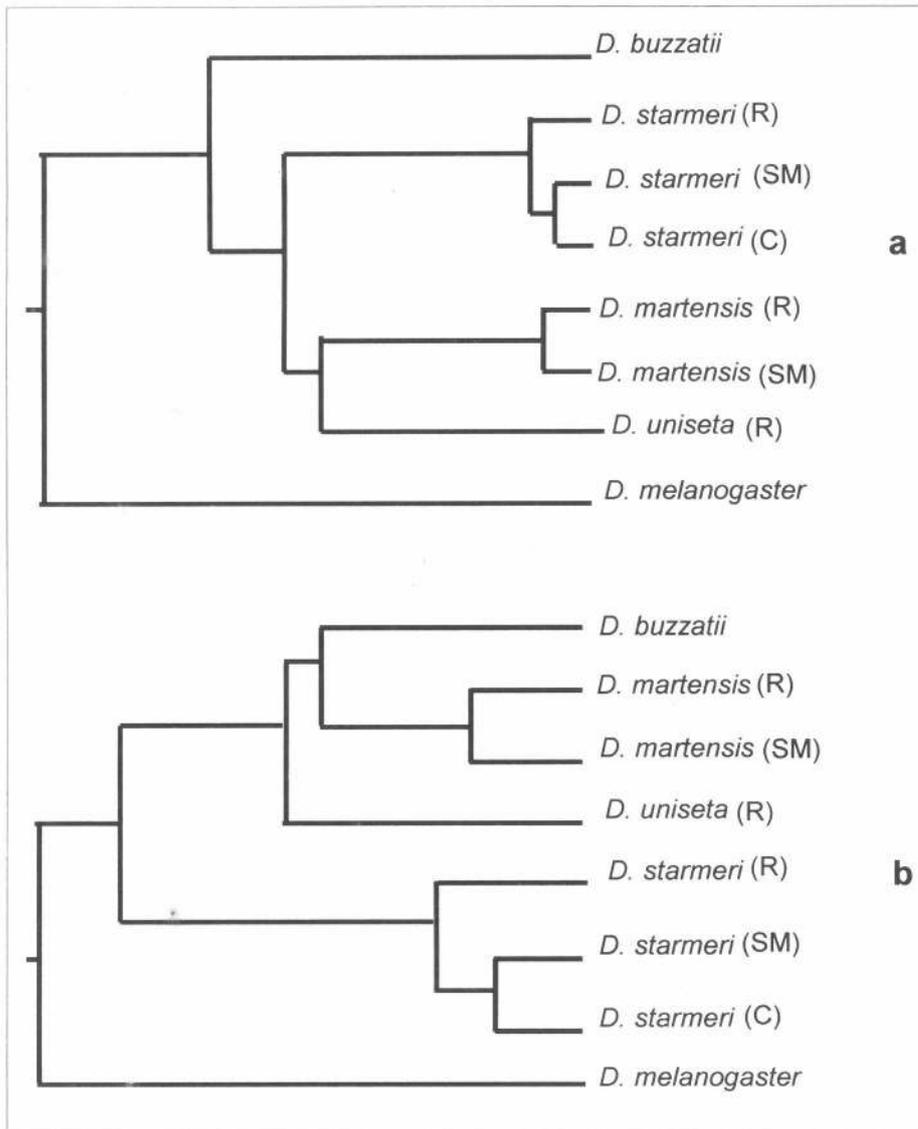


Figura 3. Fenograma obtenido por el método de UPGMA usando la Distancia (D) de Nei (1978). a, incluye todos los doce loci analizados. b, excluye los loci ubicados en del segundo cromosoma (R) = Rosalía, (SM) = Santa Marta, (C) = Camarones

blaciones de la costa norte tienen su propia estructura morfométrica, pero conservan su identidad como especie.

Subrazas. En *D. starmeri* y *D. martensis* las comparaciones entre las poblaciones de la costa norte y el desierto de la Tatacoa mostraron un valor promedio de distancia genética de $0,1412 \pm 0,002$. Es decir, se han acumulado en el tiempo 14 sustituciones alélicas por cada cien loci; valor que es 1,4 veces superior a la divergencia manifestada en *D. starmeri* en las poblaciones locales de la costa norte. Esta divergencia es mayor en *D. martensis* (0,1446) que en *D. starmeri* (0,1379). La magnitud de esta divergencia cae dentro del intervalo encontrado para subespecies por otros autores (Ayala *et al.* 1972; Zouros 1973; Sánchez 1987). Sin embargo, cuando se comparan los promedios de las frecuencias de alelos no comunes, se observa que tales poblaciones ($\bar{Q} = 0,0679$), no difieren sustancialmente de lo detectado en *D.*

starmeri para poblaciones locales ($\bar{Q} = 0,0509$). Zouros (1973) tampoco encontró diferencias entre las poblaciones locales (0,0016) y subrazas (0,002) del grupo mulleri. Por lo tanto, se considera que las poblaciones de *D. starmeri* y *D. martensis* de estas zonas alopátricas posiblemente presentan una divergencia típica de subrazas.

Entre las poblaciones de la costa norte y el desierto de la Tatacoa de las especies anteriormente mencionadas, también se ha evidenciado diferenciación a otros niveles. Rojas (2001), al realizar cruces circulares entre las poblaciones de Santa Marta, Camarones y Rosalía, observó que la viabilidad de los híbridos de la F1 (en las dos vías) y la descendencia de los retrocruces disminuyó significativamente tanto en *D. starmeri* como en *D. martensis*, siendo este efecto más acentuado en esta última especie; sin embargo, esta diferenciación no se reflejó a nivel alozímico para *D. martensis*.

No obstante para poder inferir adecuadamente al respecto es necesario analizar un mayor número de loci y de individuos. Además, Castañeda (2000) entre las poblaciones de *D. starmeri* de estas dos zonas geográficas evidenció que son morfológicamente diferentes (*D. mahalanobis* = 13,383).

Subespecie o raza. El valor de distancia genética más alto entre estas poblaciones alopátricas se detectó en *D. starmeri*, para las poblaciones de Santa Marta y Rosalía (0,1870). El cual es análogo al informado por otros autores para la categoría de subespecie (Hubby y Throckmorton 1965; Ayala *et al.* 1972; Yang *et al.* 1972; Zouros 1973; Sánchez 1987). Es decir, han ocurrido aproximadamente 19 sustituciones alélicas, acumuladas en el tiempo, por cada 100 loci entre estas poblaciones; divergencia que es aproximadamente 2,8 veces más grande que la distancia que exhibieron las poblaciones locales venezolanas, de la misma especie y 1,8 más grande que la población local de la costa norte.

Estas poblaciones manifestaron una reducción significativa de la descendencia en la F1 (Rojas 2001). En la población de Santa Marta, Prada (2002) observó un mayor polimorfismo y la presencia de heterocariotipos en híbridos cuando realizó cruces entre esta población y Rosalía. Además, Castañeda (2000) determinó morfométricamente, mediante distancias de Mahalanobis, que son diferentes (D.M. = 14,021). Aunque a nivel de aislamiento precigótico de selección múltiple, Pérez (2002) no encontró diferencias significativas entre estas poblaciones, sí se manifestó una tendencia hacia el reconocimiento de individuos de una misma localidad. Se denota que el aislamiento reproductor entre estas poblaciones es aún insuficiente, pero que ha comenzado a insinuarse. Por lo anteriormente mencionado se podría sugerir que dichas poblaciones están iniciando la primera etapa de especiación.

Enjambre martensis. Las distancias genéticas entre las especies del enjambre *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*) exhibieron valores que oscilan entre 0,6387 y 0,9777, con un valor medio de $\bar{D} = 0,7907 \pm 0,0315$. Sánchez (1987), para estas mismas especies, analizando 22 sistemas enzimáticos, encontró valores de divergencia que fluctúan entre 0,647 y 0,840, con un valor medio de 0,7225. Este nivel de diferenciación cae dentro del intervalo de distribución observado en otros enjambres de grupos diferentes (Ayala y Tracey 1974; Eisses *et al.* 1979; Cabrera *et al.* 1980; Cabrera *et al.* 1983).

Enjambres o clusters diferentes. El nivel de divergencia genética entre las poblaciones del enjambre *martensis* y *D. buzzatii* ($\bar{D} = 1,0055 \pm 0,0366$), se incrementó con respecto a lo obtenido para el enjambre *martensis*. Este resultado es concordante con los referenciados por Ayala y Tracey

(1974) y Eisses *et al.* (1979) para enjambres del grupo *willistoni* y *melanogaster*.

Especies de grupos diferentes. La divergencia genética entre especies de grupos diferentes, como es lógico, manifiesta los valores más altos de distancia genética (Cabrera *et al.* 1980; Cabrera *et al.* 1983).

Hecho que se confirmó en este estudio al comparar *D. melanogaster* con las poblaciones de *D. martensis*, *D. starmeri*, *D. uniseta*, y *D. buzzatii*, las cuales presentaron un valor medio de $1,4327 \pm 0,0934$.

En la figura 4 se grafican las identidades y distancias entre los diferentes ni-

veles taxonómicos detectados. Se aprecia un incremento gradual, desde el nivel de población local hasta el nivel de especies completamente diferenciadas. Las comparaciones entre las frecuencias de alelos comunes (C) y no comunes (Q), en los distintos niveles taxonómicos, se ajusta a lo encontrado por Zouros (1973) en especies del enjambre *mulleri*. En la figura 2 se muestra la relación inversa de Q y C para los diferentes niveles de divergencia.

En la figura 5 se grafican todos los parámetros analizados en este estudio para las especies del enjambre *martensis*, en la cual se puede apreciar que *D. starmeri* fue la especie más divergente. En esta especie el par de poblaciones Rosalía - Santa Marta (R-SM) presenta mayor diferenciación respecto al par de poblaciones locales, de Santa Marta y Camarones (SM-C).

Conclusiones

- Las especies del enjambre *martensis* (*D. martensis*, *D. starmeri* y *D. uniseta*) exhibieron bajos valores de heterocigosidad, fenómeno ya evidenciado en otras especies cactofílicas del grupo *repleta*.

- El análisis de los doce loci enzimáticos permitió sugerir seis niveles de divergencia taxonómica entre las especies: Población local ($D = 0,1031$), subrazas ($\bar{D} = 0,1412$), subespecies o razas ($\bar{D} = 0,1870$), especies de un mismo enjambre o cluster ($= 0,7907$), especies de enjambres diferentes ($\bar{D} = 1,0055$) y especies de grupos diferentes ($\bar{D} = 1,4327$).

- El dendograma construido, a partir de la matriz de distancias genéticas, separó acertadamente las especies analizadas de acuerdo con su divergencia evolutiva.

- Con esta investigación se pudo establecer que en *D. starmeri* las poblaciones geográficamente más cercanas (costa norte) no se diferenciaron alozímicamente, mientras que las poblaciones más distantes (costa norte y desierto de la Tatacoa) tanto en *D. starmeri* como en *D. martensis*, son diferentes alozímicamente. La divergencia más contundente se manifestó en *D. starmeri* entre las poblaciones de Santa Marta y Rosalía. Así en este estudio preliminar se sugiere un posible ejemplo de especiación alopátrica incipiente.

Recomendaciones

Realizar un análisis más riguroso ampliando tanto el número de individuos (los cuales deben ser recién coleccionados) como el número de loci analizados (mínimo 24), para evaluar el estado real evolutivo de las especies objeto de estudio.

Confrontar el grado de diferenciación genética obtenido a partir de las distancias genéticas de Nei, en este estudio, con otros métodos igualmente potentes como distancia de Mahalanobis y transformaciones angulares como las de Cavalli-Sforza y Eduarws.

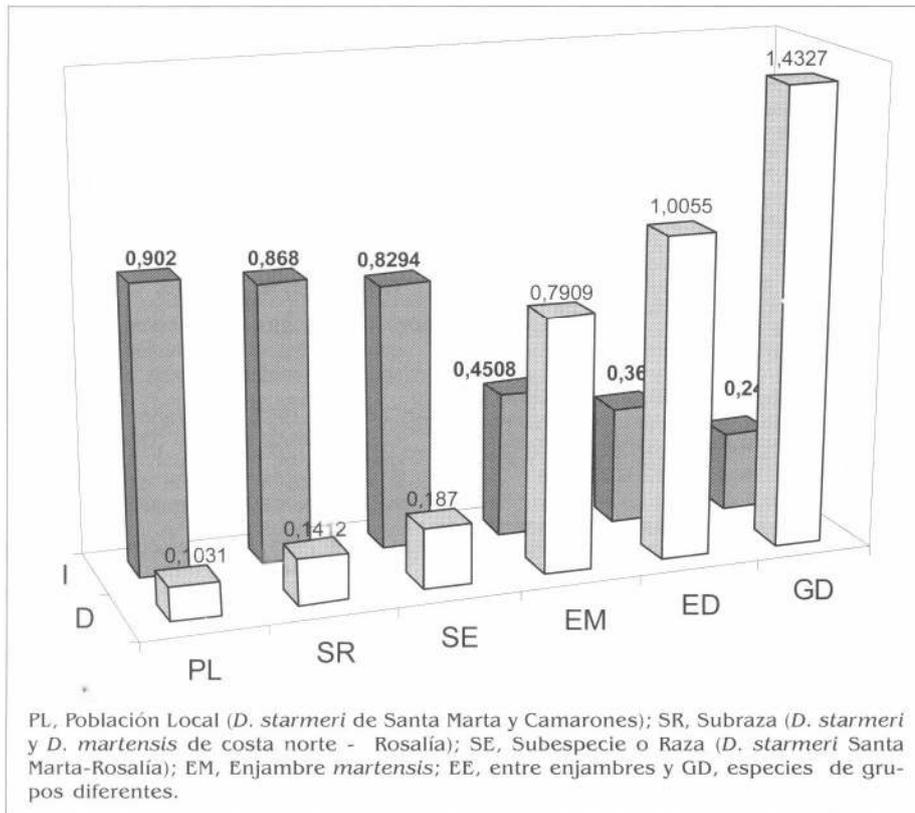


Figura 4. Comparación de identidades genéticas (I) y distancias genéticas (D) para todos los niveles de divergencia taxonómicos.

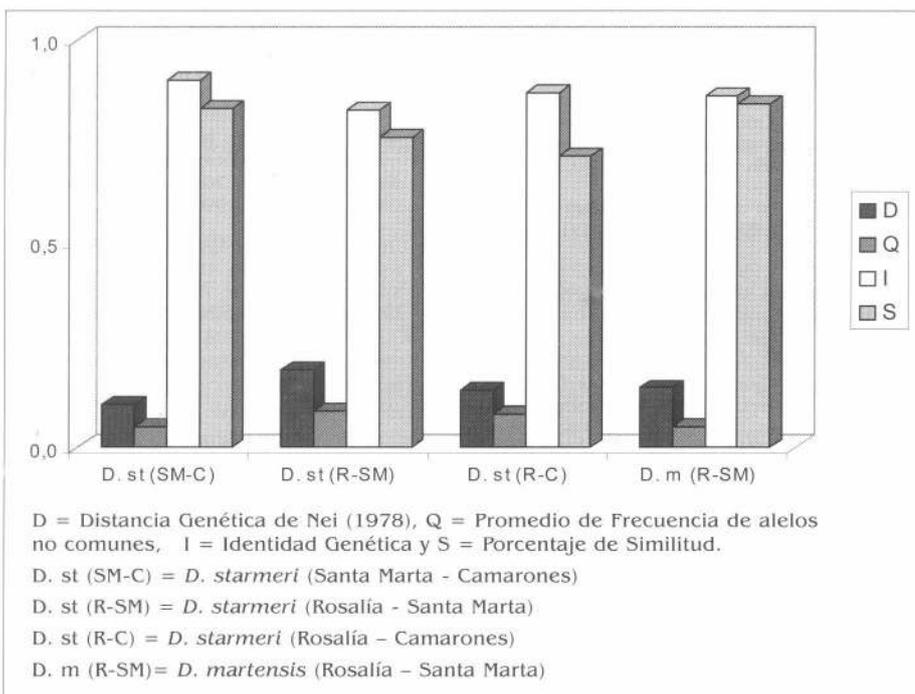


Figura 5. Comparación de parámetros para las poblaciones del enjambre *martensis*.

Extender los estudios morfométricos, cromosómicos, de cortejo y selección múltiple en las poblaciones colombianas de *D. martensis* y *D. unisetata*.

Agradecimientos

Se agradece a los profesores Gonzalo Palomino y Francisco Villa que colaboraron en las salidas de campo y a los estudiantes de biología de la Universidad del Tolima, por la ayuda en el muestreo que permitió obtener los individuos objeto de estudio. Al Director del Instituto de Genética, Mauricio Linares, por permitir realizar esta investigación en el laboratorio de electroforesis de la Universidad de los Andes. A la secretaria del Instituto de Genética, Cielo Rocío de Oro por su asistencia incondicional. A los comités de investigaciones de la Universidad de los Andes (Decanatura de Ciencias - Investigaciones varias, centro de costo 280) y de la Universidad del Tolima (465) por sus aportes económicos para la realización de este proyecto.

Literatura citada

- AYALA, F.; TRACEY, M. 1974. Genetic differentiation within and between species of the *Drosophila willistoni* group. *Proceeding. Nature. Academic. Science. USA* 71: 999-1005.
- AYALA, F.; POWELL, J.; TRACEY, M.; MAURAO, C.; PEREZ, S. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV Genic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70 (1): 113-139.
- BARKER, J.; MULLEY, J. 1976. Isozyme variation in natural populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 30: 213-233.
- BELTRÁN, M. 1999. Evidencia genética (Alozimas), para evaluar el posible origen híbrido de *Heliconius heuripa* (Lepidoptera: Nymphalidae). Tesis. Magíster Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Genética. Bogotá, D. C. 112 p.
- BELTRÁN, J.; QUEZADA-DIAZ, E.; RUIZ, A. SANTOS, M.; FONTDEVILA, A. 1995. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXII Linkage disequilibrium between allozymes and chromosome inversions in two colonizing populations. *Heredity* 74: 188-199.
- BENADO, M.; FONDEVILA, A.; CERDA, H.; GARCÍA, G.; RUIZ, A.; MONTERO, C. 1984. On the distribution and the cactophilic niche of *D. martensis* in Venezuela. *Biotropica* 16: 120-124.
- CABRERA, V. M.; GONZÁLEZ, A. M.; GULLÓN, A. 1980. Enzymatic polymorphism in *Drosophila subobscura* populations from the Canary Islands. *Evolution* 34 (5): 875-887.
- CABRERA, V. M.; GONZÁLEZ, A. M.; LARRUGA, J. M.; GULLÓN, A. 1983. Genetic Distance and evolutionary relationships in the *Drosophila obscura* group. *Evolution* 37 (4): 675-689.
- CASTAÑEDA, H. 2000. Análisis morfológico comparado en *Drosophila starmeri* de las poblaciones de Camarones (Guajira), Santa Marta (Magdalena) y la Rosalía (desierto de la Tatacoa - Huila). Tesis. Magíster Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Genética. Bogotá, D. C. 118 p.
- DE POLANCO, M. M. 1998. Estudios cromosómicos comparados de *Drosophila repleta* (cepa de Siboney Cuba) Vs *Drosophila repleta* (Wharton 1942) y *Drosophila martensis* (Valledupar, Barrancas y Riohacha). Tesis. Doctorado Genética de Poblaciones. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Genética Bogotá. 272 p.
- EISSES, K.; DIJK, H.; DELDEN, W. 1979. Genetic differentiation within the melanogaster species group of the genus *Drosophila* (Sophophora). *Evolution* 33 (4): 1063-1068.
- HOENIGSBERG, H. F.; MONTAÑO, A.; MORENO, R.; SANZ DE LA ROSA, M.; ORDÓÑEZ, M.; GRIGORIA DE BUENDIA, P. 1987. Genética de poblaciones en el trópico americano XXXIV. Las enzimas diagnosticas del enjambre *Martensis* del grupo *repleta* de *Drosophila* de la Guajira Colombiana. Instituto de Genética, Universidad de los Andes, Bogotá, D. E. Colombia. *Evolución Biológica* 1: 297-334
- HUBBY, J. L.; THROCKMORTON, L. 1965. Protein differences in *Drosophila*. II. Comparative species genetics and evolutionary problems. *Genetics* 52: 203-215.
- NAIR, P. S.; BRNCIC, D.; KOJIMA, J. 1971. Isozyme variations and evolutionary relationships in the mesophragmatica species group of *Drosophila*. University Texas. Publications 7103: 17-28.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetic*. Columbia University Press. EEUU. 125 p.
- PATTERSON, J. T.; STONE, W. S. 1952. *Evolution in the genus Drosophila*. MackMillan Co., New York. 89 p.
- PÉREZ, C. 2002. Cortejo y selección sexual entre poblaciones colombianas de *Drosophila starmeri*. Trabajo de grado. Bióloga, Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Biológicas, Bogotá, D. C. 42 p.
- POWELL, J. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology. The *Drosophila* model. Oxford University Press. New York. 562 p.
- PRADA, C. 2002. Citogenética comparada de *Drosophila starmeri* (Diptera: Drosophilidae) de dos ecosistemas áridos aislados Colombianos. Trabajo de grado. Biólogo, Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Ibagué. 124 p.
- ROJAS, A. 2001. Análisis del aislamiento reproductivo en las especies cactofílicas del enjambre *martensis*, en dos regiones colombianas (costa norte y desierto de la Tatacoa). Tesis. Magíster Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Santa fe de Bogotá, D. C. 70 p.
- RUIZ, A.; FONTDEVILA, A. 1981. Ecología y evolución del subgrupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta Científica Venezolana* 32: 338-345.
- RUIZ, A.; WASSERMAN, M. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* 70: 582-596.
- SÁNCHEZ, A. 1987. Relaciones filogenéticas en los clusters *buzzatii* (Grupo *repleta*) y *martensis* de *Drosophila*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Ciències. Bellaterra. 458 p.
- VILELA, C.R. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Review Brazilian Entomology* 27 (1): 1-114.
- WASSERMAN, M. 1962. Cytological studies of the *repleta* group. University Texas, Publications. 5721:132-156.
- WASSERMAN, M. 1967. Collections of *Drosophila* from Central Mexico. *Drosophila Information Service* 42: 67-68.
- YANG, S.; WHEELER, L. L.; BOCK, R. 1972. Isozyme variations and phylogenetic relationships in the *Drosophila peptinata*. Complex. University Texas Publications. 7213: 213-227
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. 1999. PopGene versión 1.31. Microsoft Window- based freeware for Population Genetic Analysis. Quick user guide. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>. Fecha última revisión: septiembre 2001. Fecha ultimo acceso: Agosto 30 1999.
- ZOUROS, E. 1973. Genic differentiation associated with the early stages of speciation in the *mulleri* subgroup of *Drosophila*. *Evolution* 27: 601-621.

Recibido: Ago. 22 / 2002

Aceptado: Feb. 21 / 2003

Captura de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) en trampas cebadas con su feromona sexual

Capture of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)
in traps baited with its sex pheromone

JORGE SALAS¹

¹ Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 75-78 (2004)

Resumen. El minador pequeño de la hoja del tomate *Tuta* (= *Scrobipalpus*) *absoluta* (Myerick), es un insecto plaga de importancia primaria, dentro del complejo insectil que ataca el cultivo del tomate en Venezuela. Las estrategias para su control dentro de un programa MIP han sido: medidas culturales como la destrucción de residuos de cosecha (socas) y la rotación con cultivos no solanáceos, control biológico a través del parasitoide de huevos *Trichogramma* sp. y uso de insecticidas biológicos e insecticidas organosintéticos. Su feromona sexual sintética [(E,Z,Z) - 3,8,11-tetradecatrienil acetato (95%) + (E,Z)-3,8-tetradecadienil acetato (5%)], dispensada en dedales de goma, fue evaluada en siembras experimentales de tomate durante 1997 y en siembras comerciales en 1999, usando trampas de agua (TA) y trampas Delta adhesivas (TDA) como dispositivo de captura. Los resultados indican que las capturas en las TA variaron entre 1,25 y 4,33 adultos por trampa por noche (a/t/n), y en las TDA entre 0,52 y 2,75 a/t/n durante las primeras 5 semanas, lo cual pudiera indicar que las poblaciones fueron bajas. Al colocar dedales nuevos con feromona (19-09-97), las capturas aumentaron sustancialmente, variando entre 4,11 y 17,58 a/t/n y 2,11 y 15,42 a/t/n, respectivamente. En 1999, la captura en ambas trampas fue baja, oscilando entre 0,46 y 8,18 a/t/n y 0,59 y 2,48 a/t/n, respectivamente. La TA registró un mayor número de capturas con diferencias ($p < 0,05$) respecto a la TDA. Estos resultados sugieren que dicha feromona puede detectar dicho insecto-plaga aún en poblaciones bajas y representa una nueva alternativa para el monitoreo y/o control de sus poblaciones dentro de un programa MIP.

Palabras clave: Atrayente sexual. Geléquido. Manejo integrado de plagas. Minador de la hoja. Tomate.

Summary. The lesser tomato leaf miner *Tuta* (= *Scrobipalpus*) *absoluta* (Myerick), is a pest insect of primary importance in the insect complex that attacks tomato in Venezuela. Several control strategies for its control with an IPM program have been: cultural strategies, such as the destruction of post-harvest residues and rotation with non-solanaceous crops, biological control with the egg parasitoid *Trichogramma* sp. and the use of biological and organosynthetic insecticides. Its synthetic sex pheromone [(3E, 8Z, 11Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate (95%) + (3E, 8Z)-3,8-tetradecadienyl acetate (5%)], dispensed in rubber septa, was evaluated in experimental tomato plots in 1997 and in commercial plantings in 1999, using water traps (TA) and Delta sticky traps (TDA) as capture devices. Results showed that TA captures ranged from 1,25 and 4,33 adults per trap per night (a/t/n), and TDA between 0,52 and 2,75 a/t/n during the first five weeks which could indicate that populations were low. After placing out new lures (19-09-97), captures increase substantially, ranging from 4,11 and 17,58 a/t/n and 2,11 and 15,42 a/t/n, respectively. In 1999 capture in both traps was low, ranging from 0,46 and 8,18 a/t/n and 0,59 and 2,48 a/t/n, respectively. TA had a greater number of captures with differences ($p < 0,05$) compared to TDA. These results suggest that this pheromone can detect this insect pest even in low populations and represents a new alternative to monitor and/or control its populations in an IPM program.

Key words: Sex attractant. Gelechiid. Integrated pest management. Leaf miner. Tomato.

Introducción

El minador pequeño de la hoja del tomate o palomilla pequeña *Tuta* (= *Scrobipalpus*) *absoluta* (Myerick), es uno de los dos insectos plaga de esta familia, que atacan el cultivo del tomate en el estado Lara, Venezuela, especialmente en el Valle de Quibor. Es considerado de gran importancia económica en el país (Salas 1981, 2001b), y como el factor más importante que limita la producción de tomate en Suramérica (Bahamondes y Mallea 1969; Quiroz 1976).

En el Manejo Integrado de Plagas (MIP), se han utilizado las trampas con feromona sexual de insectos para la evaluación y control de sus poblaciones (Carde y Elkinton 1984). Las poblaciones de otros insectos geléquidos como *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) han sido eficientemente monitoreados con trampas cebadas con su feromona sexual (Jenkins *et al.* 1990) y exitosamente manejadas a través del monitoreo y la técnica de la interrupción del apareamiento en siembras de tomate de uso industrial (Trumble y Alvarado-Rodríguez 1993). En *Plthorimaea operculella* (Zeller), otro geléquido plaga de

importancia económica en tomate, se han empleado trampas con feromonas, como una estrategia de monitoreo y/o control en programas de manejo integrado (Kennedy 1975; Raman 1984; Salas *et al.* 1985).

La feromona sexual de *S. absoluta* consiste de 2 componentes. El más importante, que representa cerca del 90% del material volátil encontrado en las glándulas sexuales de hembras en celo, fue identificado como (E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienil acetato (TDTA), y un componente secundario. El componente menor (10%) se caracterizó parcialmente como tetradecadienil acetato

1 Entomólogo, INIA, Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. Apartado Postal 592. Barquisimeto, Venezuela. E-mail: jsalas@inia.gov.ve/ salasjl@hotmail.com

(Attygalle *et al.* 1995, 1996), el cual resultó ser posteriormente, (E,Z)-3,8-tetradecadienil acetato (TDDA) (Svatos *et al.* 1996). Griepink *et al.* (1996) registraron las mismas 2 sustancias químicas como los componentes activos de la feromona sexual de *S. absoluta*. En bioensayos en un túnel de viento, la mezcla de estos 2 componentes 10:1, fue altamente atractiva a machos de *S. absoluta*, induciendo una actividad sexual (aleteo, vuelo, posarse en la fuente de atracción y cortejo) significativa, en comparación con sólo TDTA (Svatos *et al.* 1996).

Para evitar o al menos reducir el uso indiscriminado de insecticidas en los campos de tomate, es esencial desarrollar un método eficiente de monitoreo de las poblaciones de la plaga; por esto, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la atracción ejercida por la feromona sexual sintética [(E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienil acetato (95%) (TDTA) + (E,Z)-3,8-tetradecadienil acetato (5%) (TDDA) en las poblaciones de machos de *T. absoluta*, en siembras experimentales y comerciales de tomate, usando trampas de agua y Delta adhesivas como dispositivo de captura y así disponer de una nueva alternativa para el monitoreo y control de este insecto plaga en un programa de manejo integrado.

Materiales y Métodos

Se evaluó la atracción y captura de adultos machos de *T. absoluta* en trampas cebadas con dedales de goma impregnados con su feromona sexual sintética: [(E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienil acetato (95%) (TDTA) + (E,Z)-3,8-tetradecadienil acetato (5%) (TDDA), en siembras experimentales de tomate en el Campo Experimental Quibor del INIA (antes FONAIAP) en 1997 y en siembras comerciales localizadas en Los Jebes, Municipio Jiménez del estado Lara en 1999. Ambas localidades están situadas a 9°53' N y 69°39' O, a 680 msnm, con una temperatura y precipitación promedio de 29°C y 575 mm, respectivamente. En 1997 se colocaron 20 trampas de agua (Salas 2001a) y 20 Delta (ISCA Technologies Inc., USA), en dos lotes experimentales de tomate de 44 x 50 m, variedad Río Grande, separadas entre sí a 10 m y a 3 m de los bordes, del 15 de agosto al 19 de septiembre, y posteriormente se ubicaron dedales nuevos con feromona del 19 de septiembre al 26 de septiembre. En el año 1999, igualmente se dispusieron 20 trampas de agua y 20 trampas Delta adhesivas en una siembra comercial de aproximadamente 1,5 hectáreas de tomate híbrido Río Grande, distanciadas a aproximadamente 15-20 m. Los conteos se realizaron cada 2 a 3 días en 1997 y entre 3 a 10 días en 1999. En cada evaluación se contó y registró el número de especímenes capturados y se le cambió el agua con detergente a la trampa de agua y la laminilla de cartón con pegamento a la trampa Delta.

Para la comparación de los diseños de trampa, cada trampa fue considerada como un tratamiento. Los datos de captura colectados se transformaron de la distribución

Poisson a la normal, mediante el procedimiento señalado por Steel y Torrie (1988). Igualmente, se les practicó un análisis de varianza y una prueba de medias de Rango Múltiple de Duncan. Todo el análisis estadístico de los datos estudiados se procesaron a través del programa SAS (1990).

Resultados

Los resultados obtenidos indican que durante 1997 las capturas promedio de adultos de *T. absoluta* en las trampas de agua variaron entre 1,25 y 4,33 adultos por trampa por noche (a/t/n), mientras que en las Delta entre 0,52 y 2,75 a/t/n durante las primeras 5 semanas de observación, lo cual pudiera indicar que las poblaciones fueron bajas. Al colocar dedales nuevos con feromona (19-09-97), las capturas prome-

dio aumentaron sustancialmente, variando entre 4,11 y 17,58 a/t/n y 2,11 y 15,42 a/t/n, respectivamente (Tabla 1).

La situación de capturas bajas durante 1999 en las trampas de agua fue muy similar al inicio en 1997, aun cuando fueron ligeramente superiores. Dichas capturas oscilaron entre 0,46 y 8,18 a/t/n, pero contrariamente a 1997 las mayores capturas se registraron en los 5 primeros conteos (2 semanas), mientras que en 1997 las capturas fueron más homogéneas durante los conteos realizados en las primeras 5 semanas. En las trampas Delta (Tabla 2), las capturas también fueron bajas pero más uniformes durante las 4 semanas de evaluación, variando las capturas entre 1,00 y 2,48 a/t/n (Tabla 2). En cuanto al diseño de trampa, las de agua capturaron significativamente más adultos

Tabla 1. Captura de *T. absoluta* en trampas de agua y Delta con feromonas en siembras experimentales de tomate, Quibor, Estado Lara, Venezuela. 1997.

N° CONTEO	FECHA	TRAMPA TOTAL	ADULTOS CAPTURADOS		
			AGUA A/T/N ⁽¹⁾	TRAMPA TOTAL	DELTA A/T/N ⁽¹⁾
1	AGO 13	154	4,28	73	2,03
2	AGO 15	45	1,25	42	1,17
3	AGO 18	53	0,98	28	0,52
4	AGO 20	67	1,86	45	1,25
5	AGO 22	57	1,58	40	1,11
6	AGO 25	187	3,46	90	1,67
7	AGO 27	99	2,75	49	1,36
8	AGO 29	96	2,67	60	1,67
9	SEP 01	195	3,61	105	1,94
10	SEP 03	125	3,47	70	1,94
11	SEP 05	156	4,33	99	2,75
12	SEP 08	127	2,35	79	1,46
13	SEP 10	80	2,22	55	1,53
14	SEP 12	113	3,14	70	1,94
15	SEP 15	166	3,07	98	1,81
16	SEP 17	131	3,64	72	2,00
17	SEP 19 ⁽²⁾	108	3,00	62	1,72
18	SEP 22	74 [#]	4,11	38	2,11
19	SEP 24	103	8,58	95	7,92
20	SEP 26	211	17,58	185	15,42
	TOTAL	2.347	3,89	1.455	2,67

(1) A/T/N: Promedio Adulto por Trampa por Noche

(2) Se colocaron feromonas nuevas

Tabla 2. Captura de *T. absoluta* en trampas de agua y Delta con feromonas en siembras de tomate. Quibor, Estado Lara, Venezuela 1999.

N° CONTEO	FECHA	TRAMPA TOTAL	ADULTOS CAPTURADOS		
			AGUA A/T/N	TRAMPA TOTAL	DELTA A/T/N
1	AGO 31	1308	8,18	140	2,33
2	SEP 03	748	6,23	198	2,48
3	SEP 07	786	4,91	275	1,38
4	SEP 10	302	2,52	300	2,14
5	SEP 14	326	2,04	220	2,16
6	SEP 17	111	0,93	75	1,88
7	SEP 21	142	0,89	248	1,77
8	OCT 01	183	0,46	140	1,00
9	OCT 08	401	1,43	120	0,86
10	OCT 13	176	0,88	95	0,91
11	OCT 15	80	1,00	70	0,70
12	OCT 22	114	0,58	82	0,59
		4.677	2,50	1.963	1,52

(7.024), que las Delta (3.418) durante los 2 periodos evaluados (Tabla 3).

Discusión

Tabla 3. Captura de *T. absoluta* en trampas de agua y Delta con feromonas en siembras de tomate

DISEÑO TRAMPA	ADULTOS TOTAL	CAPTURADOS A/T/N
AGUA	7.024	3,20±3,07 a ⁽¹⁾
DELTA	3.418	2,10±0,50 b

(1) Promedios con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según la prueba de Rango Múltiple de Duncan.

Los resultados presentados difieren mayormente de los informados por Attygalle *et al.* (1996), quienes obtuvieron capturas promedio mucho mayores, aun cuando ellos solamente usaron el componente (TDTA) en dedales de goma conteniendo 1, 10 y 100 μg de esa sustancia. Los mismos autores señalaron que sus ensayos fueron conducidos en áreas muy infestadas, ya que el tratamiento testigo con trampas conteniendo solamente hexano, capturaron algunos machos, a diferencia del área con bajas poblaciones de este estudio. Igualmente, Uchoa-Fernandes *et al.* (1995) y Ferrara *et al.* (2001) indicaron que la diferencia en el número de insectos capturados en dos áreas diferentes se debe mayormente a la densidad poblacional.

Michereff Filho *et al.* (2000a), en ensayos de campo de tomate, encontraron que la adición del componente menor (TDDA) al componente mayor (TDTA) de la feromona de *T. absoluta* no incrementó significativamente la captura de machos. Los mismos autores señalaron que el TDTA es altamente atractivo y registró una captura de 869 machos por trampa en 3 noches.

Michereff Filho *et al.* (2000a) señalaron que la adición de isómeros dienos del componente menor (TDDA) al mayor (TDTA), no alteró significativamente el número de machos capturados, ya que el TDTA fue altamente atractivo, lo cual difiere con lo indicado por Svatos *et al.* (1996) quienes encontraron, en estudios realizados en un túnel de viento, que la mezcla de TDTA+TDDA fue más efectiva en el comportamiento sexual de machos de *S. absoluta* que TDTA sólo. Esta aseveración, desde un punto de vista práctico, indica que la adición del dieno (TDDA) al trieno (TDTA), es innecesaria para la captura de machos de *T. absoluta* en las siembras, ya que el componente mayor (TDTA) usado sólo, es suficiente y los costos de los dispositivos atrayentes (lures) se reducen significativamente.

Algo inesperado observado en este estudio, lo cual coincide con lo señalado por Attygalle *et al.* (1996), es que se capturaron adultos de otro geléquido *P. operculella* en pocas cantidades, en trampas cebadas con el atrayente de *T. absoluta* y similarmente pocos

adultos de *T. absoluta* se capturaron en trampas con feromonas de *P. operculella* (observaciones del autor). Esta situación es comprensible, si se tiene en cuenta que los componentes del atrayente sexual de ambas especies son compuestos muy relacionados estructuralmente.

En cuanto al diseño de trampa (Tabla 3), se observaron diferencias ($p < 0,05$) entre la trampa de agua y la Delta (adhesiva). Estos resultados coinciden con los de otros autores, quienes encontraron que las trampas CICA-R y CICA-Q (trampas de agua), muy similares a las usadas en este estudio, surtieron la mejor captura de insectos en comparación con 3 diseños de trampas adhesivas (Attygalle *et al.* 1996, Ferrara *et al.* 2001). Además, Ferrara *et al.* (2001) encontraron que las trampas de agua no presentan la limitación de saturación en la captura de adultos que presentan las adhesivas.

Quizá, la mayor captura de machos de *T. absoluta* está más relacionado con los componentes de la feromona que con el diseño de trampa. Al respecto, Michereff Filho *et al.* (2000a) indicaron que la adición del componente menor (TDDA) de la feromona de *T. absoluta* no incrementó significativamente la captura en evaluaciones de campo en comparación con el componente mayor (TDTA). Sin embargo, Salas *et al.* (1991) hallaron que la trampa de agua registró significativamente más captura de *P. operculella* en relación con la trampa de embudo y la trampa Delta adhesiva en siembras de papa.

Michereff Filho *et al.* (2000b), al estudiar el posible uso del componente mayor (TDTA) del atrayente sexual de *T. absoluta* en la técnica de "disrupción sexual o confusión en el apareamiento", encontraron que fue exitoso, y que podría ser utilizado para lograr un control deseado en programas de manejo integrado de este insecto plaga. Sin embargo, señalan que se necesitan estudios más detallados sobre su ecología y la feromona, para un mejor entendimiento de la orientación del macho y lograr un impedimento efectivo de la cópula de esta especie.

Conclusiones

- Basándose en los resultados obtenidos, se concluye que se pueden detectar y evaluar las poblaciones de *T. absoluta* con su feromona sexual sintética, aun en niveles poblacionales bajos.

- Igualmente, que esta técnica es de gran utilidad por su facilidad de uso y costo bajo, en la evaluación y control de poblaciones de este insecto plaga en programas de manejo Integrado de plagas.

Agradecimientos

El autor agradece a José Antonio Salas y a Luis Nixon (INIA-Lara) por la asistencia en los análisis estadísticos. Igualmente agradece a Omar Mendoza, María Elena Ruiz y

Liliana Torrealba, por su ayuda en la toma de datos de campo.

Literatura citada

- ATTYGALLE, A. B.; JHAM, G. N.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R. T. S.; VILELA, E. F.; FERRARA, F. A.; UCHOA-FERNANDES, M. A.; MEINWALD, J. 1995. Microscale, random reduction: application to the characterization of (3E,8Z,11Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate, a new Lepidopteran sex pheromone". *Tetrahedron Letters* 36: 5471-5474.
- ATTYGALLE, A. B.; JHAM, G. N.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R. T. S.; VILELA, E. F.; FERRARA, F. A.; UCHOA-FERNANDES, M. A.; MEINWALD, J. 1996. (3E,8Z,11Z)-3,8,11-tetradecatrienyl acetate, a sex attractant for the tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bioorg. Med. Chem.* 4 (3): 305-314.
- BAHAMONDES, L. A.; MALLEA, A. R. 1969. Biología en Mendoza de *Scrobipalpus absoluta* (Myerick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), especie nueva para la República Argentina. *Rev. Fac. Cien. Agríc.* 15: 96-104.
- CARDE, R. T.; ELKINTON, J. S. 1984. Field trapping with attractants: methods and Interpretation. p.111-129. En: H.E. Hummel & T.A. Miller (eds.). *Techniques in Pheromone Research*. New York, Springer-Verlag. 464 p.
- FERRARA, F. A.; VILELA, E. F.; JHAM, G. N.; EIRAS, A. E.; PICANÇO, M. C.; ATTYGALLE, A. B.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R. T. S.; MEINWALD, J. 2001. Evaluation of the synthetic major component of the sex pheromone of *Tuta absoluta* (Myerick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Chem. Ecol.* 27 (5): 907-917.
- GRIEPINK, F. C.; van BEEK, T. A.; POSTHUMUS, M. A.; VISSER, J. H.; VOERMAN, S. 1996. Identification of the sex pheromone of *Scrobipalpus absoluta*: Determination of double bond position in triple unsaturated straight chain molecules by means of dimethyl disulphide derivatization. *Tetrahedron Letters* 37: 411-414.
- JENKINS, J. W.; DOANE, C. C.; SCHUSTER, D. J.; McLAUGHIN, J. R.; JIMENEZ, M. J. 1990. Development and commercial application of sex pheromone for control of the tomato pinworm, p. 269. En: R.L. Ridgway, R.M. Silverstein, M.N. Inscoc (eds.). *Behavior-Modifying Chemical for Insect Management*. Marcel Dekker. New York.
- KENNEDY, G. G. 1975. Trap design and other factors influencing capture of male potato tuberworm moths by virgin female baited traps. *J. Econ. Entomol.* 68: 305-308.
- MICHEREFF FILHO, M.; VILELA, E. F.; ATTYGALLE, A. B.; MEINWALD, J.; SVATOŠ, A.; JHAM, G. N. 2000a. Field trapping of tomato moth *Tuta absoluta* with pheromone traps. *J. Chem. Ecol.* 26 (4): 875-881.
- MICHEREFF FILHO, M.; VILELA, E. F.; JHAM, G. N.; ATTYGALLE, A. B.; SVATOŠ, A.; MEINWALD, J. (2000b). Initial studies of mating disruption of the tomato moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11 (6): 621-628.
- QUIROZ, C. E. 1976. Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate

- Scrobipalpus absoluta* (Meyrick). Agri. Tec. 36: 82-86.
- RAMAN, K. V. 1984. Evaluation of a synthetic sex pheromone funnel trap for potato tuberworm moths (Lepidoptera: Gelechiidae). Environ Entomol. 13: 61-64.
- SALAS, J. 1981. *Scrobipalpus absoluta* y *Phthorimaea operculella* gelechidos que atacan el cultivo de tomate en el Valle de Quibor, Venezuela. Bol. Ent. Venez. N.S., 1 (6): 86.
- SALAS, J. 2001a. Captura de *Spodoptera frugiperda* en trampas con feromona. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 59 p.48-51.
- SALAS, J. 2001b. Insectos Plagas del Tomate. Manejo Integrado. Maracay, Venezuela., Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara, 102 p. (Serie B-Nº 1).
- SALAS, J.; PARRA, A.; ALVAREZ, C. 1985. Evaluación preliminar de la feromona sexual sintética del minador grande de la hoja del tomate *Phthorimaea operculella* en la captura de machos. Agronomía Tropical (Venezuela). 35 (4-6): 139-144.
- SALAS, J.; ALVAREZ, C.; PARRA, A. 1991. Evaluación de dos componentes de la feromona sexual, tres diseños y altura de colocación de trampas, en la eficiencia de atracción y captura de adultos machos de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agronomía Tropical (Venezuela). 41 (3-4): 169-178.
- SAS Institute. 1990. SAS/STAT user's guide, version 6, 4th ed., vol.2. SAS Institute, Cary, NC, USA, 329 p.
- STEEL, G. D.; TORRIE, J. H. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. 1ª Ed. Español. Mc Graw Hill. 622 p.
- SVATOS, A.; ATTYGALLE, A. B.; JHAM, G. N.; FRIGHETTO, R. T. S.; VILELA, E. F.; SAMAN, D.; MEINWALD, J. 1996. Sex pheromone of the tomato pest *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Chem. Ecol. 22 (4): 787-800.
- TRUMBLE, J. T.; ALVARADO-RODRIGUEZ, B. 1993. Development and economic evaluation of an IPM program for fresh market tomato production in Mexico. Agric Ecol. Environ. 43: 267-284.
- UCHÔA-FERNANDES, M. A.; VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. 1995. Ritmo diario de atração em *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Rev. Bras. Bio. 55: 67-73.

Recibido: Ene. 28 / 2003

Aceptado: Ago. 13 / 2003

Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática de *Serratia marcescens* contra *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Effect of culture conditions on the enzymatic activity of *Serratia marcescens* against *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

CARLOS FELIPE BOSA O.¹; ALBA MARINA COTES P.²

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 79-85 (2004)

Resumen. Se evaluó la actividad enzimática de extractos de *Serratia marcescens*, previamente sometida o no a pases sucesivos en larvas de *Tecia solanivora* Povolny y a crecimientos continuos sobre medios suplementados o no, con los sustratos potenciales inductores de virulencia (salvado de trigo y homogeneizado de larvas del insecto). Con la biomasa de la bacteria producida en estos medios, se prepararon extractos enzimáticos a los cuales se les determinó la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa PR-1 y β -esterasa. Para ello, la bacteria fue sometida a cinco cultivos sucesivos en estos medios y en cada cultivo se evaluaron las actividades mencionadas. Se determinó que los crecimientos sucesivos de la bacteria sobre los medios suplementados con estos potenciales sustratos, afectaron las actividades enzimáticas de los extractos, incrementándose éstas con el tercer crecimiento sucesivo de *S. marcescens* en los medios suplementados con los sustratos inductores y siendo estas actividades ligeramente mayores cuando la bacteria creció en los medios suplementados con el homogeneizado de larvas del insecto.

Palabras clave: Bacterias entomopatógenicas. *Serratia* sp. Sustratos inductores. Enzimas.

Summary. The enzymatic activity of *Serratia marcescens* extracts was evaluated, previously inoculated or not on *Tecia solanivora* Povolny larvae, and successively grown in culture media supplemented or not with potential virulence inductors (wheat bran and homogenised *T. solanivora* larvae). The bacteria biomass obtained from these media were used to prepare enzymatic extracts for which the activity of the enzymes N-acetylglucosaminidase, quimoelastase protease PR-1 and β -esterase were determined. The bacteria were grown up in five successive cultures on these media, and in each culture these activities were also evaluated. We determined that successive growth of the bacteria on culture media supplemented with these potential substrates affected the extract enzymatic activities, increasing with the third successive growing of *S. marcescens* in the supplemented culture media, these activities being slightly higher when the bacteria grew on media supplemented with homogenised insect larvae.

Key words: Entomopathogenic bacteria. *Serratia* sp. Inductor substrates. Enzymes.

Introducción

En la cutícula de los insectos existen componentes de origen bioquímico que pueden ser utilizados como fuente nutricional para los microorganismos entomopatógenos. Algunos estudios indican que puede existir una relación entre el aumento en la producción de enzimas extracelulares y el incremento en la virulencia de los entomopatógenos, cuando se utilizan medios de cultivo suplementados con estos específicos sustratos inductores (Flach *et al.* 1992; Sampson y Gooday 1998).

St Leger, en 1997, encontró que al adicionar a un medio de cultivo cutícula de larvas de *Manduca sexta* se obtuvieron las mayores producciones y actividades de enzimas proteolíticas para los hongos *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Así mismo, Gónzales *et al.* (1999) observaron un incremento en la patogeni-

dad de cuatro aislamientos de *B. bassiana* contra adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), cuando estos aislamientos se cultivaron continuamente en medios de cultivo suplementados con adultos de la broca del café. Sin embargo, son muy incipientes los estudios que relacionan los mecanismos enzimáticos de los microorganismos biocontroladores con su patogenicidad en insectos. Para el caso de las bacterias como las del género *Serratia* estos mecanismos no han sido completamente dilucidados (Núñez 1993). En bacterias como *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas* sp., la producción de enzimas como quitinasas y proteasas parece estar involucrada con el incremento de su virulencia hacia algunos insectos plaga (Flach *et al.* 1992).

De otra parte, algunas investigaciones indican que los crecimientos o cultivos continuos de los entomopatógenos so-

bre medios suplementados con sustratos inductores de virulencia, pueden incrementar su patogenicidad hacia los insectos plaga; sin embargo, también se ha demostrado que los continuos cultivos de estos microorganismos, conllevan a procesos de heterocariosis, que tienen como consecuencia la pérdida ó disminución de su virulencia, haciendo necesaria su reactivación periódica sobre los insectos susceptibles (Schaerffenberg 1964).

El conocimiento sobre la adecuada utilización de estos factores diferentes en el crecimiento y producción de los microorganismos entomopatógenos proporciona nuevas herramientas para el desarrollo de entomopatógenos mayormente biocontroladores de los insectos plaga, ya que se pueden desarrollar producciones más eficientes de estos microorganismos, en medios de cultivo suplementados con sustratos inductores adecuados y especifi-

1 Autor para correspondencia: B. Sc. M. Sc. Investigador del Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas MIP Corpoica - Tibaitatá. Teléfono: 4227300. Km 14 vía Mosquera. E-mail: Carlosfelipeb@yahoo.es

2 Ph. D. Fitopatología. Investigadora principal. Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C. I. Tibaitatá. E-mail: acotes@corpoica.org.co

cos, además de permitir la selección de los aislamientos más virulentos crecidos previamente sobre estos medios de cultivo suplementados.

Con el fin de esclarecer y relacionar algunos de los mecanismos enzimáticos en la patogenicidad de bacterias entomopatógenas como las del género *Serratia*, el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar el efecto que producen las inoculaciones sucesivas de la bacteria en larvas del insecto y sus crecimientos continuos en medios de cultivo suplementados con sustratos inductores de virulencia, sobre las actividades enzimáticas de extractos de *S. marcescens*. La hipótesis planteada propone lo siguiente: ¿es posible incrementar o, por el contrario, disminuir las actividades enzimáticas de extractos de *S. marcescens* mediante la combinación de diferentes factores de cultivo, como sus inoculaciones en larva del insecto y sus crecimientos en medios suplementados con sustratos potencialmente inductores?. En esta publicación se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática de extractos de la bacteria; posteriormente, en otra publicación se presentarán y se relacionarán los resultados obtenidos de la actividad enzimática con la actividad biocontroladora de la bacteria hacia larvas de *T. solanivora*.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica – Tibaitatá y fue ejecutada durante los años 1999 al 2001.

Materiales y Métodos

Aislamiento de bacterias potencialmente entomopatógenas

A partir de tres muestras de suelo, provenientes de tres zonas geográficas localizadas en el departamento del Amazonas (Colombia), se pesó 1 g de suelo por muestra y se adicionó a un erlenmeyer de 250 ml de capacidad, el cual contenía 100 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-2}) y se agitó a 100 rpm durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} en agua destilada estéril, las cuales se sembraron en cajas de Petri que contenían un medio sólido suplementado con quitina coloidal y se incubaron a 28°C durante 7 días. Las unidades formadoras de colonia (UFC), que produjeron un halo de degradación del medio, se repicaron y conservaron en viales con agar nutritivo, cubiertos con aceite mineral a 4°C.

Selección del microorganismo entomopatógeno de *T. solanivora*

Las bacterias que degradaron el medio de cultivo con quitina coloidal mencionadas anteriormente, un aislamiento de los hongos *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wise) Brown & Smith, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Penicillium* sp., *Trichoderma koningii* y *Verticillium lecanii* (Zimm.)

Viegas, un aislamiento de las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens* y dos aislamientos de *B. thuringiensis*, obtenidos del Banco de Germoplasma del laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá (Regional 1), fueron utilizados para seleccionar el microorganismo con potencial actividad biocontroladora de larvas de *T. solanivora*.

Teniendo en cuenta el tipo de microorganismo evaluado, se procedió a realizar la suspensión madre de la siguiente manera: para la valoración de cada hongo, a partir de su crecimiento a 28°C durante 12 días en cajas de Petri en papa dextrosa agar (PDA), se realizó una suspensión de conidios en una solución de Tween 80 al 0,1%, la cual se ajustó finalmente a una concentración de 10^8 conidios/ml del hongo, evaluándose todos los aislamientos de los hongos a esta concentración.

En el caso de los aislamientos de *B. thuringiensis*, a partir de su crecimiento en agar L, durante 10 días a 28°C, se realizó una suspensión madre de cada bacteria en una solución tampón de fosfatos. Posteriormente, mediante densidad óptica en espectrofotómetro a 595 nanómetros, se cuantificó la proteína total de cada suspensión madre bacteriana por el método de Bradford (1976) y finalmente se ajustó a una concentración de 250 µg/ml de proteína total para cada aislamiento de *B. thuringiensis*, siguiendo el método descrito por Bosa (1996). En el caso de las otras bacterias, a partir de su crecimiento en caja de Petri con medio de cultivo agar nutritivo incubado durante 4 días a 28°C, se realizó una suspensión madre de cada bacteria en agua peptonada estéril al 0,1% pH $7,2 \pm 0,2$. Esta suspensión se ajustó a una concentración de 10^8 células/ml, mediante la utilización de una curva de calibración realizada previamente, en la que se relacionó la concentración de células (UFC) y la absorbancia leída en espectrofotómetro a 600 nm.

Para la realización de los ensayos biológicos con las suspensiones de estos microorganismos, se desinfectaron tubérculos de papa variedad pastusa; luego cada tubérculo se sumergió durante 5 minutos en la respectiva suspensión del microorganismo y se dejó secar en una cámara de flujo laminar. Una vez seco, cada tubérculo se colocó en un recipiente plástico que contenía en el fondo una capa de arena estéril de 1 cm de espesor y se infestó con 10 larvas de primer instar de *T. solanivora* procedentes de una cría del insecto mantenida bajo condiciones controladas. Los recipientes plásticos se taparon y se mantuvieron a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ de humedad relativa.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 4 repeticiones por tratamiento (microorganismo). La unidad experimental consistió de 10 larvas del insecto por tubérculo, para un total de

40 larvas por tratamiento. Las evaluaciones de mortalidad en los tratamientos se realizaron a partir de los 30 días de iniciado el ensayo, donde se registraron, en forma periódica cada 5 días durante 15 días, el número de pupas presentes en cada unidad experimental y el número total de pupas por tratamiento. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de Tukey con un α de 0,05% de significancia.

El aislamiento que presentó la mayor actividad insecticida sobre las larvas de *T. solanivora* fue seleccionado para las posteriores evaluaciones de su actividad biocontroladora y para la determinación de su actividad enzimática a través del tiempo.

Medio de cultivo suplementado con los potenciales inductores de virulencia para el crecimiento de *S. marcescens*

Para evaluar los sustratos potenciales inductores de virulencia, se utilizó un medio de cultivo básico cuya composición por litro fue Agar (15,0 g), K_2HPO_4 (7,0 g), KH_2PO_4 (3,0 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g). A éste, se le adicionaron como potenciales inductores de virulencia, salvado de trigo comercial y homogeneizado de larvas de *T. solanivora* a una concentración del 2% P/V.

Salvado de trigo. El salvado de trigo comercial se sometió a un secado durante 24 horas en estufa con corriente de aire a 30°C; posteriormente, el sustrato seco se tamizó a través de una malla con un tamaño de poro de 100 µm.

Homogeneizado de larvas de *T. solanivora*. Este sustrato se obtuvo a partir de larvas sanas de segundo y tercer instar de *T. solanivora*, procedentes de la cría del insecto. Para ello se procedió a su deshidratación en una estufa con corriente de aire a 20°C, durante 72 horas. Una vez secas, las larvas se maceraron en un mortero de porcelana y posteriormente se tamizaron en una malla con un tamaño de poro de 100 µm.

Los medios con y sin potenciales inductores se esterilizaron durante 20 minutos y se sirvieron en cajas de Petri. Estos medios de cultivo sólido que contenían los potenciales inductores de virulencia, o sin la adición de éstos, se utilizaron posteriormente para el crecimiento de *S. marcescens* a 28°C durante 4 días. Los medios de cultivo sólido utilizados (tratamientos) fueron: el medio de agar nutritivo con sales (medio básico), el medio básico suplementado con salvado de trigo y el medio básico suplementado con larvas del insecto. La bacteria crecida en cada uno de estos medios, se utilizó posteriormente para la realización de los bioensayos tendientes a la evaluación de su actividad entomopatógena y para la determinación de su actividad enzimática.

Evaluación de la actividad enzimática de *S. marcescens* cultivada en los diferentes medios

Durante cada cultivo sucesivo de *S. marcescens* y simultáneo a la evaluación de su actividad entomopatogénica, también se procedió a la determinación de la actividad enzimática de la bacteria producida en cada tratamiento.

Para la preparación de los extractos enzimáticos de células de *S. marcescens*, se tomaron 100 miligramos de células bacterianas de cada tratamiento y se suspendieron en 1 ml de solución buffer Tris-HCl (Trizma ®Base T-8524 Marca sigma) 0,1M pH 8,0 preparado en agua destilada desionizada estéril. Esta suspensión se agitó a 350 rpm a 8°C durante 60 minutos. Posteriormente, esta muestra se sometió a sonicación a 50 KHz durante 2 minutos, luego se centrifugó a 12.000 rpm y 8°C durante 15 minutos, se filtró y el extracto enzimático obtenido fue utilizado para la determinación de la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa PR-1 y β -esterasa.

Determinación de la actividad N-acetilglucosaminidasa

Para la determinación de la N-acetilglucosaminidasa se utilizaron los procedimientos descritos por St. Leger *et al.* (1986a). Inicialmente se elaboró una curva de calibración con p-nitrofenol preparado en un tampón de citrato de sodio (0,2M) a pH 5 y utilizando una longitud de onda de 400 nm. Los resultados obtenidos en las muestras biológicas fueron extrapolados en dicha curva estándar, obteniéndose de esta manera la actividad enzimática que se expresó en μ moles de p-nitrofenol por mg de células bacterianas.

Para la reacción colorimétrica de las muestras biológicas, a cada 0,2 ml de extracto enzimático, se le adicionó 1 ml de solución de p-nitrofenil-N-acetil β -D-glucosaminida Referencia N-9376 marca Sigma, (1 mg/ml en tampón de citratos 0,1 M pH 5,0, preparado en agua destilada desionizada estéril). Esta mezcla se incubó a 35°C durante 30 minutos para permitir la reacción enzimática. Finalizado este tiempo de incubación, a cada muestra refrigerada se le adicionaron 1,5 ml de NH_4OH 1N con EDTA disódico (2 mM) y se determinó la absorbancia de la muestra en espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra y los resultados de absorbancia obtenidos se promediaron e interpolaron en la curva estándar del compuesto p-nitrofenol, determinándose así la concentración del producto de la reacción y expresando el resultado en μ moles de p-nitrofenol por mg de células bacterianas.

Los resultados obtenidos de las muestras biológicas por tratamiento se evaluaron mediante un análisis de varianza factorial ($3 \times 2 + 1$) y una prueba de comparación de medias de Tukey al 0,05% de significancia.

Determinación de la actividad quimoelastasa proteasa PR1

La determinación de la actividad de esta enzima se hizo siguiendo los procedimientos descritos por St. Leger *et al.* (1986b), para lo cual, se realizó una curva de calibración estándar de p-nitroanilina. Para cuantificar la actividad PR1 en los extractos enzimáticos, se tomaron 0,2 ml de la solución del sustrato N-succinil-ala-ala-propilfenialanina-p-nitroanilida (1 mM Referencia S-7388 marca Sigma (disuelto en dimetilsulfóxido), se le adicionaron 0,2 ml del extracto enzimático y 2,5 ml del tampón Tris-HCl (2 mM, pH 8), el cual contenía KCl 0,3M. Posteriormente, en el espectrofotómetro, se realizaron las lecturas de absorbancia de cada muestra a 410 nm.

Se realizaron dos repeticiones de cada muestra biológica y los resultados de absorbancia fueron promediados e interpolados en la curva estándar del compuesto p-nitroanilina, determinándose así la concentración y expresando el resultado en μ moles de p-nitroanilina por mg de células bacterianas. Los resultados obtenidos de las muestras biológicas por tratamiento, se evaluaron mediante un análisis de varianza factorial ($3 \times 2 + 1$) y una prueba de comparación de medias de Tukey al 0,05% de significancia.

Determinación de la actividad β -esterasa

Para la determinación de la enzima β -esterasa se utilizaron los procedimientos descritos por St. Leger *et al.* (1986c), utilizando la curva de calibración estándar de p-nitrofenol citada previamente. La reacción enzimática se llevó a cabo tomando 0,2 ml del extracto enzimático y adicionándole 1 ml del sustrato p-nitrophenylcaprylate (N-0752) (1 mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido). Esta mezcla se incubó a 35°C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 1,5 ml de NH_4OH 1N con EDTA disódico 2 mM.

De cada muestra biológica, se realizaron 3 repeticiones y las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo a 400 nm. Los resultados obtenidos por muestra, fueron promediados e interpolados en la curva estándar del compuesto p-nitrofenol, determinándose así la concentración del producto liberado y expresando el resultado como μ moles de p-nitrofenol por mg de células.

Los resultados obtenidos de las muestras biológicas por tratamiento se evaluaron mediante un análisis de varianza factorial ($3 \times 2 + 1$) y una prueba de comparación de medias de Tukey al 0,05% de significancia.

Evaluación de la actividad entomopatogénica de *S. marcescens* hacia larvas de primer instar de *T. solanivora*

Los resultados obtenidos en esta segunda fase de la investigación son presentados y discutidos en otro artículo, donde se relaciona tanto la actividad enzimática como biocontroladora de la bacteria hacia larvas de *T. solanivora*.

Resultados y Discusión

Selección del aislamiento de *S. marcescens* potencialmente biocontrolador de larvas de *T. solanivora*

Con el fin de seleccionar un microorganismo biocontrolador de larvas de primer instar de *T. solanivora*, se evaluaron, en ensayos preliminares, los hongos y las bacterias mencionadas anteriormente. Los porcentajes de mortalidad obtenidos con estos microorganismos evaluados, se muestran en la tabla 1.

De acuerdo con el análisis de varianza, se obtuvieron diferencias significativas entre varios de los tratamientos utilizados. A su vez, con la prueba de Tukey al 0,05% de significancia ($p \leq 0,05$), los tratamientos correspondientes a los aislamientos Br-3132 de *S. marcescens* y Br-3131 de

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad en larvas de primer instar de *T. solanivora*

TRATAMIENTOS	% de mortalidad acumulado y corregido
<i>S. marcescens</i> (Br-3132)	43,00 a
<i>B. subtilis</i> (Br-3131)	41,00 a
<i>Paecilomyces fumoso-roseus</i> (Pc 005)	36,84 b
Bacteria del Amazonas (Br-3127)	31,34 b
<i>Verticillium lecanii</i>	21,05 c
Bacteria del Amazonas (Br-3129)	16,41 c
<i>B. thuringiensis</i> (Bt-3107)	15,20 c
<i>S. marcescens</i>	12,00 d
<i>B. thuringiensis</i> (Bt-2468)	10,71 d
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8,15 d
<i>Trichoderma koningii</i> (Th 003)	7,90 d
<i>Penicillium</i> sp. (Pn 005)	5,26 d
<i>Nomuraea rileyi</i>	5,20 d
Bacteria del Amazonas (Br-3126)	4,47 d
Bacteria del Amazonas (Br-3128)	4,47 d

Los porcentajes de mortalidad seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de Tukey al 0,05% de significancia.

B. subtilis presentaron los porcentajes de control, mayores y significativamente diferentes, de 43 y 41%, respectivamente, con respecto a la actividad biocontroladora de todos los demás microorganismos evaluados. Por lo tanto, se seleccionó el aislamiento de *S. marcescens* (Br 3132) para realizar las evaluaciones de actividad enzimática y biocontroladora, ya que además de presentar la mayor actividad biocontroladora, mostró actividad alta quitinolítica en el medio de cultivo suplementado con quitina coloidal sustrato utilizado como única fuente de carbono (Fig. 1).

Efecto de las inoculaciones en larva y de los crecimientos sucesivos en medio de cultivo suplementado sobre la actividad N-acetilglucosaminidasa presente en extractos de *S. marcescens*

Durante los cinco cultivos sucesivos, al determinar la actividad N-acetilglucosaminidasa presente en los extractos de *S. marcescens*, se encontraron diversos rangos de actividad quitinolítica. El análisis estadístico determinó que no hubo diferencias significativas entre las actividades N-acetilglucosaminidasa de los extractos procedentes de cada medio de cultivo, cuando *S. marcescens* se sometió a la activación en larvas, con respecto a cuando ésta no fue sometida a dicha activación.

Por otra parte, se encontró que independientemente de la activación de *S. marcescens* en larvas, las actividades significativamente mayores de N-acetilglucosaminidasa, fueron obtenidas con los extractos de *S. marcescens* crecida sucesivamente en los medios suplementados con el homogeneizado de larvas, obteniéndose 0,421 µmoles de p-nitrofenol/g de células (PNP/g) en promedio. Estas actividades enzimáticas fueron seguidas por las obtenidas cuando *S. marcescens* creció

sucesivamente en los medios suplementados con salvado de trigo, las cuales fueron significativamente menores que las anteriores y correspondientes en promedio a 0,367 µmoles de PNP/g. Las actividades N-acetilglucosaminidasa menores pero significativamente diferentes fueron obtenidas con los extractos procedentes del crecimiento de la bacteria en los medios de agar nutritivo sin la adición de los sustratos inductores. Es así que cuando *S. marcescens* no fue sometida a las activaciones en larva se obtuvo 0,236 µmoles de PNP/g y cuando la bacteria no fue sometida a los cultivos sucesivos se obtuvo 0,230 µmoles de PNP/g.

Según el análisis estadístico, fue durante el tercer cultivo sucesivo de la bacteria sometida o no a la activación sobre larvas y crecida en los diferentes medios de cultivo, donde hubo las mayores actividades N-acetilglucosaminidasa; actividades que fueron significativamente diferentes con respecto a las obtenidas en los demás cultivos sucesivos realizados en el tiempo.

En la figura 2 se observa que durante los cinco cultivos sucesivos de *S. marcescens*, las menores actividades N-acetilglucosaminidasa fueron obtenidas cuando ésta creció en los medios de agar nutritivo, las cuales fueron en promedio de 0,190 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* sometida a la activación en larvas), de 0,284 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* no sometida a la activación) y de 0,153 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* no sometida a la activación ni a los cultivos sucesivos).

Durante los cinco cultivos sucesivos de la bacteria, las mayores actividades N-acetilglucosaminidasa, fueron obtenidas con los extractos provenientes de los medios suplementados con los dos sustratos inductores de virulencia. Es así

que cuando la bacteria creció en el homogeneizado de larvas, se obtuvieron actividades de 0,427 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* sometida sucesivamente a la activación) y de 0,417 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* no fue sometida a la activación en larvas). Estas actividades enzimáticas fueron seguidas por las obtenidas, cuando *S. marcescens* creció sucesivamente en los medios con salvado de trigo, actividades que fueron significativamente menores que las anteriores y correspondientes a 0,397 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* sometida a la activación) y a 0,337 µmoles de PNP/g (*S. marcescens* no sometida a la activación) (Fig. 2).

Las mayores actividades N-acetilglucosaminidasa, obtenidas cuando *S. marcescens* creció en los medios con homogeneizado de larvas, pudieron deberse a la composición bioquímica de este sustrato, ya que éste contiene lípidos, proteínas y quitina (St. Leger *et al.* 1986a). Esta última es la que conforma la cutícula de los insectos y podría haber inducido la producción de exoquitinasas específicas implicadas en la patogenicidad de *S. marcescens*. Según Thonart *et al.* (1991), dependiendo del tipo de sustrato adicionado al medio, podría inducirse una ma-

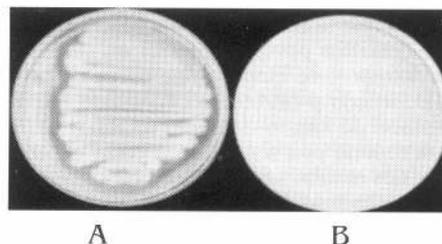


Figura 1. *S. marcescens* degradando el medio de cultivo suplementado con quitina coloidal (A); medio sin degradar (B).

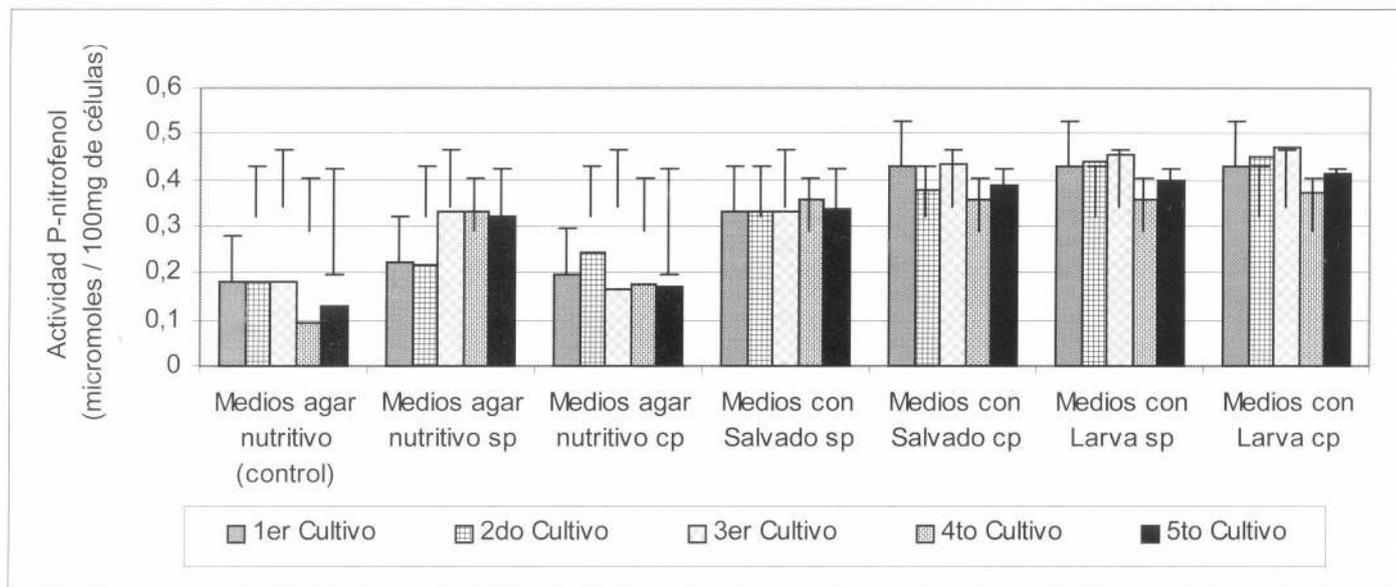


Figura 2. Actividad N-acetilglucosaminidasa presente en extractos de *S. marcescens* crecida en los diferentes medios durante los cinco cultivos sucesivos realizados en el tiempo. cp = con pase de *Serratia* sobre larvas; sp = sin pase de *Serratia* sobre larvas.

por síntesis de enzimas y mejorar las características de permeabilidad de las células, permitiendo una mayor disponibilidad de las enzimas extracelulares.

Así mismo, cuando *S. marcescens* creció en los medios con salvado de trigo, también se obtuvo una mayor actividad N-acetilglucosaminidasa. Esto corrobora lo obtenido por Thonart *et al.* (1991) quienes señalaron que este sustrato adicionado a un medio de cultivo, produjo una mayor actividad de las enzimas celulasas, B-1,3-glucanasas y quitinasas excretadas por *Trichoderma viridae*. Posiblemente este sustrato induce una mayor excreción de las enzimas, efecto que pudo producirse también en *S. marcescens* y que se reflejó en un incremento de la actividad N-acetilglucosaminidasa presente en los extractos de células.

Es posible que los cultivos sucesivos de *S. marcescens* sobre los medios, hubieran causado un efecto inductor de su actividad quitinolítica y/o una represión catabólica en su producción, ya que según Young y Carroad (1981) la producción de una quitinasa extracelular en *S. marcescens*, depende del balance entre el efecto inductor del sustrato en la producción de esta quitinasa y la represión catabólica causada por el mismo.

Por otra parte, las actividades enzimáticas menores cuando *S. marcescens* creció en los medios de agar nutritivo, pudieron deberse a una represión en la producción de las quitinasas por efecto de algún componente del medio de cultivo, ya que como lo mencionaron Monreal y Reese (1969) ciertos compuestos adicionados al medio como la glucosa, causaron una represión catabólica en la producción de las quitinasas en una cepa de *S. marcescens*.

Efecto de las inoculaciones en larva y de los crecimientos sucesivos en medio de cultivo suplementado sobre la actividad quimoelastasa proteasa PR-1 presente en extractos de *S. marcescens*

Durante los cinco cultivos sucesivos de la bacteria, se determinó que hubo diferencias significativas para la actividad de esta enzima ($p \leq 0,05$), cuando *S. marcescens* fue sometida a la activación en larvas con respecto a su no activación. Esto podría indicar, que la activación de *S. marcescens* sobre las larvas, indujo aumentos en la actividad proteasa de los extractos.

Por otra parte, las mayores y significativas actividades quimoelastasa proteasa, fueron obtenidas cuando *S. marcescens* creció en los medios suplementados con los sustratos inductores; con los extractos provenientes del homogenizado de larvas se obtuvo una actividad promedio de 2,192 μmoles de PNA/g, la cual fue estadísticamente diferente a la obtenida con el extracto proveniente del crecimiento de *S. marcescens* en los medios con salvado de trigo correspondiente a 2,094 μmoles de

PNA/g, lo cual indica que la utilización del homogeneizado de larvas ocasiona un efecto inductor mayor sobre la actividad de esta enzima que el salvado de trigo. Por el contrario, cuando *S. marcescens* creció en los medios de agar nutritivo sin la adición de estos sustratos, se obtuvieron las actividades proteasa significativamente menores de 1,582 μmoles de PNA/g en promedio, así mismo en este medio cuando *S. marcescens* no fue sometida a inoculaciones ni a cultivos sucesivos, se obtuvo una actividad de 0,920 μmoles de PNA/g en promedio (Fig. 3).

Esta actividad enzimática menor, obtenida en los extractos procedentes de los medios de agar nutritivo, podría deberse a que la peptona reprimió la producción de esta enzima en el medio y por consiguiente se obtuvo una actividad quimoelastasa proteasa menor en los extractos. Este comportamiento coincide con lo citado por Dumusois y Priest (1993) con *Bacillus sphaericus*, ya que cuando creció en presencia de peptona o de extracto de levadura, la síntesis de exoproteasas de la bacteria se vio disminuida, debido a una represión catabólica en la producción de exoproteasas.

También se observó que las actividades quimoelastasa proteasa fueron mayores en los extractos de células cuando *S. marcescens* creció en los medios suplementados con el homogeneizado de larvas; esto indica, que este sustrato de composición cuticular y constituido en mayor proporción por proteínas, posiblemente indujo la producción de exoproteasas de *S. marcescens*, que hidrolizan los enlaces amino terminales de las proteínas, que constituyen este sustrato. Esto coincide con lo mencionado por Villamizar (1998), quien encontró una inducción en la actividad proteasa de conidios del hongo *M. anisopliae*, cuando el hongo creció en un medio líquido suplementado con

alas y patas de la langosta *Rhammatocerus schistocercoides*.

El efecto inductor del salvado de trigo pudo deberse a un efecto sobre la membrana celular, ya que según Thonart *et al.* (1991) este sustrato tiene la capacidad de mejorar la permeabilidad de la membrana en algunos hongos, permitiendo una mayor excreción de sustancias. Se podría suponer que posiblemente en *S. marcescens*, este sustrato ocasionó un efecto similar en la permeabilidad de la membrana bacteriana, facilitando de esta manera, la excreción de exoproteasas en los extractos de células y por consiguiente hubo una mayor actividad de esta enzima, con respecto a las actividades menores obtenidas cuando *S. marcescens* creció en los medios de agar nutritivo sin suplementar (Fig. 3).

Como se observa en la figura 3, durante el tercer cultivo de *S. marcescens* en cada medio suplementado o no con los sustratos inductores, hubo un incremento de la actividad proteasa, actividades que con los posteriores cultivos decrecieron con respecto al tercer cultivo. Sin embargo, esta disminución observada en la actividad quimoelastasa, podría estar relacionada con la producción concomitante de otras proteasas, ya que Balakrishnan *et al.* (1997), observaron que al disminuir significativamente la actividad exoproteasa de un *Bacillus* sp., alcalófilico, se incrementó la secreción y actividad de otras proteínas de la bacteria.

Este incremento de la actividad enzimática observado durante el tercer cultivo consecutivo de *S. marcescens* en los medios, podría atribuirse a que el continuo crecimiento de la bacteria en los medios principalmente suplementados, permitió seleccionar genes específicos que codifican para exoproteasas, capaces de degradar las proteínas constituyentes de estos sustratos. De otra parte, las mayores actividades quimoelastasa proteasa se obtuvieron en

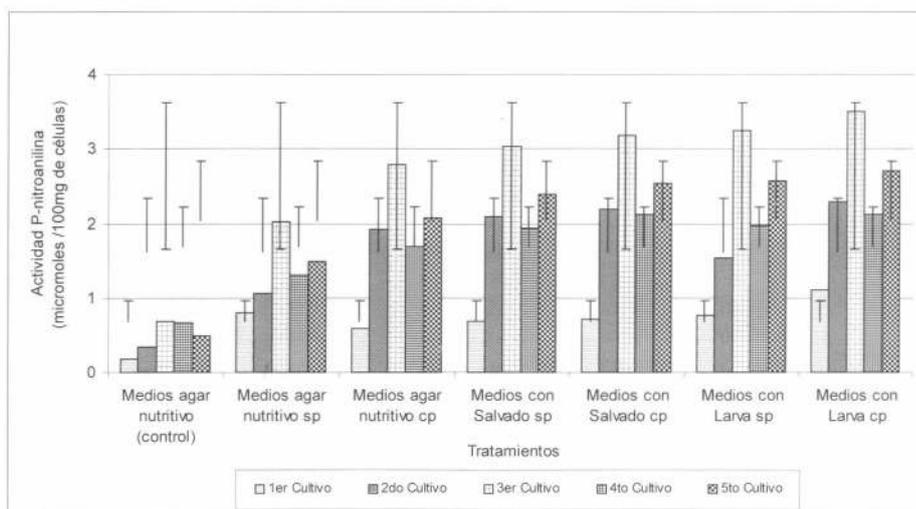


Figura 3. Actividad quimoelastasa proteasa PR-1 presente en extractos de *S. marcescens* crecida en los diferentes medios durante los cinco cultivos sucesivos realizados en el tiempo. cp = con pase de *Serratia* sobre larvas; sp = sin pase de *Serratia* sobre larvas.

los extractos cuando *S. marcescens* creció en los medios con homogeneizado de larvas; esto indica, que este sustrato cuticular constituido por proteínas, también induce la actividad de proteasas específicas en *S. marcescens*, que hidrolizan los enlaces carboxyl y amino terminales de las proteínas que constituyen este sustrato. Decedue *et al.* (1979) señalaron que los aminoácidos que constituyen los sustratos para el crecimiento de microorganismos son los que principalmente inducen una producción mayor de exoproteasas.

El sustrato celulósico salvado de trigo está constituido por un 63% de fibras, un 15% de proteínas, un 6% de cenizas y un 4% de grasas (Souza *et al.* 1999). El 15% de proteínas presente en este sustrato, pudo haber inducido la producción y actividad de exoproteasas en las células de *Serratia*. Así mismo, Biswas *et al.* (1988) concluyeron que en varias especies de hongos la actividad de algunas enzimas estaba relacionada con la composición del medio de cultivo.

Por otra parte, cuando *S. marcescens* fue sometida a la activación sobre larvas en cada medio respectivo, se observaron actividades quimoelastasa proteasa ligeramente mayores, con respecto a las obtenidas cuando *S. marcescens* no fue sometida a la activación (Fig. 3); esto podría indicar, que con la activación de *S. marcescens* en larvas, se incrementó ligeramente la actividad de esta enzima. Esto puede estar relacionado con lo indicado por Flyg y Xanthopoulos (1983), quienes encontraron que aislamientos de *S. marcescens* provenientes de insectos, produjeron más enzimas proteolíticas que otros aislados a partir de muestras de suelo o de partes vegetales.

Efecto de las inoculaciones en larva y de los crecimientos sucesivos en medio de cultivo suplementado sobre la actividad β -esterasa presente en extractos de *S. marcescens*

Para los cinco cultivos sucesivos de *S. marcescens* en los diferentes medios, se determinó que hubo diferencias significativas entre las actividades β -esterasa ($p \leq 0,05$), cuando *Serratia* fue sometida a la activación en larvas y crecida en cada medio respectivo correspondientes en promedio a 1,790 μ moles de PNP/g, con respecto a las actividades obtenidas cuando *Serratia* no fue activada en larvas y crecida en cada medio respectivo, las cuales correspondieron en promedio a 1,367 μ moles de PNP/g.

A su vez, se observó un incremento en la actividad β -esterasa en el tercer cultivo sucesivo de *S. marcescens* crecida en los diferentes medios suplementados o no con los sustratos inductores de virulencia. Posteriormente, esta actividad comenzó a disminuir en el cuarto y quinto cultivo (Fig. 4).

Durante los cinco cultivos sucesivos de *S. marcescens*, se encontró que las actividades menores y significativamente diferentes de esta enzima ($p \leq 0,05$), fueron obtenidas con los extractos de *S. marcescens* crecida en el medio agar nutritivo (bacteria sin inoculaciones ni crecimientos sucesivos) obteniéndose en promedio 0,478 μ moles de PNP/g; esta actividad fue seguida por 0,963 μ moles de PNP/g, obtenida cuando *S. marcescens* activada en larvas creció en este medio y de 0,812 μ moles de PNP/g cuando la bacteria no fue activada y creció en el medio (Fig. 4). Esto posiblemente se debió a que el medio de agar nutritivo no contenía en su composición ninguna fuente de lípidos o ésteres grasos, que indujeran la producción de esterases en la bacteria.

Por el contrario, durante los cinco cultivos de *S. marcescens*, las mayores actividades β -esterasa se obtuvieron cuando *S. marcescens* fue sometida o no a la activación en larvas y creció en los medios con homogeneizado de larvas ($p \leq 0,05$), obteniéndose 2,371 μ moles de PNP/g cuando la bacteria fue activada en larvas y

2,316 μ moles de PNP/g cuando *S. marcescens* no fue sometida a la activación, actividades que no fueron significativamente diferentes entre sí (Fig. 4).

Lo anterior podría indicar, que el sustrato homogeneizado de larvas, en cuya composición están presentes ésteres y ácidos grasos provenientes del cuerpo de las larvas, posiblemente sirvieron como sustratos específicos que indujeron una mayor actividad β -esterasa, que hidrolizaron los enlaces éster, fosforil o carboxil de los fosfolípidos constituyentes de este sustrato, resultado similar al obtenido por Villamizar (1998), quien observó un efecto inductor de la actividad esterasa de conidios de *M. anisopliae*, cuando el hongo creció en medio líquido suplementado con alas y patas de su insecto hospedero.

Las segundas actividades β -esterasa mayores fueron obtenidas con los extractos de *S. marcescens* crecida en los medios con salvado de trigo, las cuales fueron significativamente menores que las anteriores ($p \leq 0,05$), siendo en promedio de 2,036 μ moles de PNP/g cuando *S. marcescens* fue sometida al pase y de 0,973 μ moles de PNP/g cuando la bacteria no fue sometida al pase en larvas.

Tal como se observa en la figura 4, la actividad β -esterasa baja obtenida en los extractos de *S. marcescens*, sometida o no a la activación en larva y crecida en los medios de agar nutritivo sin suplementar y no sometida a activación en larva y crecida en los medios suplementados con salvado de trigo, podría atribuirse a la escasa proporción de lípidos o ésteres grasos que contiene en su composición el salvado de trigo (4% de grasas) y a la ausencia de éstos en la composición del agar nutritivo. Esto posiblemente originó una actividad β -esterasa baja en los extractos de células de *S. marcescens*.

De otra parte, los resultados observados en la figura 4 indican que, con la utilización del homogeneizado de larvas, se originó un efecto inductor de la actividad β -esterasa. Según Thaler *et al.* (1998), una amplia variedad de bacterias gram positivas y gram negativas, producen lecitinasas (lipasas) para suplirse de fuentes de lípidos y en algunos casos estas enzimas pueden tener un papel importante en la inducción de la patogenicidad en hospederos blanco; tal es el caso, de la fosfolipasa C de *B. thuringiensis*, que está relacionada con su virulencia hacia algunos insectos plaga. Grimont y Grimont (1978) encontraron una correlación positiva entre la patogenicidad y la producción de lecitinasas (lipasas) en varias bacterias incluyendo especies del género *S. marcescens*.

Conclusiones

- Los sustratos potenciales inductores, salvado de trigo y homogeneizado de larvas de *T. solanivora* incorporados al medio de cultivo, incrementaron significativamente la actividad de las enzimas N-

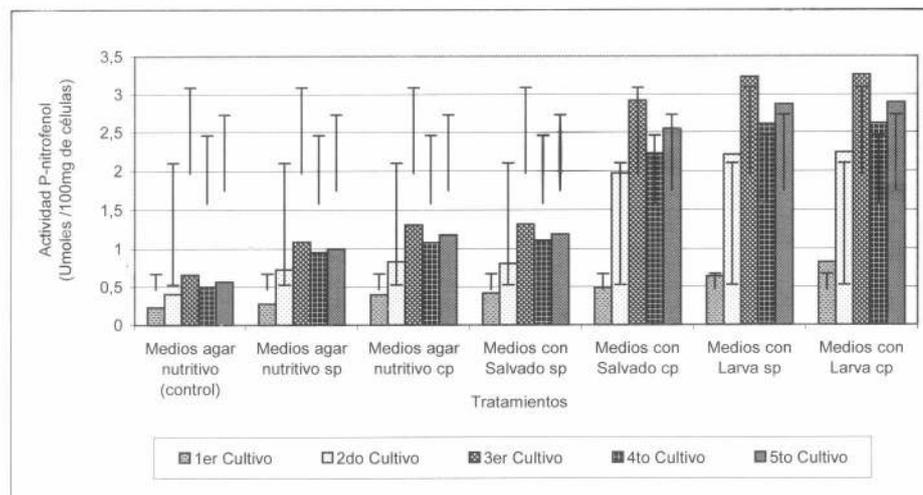


Figura 4. Actividad β -esterasa presente en extractos de *S. marcescens*, crecida en los diferentes medios durante los cinco cultivos sucesivos realizados en el tiempo. cp = con pase de *Serratia* sobre larvas; sp = sin pase de *Serratia* sobre larvas.

acetilglucosaminidasa y quimoelastasa proteasa de los extractos de células de *S. marcescens*.

• Las inoculaciones sucesivas (activaciones) de la bacteria sobre larvas del insecto no indujeron una significativa actividad de los extractos enzimáticos de la bacteria.

• Durante el tercer crecimiento sucesivo de *S. marcescens* sobre los medios suplementados con los sustratos salvado de trigo y homogeneizado de larvas, se incrementaron significativamente las actividades quimoelastasa proteasa PR-1 de los extractos de células de la bacteria.

• Los crecimientos sucesivos de la bacteria sobre los medios de cultivo afectaron las actividades quimoelastasa proteasa y β -esterasa, viéndose éstas disminuidas durante el cuarto y quinto cultivo sucesivo de la bacteria sobre estos medios.

Literatura citada

- BALAKRISHNAN, H.; SRINIVASAN, M.; RELE, M. 1997. Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 19 (7): 599-601.
- BISWAS, S.; MISHRA, A.; NANDA, G. 1988. Xylanase and B-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnology Bioengineering* 31: 613-616.
- BOSA, C. 1996. Desarrollo de una metodología para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Trabajo de Grado de Biólogo. Universidad Distrital FJC, Bogotá. 98 p.
- BRADFORD, M. 1976. Rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 254-284.
- DECEDUE, C.; BROUSSARD, E.; LARSON, A.; BRAYMER, H. 1979. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 569: 293-301.
- DUMUSOIS, C.; PRIEST, F. 1993. Extracellular serine protease synthesis by mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Bacteriology* 75: 416-419.
- FLACH, J.; PILET, P.; JOLLES, P. 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia* 48: 701-716.
- FLYG, C.; XANTHOPOULOS, K. 1983. Insect pathogenic properties of *S. marcescens*. Passive and active resistance to insect immunity studied with protease-deficient and phage-resistant mutants. *Journal of General Microbiology* 129: 453-464.
- GONZÁLES, M.; VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. 1999. Incremento de la patogenicidad de *B. bassiana* hacia *Hypothenemus hampei*, utilizando cutícula de broca en el medio de cultivo. Resúmenes. XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. p. 156. Julio. Bogotá.
- GRIMONT, F.; GRIMONT, F. 1978. The Genus *Serratia*. *Annual Review Microbiology* 32: 221-248.
- MONREAL, J.; REESE, E. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal Microbiology* 15: 689-696.
- NÚÑEZ, V. 1993. Perspectivas de la biología molecular en el control de larvas de Scarabaeidae de importancia agrícola. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas. A. Morón (ed.). Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. p 217-233.
- SAMPSON, M.; GOODAY, G. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* 144: 2189-2194.
- SCHAERFFENBERG, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* sp., and *Metarhizium* sp. *Journal of Invertebrate Pathology* 6:8-20.
- SOUZA, M.; ROBERTO, I.; MILAGRES, A. 1999. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Applied Microbiological Biotechnology* 52: 768-772.
- ST. LEGER, R. 1997. Biology and Mechanisms of Insect-cuticle Invasion by Deuteromyce-
- te Fungal Pathogens. Cap 10. p. 211-225. En: Parasites and Pathogens of Insects. Vol 2. N. Beckage., S. Thompson., y B. Federici (eds.) AcademicPress, San Diego, California.
- ST. LEGER, R.; CHARNLEY, A.; COOPER, R. 1986a. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Cuticle Degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 167-177.
- ST. LEGER, R.; CHARNLEY, A.; COOPER, R. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 295-302.
- ST. LEGER, R.; CHARNLEY, A.; COOPER, R. 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85-95.
- THALER, J.; DUVIC, B.; GIVAUDAN, A.; BOEMARE, N. 1998. Isolation and entomotoxic properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2367-2373.
- THONART, A.; COTES, A.; CAMPOS, D.; ROBLAIN, D.; LEPOIVRE, P. 1991. Modelling of uses of microorganisms in the degradation of natural polymers. En: Production and utilization of lignocelluloses. Galletti (ed.). Geambloux, Belgium. p. 79-89.
- VILLAMIZAR, L. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Tesis de Maestría para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 112 p.
- YOUNG, M.; CARROAD, P. 1981. Dependence of extracellular chitinase activity of *S. marcescens* QMB1466 on continuous culture dilution rate. *Canadian Journal Microbiology* 27: 142-144.

Recibido: May. 02/2002

Aceptado: Abr. 15/2003

Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad entomopatogénica de *Serratia marcescens* contra *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Effect of culture conditions on the entomopathogenic activity of *Serratia marcescens* against *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

CARLOS FELIPE BOSA O.¹, ALBA MARINA COTES²

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 87-92 (2004)

Resumen. Se estableció un modelo para evaluar el efecto que sobre la actividad enzimática y biocontroladora de *Serratia marcescens*, producen sus inoculaciones sucesivas en larvas del insecto y sus crecimientos continuos sobre medios suplementados o no, con los sustratos potenciales inductores de virulencia (salvado de trigo y homogeneizado de larvas de *Tecia solanivora* Povolny). A la biomasa de la bacteria producida en estos medios, le fue evaluada la actividad biocontroladora contra larvas del insecto y se prepararon extractos enzimáticos, con los cuales se determinó la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa y β -esterasa. Se realizaron cinco cultivos sucesivos de la bacteria y en cada uno se evaluaron las actividades mencionadas. En general, tanto el tipo de sustrato adicionado al medio como los crecimientos sucesivos de la bacteria, afectaron las actividades enzimática y biocontroladora, incrementándose éstas durante el tercer crecimiento de la bacteria. Las mayores actividades biocontroladoras de *S. marcescens* sometida o no a la activación en larvas, correspondientes al 65 y 64% de mortalidad respectivamente, se obtuvieron cuando creció en el medio con salvado, seguidas por el 58 y 59% de mortalidad respectivamente, cuando creció en el medio con larvas, actividades que fueron significativamente diferentes de la obtenida cuando *S. marcescens* creció en el medio sin suplementar (48,5%). A su vez, se determinó una correlación positiva, entre las actividades N-acetilglucosaminidasa y quimoelastasa proteasa con la actividad biocontroladora de *S. marcescens*, sugiriendo que la actividad de estas enzimas, puede estar relacionada con el mecanismo de acción de las bacterias entomopatogénicas del género *Serratia*.

Palabras clave: Bacterias entomopatogénicas. *Serratia* sp. Modo de acción. Enzimas.

Summary. A model was established to evaluate the effect of successive inoculations and successive growths in culture media supplemented or not with potential virulence inductors (wheat bran and homogenised *Tecia solanivora* Povolny larvae) on the enzymatic and biocontrol activity of *Serratia marcescens*. The bacteria biomass obtained from these media was evaluated for biocontrol activity against insect larvae, and enzymatic extracts were prepared to determine the activity of the enzymes N-acetylglucosaminidase, quimoelastase protease PR-1 and β -esterase. These activities were evaluated in each of five successive bacteria cultures. In general, both the type of substrate added to the media as well as successive growth affected the biocontrol and enzymatic activities, increasing in the third growth of the bacteria. The greatest biocontrol activities of *S. marcescens*, with or without activation in larvae, corresponding to 65 and 64% mortality, respectively, were obtained when the bacteria were grown in wheat bran medium, followed by 58 and 59% mortality, respectively, when grown in the larval medium, activities that were significantly different than that obtained when *S. marcescens* grew in medium without supplement (48,5%). In addition, a positive correlation was found between N-acetylglucosaminidase and quimoelastase protease activities and *S. marcescens* biocontrol activity, suggesting that the activity of these enzymes could be related with the mode of action of entomopathogenic bacteria of the genus *Serratia*.

Key words: Entomopathogenic bacteria. *Serratia* sp. Mode of action. Enzymes.

Introducción

Para el control biológico de los insectos plaga como *Tecia solanivora* Povolny se han realizado varios estudios exploratorios utilizando microorganismos entomopatogénicos. Sin embargo, actualmente la mayoría de estos estudios están enfocados básicamente a la evaluación y selección de microorganismos contra diferentes insectos plaga susceptibles; pero estos

estudios no esclarecen ni relacionan los mecanismos de acción posiblemente implicados en su patogenicidad y virulencia hacia los insectos plaga.

En las bacterias entomopatogénicas y específicamente dentro del género *Serratia*, existen especies asociadas a insectos como *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica* (Ewing y Martin 1981), *S. marinorubra*, *S. entomophila* y *S. protea-*

maculans (Gray 1998); pero los estudios para caracterizar su proceso infeccioso en los insectos susceptibles son muy escasos. Algunas investigaciones han propuesto que las enzimas quitinasas y proteasas producidas por estos microorganismos, son determinantes en su proceso de patogenicidad y virulencia (Goody 1994), participando activamente en la degradación de las células epiteliales del intestino medio del insecto, facilitando el acceso de la

1 Autor para correspondencia: B. Sc. M. Sc. Investigador del Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas MIP Corpoica - Tibaitatá. Teléfono: 4227300. Km 14 vía Mosquera. E-mail: Carlosfelipeb@yahoo.es

2 Ph. D. Fitopatología. Investigadora principal. Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C. I. Tibaitatá. E-mail: acotes@corpoica.org.co

bacteria al hemocele, aunque son pocos los estudios que relacionan *in vivo* la actividad de estas enzimas, con la actividad biocontroladora de las bacterias entomopatógenas.

La actividad de estas enzimas puede verse afectada por factores externos como la composición del medio de cultivo; es así como, la adición de sustratos cuticulares de insectos, puede proporcionar una fuente de nutrición específica para estos microorganismos y conferir un incremento en su actividad biocontroladora hacia los insectos plaga de interés (Flach *et al.* 1992; Sampson y Gooday 1998). Este fenómeno biológico, posiblemente se debe a la activación por parte del sustrato, de sistemas enzimáticos específicos, los cuales son determinantes en la actividad insecticida de los microorganismos sobre los insectos susceptibles (Lane y Trinci 1991). Parece ser que otro factor externo importante, involucrado en el incremento o disminución en la patogenicidad de los entomopatógenos contra los insectos plaga, es el sometimiento de éstos a crecimientos sucesivos (González *et al.* 1999). Sin embargo, este factor hasta el momento no ha sido estudiado y comprobado para el caso de las bacterias entomopatógenas.

Teniendo en cuenta estos factores potencialmente involucrados en el incremento de la patogenicidad y virulencia de los entomopatógenos, y con el fin de esclarecer y relacionar algunos de los mecanismos enzimáticos específicos de la bacteria entomopatógena *S. marcescens* con su actividad biocontroladora hacia los insectos plaga, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto que producen sus inoculaciones sucesivas en larvas del insecto y sus crecimientos continuos en medios suplementados con diferentes sustratos potenciales inductores de virulencia, sobre la actividad enzimática y biocontroladora de *S. marcescens* hacia larvas de primer instar de *T. solanivora*. La hipótesis de la investigación se refiere: a si los crecimientos sucesivos de la bacteria sobre medios de cultivo suplementados con sustratos potenciales inductores de virulencia, provocan un incremento en su actividad entomopatógena hacia larvas de *T. solanivora*.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica – Tibaitatá y fue ejecutado durante los años de 1999 al 2001.

Materiales y Métodos

Evaluación de la actividad entomopatógena de *S. marcescens* hacia larvas de primer instar de *T. solanivora*

En la evaluación de la actividad biocontroladora de la bacteria hacia *T. solanivora*, durante cada uno de los cultivos sucesivos realizados en el tiempo, se utilizaron los siguientes tratamientos:

1. *S. marcescens* crecida en agar nutritivo (bacteria sin inoculaciones, ni cultivos sucesivos en el medio)
2. *S. marcescens* sin activación en larvas y crecida en agar nutritivo
3. *S. marcescens* con activación en larvas y crecida en agar nutritivo
4. *S. marcescens* sin activación en larvas y crecida en el medio suplementado con salvado de trigo
5. *S. marcescens* con activación en larvas y crecida en el medio suplementado con salvado de trigo
6. *S. marcescens* sin activación en larvas y crecida en el medio suplementado con homogeneizado de larvas de *T. solanivora*
7. *S. marcescens* con activación en larvas y crecida en el medio suplementado con homogeneizado de larvas de *T. solanivora*

Este procedimiento metodológico se realizó sucesivamente durante los cinco cultivos de la bacteria con el fin de determinar, en cada uno de ellos, el efecto y la relación que las inoculaciones sucesivas de *S. marcescens* en larvas (activación de la bacteria) y sus crecimientos continuos en cada uno de los medios mencionados anteriormente, producen sobre la actividad enzimática y biocontroladora de *S. marcescens* hacia *T. solanivora*.

El proceso metodológico por el cual se llevó a cabo la inoculación de la bacteria sobre las larvas del insecto (proceso de activación), se describe a continuación:

Activación de *S. marcescens* en larvas de *T. solanivora*

Durante cada uno de los cultivos sucesivos de la bacteria, los tratamientos que implicaron la activación previa de *S. marcescens* sobre larvas de segundo instar del insecto, se llevaron a cabo de la siguiente manera: Del crecimiento de la bacteria en una caja de Petri, que contenía el medio de cultivo respectivo e incubada a 28°C durante 4 días, se realizó una suspensión madre en 9 ml de agua peptonada estéril al 0,1% pH 7,2. Luego, con diluciones, esta suspensión fue ajustada a la concentración 1×10^8 células/ml utilizando técnicas espectrofotométricas, según una curva estandarizada por Bosa (2001).

Las larvas de segundo instar, se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaHClO) al 0,05% durante 5 segundos; luego, se realizaron 2 lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5 segundos cada uno. Posteriormente, las larvas desinfectadas se colocaron en una caja de Petri estéril, que contenía en el fondo una toalla de papel estéril. Luego estas larvas se sumergieron durante 10 segundos, en la suspensión bacteriana ajustada a la concentración

1×10^8 células/ml, utilizando una curva que relacionaba densidad óptica vs. unidades formadoras de colonia (UFC) (Bosa 2001). Al cabo de este tiempo, éstas se colocaron en una caja de Petri estéril, que contenía una toalla de papel estéril.

Los tubérculos de papa también se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0,05% durante 2 minutos; luego, se realizaron 3 lavados sucesivos en agua destilada estéril, durante 5 minutos cada uno. Los tubérculos desinfectados y secos, se cortaron por la mitad y se sumergieron durante 5 minutos en la suspensión bacteriana ajustada. Posteriormente, cada tubérculo inoculado se ubicó en el fondo de un recipiente plástico estéril se infestó con 15 larvas tratadas de segundo instar, el cual finalmente se tapó. Al cabo de los 2 días de realizado el ensayo, las larvas muertas se recolectaron y se colocaron en cámara húmeda a 28°C durante 1 día.

A partir de las larvas incubadas en cámara húmeda, se realizó el aislamiento de la bacteria activada en el medio suplementado con quitina coloidal. Para esto, se pesó 0,1 g de larvas muertas las cuales se maceraron en un mortero de porcelana estéril y el macerado se suspendió en 9 ml de agua peptonada estéril al 0,1% pH 7,2. A partir de esta suspensión madre, se hicieron diluciones seriadas, realizándose la siembra de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} en cajas de Petri que contenían el medio con quitina coloidal. Después de la incubación durante 4 días a 28°C, se realizó la verificación de las UFC, midiendo el halo de degradación de las colonias en el medio con quitina y se verificó su morfología típica macroscópica y microscópica utilizando la tinción de Gram; posteriormente, las colonias verificadas como típicas se cultivaron en los medios de cultivo respectivos.

Evaluación de la actividad entomopatógena de *S. marcescens* sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*

En todos los casos, a partir del crecimiento bacteriano a 28°C durante 4 días, en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo respectivo, se procedió a la realización de una suspensión madre en 9 ml de agua peptonada estéril al 0,1% pH de 7,4, la cual se cuantificó utilizando una curva estandarizada de UFC vs. densidad óptica a 600 nm. Posteriormente, se ajustó la suspensión madre a la concentración de 1×10^8 células/ml.

Por otra parte, se desinfectaron tubérculos de papa variedad pastusa, en una solución de hipoclorito de sodio al 0,05 % durante 2 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces sucesivas en agua destilada estéril durante 5 minutos cada vez. Los tubérculos desinfectados se sumergieron durante 5 minutos en la suspensión bacteriana correspondiente y finalmente ésta se ajustó a la concentración única de 10^8 células/ml. Para la infestación de los tubérculos tratados, se utilizó un pincel

estéril para recoger las larvas de primer instar provenientes de la cría. Cada tubérculo tratado con la respectiva suspensión bacteriana, se infestó con 20 larvas de primer instar del insecto.

Diseño experimental para los bioensayos

Las condiciones ambientales para los ensayos biológicos fueron similares a las mencionadas para el mantenimiento de la cría. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con 5 repeticiones por tratamiento. Cada repetición o unidad experimental, consistió de 20 larvas colocadas sobre un tubérculo de papa desinfectado y tratado, ubicado en el fondo de un recipiente de poliuretano con 1 cm de arena estéril. Se utilizaron 100 larvas de primer instar de *T. solanivora* por tratamiento.

Se empleó un testigo tratado (tubérculos desinfectados, tratados con solución de agua peptonada e infestados con larvas) y un testigo larva (tubérculos desinfectados, e infestados con larvas). La variable evaluada para cada tratamiento fue el porcentaje de mortalidad en larvas (número de pupas formadas). Las evaluaciones de la variable, se realizaron a partir de los 30 días de efectuado el ensayo, llevando a cabo lecturas periódicas cada 5 días durante 15 días. Esta variable evaluada se describe a continuación:

Porcentaje de mortalidad. El porcentaje de mortalidad acumulado y corregido en cada uno de los tratamientos, se determinó mediante la fórmula de Abbott (Ciba-Geigy 1978):

$$\text{Porcentaje de Mortalidad corregido} = \frac{Cd - Td}{Cd}$$

Donde

Cd: Infestación en el tratamiento testigo después de la aplicación

Td: Infestación en el tratamiento después de la aplicación

Para el análisis de los resultados, se realizó un análisis de varianza factorial (3x2+1), correspondiente a 3 medios de cultivo x 2 interacciones, que incluyeron *S. marcescens* sometida o no a la activación sobre el insecto + el tratamiento control. Este análisis se aplicó para cada uno de los cultivos sucesivos realizados a través del tiempo y adicionalmente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey al 0,05% de significancia.

Resultados y Discusión

Efecto de las inoculaciones en larva y de los crecimientos sucesivos de *S. marcescens* en medios de cultivo sobre su actividad biocontroladora contra *T. solanivora*

Paralelo a las determinaciones de la actividad enzimática de los extractos de células de *S. marcescens*, también se realizaron

las evaluaciones de la actividad entomopatogénica de suspensiones de *S. marcescens* ajustadas a una concentración única de 10^8 células/ml y procedentes de los diferentes medios de cultivo. En cada cultivo sucesivo de la bacteria, realizado en el tiempo, se determinó el porcentaje de mortalidad en larvas y los porcentajes de daño y control del daño en los tubérculos tratados.

Durante los cinco cultivos sucesivos de *S. marcescens* no hubo diferencias significativas en la actividad biocontroladora cuando se comparó el efecto de someter o no a la bacteria a la activación sobre larvas del insecto y su posterior crecimiento en los diferentes medios. Esto indica, que la activación previa de la bacteria sobre las larvas del insecto, no ocasionó un efecto inductor en el incremento de su actividad biocontroladora (Fig. 1).

Por otra parte, se determinó que durante el tercer y cuarto cultivo sucesivo de la bacteria sobre los medios, se obtuvieron las mayores actividades biocontroladoras, las cuales fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) con respecto a las obtenidas en los demás cultivos sucesivos realizados en el tiempo (Fig. 1).

De acuerdo con los resultados obtenidos durante los cinco cultivos sucesivos, la menor actividad biocontroladora y significativamente diferente ($p < 0,05$) fue obtenida cuando la bacteria, sometida o no a la activación en larvas, creció en los medios de agar nutritivo. Es así que cuando la bacteria sometida a la activación creció en este medio, se obtuvo una mortalidad del 44,91% en promedio y cuando no fue sometida a la activación se obtuvo una mortalidad del 42,09%. Estas actividades, no fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$), ni diferentes de las obtenidas cuando la bacteria creció en agar

nutritivo (medio control: bacteria sin inoculaciones en larva ni cultivos sucesivos), con la cual se obtuvo una mortalidad en promedio de 39,69% (Fig. 1).

Por el contrario, durante los cinco cultivos sucesivos de la bacteria, las mayores actividades biocontroladoras y significativamente diferentes de las anteriores ($p < 0,05$), se obtuvieron cuando *S. marcescens*, activada o no activada en larvas, se cultivó en los medios suplementados con el salvado de trigo y con el homogeneizado de larvas; actividades que no fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). Cuando la bacteria fue sometida a la activación y creció en los medios con el homogeneizado de larvas, se obtuvo un 54,20% de mortalidad en promedio y cuando ésta no fue sometida a la activación y creció en este medio, se obtuvo una actividad en promedio de 53,35% de mortalidad (Fig. 1). De otra parte, cuando la bacteria fue sometida a la activación y creció en los medios con salvado de trigo, se obtuvo una actividad en promedio de 56,92% de mortalidad y cuando ésta no fue sometida a la activación se obtuvo un 54,81% de mortalidad (Fig. 1).

Es importante destacar que en las determinaciones de la actividad enzimática de los extractos, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando *S. marcescens* creció en el medio suplementado con el homogeneizado de larvas, con respecto a las obtenidas cuando la bacteria creció en el medio suplementado con salvado de trigo. Sin embargo, cuando la bacteria creció en estos dos medios suplementados, no se observaron diferencias estadísticas en las actividades biocontroladoras de la bacteria. Esto podría indicar que los sustratos salvado de trigo y homogeneizado de larvas adicionados al medio, posiblemente indujeron una mayor producción y actividad de enzimas en las células de la bacteria.

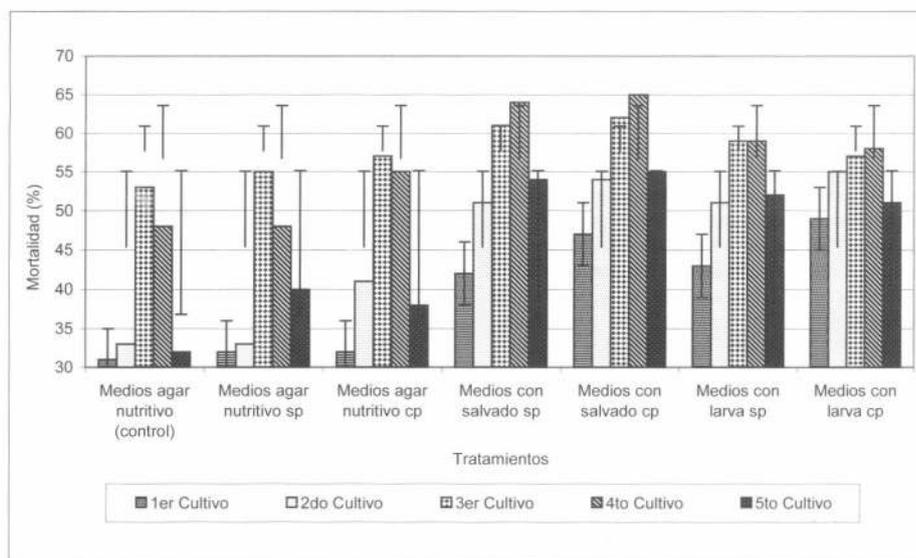


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *T. solanivora*. *S. marcescens* crecida en los diferentes medios durante los cinco cultivos sucesivos realizados en el tiempo. cp= con pase de *Serratia* sobre larvas; sp= sin pase de *Serratia* sobre larvas.

También esta mayor actividad biocontroladora obtenida a partir del crecimiento de la bacteria en estos medios, posiblemente se debió a los crecimientos sucesivos de *S. marcescens* sobre estos medios suplementados, confiriéndole una mayor patogenicidad contra las larvas de *T. solanivora* y además se indujo una selección de genes posiblemente involucrados con la producción y actividad de enzimas específicas implicadas en la patogenicidad de esta bacteria. Esto coincide con los autores Grkovic *et al.* (1995), quienes sugirieron que los aumentos en la virulencia de la bacteria podrían estar relacionados con los genes contenidos en plásmidos, los cuales están presentes en algunas especies del género *Serratia*, ya que en aislamientos entomopatogénicos de *S. entomophila* y *S. proteamaculans*, se encontró un gran plásmido de 105 Kb (PADAP) que contiene genes esenciales, los cuales parecen estar involucrados con el desarrollo de la enfermedad ambarina producida en larvas de *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Grkovic *et al.* 1995).

Durante las evaluaciones de la actividad enzimática de *S. marcescens*, se observó una relación directamente proporcional entre el incremento de estas actividades y el aumento en el número de cultivos sucesivos de la bacteria; es así que, este comportamiento enzimático estuvo relacionado con los incrementos en las actividades biocontroladoras de la bacteria, siendo éstas máximas durante el tercer y cuarto cultivo sucesivo de la bacteria en los medios. Lo anterior indica, que los sustratos adicionados al medio además de incrementar la actividad enzimática en los extractos, también indujeron aumentos en la actividad biocontroladora de *S. marcescens*, indicando que posiblemente estas actividades parecen estar relacionadas entre sí (Fig. 1).

Es posible que la utilización y adición de estos sustratos al medio haya mejorado la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, además de inducirle una alta especificidad contra *T. solanivora*, lo que posiblemente conllevó a una mayor virulencia de la bacteria. Según Flyg *et al.* (1980), la capacidad patogénica de un aislamiento de *Serratia* depende de: su capacidad invasora, la cual está relacionada con la habilidad de la bacteria para penetrar el intestino de los insectos; de la excreción de diferentes enzimas hidrolíticas como proteasas y quitinasas; de la resistencia pasiva que la bacteria puede mantener dentro del sistema inmune del insecto hospedero; y de la tasa de crecimiento y multiplicación de la misma dentro del insecto. Se podría sugerir que las continuas inoculaciones de *S. marcescens* en larvas y sus crecimientos sucesivos sobre los medios suplementados con los sustratos, posiblemente indujeron o potencializaron algunas de estas características.

Aunque la mayoría de las bacterias entomopatogénicas como *B. thuringiensis* presentan su modo de acción vía inges-

tión, podría pensarse que algunas bacterias también ejercen su modo de acción por vía cuticular. Según Hawtin *et al.* (1997), la cutícula de las larvas de lepidópteros está constituida por quitina suave y flexible, que interactúa con los componentes proteicos para producir una estructura de poca rigidez pero de gran distensionabilidad. Sin embargo, dada la alta actividad quitinolítica presentada por este aislamiento de *S. marcescens*, se podría sugerir que ésta es capaz de degradar la quitina de la cutícula de las larvas y alcanzar la hemolinfa para ocasionar la septicemia. Este proceso puede ser muy similar al ocurrido en la degradación de la cutícula durante el proceso de la muda, donde el fluido enzimático excretado por las células epidermales, que está constituido por proteasas y quitinasas, degrada la vieja cutícula para dar paso a la nueva cutícula (Hawtin *et al.* 1997). Por lo anterior, se podría sugerir que este aislamiento de *S. marcescens*, presentó un modo de acción tanto por ingestión como cuticular, lo cual podría haber facilitado su patogenicidad contra *T. solanivora*.

Como se observa en la figura 1, durante el tercer cultivo sucesivo las mayores actividades biocontroladoras del 62,26 y 61,00% de mortalidad, se obtuvieron cuando *S. marcescens*, sometida o no a la activación, creció en los medios con salvado de trigo respectivamente; actividades seguidas por el 57,23 y 59,74% de mortalidad, cuando *S. marcescens* sometida o no a la activación en larvas creció en los medios con homogeneizado de larvas respectivamente. Otros autores como Rabelo *et al.* (1985) encontraron un comportamiento similar, cuando al evaluar dos cepas del hongo *M. anisopliae* activadas una sola vez sobre ninfas de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) y cultivadas varias veces en medios de arroz, ocasionaron los mayores porcentajes de mortalidad sobre ninfas de este insecto del 65 y 76,6% con el tercer crecimiento sucesivo de estos dos hongos sobre los medios de arroz, valores comparados con el 37 y 65% de mortalidad obtenidos durante el primer crecimiento de estos dos hongos, respectivamente.

Por otra parte, durante el cuarto cultivo sucesivo de *S. marcescens*, las actividades biocontroladoras mayores, correspondientes en promedio al 65,26 y 64,07% de mortalidad, se obtuvieron cuando *S. marcescens* fue sometida o no a la activación sobre larvas y cultivada en el medio con salvado de trigo; actividades seguidas por el 58,08 y 59,28% de mortalidad, obtenidas cuando *S. marcescens* fue sometida o no a la activación y creció en el medio con homogeneizado de larvas (Fig. 1). Los incrementos ligeros observados en las actividades biocontroladoras durante el cuarto cultivo con respecto al tercer cultivo, no estuvieron relacionados con la disminución observada en las actividades enzimáticas para el cuarto cultivo sucesivo de *S. marcescens*. Por lo cual se podría sugerir,

que además de las enzimas N-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa y β -esterasa, posiblemente otras enzimas o metabolitos, podrían estar involucradas en la patogenicidad de *S. marcescens*.

Para el tercer y cuarto cultivo sucesivo de *S. marcescens* en los medios suplementados, es probable que las larvas muertas dentro de los tubérculos tratados por estos aislamientos posiblemente más virulentos, pudieron servir como reservorios para liberar las células infectivas dentro de los tubérculos. Esto se debe a que esta bacteria también presenta la ventaja competitiva de sobrevivir como saprófito facultativo, lo cual pudo haber favorecido la infección de otras larvas presentes dentro de los tubérculos, al haber consumido la pulpa del tubérculo infectada con la bacteria.

Aunque los mecanismos de patogenicidad en especies del género *Serratia* no han sido aún esclarecidos, algunos autores como Callaghan *et al.* (1996) mencionan que toxinas y enzimas extracelulares como lecitinasas (lipasas), quitinasas y proteasas, pueden estar relacionadas con la patogenicidad de algunas especies del género *Serratia*. Se podría sugerir que la actividad de las enzimas evaluadas en este trabajo, pueden estar involucradas en la actividad entomopatogénica de *S. marcescens*.

Por otra parte, durante el quinto cultivo sucesivo las actividades biocontroladoras de *S. marcescens* decrecieron aún más, con respecto al cultivo anterior. Esta disminución posiblemente se debió a las continuas inoculaciones de *S. marcescens* sobre larvas, así como a sus crecimientos sucesivos en los medios, lo cual pudo originar la pérdida de algunos genes contenidos en plásmidos que codifican para estas enzimas específicas o una disminución en la actividad de estas enzimas y otros compuestos implicados en la patogenicidad de *S. marcescens*.

Para el caso de hongos como *M. anisopliae* y *B. bassiana* se ha demostrado que sus continuos crecimientos sobre medios de cultivo sintéticos o las inoculaciones sucesivas por insectos no hospederos, han originado heterocariosis y disminución o pérdida total de su virulencia contra el insecto hospedero. La pérdida en la virulencia de estos hongos ha sido relacionada con la disminución en la actividad enzimática de los conidios, ya que sus enzimas son expresadas en menor cantidad (Schaerffenberg 1964; Fox y Jaques 1958).

El crecimiento y metabolismo fisiológico de las bacterias es más rápido a diferencia de los hongos, lo cual implica que las bacterias pueden perder más fácilmente sus genes de virulencia por diversos factores externos, con la consecuente pérdida o disminución de su patogenicidad. Así mismo, la disminución en la actividad biocontroladora de *S. marcescens* durante el quinto cultivo, pudo deberse, según Godfray *et al.* (1999), a que los estados larvales de los insectos presentan en su

microbiota intestinal, bacterias saprofitas no patogénicas, las cuales se alimentan dentro del tracto digestivo; sin embargo, estas bacterias pueden adherirse en una alta proporción a los receptores de membrana del tracto intestinal, compitiendo con las bacterias entomopatogénicas por estos sitios de unión. Este fenómeno podría reducir la efectividad de las bacterias entomopatogénicas y en consecuencia, se requeriría de altas concentraciones del biocontrolador para causar una infección en los insectos tratados.

Relación entre la actividad biocontroladora y las actividades enzimáticas presentes en los extractos de *S. marcescens*. Dado que la excreción y actividad de las enzimas de la bacteria (Bosa y Cotes 2004) pueden determinar el proceso entomopatogénico hacia larvas de *T. solanivora*, se realizó un análisis de correlación lineal entre estas actividades. Así mismo, se propuso un modelo matemático para correlacionar y cuantificar la actividad de estas variables, con la posibilidad de utilizar la actividad de estas enzimas como marcadores biológicos predictivos de la actividad biocontroladora de aislamientos nativos de *Serratia* spp.

Relación entre la actividad biocontroladora y la actividad N-acetilglucosaminidasa presente en los extractos de *S. marcescens*. Al determinar la correlación entre la actividad N-acetilglucosaminidasa (Bosa y Cotes 2004) y la actividad biocontroladora de *S. marcescens* sobre larvas de *T. solanivora* obtenidas durante los cinco cultivos, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,8741 ($p < 0,05$), valor que indica una correlación positiva y alta entre la actividad de dicha enzima presente en los extractos de *Serratia* y su actividad biocontroladora hacia larvas del insecto. Sin embargo, es probable que también otras enzimas quitinasas diferentes de ésta, estén implicadas en el proceso entomopatogénico de *S. marcescens*, ya que según Khoury *et al.* (1997), en *S. marcescens* se han identificado las quitinasas Chi1, Chi2, Chi3 y Chi4; sin embargo, no hay datos que relacionen la actividad de estas quitinasas con la actividad biocontroladora de especies de *Serratia*.

Este resultado permite proponer un modelo matemático para relacionar la actividad de estas dos variables, con la posibilidad de cuantificar la actividad de dicha enzima como un marcador bioquímico predictivo de la actividad biocontroladora de un aislamiento de *S. marcescens*.

$$Y = A + B (X)$$

% de mortalidad = 31,98294436 + 55,33242548 x Actividad N-acetilglucosaminidasa (expresada en μ moles de PNP/g de células).

Relación entre la actividad biocontroladora y la actividad quimoelastasa proteasa PR-1 presente en los extractos de *S. marcescens*. Al realizar la

correlación entre los porcentajes de mortalidad acumulada y corregida de *S. marcescens*, con la actividad quimoelastasa proteasa detectada en los extractos de células, se determinó un coeficiente de correlación de 0,8775 ($p < 0,05$), valor que indica una correlación positiva entre la actividad de dicha enzima con la actividad biocontroladora de *S. marcescens* hacia larvas de *T. solanivora*, siendo este valor de correlación ligeramente mayor que el obtenido con la actividad N-acetilglucosaminidasa. Este comportamiento enzimático coincide con lo mencionado por Dancer y Chantawannakul (1997), quienes observaron que las proteasas de *Paenibacillus larvae* (bacteria gram positiva, aeróbica y esporulante), tienen una importante función durante los estados tempranos de la infección en el insecto hospedero. Según estos autores, las proteasas de esta bacteria parecen estar implicadas directamente en el debilitamiento de la respuesta inmune del insecto, ya que estas enzimas degradan los polipéptidos antibacteriales tales como las apidaecinas y cecropinas, producidas durante los estados iniciales de la infección.

En el caso de las bacterias entomopatogénicas no formadoras de esporas, como las especies del género *Serratia*, las enzimas proteolíticas cumplen una importante función en la virulencia, ya que como estas bacterias carecen de esporas y cristales paraesporales, sus enzimas secretadas deben cumplir con esta función para facilitar la patogenicidad en los insectos. De acuerdo con este valor de correlación, se propone un modelo matemático para relacionar la actividad de estas dos variables. Esto da la posibilidad de utilizar la actividad de dicha enzima, como un marcador bioquímico predictivo de la actividad biocontroladora de aislamientos nativos de *Serratia* spp.

$$Y = A + B (X)$$

% de mortalidad = 32,77596898 + 9,549201123 x Actividad quimoelastasa proteasa (expresada en μ moles de PNA/g de células).

Relación entre la actividad biocontroladora y la actividad β -esterasa presente en los extractos de *S. marcescens*. Al correlacionar los porcentajes de mortalidad acumulada y corregida de *S. marcescens*, con la actividad β -esterasa detectada en los extractos (Bosa y Cotes 2004), se encontró un coeficiente de correlación de 0,70 ($p < 0,05$), indicando que posiblemente la actividad de esta enzima no es tan determinante en el proceso entomopatogénico de *Serratia* sp., con respecto a las actividades enzimáticas anteriores; aunque su actividad podría ser complementaria a otros mecanismos de acción de la bacteria. Esto podría coincidir con lo obtenido por Villamizar (1998), quien determinó un bajo coeficiente de correlación (0,55) entre la actividad esterasa de extractos de conidios de una cepa de *M. anisopliae* con su actividad

biocontroladora hacia adultos de la langosta llanera *R. schistocercoides*, concluyendo de igual forma que dicha enzima no juega un papel determinante en el mecanismo de acción del hongo.

Conclusiones

- Los crecimientos sucesivos de *S. marcescens* sobre los medios de cultivo suplementados con estos sustratos, indujeron un incremento significativo de sus actividades enzimáticas y biocontroladoras, siendo mayores a partir del tercer crecimiento sucesivo de la bacteria sobre estos medios.
- Los sustratos potenciales inductores de virulencia salvado de trigo y homogeneizado de larvas de *T. solanivora* incorporados al medio de cultivo, además de incrementar la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminidasa y quimoelastasa proteasa de los extractos de células de *S. marcescens*, incrementaron su actividad biocontroladora hacia larvas de *T. solanivora*.
- Se determinó una correlación positiva entre el incremento de la actividad quimoelastasa proteasa PR-1 y N-acetilglucosaminidasa en los extractos de células de la bacteria, con su actividad biocontroladora hacia *T. solanivora*, lo cual permitió proponer modelos de predicción de la actividad biocontroladora de otros aislamientos nativos de *Serratia*.
- Esta metodología desarrollada podría ser aplicada en procesos de cultivo a otras bacterias entomopatogénicas y otros insectos plaga.

Literatura citada

- BALAKRISHNAN, H.; SRINIVASAN, M.; RELE, M. 1997. Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 19 (7): 599-601.
- BISWAS, S.; MISHRA, A.; NANDA, G. 1988. Xylanase and B-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnology Bioengineering* 31: 613-616.
- BOSA, C. 2001. Efecto de la composición del medio de cultivo y los pases sucesivos sobre la actividad enzimática y biocontroladora de *Serratia marcescens* hacia *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Bogotá. 111 p.
- BOSA, C.F.; COTES, A. M. 2004. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática de *Serratia marcescens* contra *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología* 30 (1): 79-85.
- CALLAGHAN, M.; GARNHAM, L.; NELSON, T.; BAIRD, D.; JACKSON, T. 1996. The Pathogenicity of *Serratia* strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 68 (1): 22-27.
- CIBA-GEIGY. 1978. Manual de ensayos de campo. Cómo realizar un ensayo biológico. Bogotá. p. 14-18.

- DANCER, B.; CHANTAWANNAKUL, P. 1997. The proteases of American foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 79-87.
- EWING, W.; MARTIN, W. 1981. Enterobacteriaceas. En: *Manual de Microbiología Clínica*. Cap 18, 2da edición. Barcelona, España. p. 192-223.
- FLACH, J.; PILET, P.; JOLLES, P. 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia* 48: 701-716.
- FLYG, C.; KERSTIN, K.; BOMAN, H. 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* Immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *Journal of General Microbiology* 120:173-181.
- FOX, C.; JAQUES, P. 1958. Note on the green-musccardine fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) as a control for wireworms. *Canadian Entomology* 90: 314-315.
- GODFRAY, H.; BRIGGS, C.; BARLOW, N.; CALLAGHAN, M.; GLARE, T.; JACKSON, T. 1999. A model of insect-pathogen dynamics in which a pathogenic bacterium can also reproduce saprophytically. *Proceedings Royal Society of London* 266: 233-240.
- GONZÁLES, M.; VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. 1999. Incremento de la patogenicidad de *B. bassiana* hacia *Hypothenemus hampei*, utilizando cutícula de broca en el medio de cultivo. Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Bogotá. 156 p.
- GOODAY, G. 1994. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biochemistry of Microbial Degradation* p. 279-312.
- GRAY, D. 1998. Sex Differences in Susceptibility of House Crickets, *Acheta domesticus*, to experimental Infection with *Serratia liquefaciens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71(3):288-289.
- GRKOVIC, S.; GLARE, T.; TREVOR, A.; CORBETT, G. 1995. Genes essential for amber disease in grass grubs are located on the large plasmid found in *S. entomophila* and *S. proteamaculans*. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (6): 2218-2223.
- HAWTIN, R.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C. 1997. Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus infected insects is dependent on the integrity of virus encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238: 243-253.
- KHOURY, C.; MINIER, M.; HUYNH, N.; GOFFIC, F. 1997. Optimal dissolved oxygen concentration for the production of chitinases by *S. marcescens*. *Biotechnology Letters* 19 (11): 1143-1146.
- LANE, B.; TRINCI, A. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper *Nephotettix virescens*. *Mycological. Research* 95 (7): 829-833.
- RABELO, F.; MOREIRA, W.; SANTOS, G. 1985. Efeito de sucesivas repicagens em arroz na virulencia de *Metarhizium anisopliae* para *Deois flavopicta*. *Pesquisa Agropecuaria*. Brasilia 20 (10): 1115-1118.
- SAMPSON, M.; GOODAY, G. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* 144: 2189-2194.
- SCHAERFFENBERG, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* sp., and *Metarhizium* sp. *Journal of Invertebrate Pathology* 6:8-20.
- VILLAMIZAR, I. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Tesis de Maestría para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 112 p.

Recibido: May. 02 / 2002

Aceptado: Feb. 25 / 2003

Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Evaluation of native isolates of *Nomuraea rileyi* for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

CARLOS FELIPE BOSA O.¹, DORA CHÁVEZ², LISSETTE TORRES³, ALEJANDRO PARÍS⁴,
LAURA VILLAMIZAR⁵, ALBA MARINA COTES⁶

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 93-97 (2004)

Resumen. El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*, es la principal plaga de este cultivo. Debido a que en el país no se cuenta con un producto registrado a base de hongos entomopatógenos para el control de *S. frugiperda* y dado que *Nomuraea rileyi* es un microorganismo que se encuentra con más frecuencia causando epizootias en campo, se planteó como objetivo aislar y seleccionar cepas de este hongo con alta actividad biocontroladora contra *S. frugiperda*. Para ello, a partir de 10 aislamientos provenientes de los llanos orientales, se evaluó en laboratorio su actividad biocontroladora a una concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹, mediante la aspersión sobre hojas de higuera (*Ricinus communis*) infestadas con larvas de segundo instar del insecto. Con tres aislamientos se obtuvo una mortalidad de 94,7, 95 y 100%, seleccionándose el aislamiento Nm07 procedente de Villavicencio (Meta), ya que ocasionó el 100% de mortalidad y los tiempos letales menores (TL₅₀ y TL₉₀) que fueron de 6,2 y 7,9 días, respectivamente. Posteriormente, se determinó la concentración y dosis letal de este aislamiento obteniéndose una CL₅₀ de $9,8 \times 10^3$ conidios.ml⁻¹ a los 11 días y una CL₉₀ de $2,2 \times 10^5$ conidios.ml⁻¹ a los ocho días, respectivamente. Para la determinación de las dosis letales se aplicaron 5 µl de cada dosis sobre el dorso torácico de cada larva, determinándose una DL₅₀ de 44 conidios/larva a los 12 días y una DL₉₀ de 3,380 conidios/larva a los 10 días, respectivamente. Estos resultados permiten obtener parámetros de referencia para realizar estudios de producción masiva y formulación, dirigidos al control integrado de *Spodoptera* spp.

Palabras clave: Entomopatógeno. Control biológico. Gusano cogollero del maíz.

Summary. The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is the major insect pest of the maize crop. Considering that the country does not have a registered product based on fungal entomopathogens for the control of *S. frugiperda*, and given that *Nomuraea rileyi* is a microorganism that is most frequently found to cause epizootics in the field, our objective was to isolate and select strains of this fungus with high biocontrol activity against *S. frugiperda*. To do this, the biocontrol activity of 10 isolates of *N. rileyi*, isolated under laboratory conditions from the Llanos Orientales, at 1×10^7 conidia.ml⁻¹ was evaluated by spraying onto "higuera" leaves (*Ricinus communis*) infested with second instar larvae. A mortality of 94,7, 95 and 100% were obtained with three isolates, the isolate Nm-07 from Villavicencio being selected because it caused 100% mortality and the lowest lethal times (LT₅₀ and LT₉₀) of 6, 2 and 7,9 days, respectively. Afterwards, both the lethal concentrations and doses of this isolate were determined, with LC₅₀ of $9,8 \times 10^3$ conidia.ml⁻¹ at 11 days and LC₉₀ of $2,2 \times 10^5$ conidia.ml⁻¹ at eight days, respectively. To determine the lethal doses 5 µl of *N. rileyi* suspensions were applied to the thoracic tergum of each larvae, with a LD₅₀ of 44 conidia/larvae after 12 days and a LD₉₀ of 3,380 conidia/larvae after 10 days, respectively. These results offer reference parameters to conduct studies on mass production and formulation directed towards the integrated control of *Spodoptera* spp.

Key words: Entomopathogen. Biological control. Fall army worm.

Introducción

Uno de los factores más limitantes en la producción del maíz en Colombia lo constituyen los insectos plaga entre los que se destaca el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, el cual puede ocasionar daños directos o indirectos

al cultivo pues actúa como trozador, comedor de follaje y comedor de estructuras (mazorcas). Este insecto está distribuido por todo el continente americano y puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 2.600 msnm. Sin embargo, el uso indiscriminado de algunos insecticidas químicos de amplio espectro para el

control de esta plaga, tales como el endosulfan, carbofuran, metamidofos y clorpirifos (fosforados, piretroides y carbamatos), ha favorecido la selección de genes resistentes a estos insecticidas, además de ocasionar efectos negativos sobre la fauna benéfica y de interferir con el equilibrio biológico (García et al. 2002).

1 B. Sc. M. Sc. Investigador Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá.

2 Bacterióloga. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá.

3 B. Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá.

4 I. A. Investigador Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá.

5 Química Farmacéutica M. Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. E-mail: laurafernandav@yahoo.es

6 Autor para correspondencia: Ph. D. Fitopatología Investigador Principal. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. Km 14 Vía Mosquera. Teléfono: 3443156. E-mail: acotes@corpoica.org.co

Según estadísticas del Ministerio de Agricultura (1996), el área sembrada con maíz en Colombia asciende a 79.351 ha con un rendimiento promedio de 3.243 kg/ha y con un gasto en insecticidas para el control de esta plaga de \$ 4,2 millones de dólares por año aproximadamente, lo cual incide considerablemente en los costos de producción.

Una alternativa promisorio para el control de esta plaga es la utilización de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Nomuraea rileyi*. Su uso presenta varias ventajas frente a los insecticidas químicos, ya que su espectro de acción biológica es menor, disminuyendo el efecto sobre los insectos benéficos o no blanco, además es posible su producción sobre sustratos económicos y su aplicación en campo no representa riesgo toxicológico para otros seres vivos como aves, peces y mamíferos. En trabajos preliminares desarrollados en el C.I. Palmira de Corpoica con hongos entomopatógenos y productos no convencionales, se obtuvo en campo un 90% de control de larvas de *S. frugiperda* mediante el uso de una cepa seleccionada del hongo *N. rileyi* (García et al. 2002).

Considerando la importancia de este insecto, los resultados de control obtenidos mediante el uso de entomopatógenos y aprovechando la experiencia del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, se hace necesario desarrollar estudios encaminados al aislamiento y selección de cepas de hongos entomopatógenos, con actividad biocontroladora alta de la plaga con miras a desarrollar preformulados que sean seguros, eficaces y confiables. Por las razones anteriores, los objetivos del presente trabajo fueron aislar y seleccionar aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* con actividad biocontroladora alta contra *S. frugiperda*; así como determinar las concentraciones y dosis letales de los aislamientos seleccionados.

Materiales y Métodos

Aislamiento, selección y evaluación de *N. rileyi*. Se llevó a cabo una recolección de insectos con síntomas de infección en cuatro lotes sembrados con maíz en la zona del piedemonte llanero (Villavicencio, Meta) y en cuatro lotes en la zona de la altillanura (Puerto Gaitán, Meta). Para el piedemonte llanero se realizó el muestreo en tres lotes cultivados con maíz del Centro de Investigaciones "La Libertad" de Corpoica; el otro cultivo en donde se realizaron colectas correspondió a un lote comercial ubicado en la vereda de Pompeya Baja. En la altillanura, se hicieron muestreos en dos de las fincas con las mayores áreas de cultivo de maíz: Panorama y Santana. En cada una de ellas se escogieron dos lotes, teniendo en cuenta su ubicación y nivel de daño. Las larvas muertas o enfermas, con sintomatología típica de infección por hongos o bacterias, se colectaron y se dispusieron individualmente en viales de vidrio. De esta manera, las muestras se transportaron al Laboratorio

de Control Biológico del Centro de Investigaciones Tibaitatá de Corpoica, para su análisis.

A partir de las larvas recolectadas, se realizó el aislamiento de los hongos entomopatógenos potenciales en cajas de Petri con un medio de cultivo codificado como Agar-harina de soya (Agar-Soya). Este medio estuvo constituido por salvado de trigo, frijol soya triturado, extracto de levadura, sales minerales y agar. Luego, cada caja de Petri se incubó a 22°C bajo luz constante; las colonias características del hongo *N. rileyi* se purificaron y se conservaron en el medio Agar-Soya.

Con el fin de realizar la evaluación de la actividad biocontroladora de los diferentes aislamientos nativos de *N. rileyi*, se hizo una activación sobre larvas del insecto y se incubaron durante 12 días a 22°C en el medio de cultivo Agar-Soya. Posteriormente, con los conidios producidos por cada aislamiento se obtuvo una suspensión ajustada a una concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹. Se hizo la aplicación por medio de un aspersor manual a un volumen de 0,4 ml por el haz y 0,4 ml por el envés de hojas de higuera (*Ricinus communis*) previamente sometidas a desinfección en hipoclorito de sodio al 0,5% y luego tres enjuagues con agua destilada estéril por 5 minutos cada uno; posteriormente, cada hoja se infestó con dos larvas de segundo instar del insecto. Se seleccionó, como cepa de referencia, un aislamiento de *N. rileyi* procedente del Centro de Investigaciones Palmira de Corpoica (Valle del Cauca), por haber presentado en estudios previos la actividad bioinsecticida más alta obteniéndose un porcentaje acumulado superior al 90%, al ser probada en campo (García et al. 2002).

El bioensayo se realizó bajo condiciones controladas de 20°C \pm 0,2°C de temperatura y 65% de humedad relativa; se utilizó un diseño completamente aleatorio, donde la unidad experimental consistió en 2 larvas/hoja para un total de 20 repeticiones y cuarenta individuos por tratamiento. A su vez, se utilizaron testigos tratados (hojas desinfectadas, asperjadas con Tween 80 al 0,1% e infestadas con larvas) y testigos larva (hojas desinfectadas, no tratadas con el hongo e infestadas con larvas).

Las lecturas del bioensayo se realizaron cada 24 h, registrando el porcentaje de mortalidad diaria y determinando el tiempo al cual muere el 50 - 90% de la población (TL₅₀, TL₉₀) para cada aislamiento. Las larvas muertas diariamente se colocaron en cámaras húmedas para evidenciar si la muerte fue provocada por la infección del hongo evaluado. Los datos de mortalidad se corrigieron mediante la fórmula de Schneider - Orelli (Ciba Geygi 1973), obteniéndose el porcentaje de eficacia. Posteriormente, se sometieron a un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias por Tukey ($\alpha=0,05$).

Determinación de las concentraciones y dosis letales de los aislamientos seleccionados. Posteriormente, se seleccionaron los aislamientos de este hongo que cumplieron con los criterios de actividad biocontroladora alta sobre larvas del insecto, tiempos letales TL50 y TL90 menores y un crecimiento y esporulación óptimas en el medio de cultivo. A estos aislamientos seleccionados se les determinó la concentración letal media y novena (CL50 y CL90) y al mejor de ellos se le determinó la dosis letal media y novena (DL50 y DL90).

Las condiciones metodológicas y el diseño experimental de los bioensayos para la determinación de las concentraciones letales, fueron las mismas descritas anteriormente; para ello se evaluaron cinco concentraciones correspondientes a 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 conidios.ml⁻¹. Los datos obtenidos en el experimento se analizaron mediante el programa estadístico Probit.

Para determinar la DL₅₀ y DL₉₀ del mejor aislamiento de *N. rileyi* seleccionado, se hizo una aplicación tópica de 5 μ l con dosis de 5, 50, 500, 5.000 y 50.000 conidios/larva (las suspensiones de conidios se realizaron en solución de Tween 80 al 0,5%). La aplicación se hizo sobre el dorso torácico de larvas de segundo instar. El diseño experimental para este bioensayo fue igual al descrito anteriormente. De igual forma, los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico Probit.

Resultados y Discusión

Aislamiento, selección y evaluación de *N. rileyi*. Se recolectaron 37 muestras (larvas muertas de *S. frugiperda* con síntomas aparentes de infección por hongos). En la finca Santana (lotes 4 y 5) fue donde se encontró el número mayor de insectos con signos de *Nomuraea rileyi*. Para la zona de la altillanura y del piedemonte llanero, se observó una alta incidencia de epizootias causadas por el hongo *N. rileyi* afectando diferentes instares larvales del insecto. Esto sugiere que las esporas del hongo son fácilmente dispersadas y arrastradas por el viento y la lluvia, adhiriéndose, germinando, esporulando e infectando nuevos insectos en el campo, comportamiento favorecido por la humedad alta presente en la región.

A partir de muestras analizadas correspondientes a larvas muertas de *S. frugiperda* procedentes del departamento del Meta, se obtuvieron diez (10) aislamientos nativos de *N. rileyi*, los cuales presentaron morfología típica tanto microscópica como macroscópica del hongo, con algunas diferencias ligeras en cuanto a la tonalidad en el color de la esporulación. Estos diez aislamientos, se purificaron mediante repiques sucesivos en el medio de cultivo específico, para su posterior conservación en cuarto frío a 4°C (Tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos de *N. rileyi* obtenidos a partir de larvas de *S. frugiperda* colectadas en el departamento del Meta (Colombia)

Código del aislamiento	Procedencia	Morfología macroscópica en medio sólido
Nm-01-6 (<i>N. rileyi</i>)	La libertad (Villavicencio- Meta)	Esporulación polvosa
Nm-04-2	Finca Santana, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación algodonosa
Nm-04-3	Finca Santana, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-04-11	Finca Santana, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-06-4	Finca Panorama, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-2P	Finca Panorama, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación algodonosa
Nm-5P	Finca Panorama, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-07	Finca Panorama, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-9P	Finca Panorama, Puerto Gaitán (Meta)	Esporulación polvosa
Nm-10*	La libertad Villavicencio (Meta)	Esporulación polvosa
Nm 004 Corpoica- Palmira	Corpoica Palmira	Esporulación algodonosa

(* Aislada de *Anticarsia gemmatalis*)

El número limitado de aislamientos nativos obtenidos de *Nomuraea rileyi* (10), con respecto a la alta cantidad de muestras recolectadas (37), pudo haberse debido a la dificultad en purificar este hongo y a las exigencias nutricionales requeridas para su crecimiento y esporulación; ya que las muestras biológicas traídas de campo presentaron en su superficie muchos microorganismos saprófitos como hongos y bacterias, que interfirieron con el aislamiento y purificación de éste, debido a su crecimiento rápido en los medios, en comparación con los inóculos de *N. rileyi*, que presentan un crecimiento más lento, lo cual conllevó a una competencia entre estos microorganismos por espacio y por nutrientes en el medio de cultivo.

Si bien es cierto que en la literatura existen medios recomendados para el crecimiento de hongos del género *Nomuraea*, éstos no son los más eficientes para el aislamiento, crecimiento y esporulación del hongo, debido a que no son selectivos y muchos carecen de los requerimientos nutricionales específicos para la total esporulación del hongo. Por tal razón fue necesario mejorar el medio de cultivo semi-selectivo descrito por Vimala (1994), que permitiera inicialmente realizar el aislamiento adecuado del hongo a partir de las muestras recolectadas.

El criterio para haber utilizado en todos los ensayos biológicos larvas de segundo instar del insecto, fue motivado porque los primeros estadios de lepidópteros (primer y segundo instar) son más susceptibles de controlar en campo que instares avanzados. Además, en ensayos previos de estandarización para comparar la patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea* utilizando diferentes instares larvales de *S. frugiperda*, se aplicó una concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹ sobre hojas de higuera, las cuales se infestaron independientemente con larvas de segundo y de cuarto instar del insecto, obteniéndose porcentajes de mortalidad del 100 y del 80%,

respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Bustillo y Posada (1986), quienes evaluaron la patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas de tercer instar de *S. frugiperda*, encontrando que éstas fueron muy susceptibles al hongo, con una mortalidad de 83,7%. De otro lado, Múnera et al. (1999) determinaron que larvas de primer instar de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae) fueron más susceptibles a la patogenicidad de un aislamiento de *B. bassiana* obteniéndose el 87,5% de mortalidad, a diferencia del 27,5% de mortalidad obtenido cuando se utilizaron larvas de quinto instar del insecto.

Este comportamiento podría atribuirse a diferentes mecanismos de defensa presentes en los estadios larvales de los insectos; según Watanabe (1987) éstos pueden ser de índole cuticular cuando se lleva a cabo la penetración de los hongos, también factores en la hemolinfa contra el crecimiento del patógeno y la resistencia por parte del insecto a los metabolitos tóxicos producidos por los hongos. Por otra parte, Tanada y Kaya (1993) afirman que la composición de los aminoácidos de la superficie del integumento de las larvas, varía según el estadio larval en que se encuentren las larvas y el tiempo antes de la muda; lo anterior podría explicar, la mayor susceptibilidad del segundo instar de *S. frugiperda* a *N. rileyi* al suponer que la composición de su integumento en un momento dado, permitió la efectiva penetración y por lo tanto una mayor mortalidad que la obtenida con el cuarto instar del insecto.

De otra parte, con el fin de simular las aplicaciones en campo, las suspensiones de conidios de los diferentes aislamientos se asperjaron sobre hojas de higuera (utilizadas como alimento) y no sobre las larvas del insecto; ya que si las aspersiones se realizaban sobre las hojas y sobre los insectos, se estaría propiciando la patogenicidad de los microorganismos en los in-

sectos bajo condiciones obligadas, lo que conllevaría a obtener falsos positivos. Además, autores como Múnera et al. (1999), en ensayos realizados en laboratorio, cuando compararon dos métodos de inoculación de conidios de un aislamiento de *Beauveria bassiana* contra larvas de *Erinnyis ello*, aspersión directa sobre las larvas contra aspersión sobre el sustrato de alimentación, no encontraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad.

Al cabo de los 10 días de haber hecho la aplicación, el aislamiento que ocasionó la actividad biocontroladora mayor (100%) fue el codificado como Nm-07 procedente de la finca Panorama (Puerto Gaitán, Meta), esta actividad fue seguida por la producida por el aislamiento Nm-06-4 (proveniente de Puerto Gaitán -Meta) con el 95% de mortalidad, y por los aislamientos Nm-01-6 y Nm-10 (provenientes de Villavicencio -Meta) con una mortalidad del 95%. Las actividades biocontroladoras de estos cuatro aislamientos no fueron significativamente diferentes entre sí, ni diferentes con la actividad obtenida con la cepa de referencia de *Nomuraea rileyi* Nm-004, procedente de Palmira, con la cual se obtuvo también el 100% de mortalidad (Tabla 2).

Teniendo en cuenta los criterios para la selección de aislamientos expuestos en la metodología, se seleccionaron, para el ensayo posterior, los aislamientos nativos Nm-07 y Nm-06-4 por presentar la actividad biocontroladora más alta correspondiente al 100 y 95% de mortalidad, respectivamente. Además, estos aislamientos exhibieron tiempos letales 50 y 90 bajos, correspondientes a 6,2 días y 7,9 días, respectivamente, para el aislamiento Nm-07 y de 6 días, 7 horas y 9 días, para el aislamiento Nm-06-04; en comparación con la cepa de referencia (Tabla 2), con la que los tiempos letales 50 y 90 fueron de 6,8 y 8,4 días, respectivamente.

Así mismo, estos aislamientos produjeron una esporulación polvosa en el medio de cultivo, lo que permitió la fácil recolección y manipulación de los conidios del medio, a diferencia de la cepa de referencia que, en el medio de cultivo, presentó una esporulación algodonosa (con presencia de micelio) lo que dificultó la recolección de los conidios.

Determinación de las concentraciones y dosis letales de los aislamientos seleccionados. Para la determinación de las concentraciones letales de los aislamientos seleccionados, se evaluaron cinco concentraciones: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 conidios.ml⁻¹. Las lecturas de los tratamientos se realizaron diariamente hasta los 15 días después de aplicación.

El análisis estadístico Probit determinó para el aislamiento Nm-07 una concentración letal media (CL₅₀) de $9,8 \times 10^3$ conidios.ml⁻¹ y una concentración letal noventa (CL₉₀) de $2,2 \times 10^5$ conidios.ml⁻¹.

Para el aislamiento Nm 06-04, el análisis Probit determinó una CL_{50} de $1,3 \times 10^4$ conidios. ml^{-1} y una CL_{90} de $7,9 \times 10^5$ conidios. ml^{-1} , valores que fueron ligeramente mayores a los obtenidos con el aislamiento Nm-07 (Tabla 3). Teniendo en cuenta que el aislamiento nativo Nm-07 fue el que obtuvo una menor CL_{50} y CL_{90} , se seleccionó para determinarle la dosis letal media y la dosis letal noventa (DL_{50} y DL_{90}).

Los valores de CL_{50} y CL_{90} , obtenidos en este estudio, sugieren que la cepa seleccionada es virulenta y altamente promisoría para el control de larvas de *S. frugiperda* en campo, si se comparan estos resultados con los de autores como Vimala (1994) y Gonzáles *et al.* (1996), quienes mencionaron que aislamientos de *N. rileyi* evaluados sobre larvas de segundo instar de *S. littura*, tuvieron un rango de CL_{50} que varió entre $9,3 \times 10^9$ y 1×10^8 conidios. ml^{-1} .

Al determinarse la DL_{50} y DL_{90} , se observó que los porcentajes de mortalidad menores se obtuvieron cuando se aplicaron las dosis de cinco y cincuenta conidios sobre cada larva, con estas dosis letales sólo hasta el noveno día se presentó mortalidad en las larvas, la cual fue de 2,5 y 20% respectivamente; y se incrementaron hasta obtenerse el 22,5 y el 50% de mortalidad respectivamente, al cabo de los quince días de realizado el ensayo.

De otra parte, los porcentajes de mortalidad mayores se obtuvieron cuando se aplicaron las dosis de 500, 5.000 y 50.000 conidios/larva. Con estas tres dosis a partir del quinto día se obtuvo el 5% de mortalidad, y se incrementó en un 22,5, 32,5 y 60%, respectivamente, al cabo de los siete días post aplicación. A los quince días de realizado el ensayo, se obtuvo una mortalidad acumulada del 85% con la dosis de 500 conidios/larva; de 92,5% de mortalidad con la dosis de 5.000 conidios/larva y de 95% de mortalidad con la dosis de 50.000 conidios/larva. Estos resultados demuestran que con las dosis más altas de 5.000 y 50.000 conidios/larva se obtuvo una mortalidad similar en larvas del insecto correspondientes al 92,5 y 95%, respectivamente (Fig. 1).

En la determinación de las dosis letales cincuenta y noventa del aislamiento Nm-07 de *N. rileyi*, se estableció una DL_{50} de 44 conidios/larva necesarios para matar el 50% de la población y una DL_{90} de 3.380 conidios/larva necesarios para matar el 90% de las larvas utilizadas. Estos resultados indicarían que para controlar la población de la plaga en campo se necesitaría aplicar concentraciones bajas del hongo; lo que significaría un ahorro de tiempo y dinero en las etapas de producción masiva y formulación, necesarias para el desarrollo de un bioplaguicida.

Conclusiones

- Las mayores actividades biocontroladoras se obtuvieron con cuatro aislamientos

Tabla 2. Actividad biocontroladora de los aislamientos nativos de *N. rileyi* sobre *S. frugiperda*

Aislamiento	Germinación de conidios (%) (24 horas)	TL50 (días, horas)	TL90 (días, horas)	Mortalidad acumulada corregida (%)
Nm-01-6	94,623	6d 7h	8d 9h	94,73 a
Nm-04-2	71,493	7d	—	75,00 b
Nm-04-3	70,539	7d	—	73,00 b
Nm-04-11	71,296	6d 8h	—	80,00 b
Nm-06-4	97,770	6d 7h	9d	95,00 a
Nm-2P	75,471	5d 8h	—	80,00 b
Nm-5P	62,836	6d 8h	—	80,00 b
Nm-07	85,747	6d 2h	7d 9h	100,00 a
Nm-9P	87,058	5d 7h	8d 1h	90,00 a
Nm-10	68,310	6d 6h	10d 2h	94,73 a
Nm 004 (Palмира) (Cepa de referencia)	81,311	6d 8h	8d 4h	100,00 a

(*)Letras iguales no presentan diferencias significativas a un nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey). d=días, h=horas.

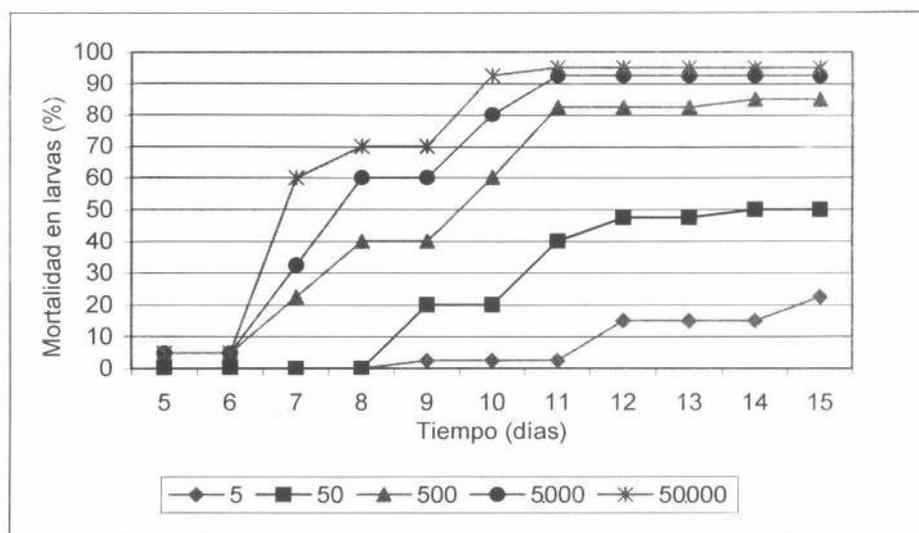


Figura 1. Determinación de la dosis letal del aislamiento Nm-07 de *N. rileyi* contra larvas de *S. frugiperda*. Dosis en conidios/larva.

Tabla 3. Comparación de las concentraciones letales para los aislamientos de *N. rileyi* seleccionados sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Análisis Probit, significancia del 0,90%)

Concentraciones letales	Aislamiento Nm07	Aislamiento Nm-06-04
CL10	$4,35 \times 10^2$ conidios. ml^{-1}	$2,2 \times 10^3$ conidios. ml^{-1}
CL50	$9,8 \times 10^3$ conidios. ml^{-1}	$1,2 \times 10^4$ conidios. ml^{-1}
CL90	$2,2 \times 10^5$ conidios. ml^{-1}	$7,9 \times 10^5$ conidios. ml^{-1}

tos de *N. rileyi* (Nm 01-06, Nm-10, Nm 06-04 y Nm-07) ocasionando mortalidades entre 94,73 y 100%.

- Con el aislamiento Nm-07 se obtuvieron los menores valores de concentración y dosis letal

- Teniendo en cuenta su virulencia alta y la mortalidad causada bajo condiciones de laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda*, el aislamiento Nm-07 de *N. rileyi* fue seleccionado como el más promisorio para hacer estudios de formulación y la posterior evaluación bajo condiciones de campo.

Literatura citada

- BUSTILLO, A.; POSADA, F. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Revista Colombiana de Entomología 12 (1): 5-15.
- CIBA GEYGI. 1975. Manual de ensayos de campo. 215 p.
- GARCÍA, F.; MOSQUERA, M.; VARGAS, C.; ROJAS, L. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz

- y otros cultivos en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 53-60.
- GONZÁLES, H.; CARBALLO, M.; BLANCO, H. 1996. Efecto de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre la mortalidad de *Ecdytoplopha torticornis* (Meyrick) (Lep: Tortricidae) en macadamia. <http://www.catie.ac.cr/-cicmip/rev40hgonz40>.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 1996. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero. Oficina de información y Estadística. Bogotá. 206 p.
- MÚNERA, D.; DE LOS RÍOS J.; BELLOTTI, A. 1999. Patogenicidad sobre *Erinnys ello* (Lepidoptera: Sphingidae) en condiciones de laboratorio por hongos entomopatógenos recolectados en cultivos comerciales de yuca, *Manihot esculenta* en el Valle del Cauca, Colombia. Revista Colombiana de Entomología 25 (3-4): 161-167.
- TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. Insect pathology. Academic Press INC. New York. 666 p.
- VIMALA, P. 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomureae rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab.) on *Ricinus communis*. Journal of Invertebrate Pathology 63: 145-150.
- WATANABE, H. 1987. The host population. Epizootiology of insect diseases. John Wiley and Sons. USA. 555 p.

Recibido: Abr. 22 / 2003

Aceptado: Ago. 07 / 2003

Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Development of preformulated products based on *Nomuraea rileyi* for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

LAURA VILLAMIZAR¹, CAROLINA ARRIERO², CARLOS FELIPE BOSA O.³, ALBA MARINA COTES⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 99-105 (2004)

Resumen. *Nomuraea rileyi* es el microorganismo que más frecuentemente se encuentra causando epizootias naturales en campo en larvas de *Spodoptera frugiperda* en diferentes zonas productoras de maíz en Colombia; sin embargo, en el mercado nacional no existe ningún producto registrado a base de este hongo. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron los de desarrollar un método de producción masiva y desarrollar prototipos de bioplaguicida con una cepa del hongo *N. rileyi* seleccionada por su actividad para el control del gusano cogollero del maíz. Inicialmente se estandarizó un sistema de producción masiva de conidios, para lo cual se evaluaron matrices sólidas como arroz, salvado de trigo y granos de millo, contenidas tanto en bolsas de polietileno de alta densidad, como en bandejas de aluminio y suplementadas con fuentes de nitrógeno orgánico e inoculadas con diferentes tipos de inóculo. Una vez seleccionado el medio en el que se obtuvo el mayor rendimiento de conidios por gramo de sustrato, los conidios fueron separados y utilizados como principio activo para la elaboración de prototipos de bioplaguicida. En el sistema de producción masiva en bolsas, la mayor esporulación se produjo cuando se utilizaron granos de millo, inoculados con fragmentos de medio de cultivo crecido y esporulado de ocho días de edad, siendo ésta de 30×10^9 conidios.g⁻¹. Se desarrollaron dos sistemas de entrega para el bioplaguicida, un concentrado emulsionable con una concentración de 1×10^{11} conidios.g⁻¹ y un polvo mojable con una concentración de 1×10^9 conidios.g⁻¹, con germinaciones del 92 y 87%, respectivamente. Los sistemas de producción masiva resultaron eficientes y económicos para la obtención de conidios y los preformulados representan una alternativa promisoriosa para el control del gusano cogollero del maíz.

Palabras clave: Fermentación. Bioplaguicida. Formulación. Control biológico.

Summary. *Nomuraea rileyi* is the microorganism that is most frequently found causing natural field epizootics of *Spodoptera frugiperda* larvae in different maize production zones of Colombia; however, in the national market there are no registered products based on this fungus. Therefore, the objectives of the present work were to develop a method of mass production and develop biopesticide prototypes with a strain of the fungus *N. rileyi* selected for its control activity on the fall armyworm. A system for mass production of conidia was initially standardized after evaluating different solid matrices such as rice, wheat bran and mijo grains, contained in both, high density polyethylene bags and aluminum trays, supplemented with different organic nitrogen sources and inoculated with different inoculum types. Once the medium was selected where the greatest conidia production per gram of substrate was obtained, the conidia were separated and used as active starter for elaborating the biopesticide prototypes. In the system of mass production in bags, the highest sporulation took place when mijo grains were used, inoculated with eight day old fragments of agar grown with the sporulated fungus, this being at 30×10^9 conidia.g⁻¹. Two delivery systems were developed for the biopesticide, an emulsifying concentrate with a concentration of 1×10^{11} conidia.g⁻¹ and a wettable powder with a concentration of 1×10^9 conidia.g⁻¹, with germinations of 92 and 87%, respectively. The systems of mass production were efficient and economical for conidia production and the preformulations represent a promising alternative for the control of the fall armyworm in maize.

Key words: Fermentation. Biopesticide. Formulation. Biological control.

Introducción

El "gusano cogollero del maíz", *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), es considerado la plaga más importante del maíz en muchas regiones de América (García *et al.*

1999). La gran cantidad de hospederos alternos que tiene esta plaga hace que su dispersión sea amplia, asegurando su supervivencia y la abundancia de sus poblaciones (García 2000). En la actualidad el complejo *Spodoptera* es uno de los pro-

blemas principales en el manejo de plagas en el país. La incidencia alta de esta plaga ha hecho necesario el uso indiscriminado de insecticidas químicos, con dosis de hasta dos y tres veces las indicadas, dejando como consecuencia el desequilibrio bio-

1 Autor para correspondencia: Química Farmacéutica M. Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C.I. Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera. E-mail: laurafernanda@yahoo.es

2 Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

3 B. Sc. M. Sc. Investigador Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá.

4 Ph. D. Fitopatología. Investigadora Principal. Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C.I. Tibaitatá. E-mail: acotes@corpoica.org.co

lógico y la generación de resistencia (García 1996).

Diferentes trabajos realizados para manejar este insecto, han demostrado que la integración de medidas culturales, físicas, biológicas y químicas selectivas pueden disminuir las poblaciones del mismo, manteniéndolas por debajo de niveles de daño económico (García 1996).

Los hongos entomopatógenos representan una alternativa para el manejo de esta plaga. Entre ellos se destacan *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Verticillium* sp. y *Nomuraea rileyi*, los cuales actúan por contacto, invadiendo el cuerpo del insecto y causando la muerte (León y Pulido 1991). El hongo *N. rileyi* es una alternativa promisoriosa para controlar las poblaciones altas de larvas de *S. frugiperda*, ya que son frecuentes las epizootias naturales ocasionadas por el hongo sobre *Spodoptera* y otros lepidópteros. Este hongo imperfecto y dimórfico en su desarrollo es diferente de los hongos oportunistas *Metarhizium anisopliae* (Metschin) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., pues tiene unos requisitos de crecimiento muy exigentes, posee un amplio rango de hospederos y no tiene una fase saprofítica en el suelo (Boucias et al. 2000). *N. rileyi* no germina, ni crece, ni esporula a temperaturas superiores a 35°C, lo cual indica que no afecta a vertebrados homeotérmicos. Los conidios expuestos a jugos gástricos de humanos se inactivan rápidamente. Cuando se administró a ratas en dosis de $1,1 \times 10^7$ conidios/litro de aire durante una hora no se observaron anomalías clínicas, patológicas o histopatológicas (Ignoffo et al. 1979).

A pesar de lo promisorio que puede resultar el uso de este entomopatógeno, no existe ningún bioplaguicida registrado a base de este hongo ni en Colombia ni en el mundo, posiblemente por la dificultad que presenta este microorganismo para su producción masiva, ya que tiene unos requerimientos nutricionales específicos y es de desarrollo muy lento.

El logro de un bioplaguicida a base de este hongo, implica el cumplimiento de diversas etapas que garantizan la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, la evaluación de su actividad controladora, su producción masiva, estudios de preformulación, formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, estudios de toxicidad, ensayos de campo, determinación de los mecanismos de biocontrol, estudios de impacto ambiental, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento, entre otros (Gómez y Villamizar 2000)

Una etapa importante en el desarrollo de estos biocontroladores es la preformulación, la cual se define como el conjunto de actividades organizadas conducentes a la determinación de las caracte-

terísticas del principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que éste puede sufrir sólo o al combinarlo con los auxiliares de formulación necesarios para la elaboración del producto final (Gómez y Villamizar 2000).

Basados en los resultados de los estudios de preformulación, se desarrollan los estudios de formulación, cuyo objetivo es lograr la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el ingrediente activo junto con los excipientes forme un bioplaguicida estable, efectivo, seguro, de fácil aplicación y aceptable para su uso (Morales 1993).

Los bioplaguicidas pueden ser formulados en diferentes presentaciones: los polvos para espolvoreo que se aplican directamente sobre las plantas empleando equipos adecuados. En éstos, la materia activa se encuentra dispersa en un vehículo inerte sólido y si es necesario se añaden al mismo agentes de fluidez y estabilizantes (Barbera 1976). Los polvos para reconstituir se presentan en forma de un polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión en el agua durante un período de tiempo largo (Barbera 1976). Los granulados tienen aspecto de arenilla con tamaños de partícula que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm, ésta contiene el principio activo, el vehículo y el adherente (Barbera 1976). Los líquidos emulsionables constan de un principio activo en un medio graso apropiado al que acompañan los coadyuvantes necesarios, en estos productos su dilución en agua produce emulsiones formadas por gotitas finas de la formulación dispersas en agua.

La mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas existentes en el mercado para el control de insectos plaga, fitopatógenos y malezas, están basadas en formas secas, polvos mojables o polvos de reconstitución en vehículos oleosos. El diseño de la formulación depende de la plaga, el sitio en que el plaguicida debe ser localizado, las condiciones medioambientales y el tipo de usuario al cual el producto será vendido (Gómez y Villamizar 2000).

Por tal razón, el propósito del presente trabajo fue el de estandarizar un medio de cultivo económico para la producción de conidios de *N. rileyi* y desarrollar prototipos de bioplaguicida para el control de *S. frugiperda*.

Materiales y Métodos

Microorganismo y medios de cultivo.

La cepa que se utilizó en el presente estudio fue el hongo entomopatógeno *N. rileyi*, proveniente de Corpoica C.I. Palmira, la cual fue aislada de larvas enfermas de *S. frugiperda* recogidas en campo. Esta cepa se encuentra conservada en medio extracto de malta - extracto de levadura (YM) bajo aceite mineral estéril a una temperatura de 8°C y fue codificada como Nm 004 en el Banco de Germoplasma del Labora-

torio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica C.I. Tibaitatá.

Medios de producción masiva. Ya que el principal requerimiento del hongo es la presencia de una fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo, se evaluaron diferentes hidrolizados de proteína, adicionados a matrices sólidas adecuadas.

Preparación de los hidrolizados de proteína

Se realizaron hidrolizados proteicos utilizando aquellas fuentes de nitrógeno que indujeron esporulación en los medios en caja de Petri: levadura seca, soya y malta. Los hidrolizados se obtuvieron siguiendo el método propuesto por Díaz y Forero (1997).

Producción masiva. La producción masiva de *N. rileyi* se realizó en bandejas de aluminio y en bolsas de polietileno de alta densidad que contenían diferentes matrices sólidas (salvado de trigo para las bandejas y arroz y frijol soya para las bolsas), matrices comúnmente utilizadas en estos dos sistemas de producción.

Preparación de bandejas de aluminio

En bandejas de aluminio de 20 cm de largo por 14 cm de ancho y 3 cm de profundidad, se pesaron 34 g de matriz sólida (salvado de trigo) y se humedecieron con 120 ml del hidrolizado de proteína. Las bandejas se cubrieron con papel de aluminio y se esterilizaron durante 35 minutos a 121°C y 15 psi. Cada tratamiento consistió en la matriz sólida humedecida con cada hidrolizado de proteína. Se utilizaron cinco unidades experimentales por tratamiento.

Preparación de bolsas de polietileno

En bolsas de polietileno de alta densidad dobles, se colocaron 100 g de arroz o millo con 80 ml del hidrolizado de proteína. A las bolsas se les acondicionó un cuello en el que se ajustó un tapón de algodón y se esterilizaron durante 35 minutos a 121°C y 15 psi. Cada tratamiento consistió en la matriz sólida humedecida con cada hidrolizado de proteína. Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento.

Tipos de inóculo. Con el objetivo de evaluar distintos tipos de inóculo para la producción masiva de conidios de *N. rileyi*, se probaron para la producción en bandeja los siguientes: suspensión de conidios que contenía 1×10^7 conidios.ml⁻¹ y precultivo líquido crecido en medio YM sin agar durante 7 días y para la producción en bolsa se utilizó inoculación con fragmentos de medio de cultivo (YM) crecido con el hongo durante 15 días.

Las bandejas se cubrieron con una lámina plástica permeable al gas para evitar posibles contaminaciones y para permitir el intercambio de gases, facilitando el crecimiento del hongo (Mariño 2001). Las bol-

sas se taparon de nuevo con el tapón de algodón y se sellaron con cinta de emascarar (Gómez y Villamizar 1996).

Las bandejas y las bolsas se dejaron incubando en un cuarto de crecimiento con luz constante a una temperatura de 25°C.

Evaluación de resultados

Para evaluar el rendimiento de cada medio de cultivo, se utilizó la técnica de conteo en cámara de Neubauer, la cual permitió determinar el número de conidios producidos por gramo de medio en cada tratamiento, a los 10 días de incubación. Estos tiempos son los comúnmente utilizados para la producción de conidios de los hongos filamentosos trabajados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, seleccionando como óptimo, aquel medio en el que se presentó el rendimiento mayor. De igual manera se determinó el tiempo óptimo de incubación.

Para la evaluación en bolsas, se tomó un gramo del medio esporulado de una unidad experimental y se homogeneizó manualmente en erlenmeyers de 500 ml de capacidad con 300 ml de solución de Tween 80 al 0,1%. Cada evaluación se realizó por triplicado, utilizando tres unidades experimentales (tres bolsas) por tratamiento.

Para la evaluación en bandejas, se tomaron tres muestras de 1 cm² de medio por cada unidad experimental. Éstas se homogeneizaron en 300 ml de Tween 80 al 0,1% dentro de una licuadora Osterizer® por 30 segundos a velocidad media. Cada evaluación se realizó por triplicado, utilizando tres unidades experimentales (tres bandejas) por tratamiento.

Obtención del principio activo

Utilizando el medio seleccionado, se procedió a la obtención del principio activo consistente en conidios puros y secos. El medio esporulado con el hongo se lavó con una solución de Tween 80 al 0,1% para remover los conidios de la matriz sólida. Se separaron las partículas grandes de esta suspensión, haciéndola pasar por un colador. El líquido resultante se centrifugó en una centrífuga de flujo continuo CEPA 77933® a 32.000 r.p.m. El sedimento consistente en la biomasa húmeda constituyó el principio activo (conidios húmedos) y el tamaño de éstos se determinó por observación al microscopio con un lente micrométrico. Posteriormente, la biomasa húmeda se extendió en una bandeja de aluminio y se cubrió con papel absorbente para permitir un mejor intercambio gaseoso, con el fin de realizar el secado del principio activo durante 48 h a 25°C. Finalizado el tiempo de secado, los conidios se pulverizaron en un mortero y se tamizaron por una malla de 45 µm para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

Elaboración de prototipos

Con el principio activo (conidios secos) se elaboraron dos prototipos de biopla-

guicida siguiendo metodologías estandarizadas previamente en el laboratorio. Los sistemas de entrega diseñados para el bioplaguicida consistieron en un concentrado emulsionable y en un gránulo dispersable.

Caracterización de los prototipos

Viabilidad. Para evaluar la viabilidad se utilizó la técnica de recuento en placa, para lo cual se tomó 0.1 g de cada prototipo y se llevó a un volumen de 10 ml con solución de Tween 80 al 0,1%. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas sembrando las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ por triplicado en cajas de Petri con medio YM y se incubaron por 96 horas a 25°C, tiempo en el cual se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), expresando los resultados como UFC.g⁻¹.

Germinación. Esta prueba permite calcular el número de conidios viables por unidad de volumen o peso en 24 h. Se tomó 0,1 g de cada tratamiento y se llevó a un volumen de 10 ml con Tween 80 al 0,1%. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones 10⁻² y 10⁻³ sembrándolas en cajas de Petri con medio YM. Transcurrido el tiempo de incubación (24 h), se agregó una gota de azul de lactofenol con el propósito de teñir los conidios del hongo. En el microscopio con un aumento de 40X, se realizó la lectura del número de conidios totales (germinados y no germinados) en 10 campos ópticos seleccionados aleatoriamente, expresando los resultados como porcentaje de conidios germinados.

Concentración. La cuantificación de la concentración de conidios permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen (Vélez *et al.* 1997). Se tomó 0,1 g de cada prototipo y se adicionó a un volumen de 500 ml de agua, esta suspensión se agitó vigorosamente y se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer, expresando los resultados en conidios por gramo.

Bioensayo

Para la determinación de la actividad biocontroladora de los preformulados, se llevó a cabo un bioensayo bajo condiciones de laboratorio. Para tal fin, se evaluaron diferentes tratamientos que consistieron en cada prototipo (gránulo dispersable y concentrado emulsionable), los excipientes de los dos prototipos, el principio activo (conidios secos), y conidios frescos provenientes de cultivo en caja de Petri. Con cada tratamiento se preparó una suspensión en una solución de Tween 80 (0,1%) y se realizaron diluciones seriadas, las cuales se ajustaron a una concentración de 1x10⁶ conidios.ml⁻¹. Se asperjaron 0,4 ml de cada tratamiento sobre una hoja de higuera (*Ricinus communis*) y luego cada hoja se infestó con dos larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, provenientes de una cría establecida previamente. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con treinta repeticiones por tratamiento y

se utilizó un testigo tratado al cual se le aplicó una solución de Tween 80 (0,1%). Las lecturas de mortalidad se realizaron cada 24 h durante dieciséis días. Los resultados de mortalidad se corrigieron con la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba-Geigy 1973).

Análisis estadístico. Para todos los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones para los ensayos de producción masiva y 30 repeticiones para el bioensayo. Para los estudios de producción masiva, la unidad experimental fue una bandeja o una bolsa y para los bioensayos, la unidad experimental consistió en cada recipiente con una hoja de higuera y dos larvas de *S. frugiperda*. Todos los resultados se sometieron a un análisis estadístico en el programa Statistix, mediante el cual se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con una significancia de 0,05.

Resultados y Discusión

Medios de producción masiva. En la producción de *N. rileyi* realizada en bandejas con salvado de trigo humedecido con cada uno de los hidrolizados proteicos (solución de malta e hidrolizados de levadura y soya), se inocularon 10 ml de suspensión de conidios, observándose crecimiento micelial cinco días después de realizarse la inoculación. El micelio en todos los casos fue blanco y algodonoso y cubrió toda la superficie de la matriz sólida pasados siete días, tiempo después del cual el hongo empezó a esporular produciendo una coloración verde claro en la superficie de la matriz; posteriormente el cultivo tomó un aspecto polvoso y seco en todos los tratamientos. Al décimo día de incubación, el medio estaba totalmente colonizado, con una abundante producción y desprendimiento de conidios.

En los tratamientos inoculados con 10 ml de precultivo líquido, se observó micelio blanco 24 h después de haberse realizado la inoculación y 48 h después se inició la esporulación de color verde claro por toda la matriz sólida. Pasados siete días de incubación, los tratamientos presentaron hiperparasitismo, efecto que no se observó en los tratamientos en los que la inoculación se realizó con suspensión de conidios. Este hiperparasitismo posiblemente se debió a que al inocular el medio con precultivo líquido, la concentración de propágulos es mayor que en la suspensión, lo que favoreció una rápida colonización e iniciación de la esporulación y causó el agotamiento de los nutrientes del medio; sin embargo, al encontrarse el hongo dentro de un sistema con una elevada humedad relativa, los conidios producidos probablemente germinaron y produjeron micelio sobre la capa esporógena generada, por tal razón se recomienda para este tratamiento un tiempo total de crecimiento no mayor a siete días de incubación.

Cuando la matriz sólida se inoculó con suspensión de conidios, el inicio del desa-

rrollo micelial tomó más tiempo que cuando se utilizó como inóculo el precultivo líquido, esto posiblemente se debió a que los conidios de la suspensión requieren un periodo de adaptación al medio de cultivo, mientras que al inocular con precultivo líquido el hongo se encuentra en crecimiento activo que se expresa como pellets de micelio en el medio líquido y al pasarlo al medio sólido, coloniza fácilmente, iniciando rápidamente la conidiación sobre la matriz sólida.

El rendimiento expresado como conidios producidos por gramo de medio de cultivo esporulado para cada sistema de inoculación fue: para el precultivo líquido $1,7 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ con el hidrolizado de soya, $1,1 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ con el hidrolizado de levadura y $2,1 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ con la solución de malta, mientras que para la inoculación con suspensión de conidios se obtuvieron $1,2 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ con el hidrolizado de soya, $8,9 \times 10^8$ conidios.g⁻¹ con el hidrolizado de levadura y $1,4 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ con el refresco de malta (Fig. 1).

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, con un $\alpha=0,02$, no detectó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para la producción masiva en bandejas. Las diferentes fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas no tuvieron un efecto determinante en el rendimiento de conidios.g⁻¹, así como tampoco lo tuvieron los dos sistemas de inoculación evaluados (precultivo líquido y suspensión de conidios). Sin embargo, como se observa en la figura 1, el tratamiento consistente en bandejas con salvado de trigo humedecido con solución de malta e inoculadas con precultivo líquido, presentó el mayor rendimiento ($2,1 \times 10^9$ conidios.g⁻¹), por lo cual sería el sistema de multiplicación masiva más adecuado para la producción de conidios de *N. rileyi* en bandeja. No obstante, la inoculación con precultivo líquido es un proceso que aumenta los costos de producción, ya que se requiere de un tiempo de incubación total de 14 días a partir del cultivo en caja de Petri (siete días para crecer el precultivo en medio líquido y 7 días para el crecimiento en bandeja), incrementando el consumo de energía, materiales y reactivos; mientras que cuando la inoculación se realiza con suspensión de conidios a partir de caja de Petri, sólo se requieren 10 días de cultivo después de la inoculación de las bandejas y la producción de conidios no fue significativamente diferente de la obtenida con precultivo, requiriendo menos tiempo de incubación y resultando en consecuencia más económico. Además, el hecho de utilizar un sistema bifásico de producción, implica mayor manipulación y por lo tanto mayor riesgo de contaminación, como lo señalaron Gómez y Villamizar en 1996, quienes evaluaron la multiplicación de *Metarhizium anisopliae* en un sistema de producción en dos fases, la primera consistente en un medio líquido de levadura-sacarosa inoculado directamente con suspensión de conidios y la se-

gunda en granos de arroz precocidos, obteniendo una producción de $4,3 \times 10^8$ conidios.g⁻¹ de arroz esporulado y 3×10^9 conidios.g⁻¹ de arroz esporulado al inocular con precultivo y con suspensión de conidios respectivamente; en este trabajo se seleccionó el sistema de inoculación directa con suspensión de conidios como el más adecuado, ya que la producción en dos fases aumentó el tiempo de incubación, propició una contaminación alta de las unidades experimentales y una mayor producción de micelio, con menor rendimiento de conidios por gramo de arroz que cuando se inoculó con suspensión. Por tal razón, para este estudio se seleccionó como sistema de inoculación la suspensión de conidios provenientes de un cultivo en caja de Petri en medio YM durante 15 días, ya que la producción obtenida no presentó diferencias significativas con respecto a la determinada cuando se inoculó con precultivo y además porque este proceso reduce tiempo, energía, materiales y riesgos de contaminación. El rendimiento mayor utilizando este tipo de inoculación se observó cuando el salvado se suplementó con refresco de malta, siendo éste de $1,4 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ de salvado esporulado, seleccionándose este medio para la producción en bandeja. La producción en bandejas con salvado se ha utilizado eficientemente para otros hongos, mostrando rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo para *N. rileyi*, como lo indicó Castillo en el 2000, quien realizó la producción masiva de potenciales hongos antagonistas del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* en un medio de salvado de trigo suplementado con arroz y obtuvo rendimientos de $2,9 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ para *Trichoderma* sp., de $4,8 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ para *Beauveria* sp., de $3,9 \times 10^8$ conidios.g⁻¹ para *Aspergillus* sp.,

de $1,1 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ para *Clonostachys rosea* y de 1×10^9 conidios.g⁻¹ para *Gliocladium virens*, considerando este medio de bajo costo, fácil preparación y adecuado para la producción de conidios de estos hongos.

En el sistema de producción de conidios de *N. rileyi* en bolsas con arroz o millo suplementado con los hidrolizados de proteína, se evaluaron tres métodos de inoculación: precultivo líquido, discos de medio YM esporulado y suspensión de conidios. En todos los casos se evidenció la colonización del sustrato por la presencia de micelio blanco en la superficie de los granos, a partir del séptimo día se observó una coloración verde claro como signo de esporulación, la cual se tornó intensa y homogénea en todas las bolsas (Fig. 2). La producción en bolsas plásticas es de fácil manejo, permite el traslado fácil de las unidades de producción (bolsas), de un lugar a otro y la diseminación rápida del inóculo. Métodos similares de producción masiva sobre granos de cereales en bolsas, han sido indicados para el hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* por Aregger (1992), quien obtuvo $3,24 \times 10^6$ conidios.g⁻¹ de cebada después de 14 días de incubación, 1×10^8 conidios.g⁻¹ a los 24 días y 2×10^9 conidios.g⁻¹ después de 42 días de incubación; Gómez y Villamizar (1996) produjeron conidios de *M. anisopliae* y *M. flavoridiae* en bolsas con arroz precocido estéril y obtuvieron rendimientos de 1×10^{11} conidios.g⁻¹ de medio esporulado para las dos especies; igualmente Winder (1999) produjo *Fusarium avenaceum* en un medio consistente en granos de trigo suplementado con extracto de malta, con un rendimiento de 1×10^9 conidios.g⁻¹.

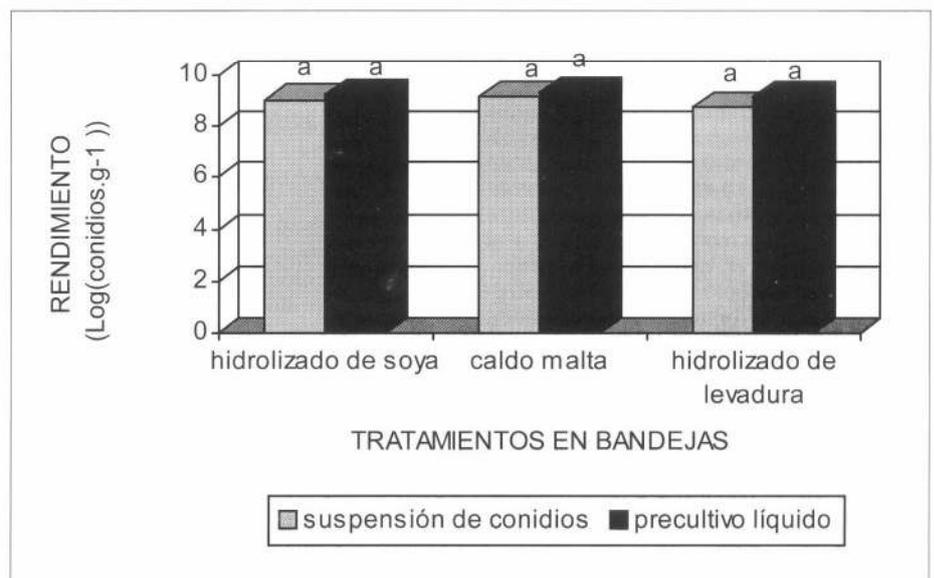


Figura 1. Producción de conidios del hongo *Nomuraea rileyi* crecido en bandejas con salvado de trigo. Resultados con la misma letra no presentan diferencias significativas según una prueba de Tukey con una significancia del 0,05%.

El rendimiento de *N. rileyi* en conidios por gramo de arroz esporulado obtenidos en el presente estudio con cada tratamiento evaluado fue: con el hidrolizado de soya de $6,5 \times 10^8$ conidios. g^{-1} ; con el hidrolizado de levadura de $9,7 \times 10^8$ conidios. g^{-1} y con la solución de malta de $3,7 \times 10^8$ conidios. g^{-1} . La producción de conidios de *N. rileyi* por gramo de millo esporulado obtenidos en el presente estudio con cada tratamiento evaluado fue: con el hidrolizado de soya de $5,5 \times 10^8$ conidios. g^{-1} ; con el hidrolizado de levadura de $1,9 \times 10^9$ conidios. g^{-1} y con el refresco de malta de $1,1 \times 10^8$ conidios. g^{-1} .

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un $\alpha=0,02$, no detectó diferencias significativas entre los tratamientos en que se utilizó como matriz sólida arroz y se varió la fuente de nitrógeno orgánico, sugiriendo que los hidrolizados de proteína evaluados tuvieron similar efecto sobre la producción de conidios cuando se realizó el cultivo en este sustrato. La producción en millo en todos los casos fue superior y significativamente diferente de la obtenida en arroz, sugiriendo que el millo es más eficiente desde el punto de vista nutricional para la esporulación de *N. rileyi* que el arroz, posiblemente debido a que este sustrato presenta una cutícula que dificulta la disponibilidad de nutrientes, mientras que en el arroz, los carbohidratos están muy disponibles, favoreciendo el crecimiento vegetativo por exceso de fuente de carbono y desfavoreciendo la conidiación, la cual se estimula cuando la fuente de carbono está en concentraciones bajas (Galbraith y Smith 1969).

Dentro de los diferentes tratamientos en los cuales se utilizó como matriz sólida el millo, el análisis estadístico detectó diferencias significativas entre la utilización del hidrolizado de levadura y las dos fuentes de nitrógeno restantes, siendo el hidrolizado de levadura el que produjo el mayor y estadísticamente significativo rendimiento de conidios por gramo de sustrato. La mayor producción de conidios con esta fuente de nitrógeno se podría deber a que la levadura no sólo es una fuente de nitrógeno sino que contiene una gran cantidad de nutrientes como microelementos y vitaminas como las del complejo B, para los cuales se ha demostrado su efecto inductor de la esporulación (Villamizar 1998).

Silva y Loch (1987) produjeron *N. rileyi* en granos de arroz suplementados con extracto de levadura; sin embargo, el crecimiento del hongo en este medio fue muy pobre. El crecimiento micelial se obtuvo solamente siete días después de la inoculación y una esporulación reducida se observó a los 15 días de incubación, el rendimiento final fue de $6,65 \times 10^6$ conidios. g^{-1} de arroz, resultado inferior al obtenido en este estudio en el cual se alcanzaron rendimientos superiores a 1×10^8 conidios. g^{-1} de arroz; es decir, aproximadamente 100 veces más conidios que los obtenidos por los mencionados auto-

res. Esta producción mayor podría deberse a diferencias intrínsecas de las cepas de *N. rileyi*, a la fuente de nitrógeno utilizada, o a diferencias en los niveles de humedad de los granos de arroz que en el presente trabajo pudieron favorecer la esporulación del hongo. Los hidrolizados proteicos y las matrices sólidas utilizadas en este trabajo son una alternativa promisoría para la producción masiva de conidios de *N. rileyi*, ya que en todos los casos, se obtuvo un buen crecimiento micelial con altos rendimientos de conidios. Los componentes usados para los medios de cultivo son fáciles de conseguir y su costo bajo, lo cual podría hacer a estos medios adecuados para una producción a nivel industrial.

A pesar de que el rendimiento en conidios por gramo de sustrato fue mayor en el mejor tratamiento en bandejas con respecto al mejor tratamiento obtenido en bolsas, la separación de conidios a partir del salvado utilizado para las bandejas fue más dispendiosa y poco práctica para ser utilizada a nivel industrial, por tal razón se seleccionó la producción en millo para continuar con los estudios de preformulación. La separación de conidios a partir de los granos de millo fue muy sencilla y no se

observaron pérdidas significativas ya que la superficie del grano quedó totalmente limpia.

Caracterización de los prototipos de bioplaguicida. Se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicida diferentes a base de *N. rileyi*, los cuales consistieron en un concentrado emulsionable y en un granulado dispersable. Estos fueron caracterizados por medio de pruebas de viabilidad, germinación, humedad y concentración (Tabla 1).

Los resultados de concentración obtenidos para los dos prototipos fueron de $1,2 \times 10^9$ conidios. g^{-1} para el gránulo dispersable y de $8,1 \times 10^8$ conidios. g^{-1} para el concentrado emulsionable, resultados que no fueron estadísticamente diferentes entre sí. Estas concentraciones se consideran adecuadas para este tipo de productos y son las comúnmente encontradas en los productos comerciales a base de hongos entomopatógenos. Para la reconstitución de los productos se recomendaría una relación de 1 kg en 200 l de agua, que serán utilizados por hectárea, siendo esta cantidad adecuada y similar a la utilizada con plaguicidas químicos, lo que no cambiaría drásticamente las costumbres del agricultor.

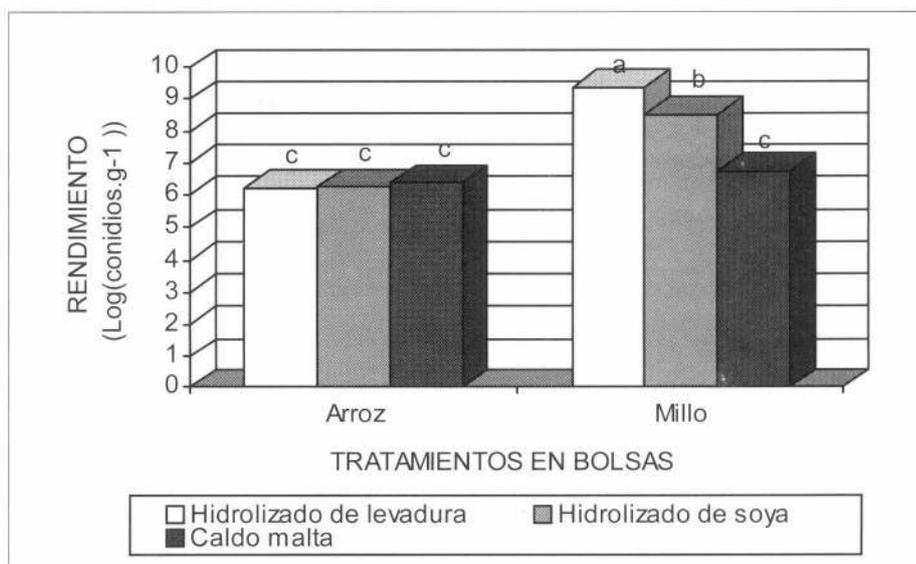


Figura 2. Producción de conidios del hongo *Nomuraea rileyi* crecido en bolsas con arroz. Resultados con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey con una significancia del 0,05%.

Tabla 1. Caracterización de los preformulados a base de *Nomuraea rileyi*. Resultados con la misma letra no presentan diferencias significativas según una prueba de Tukey con una significancia del 0,05%

Preformulado	Gránulo Dispersable	Concentrado Emulsionable
Concentración (Conidios. g^{-1})	$1,2 \times 10^9$ a	$8,1 \times 10^8$ a
Viabilidad (UFC. g^{-1})	1×10^9 a	$7,6 \times 10^8$ a
Germinación (%) (18h)	68 b	91,2 a
Humedad (%)	9,0 a	6,8 a

En estos prototipos, se obtuvo una viabilidad de 1×10^9 UFC.g⁻¹ para el gránulo dispersable y de $7,6 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ para el concentrado emulsionable, no siendo estos resultados significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey. Al comparar estos resultados con los obtenidos en concentración, se podría pensar que la mayoría de los propágulos contados al microscopio están viables y que los excipientes o el proceso de formulación no afectó significativamente la viabilidad de las células.

Para la prueba de porcentaje de germinación se observó que el gránulo dispersable presentó una germinación significativamente inferior a la del concentrado emulsionable, siendo ésta del 68% para el gránulo dispersable mientras que para el concentrado emulsionable, la germinación fue del 91,2%. Estas diferencias en germinación pudieron deberse al proceso de formulación ya que para la elaboración del granulado dispersable, las esporas se ven sometidas a dos operaciones de secado, mientras que para el otro formulado sólo se realiza un secado. Este doble secado pudo haber afectado drásticamente a las células, dicho proceso es uno de los más limitantes en la estabilidad de los microorganismos ya que puede producir pérdida de agua intracelular, cambios enzimáticos, genéticos y daño de la membrana celular (Bahamón *et al.* 2001).

Los valores de humedad determinados para los prototipos fueron de 9,8 y 6,3% para el gránulo y el concentrado emulsionable respectivamente, valores que se encuentran dentro del límite establecido como aceptable para productos de este tipo, el cual debe ser inferior al 10%

(Mariño 2001). Sin embargo, en el proceso de formulación podría optimizarse el secado para lograr humedades inferiores al 5% que garanticen mayor estabilidad del microorganismo bajo condiciones de almacenamiento.

En la determinación de la actividad biocontroladora de los diferentes prototipos, se obtuvieron cuatro grupos que presentaron diferencias estadísticas. El primero, el cual produjo los porcentajes mayores de mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, estuvo conformado por los conidios puros tanto provenientes de caja de Petri como el principio activo de los formulados consistente en conidios puros y secos provenientes del cultivo en millo, con mortalidades acumuladas de 87,1 y 82% respectivamente. El segundo grupo significativo consistió en el concentrado emulsionable, el cual causó una mortalidad del 64%, seguida por el tercer grupo estadístico consistente en el gránulo dispersable que produjo una mortalidad del 30,7% y por último, los excipientes y los testigos que causaron mortalidades inferiores al 10% (Fig. 3).

Estos resultados indican que las dos formulaciones afectaron la actividad biocontroladora del microorganismo, obteniéndose porcentajes de mortalidad significativamente inferiores con los prototipos en comparación con los conidios sin formular, lo cual se puede deber a las operaciones de cada proceso o a alguno de los adyuvantes de formulación que podrían afectar las células o interferir en el proceso de infección. También se observaron diferencias estadísticas entre los dos formulados, siendo más eficiente el concentrado emulsionable que el gránulo dispersable.

Esto se podría relacionar con los resultados de germinación, ya que como se mencionó anteriormente, los conidios presentes en el gránulo dispersable tienen una germinación inferior a la del concentrado emulsionable, siendo éste uno de los parámetros fundamentales en el mecanismo de acción (Clarkson y Charnley 1996), que pudo repercutir en la actividad biocontroladora baja del producto.

Para los dos prototipos, los excipientes o adyuvantes no causaron ningún efecto negativo sobre las larvas del gusano cogollero del maíz, indicando que el efecto biocontrolador de los prototipos se debe a la acción del hongo entomopatógeno.

El concentrado emulsionable se seleccionó para continuar con los estudios de formulación, en los cuales se buscará la causa de la disminución de la actividad biocontroladora en los productos formulados, se ajustará la composición de los prototipos y se optimizarán las operaciones del proceso para lograr una mayor eficiencia biocontroladora.

Conclusiones

- El método de inoculación para el sistema de producción en bandeja mediante el uso de una suspensión de conidios fue el más adecuado.
- La producción masiva sobre las matrices sólidas salvado de trigo suplementado con malta e inoculado con suspensión de conidios en bandejas y los granos de millo suplementados con el hidrolizado de levadura e inoculados con discos de agar YM crecidos con el hongo durante 15 días en bolsa fueron seleccionados como los sistemas más eficientes para la producción de conidios de *N. rileyi*.
- Las dos formulaciones afectaron negativamente la actividad biocontroladora del microorganismo.
- El concentrado emulsionable fue el prototipo más adecuado para continuar con los estudios de formulación y optimización.

Literatura citada

- AREGGER, E. 1992. Conidia production of the fungus *Beauveria brogniartii* on barley and quality evaluation during storage at 2°C. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 2-10.
- BAHAMÓN, T.; AYCARDI, E.; OROZCO, P.; MARÍN, P.; BUSTILLO, A. 2001. Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3 (1): 80-90.
- BARBERA, C. 1976. Pesticidas agrícolas. Capítulo 1-2, Ed. Ediciones Omega, S. A. p. 9-46.
- BOUCIAS, D. G.; TIGANO, M. S.; SOSA-GOMEZ, D. R.; GLARE, T. R.; INGLIS, P. W. 2000. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Biological Control* 19: 124-138.

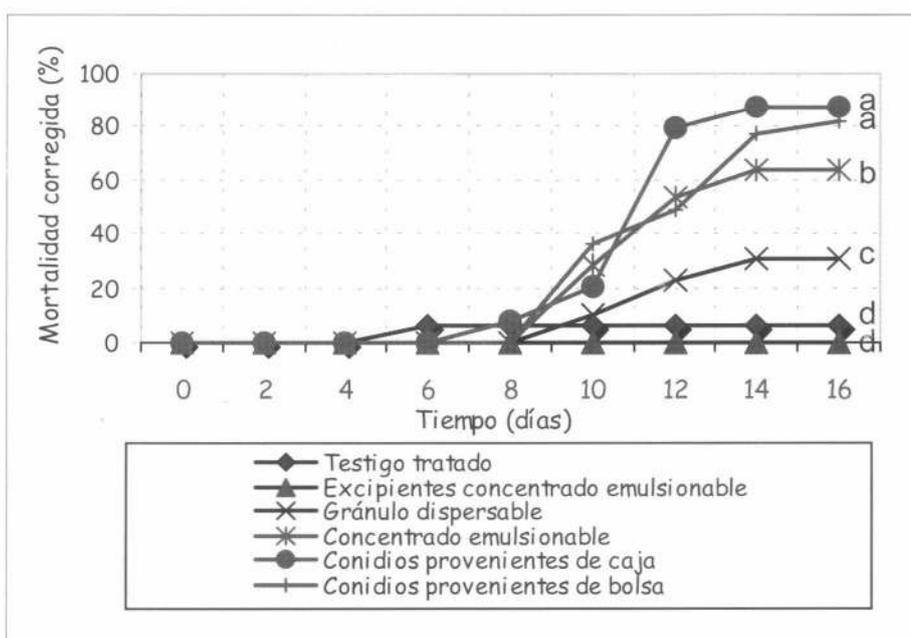


Figura 3. Actividad biocontroladora de los preformulados a base de *Nomuraea rileyi*. Resultados con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey con una significancia del 0,05%.

- CASTILLO, N. 2000. Aislamiento, identificación y selección de potenciales hongos antagonistas al hongo *Sclerotium cepivorum* Berk causante de la pudrición blanca de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). Tunja, Colombia. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Agronomía. 143 p.
- CIBA - GEIGY. 1973. Como realizar un bioensayo. Manual de ensayos de campo, p. 2-10.
- CLARKSON, J.; CHARNLEY, K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology 4 (5): 197-202.
- DÍAZ, A.; FORERO, M. 1997. Producción y purificación del complejo espora cristal de *Bacillus thuringiensis* HD 157 con actividad contra *Spodoptera frugiperda*. Bogotá, Colombia. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 161 p.
- GALBRAITH, J.; SMITH, J. 1969. Sporulation of *Aspergillus niger* in liquid culture. Journal of General Microbiology. Gran Bretaña 59: 31-45.
- GARCÍA R., F. 1996. Integración de métodos para el manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) p. 59-64. En: Manejo integrado de plagas y enfermedades en maíz y sorgo. Boletín de sanidad vegetal 13. ICA Ed. Produmedios. Palmira.
- GARCÍA, F. 2000. Manejo integrado del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. En: Corpoica-MIP. I Curso-Taller Internacional Control Biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Bogotá, Colombia. A. López-Avila (ed.), p. 146-154.
- GARCÍA R., F.; MOSQUERA, A. T.; VARGAS S., C. A.; ROJAS A., L. 1999. Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Boletín informativo Convenio Corpoica-PRONATTA. Palmira. Mayo. 19 p.
- GÓMEZ A., M. I.; VILLAMIZAR R., L. F. 1996. Estudio tecnológico para la producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp. para el control biológico de la langosta de los llanos orientales. Bogotá. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 112 p.
- GÓMEZ, M. I.; VILLAMIZAR, L. F. 2000. Formulación de bioplaguicidas. En: Corpoica-MIP. I Curso-Taller Internacional Control Biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Bogotá, Colombia. Editor A. López-Avila. p.108-112.
- IGNOFFO, C. M.; GARCÍA, C.; KAPP, R.W.; COATE, W. B. 1979. An evaluation of the risks to mammals of the use of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as microbial insecticide. Environmental Entomology 8 (2): 354-359.
- LEÓN M., G. A.; PULIDO, J. I. 1991. Importancia del control natural del cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith p. 78-82. En: Memorias seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Cali, Colombia.
- MARIÑO C., P. F. 2001. Caracterización y evaluación de la estabilidad biocontroladora y microbiológica de preformulados granulados a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de la chiza *Ancognatha scarabaeoides*. Bogotá. Trabajo de grado (Microbiología Industrial) Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 126 p.
- MORALES, L. 1993. Formulación de bioinsecticidas, biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 85-89.
- SILVA, L.; LOCH, L. 1987. Esporulação do fungo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meio de cultura à base a grãos de arroz polidos. An. Soc. Entomol. Brasil 16 (1): 213-222.
- VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, F.; GONZÁLEZ, G. M.; OSORIO, V. E.; BUSTILLO, A. E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No 17. Cenicafé. Chinchiná, caldas, Colombia. p. 7-25.
- VILLAMIZAR, L.F. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Bogotá. Tesis (M. Sc. Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. 112 p.
- WINDER, R. S. 1999. The influence of substrate and temperatura on the sporulation of *Fusarium avenaceum* and its virulence on marsh reed grass. Mycological Research 103 (9): 1145-1151.

Recibido: Abr. 22/2003

Aceptado: Ago. 11/2003

Evaluación de la eficiencia de *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el control de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada

Evaluation of the efficiency of *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to control *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in storage potato

SILVIA ALEJANDRA RUBIO C.¹, BLANCA IRENE VARGAS A.², ARISTÓBULO LÓPEZ-ÁVILA³

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 107-114 (2004)

Resumen. Se evaluó la eficiencia del parasitoide *Trichogramma lopezandinensis* Sarmiento en el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny) en papa almacenada. Se llevaron a cabo cuatro experimentos para determinar aspectos biológicos de la interacción en tres niveles tróficos constituidos por la papa almacenada, la plaga y el parasitoide. Estos experimentos comprendieron el diseño de un dispositivo de liberación del parasitoide, la determinación de las densidades y frecuencias de liberación para prevenir el daño de la plaga y el efecto de la luz en la actividad parasítica de la avispa. El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tibaitatá, en el programa MIP de Corpoica y se desarrolló bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luminosidad. La unidad experimental consistió en una jaula de madera con paredes de muselina, dentro de la cual se introdujo una bandeja con 100 tubérculos con un peso promedio de 100 g cada uno. Se diseñó e implementó un dispositivo eficiente de liberación del parasitoide en condiciones de almacenamiento al que se denominó "tipo túnel". Se determinó que la luz es un factor importante en la actividad parasítica de la avispa presentándose los mayores porcentajes de parasitismo con luminosidad normal en laboratorio comparada con completa oscuridad. En los experimentos de densidades y frecuencias de liberación del parasitoide se concluyó que la frecuencia es un factor significativo en la prevención del daño causado por la plaga. La frecuencia de liberación cada tres días presentó los mejores resultados, indicando que la presencia continua de hembras jóvenes es determinante para lograr un parasitismo mayor.

Palabras clave: Densidades. Frecuencias. Liberación. Luminosidad.

Summary. The efficiency of the parasitoid *Trichogramma lopezandinensis* Sarmiento to control the Guatemalan potato tuber moth *Tecia solanivora* (Povolny) in stored potato was evaluated. Four experiments were carried out to determine biological aspects of their interaction at three trophic levels constituting the stored potato, the pest and the parasitoid. These experiments included the design of a device to release the parasitoid, determination of the densities and frequencies of parasitoid release required to prevent damage of the pest and effect of light on the parasitic activity of the wasp. The study was conducted at the Research Center Tibaitatá, in the IPM program of Corpoica, and was conducted under controlled conditions of temperature, humidity and light. The experimental unit consisted of a wooden cage with muslin walls, in which a tray was introduced with 100 tubers, of an average 100 g each. An efficient device to release the parasitoid in storage conditions was designed and implemented which was denominated the "tunnel type". It was found that light conditions are an important factor in the parasitic activity of the wasp, presenting the highest percentages of parasitism under normal light conditions in the laboratory compared to complete darkness. In the experiments of densities and frequencies of parasitoid release, it was found that frequency is a significant factor in preventing of damage caused by the pest. Frequency of release every three days showed the best results, indicating that the continuous presence of young females is critical for achieving better parasitism.

Key words: Densities. Frequencies. Release. Light.

Introducción

Una de las plagas de mayor importancia económica en el cultivo de la papa y que afecta de forma directa la calidad del tubérculo es "la polilla guatemalteca de la papa", *Tecia solanivora* (Povolny). Esta plaga es originaria de Centro América y fue

introducida a Sur América en una importación de semilla hecha por Venezuela desde Costa Rica en 1983 (Salazar y Escalante 1984).

La polilla guatemalteca ha cobrado gran importancia debido a la severidad de su ataque, que ocasiona grandes pérdidas

económicas en las áreas que invade. Así por ejemplo, en Norte de Santander las pérdidas en campo y almacén superaron el 50% en 1986. En Boyacá y Cundinamarca las pérdidas iniciales se calcularon hasta en 80% en campo para el año 1994. En el municipio de Ventaquemada el registro en la vereda el Hato, indicó que

1 Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Parte del Trabajo de Grado. E-mail: srubio_castro@hotmail.com
2 Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Parte del Trabajo de Grado. E-mail: bivargas@yahoo.com.mx
3 Autor para correspondencia: I. A. Ph. D. Investigador Programa Nacional MIP Corpoica, C. I. Tibaitatá. A. A. 240142 Bogotá. E-mail: alopez@corpoica.org.co

la plaga arrasó con lotes en los cuales hasta el 90% de la papa de la cosecha de mitaca fue atacada. En 1996, se calculó que 540 toneladas de papa fueron consumidas por la plaga en sitios de almacenamiento y más de 2.000 toneladas en los lotes del cultivo para el altiplano cundiboyacense (Espitia 1999).

La producción de papa en Colombia reúne una serie de prácticas de cultivo que difieren de una región a otra en el país, siendo la poscosecha, o almacenamiento, una de las prácticas en donde existe probablemente la mayor variación a nivel nacional. La forma tradicional de almacenamiento es en bultos, a granel o en cajas de madera guardados en cuartos oscuros, pequeñas bodegas o en ramadas protegidas de la lluvia (Porras 1999).

Estos lugares generalmente son inapropiados por que las condiciones de humedad, temperatura y luminosidad favorecen la llegada y permanencia de la plaga en el sitio de almacenamiento. Esto, a su vez, genera una gama amplia de problemas que se deben abordar teniendo en cuenta el factor humano de cada región (Porras 1999).

El control biológico es considerado como una estrategia dentro de los programas de manejo integrado de plagas, el cual puede proveer un control adecuado de éstas dentro de conceptos más recientes de la agricultura sostenible, siendo las liberaciones de parasitoides, especialmente *Trichogramma* spp. de suma importancia, principalmente por su inocuidad y su economía (López-Ávila 1998).

Una nueva especie de avispa del género *Trichogramma* se encontró y describió a comienzos de los años 90, como parasitoide de huevos sobre la mariposa *Colias dimera* (Lepidoptera: Pieridae) en los Andes colombianos a 2.850 msnm y una temperatura promedio de 12 °C. Esta especie se nombró como *Trichogramma lopezandinensis* (Sarmiento 1995) y se adelantaron algunos estudios preliminares sobre su biología y potencial para el control biológico de la "palomilla de la papa" *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) especie que ha constituido una de las plagas más importantes del cultivo de la papa en el país, tanto en campo como en almacenamiento desde 1978 (López-Ávila 2001).

Ante la importancia adquirida por la "polilla guatemalteca" como plaga del cultivo de la papa y las perspectivas promisorias brindadas por la nueva especie de *Trichogramma*, a finales de los años 90, Rincón (1999) adelantó estudios básicos sobre la biología del parasitoide, orientados al control de dicha plaga. En dicho estudio, se concluyó que *T. lopezandinensis* podría ser utilizado eficazmente en el control de la polilla guatemalteca, dada su afinidad con este huésped, su adaptación evolutiva a las condiciones agroecológicas de la zona papera y sus características bio-

lógicas intrínsecas. Para utilizar este parasitoide de manera eficaz se requiere adelantar estudios detallados de su comportamiento como controlador en condiciones de campo y almacenamiento de papa, con el fin de estimar parámetros como: preferencia por el hospedero *Tecia solanivora*, eficiencia de búsqueda del parasitoide en dichas condiciones, densidades y frecuencias de liberación en una estrategia de control y requisitos específicos para su cría y producción masiva (Rincón 1999).

Con el propósito de contribuir al conocimiento de estos aspectos básicos del comportamiento del parasitoide y generar tecnologías para su utilización en el control de la polilla guatemalteca en condiciones de almacenamiento se llevó a cabo la presente investigación con los objetivos específicos de: evaluar la eficiencia de las liberaciones del parasitoide en el control *T. solanivora* en condiciones controladas de almacenamiento; determinar la metodología para realizar las liberaciones del parasitoide bajo estas condiciones; y dar recomendaciones para el uso del parasitoide como controlador biológico dentro de la estrategia MIP en papa almacenada.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de entomología del Programa Nacional de Manejo Integrado de plagas en el Centro de Investigación "Tibaitatá" de Corpoica, localizado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca), con una altitud de 2.550 msnm. Los experimentos se realizaron en condiciones ambientales controladas, con temperatura promedio de 18°C ± 3, humedad relativa del 60% ± 5 y bajo diferentes condiciones de luz de acuerdo con los experimentos.

El material biológico tanto de la plaga como del parasitoide utilizado en los diferentes experimentos se obtuvo de las unidades de cría establecidas en el laboratorio de entomología, en donde se producen las cantidades que se requieren de los insectos mediante metodologías estandarizadas y utilizadas en el laboratorio.

En todos los experimentos las liberaciones del parasitoide se realizaron colocando cartulinas con huevos de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) parasitados por *T. lopezandinensis*. Una pulgada cuadrada parasitada tiene aproximadamente 3.350 huevos de *S. cerealella*, que con un porcentaje de parasitismo del 60 % produce en promedio 2.000 avispas, de las cuales 1.000 son hembras y 1.000 machos.

Evaluación de dispositivos de liberación del parasitoide de huevos *Trichogramma lopezandinensis* en papa almacenada

Se diseñaron dos dispositivos en los que se pudieran depositar huevos de *Sitotroga cerealella* parasitados, que garantizaran una óptima emergencia de los adultos del parasitoide, y a la vez protegiera los huevos de posibles ataques de enemigos naturales como chinches, cucarachas o arañas e incluso roedores, frecuentes en los lugares de almacenamiento.

El dispositivo "tipo túnel", consistió en un tubo de PVC (policloruro de vinilo) de 15 cm de largo y 4 cm (1 ½ pulg) de diámetro, al cual se le realizaron perforaciones con una broca de 5 mm (3/16). Se hicieron seis líneas de orificios distribuidas uniformemente alrededor del tubo, espaciadas 2,54 cm (1 pulg). Dentro del tubo se introdujo un alambre hasta el punto medio con un soporte para colocar la cartulina con los huevos parasitados (Fig. 1). El dispositivo "tipo colgante" consistió en un alambre de cobre con un soporte para colocar la cartulina con los huevos parasitados, el alambre estaba sostenido de una chupa de goma adherida al centro del vidrio de la parte superior de la jaula, la plataforma de liberación del dispositivo quedaba justo en contacto con la parte superior del arrume de papa (Fig. 2).

La unidad experimental utilizada consistió en una jaula de madera de 50 cm x 50 cm x 63 cm de alto, con tres paredes de muselina, la puerta y la parte superior en vidrio. Dentro de la jaula se introdujo una bandeja plástica de 40 x 30 cm, a la cual se le colocó una capa de arena de 5 mm de

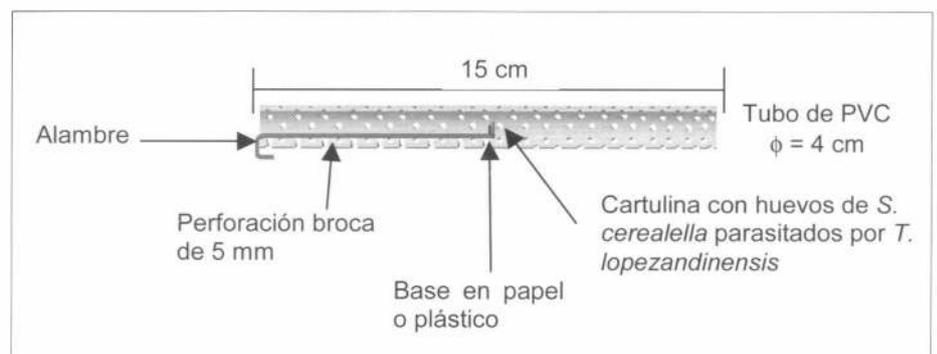


Figura 1. Dispositivo "tipo túnel". Tubo de PVC perforado y alambre para la introducción y liberación del parasitoide.

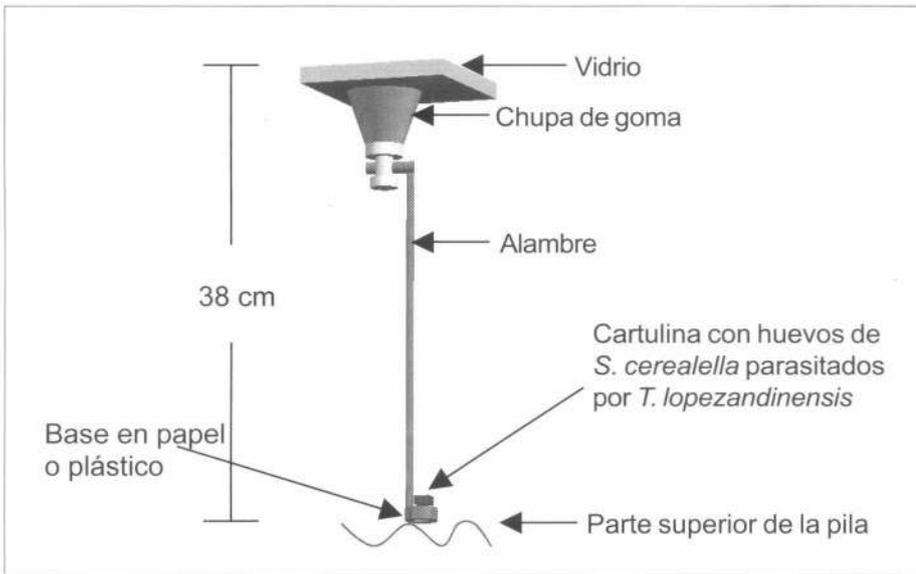


Figura 2. Dispositivo "tipo colgante". Chupa de goma y alambre para introducción y liberación del parasitoide.

espesor. Sobre la arena se ubicó un arrume de 100 tubérculos, cada tubérculo con un peso promedio de 100 g (Fig. 3).

Para evaluar la eficacia de los dispositivos se utilizaron dos unidades experimentales como la descrita anteriormente. En este experimento se colocaron indistintamente, en tres estratos (alto 3 – 5 cm, medio 10 – 12 cm y bajo 3 – 5 cm), tanto en la parte superficial como en el centro del montón, un promedio de 15 huevos de *T. solanivora* de un día de ovipositados en los mismos papeles en los que se obtienen las posturas en la cría. Cada papel se fijó con un alfiler enterrado completamente en el tubérculo. En cada dispositivo se liberaron 1.000 hembras de *T. lopezandinensis*.

Ocho días después de colocadas las posturas y liberado el parasitoide se procedió a la evaluación, que consistió en retirar, de cada tubérculo, los papeles con las posturas, para cada papel se determinó el número de huevos parasitados del

total de huevos teniendo en cuenta su ubicación en la pila de tubérculos de papa.

Prueba del efecto de la luz sobre la actividad parasítica de la avispa

Dado que el comportamiento parasítico de *T. lopezandinensis* puede ser afectado al ser liberado en papa almacenada bajo condiciones de oscuridad y luz difusa, se llevó a cabo un experimento para evaluar la eficiencia de parasitismo de la avispa bajo diferentes condiciones de luz.

La unidad experimental (Fig. 4) estuvo constituida por una cubeta plástica semitransparente, de 33 cm de largo x 26 cm de ancho x 10 cm de alto, con su tapa en la cual se perforó un orificio de 20 cm x 12 cm y se cubrió con muselina para permitir la aireación. Se colocó un dispositivo

de liberación de 10 cm de largo en posición horizontal a lo largo y en el centro de la cubeta. El dispositivo llevaba una tapa en cada uno de sus extremos. Se determinaron 11 sitios en la cubeta donde se colocaron huevos de *T. solanivora* para ser parasitados. En el interior de la cubeta se ubicaron seis sitios en los cuales se pusieron papeles con un promedio de 20 huevos de un día de ovipositados, fijando un papel en cada esquina y un papel a cada lado del tubo y sobre la tapa se distribuyeron cinco sitios, uno en cada esquina y uno en el centro sobre la muselina, para un total de 11, por unidad experimental (Fig. 4).

Se determinaron tres condiciones de luz como tratamientos, oscuridad total (5.46 lux), luz difusa (1.459,57 lux) y luminosidad normal dentro de laboratorio (12.681,60lux), con dos repeticiones. Para dar las condiciones de oscuridad y luz difusa se utilizaron cajas de cartón, unas completamente oscurecidas con cartulina negra y otras con ventanas hechas a los lados. Dentro de estas cajas se colocaron las unidades experimentales. El experimento completo se montó sobre un mesón cerca de una ventana del laboratorio.

La liberación del parasitoide se realizó utilizando el "dispositivo tipo túnel" dentro del cual se liberaron 500 hembras de *T. lopezandinensis*.

La evaluación se realizó a los ocho días de montado el experimento, tiempo en el cual los huevos no parasitados aún no han eclosionado y los parasitados presentan signos inequívocos de parasitismo. Se determinó el número de huevos parasitados del total de huevos expuestos. También se hicieron observaciones sobre el comportamiento de "forrajeo" de las avispas fuera del dispositivo, fuera de la cubeta o de la caja, y sobre las posturas.

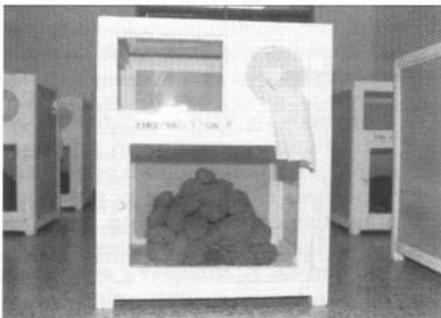


Figura 3. Unidad Experimental. Jaula con bandeja y pila de 100 tubérculos de papa parda pastusa pareja.

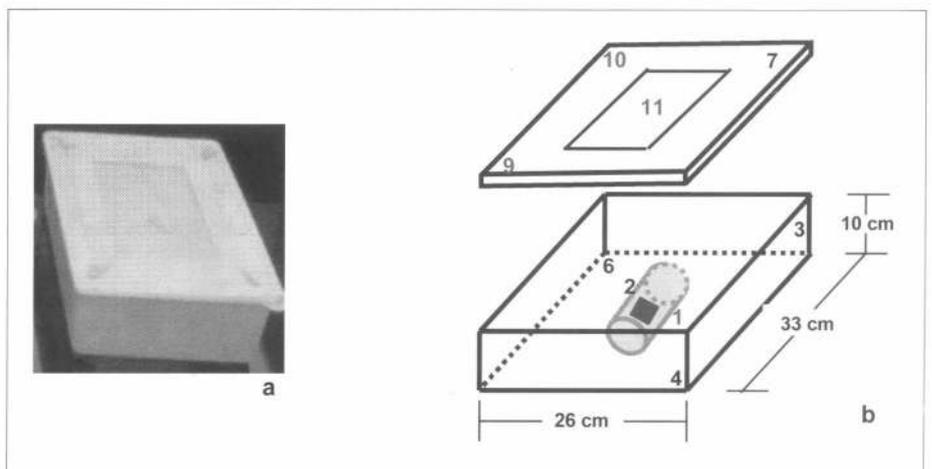


Figura 4. Experimento prueba del efecto de la luz. a) Unidad experimental, b) Distribución de las posturas en la cubeta y en la tapa (11 sitios).

Determinación de las densidades y frecuencias de liberación del parasitoide para prevenir el daño de la plaga en papa almacenada

Para lograr una primera aproximación de las densidades del parasitoide a liberar se llevó a cabo un experimento con un diseño en bloques completos al azar; con cinco tratamientos y tres repeticiones. La unidad experimental fue igual a la ya descrita. En cada jaula se dispuso una pila de papa de 100 tubérculos y se liberó una población de diez parejas de *T. solanivora* de un día de vida. La liberación del parasitoide se realizó mediante el "dispositivo tipo túnel" que se modificó en cuanto a la posición en la pila y su longitud, colocándolo horizontalmente en la parte inferior del montón, con una longitud de 35 cm para cubrir el largo de la bandeja y tapado en sus extremos. Dentro del tubo se ubicó la densidad de *T. lopezandinensis*

determinada por los tratamientos, como se describe en la tabla 1. La liberación de la avispa se llevó a cabo dos días después de liberados los adultos de la polilla.

El experimento permaneció bajo condiciones de luz difusa y buena ventilación por 40 días; tiempo en el cual se produjo el pupamiento de las larvas de *T. solanivora*.

En el experimento se evaluaron las siguientes variables: peso inicial de los 100 tubérculos, número de tubérculos afectados, peso final de los tubérculos sanos y peso final de los tubérculos afectados.

Un segundo experimento, para determinar las densidades y frecuencias de liberación del parasitoide, se realizó bajo un diseño en bloques completos al azar; con un arreglo factorial 3 x 3 x 1 con diez tratamientos y tres repeticiones. El factor A fue la densi-

dad del parasitoide donde se liberaron 3.000, 6.000 y 9.000 hembras del parasitoide *T. lopezandinensis* y el factor B fue la frecuencia con liberaciones cada 3, 5 y 8 días, utilizando la misma unidad experimental. En todas las jaulas se liberó una población de diez parejas de *T. solanivora* de un día de vida, y a los dos días se iniciaron las liberaciones del parasitoide. El parasitoide se liberó utilizando el "dispositivo tipo túnel" de 35 cm de largo colocado horizontalmente en la parte inferior de la pila. Las densidades y frecuencias de liberación de *T. lopezandinensis* correspondieron a los tratamientos descritos en la tabla 2.

Las liberaciones del parasitoide se hicieron hasta el día 20, contados a partir de la liberación de la plaga. En todas las jaulas se colocaron algodones humedecidos con una solución de miel al 10% para alimentar los adultos de *T. solanivora* y del parasitoide.

El experimento permaneció bajo condiciones de oscuridad y buena ventilación por 40 días; tiempo en el cual se produjo el pupamiento de las larvas de la plaga. La evaluación consistió en determinar las variables: peso inicial de los 100 tubérculos, número de tubérculos afectados, peso final de tubérculos afectados y peso final de tubérculos sanos.

Resultados y Discusión

Evaluación de dispositivos de liberación del parasitoide de huevos *Trichogramma lopezandinensis* en papa almacenada

Los promedios de los resultados se presentan en la tabla 3. El dispositivo "tipo túnel" ofrece la posibilidad a las avispas de salir desde el centro y la parte inferior hacia todos los estratos de la pila y en el dispositivo "tipo colgante", las avispas inician su búsqueda desde la parte superior de la pila hacia abajo. Los porcentajes de parasitismo muestran que las avispas posiblemente se vieron estimuladas a parasitar principalmente los huevos colocados en la parte superior, dándose allí el mayor porcentaje de parasitismo, seguido del estrato medio y en último lugar del estrato inferior. Sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias en el parasitismo entre estratos ($P=0,05$). Los huevos situados más superficialmente en la pila, en todos los estratos, fueron en su mayoría parasitados.

Los resultados de este experimento para los dos dispositivos fueron similares ($P>0,05$), por lo tanto no se pudo elegir un dispositivo definido por el porcentaje de parasitismo; sin embargo, teniendo en cuenta los estudios de hábitos y comportamiento de *T. solanivora* en almacenamiento, donde se determinó que la plaga prefiere ovipositar en los lugares más protegidos dentro del montón, se eligió el dispositivo "tipo túnel" el cual permite realizar las liberaciones del parasitoide

Tabla 1. Tratamientos en el experimento preliminar para determinar las densidades del parasitoide requeridas para prevenir el daño de una población inicial de diez parejas de *T. solanivora*

Trat. No	Descripción de tratamientos
T ₁	Testigo, sin parasitoide (0 ♀)
T ₂	¼ pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i> (250 ♀)
T ₃	½ pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i> (500 ♀)
T ₄	1 pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i> (1.000 ♀)
T ₅	1 pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i> ; ½ de pulg ² en el "dispositivo tipo túnel" y ½ pulg ² en el "dispositivo tipo colgante" (1.000 ♀)

Tabla 2. Tratamientos para determinar densidades y frecuencias de liberación del parasitoide *T. lopezandinensis* para prevenir el daño de la polilla guatemalteca en condiciones controladas de almacenamiento

Trat. No	Descripción de tratamientos
T ₁	10 parejas de <i>T. solanivora</i> , testigo, sin parasitoide
T ₂	
T ₃	
T ₄	3 pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i>
T ₅	
T ₆	
T ₇	6 pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i>
T ₈	
T ₉	
T ₁₀	9 pulg ² de <i>T. lopezandinensis</i>

Tabla 3. Porcentaje promedio de huevos parasitados por estrato para los dos dispositivos evaluados

Porcentaje promedio de huevos parasitados por estrato					
Dispositivo tipo túnel			Dispositivo tipo colgante		
Superior	Medio	Inferior	Superior	Medio	Inferior
56,76%	41,61%	37,34%	70,11%	33,01%	28,43%
Porcentaje total de parasitismo					
45,24%			43,85%		

Tabla 4. Promedios de parasitismo de *T. lopezandinensis* bajo tres condiciones lumínicas

Tratamiento	Luz natural		Luz difusa		Oscuridad	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Repetición						
% parasitismo	89,75	79,46	82,88	71,36	65,50	56,33
Promedio	84,6%		77,12%		60,91%	

Tabla 5. Promedios de las variables peso inicial, peso final y número de tubérculos afectados en el experimento preliminar de densidades de liberación del parasitoide

Trat. No	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	No Tub. Afectados
T ₁	8.508,33	8.141,67	22,67
T ₂	9.125,00	7.708,33	22,33
T ₃	9.191,67	8.775,00	22,00
T ₄	9.125,00	8.683,33	25,67
T ₅	8.116,67	7.725,00	25,33

Tabla 6. Promedios de las variables evaluadas en el experimento principal sobre densidades y frecuencias de liberación del parasitoide

Trat. No	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Perdido (g)	No Tub. Afectados
T ₁	8.775,00	8.075,00	700,00	29,30
T ₂	8.308,30	7.816,67	491,67	12,00
T ₃	7.925,00	7.358,33	566,67	34,67
T ₄	7.858,30	7.358,33	500,00	24,00
T ₅	8.300,00	7.833,33	466,67	21,67
T ₆	9.341,67	8.750,00	591,67	19,66
T ₇	8.916,67	8.308,33	608,33	19,66
T ₈	8.175,00	7.791,67	383,33	20,33
T ₉	8.166,67	7.300,00	450,00	29,67
T ₁₀	8.233,33	7.675,00	558,33	26,00

en los sitios donde se presenta la mayor oviposición, como puede observarse en la figura 5.

Prueba del efecto de la luz sobre la actividad parasítica de la avispa

En el momento de la evaluación se detectó la presencia de adultos de *T. lopezandinensis* fuera de los dispositivos y de las cubetas forrajeando en los focos de huevos expuestos.

Los resultados mostraron que el parasitismo ocurrió en las tres condiciones de luminosidad evaluadas (Tabla 4), pero con un efecto de la luz positivo en la actividad parasítica de las avispas. El mayor parasitismo se presentó en las condiciones de luminosidad normal en laboratorio, con 84,6% y el más bajo con un 60,91% bajo condiciones de oscuridad total. La prueba de T ($\alpha=0,05$), mostró diferencias significativas entre estas dos condiciones extremas; pero ninguna de las dos se diferencia estadísticamente de la intermedia a luz difusa.

Amaya (1998) revisó varios estudios en los cuales se evaluó el efecto de la luz en el comportamiento de las avispas de diferentes especies del género *Trichogramma*,

encontrando que los adultos son fuertemente atraídos por la luz, que bajo condiciones naturales se ubican en las partes más expuestas de las plantas, y que su actividad se incrementa al aumentar la intensidad lumínica. También indica que el parasitismo de *Trichogramma* es más alto a la plena luz que en la sombra, y atribuye esta actividad al aumento en la visibilidad. Pero para *T. evanescens* resalta que esta

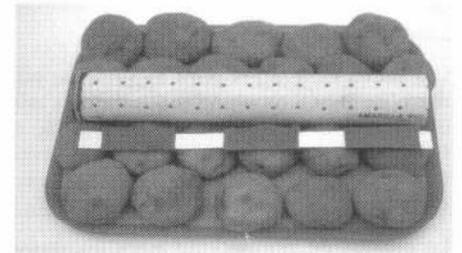
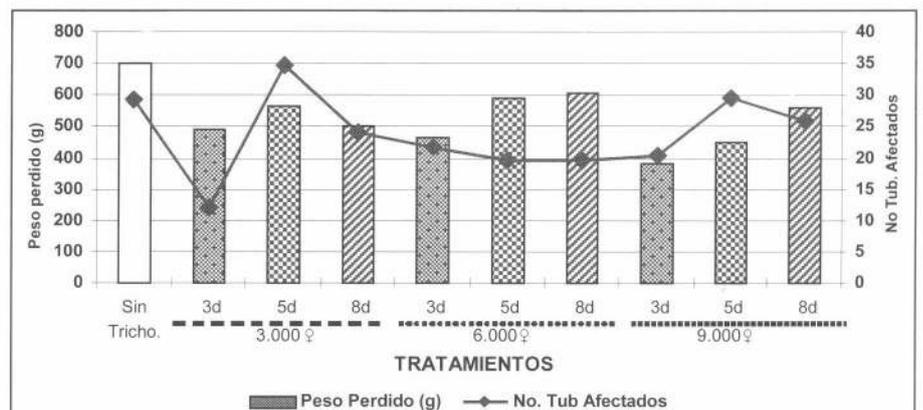
especie puede distinguir el huésped y ovipositar en completa oscuridad. En el presente trabajo, se obtuvo un 61% de parasitismo en condiciones de completa oscuridad, corroborando que la especie en estudio presenta una buena actividad parasítica en dichas condiciones.

Dado que la parasitismo se dio bajo las tres condiciones de luminosidad, podría pensarse que el parasitoide utiliza no sólo señales visuales para encontrar su huésped, posiblemente utiliza estímulos olfativos, o táctiles para encontrarlo asociado a otro tipo de estrategias de búsqueda más refinadas.

Determinación de las densidades y frecuencias de liberación del parasitoide para prevenir el daño de la plaga en papa almacenada

Los resultados del experimento preliminar para determinar la cantidad de avispas de *T. lopezandinensis* que se requieren liberar para prevenir el daño causado por una población de *T. solanivora* se presentan en la tabla 5. Los adultos de la polilla murieron entre 10 y 12 días después de la liberación y los adultos del parasitoide murieron entre 5 y 8 días después de la liberación.

Se hicieron pruebas de normalidad para los datos y se realizó un análisis de varianza bajo un diseño en bloques completos al azar para la variable número de tubérculos afectados y un análisis de covarianza para las variables peso inicial y peso final.

**Figura 5.** Dispositivo "tipo túnel" en posición horizontal y de 35 cm de longitud.**Figura 6.** Comparación entre el número de tubérculos afectados y el peso perdido por tratamiento.

Para la variable número de tubérculos afectados los datos presentan una distribución normal (Shapiro – Wilk = 0,98); el análisis de varianza para tratamientos que variaron desde la liberación de 250 hembras hasta 1.000 hembras de *T. lopezandinensis*, con número de tubérculos afectados de 22 a 25, no presentó diferencias significativas, y tampoco se presentaron entre bloques.

En el experimento, las liberaciones de la avispa parasitoide correspondieron a 250 ♀, 500 ♀ y 1.000 ♀ para los tratamientos, rangos que permitieron determinar que este número de hembras resulta insuficiente para encontrar y parasitar los huevos de diez hembras de *T. solanivora* y prevenir el daño causado por la plaga, comparados con el tratamiento testigo donde no se liberó el parasitoide. Posiblemente el parasitoide encontró algunas dificultades en el reconocimiento del medio y en la búsqueda de las posturas en sitios escondidos y oscuros que no son de su preferencia. Debido a que las cantidades fueron insuficientes, se planteó un nuevo experimento para probar cantidades mayores de la avispa.

Los resultados obtenidos en el experimento principal para determinar densidades y frecuencias de liberación del parasitoide *T. lopezandinensis* para prevenir el daño causado por *T. solanivora* en papa almacenada se presentan en la tabla 6.

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y a un análisis de varianza bajo un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 3x3x1 para la variable número de tubérculos afectados y se hizo un análisis de covarianza para las variables peso inicial y peso final.

Los datos obtenidos para la variable número de tubérculos afectados siguen una distribución normal (Shapiro – Wilk = 0,97). El análisis de varianza no presenta diferencias entre tratamientos y tampoco entre bloques.

La prueba de normalidad para los datos de las variables peso inicial y peso final demostró que éstos siguen dicha distribución (Shapiro – Wilk = 0,96). En el análisis de covarianza los resultados indicaron diferencias significativas entre tratamientos ($F= 3,54$; g.l: 9,16; $P < 0,01$) más no entre bloques.

Las pruebas de comparación entre tratamientos se hicieron a través de contrastes ortogonales, encontrándose diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) en la comparación entre el tratamiento testigo donde no se hicieron liberaciones del parasitoide y los demás tratamientos. Igualmente se presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$) en la comparación entre la frecuencia de liberación cada tres días y las frecuencias de liberación cada cinco y cada ocho días. Es importante tener en cuenta que no hubo interacción entre los factores densidad y frecuencia.

En la figura 6 se puede observar que el tratamiento testigo, donde se liberaron diez parejas de la plaga y no se liberó parasitoide, presenta la pérdida mayor de peso con respecto a los demás tratamientos y es uno de los tratamientos donde se obtuvo el número mayor de tubérculos afectados.

Los tratamientos en los que se realizaron liberaciones del parasitoide cada tres días presentaron las pérdidas menores de peso y 12, 21 y 20 tubérculos afectados; notándose que en la frecuencia cada tres días se reduce el daño en 11% en promedio con respecto al testigo; sin embargo, es paradójico que para el tratamiento correspondiente a la menor densidad de liberación con 3.000 hembras cada tres días, pero con la mayor frecuencia, presentó la mayor reducción en daño.

Por otra parte, el tratamiento en el cual ocurrió la pérdida menor de peso, 383,33 g, combinada con un promedio de 20,33% de tubérculos afectados fue el de 9.000 avispas cada 3 días. Estos resultados indican que para obtener un mayor parasitismo y una mayor reducción en el daño por la plaga se requiere la presencia continua de hembras jóvenes de *T. lopezandinensis*.

El hecho de que las densidades más altas del parasitoide no presentaron los mayores niveles de control, como era de esperarse, podría explicarse a que en tales densidades pudo ocurrir el fenómeno de interferencia mutua, por un aumento en la probabilidad de encuentros entre hembras, que trae como consecuencia una disminución en el número de huevos parasitados por cada avispa, como lo explica Rincón (1999) en su estudio del comportamiento de interferencia intraespecífica. Esta situación también ha sido registrada en experimentos realizados en laboratorio con otras avispas como en el caso del parasitoide *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae) donde se evaluó la interferencia mutua entre hembras sobre la progenie y la proporción de sexos, y se determinó que la tasa de oviposición disminuye al incrementar la densidad de hembras sin afectar significativamente la proporción de sexos (Sagarra *et al.* 2000).

En condiciones de cría de *A. kamali* un aumento en la densidad de hembras de 25 a 75 individuos por jaula resultó en un incremento en la producción de la progenie de 266 ± 70 a 877 ± 393 parasitoides. Sin embargo, al pasar de 75 a 100 hembras por jaula la producción de la progenie no fue significativamente diferente con 877 ± 393 a 965 ± 608 parasitoides producidos respectivamente (Sagarra *et al.* 2000), lo que demuestra un claro efecto de interferencia.

Rincón (1999) por su parte, en experimentos con *T. lopezandinensis*, encontró que el aumento de avispas forrajeando sobre una misma área crea una confusión entre ellas y disminuye su eficiencia de búsqueda por el efecto de huella.

Con base en los resultados y en las razones discutidas, se puede afirmar que el uso de *T. lopezandinensis* como parasitoide de la polilla guatemalteca, reduce la intensidad del daño causado por ésta, lo cual se refleja en el peso.

Conclusiones

- Un aporte importante de esta investigación fue el diseño e implementación de un dispositivo que resultó muy útil y eficiente para la liberación del parasitoide en condiciones de almacenamiento de papa el cual se denominó "tipo túnel".

- A partir de este estudio, el parasitoide *T. lopezandinensis* puede ser considerado como un agente potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa en almacenamiento que podría utilizarse bajo la estrategia de una nueva asociación.

- Se determinó que las condiciones de luminosidad no influyen de manera significativa en la actividad parasítica de la avispa, aunque el parasitismo fue mayor en condiciones de luz normal en laboratorio.

- La mayor frecuencia de liberación del parasitoide presentó un efecto significativo en la reducción del daño ocasionado por la polilla, lo que indica que es posible que una presencia continua de hembras jóvenes forrajeando el sistema de almacenamiento sea determinante para lograr un parasitismo mayor y consecuentemente un control mayor de la plaga.

- No se observó un efecto significativo de densidades del parasitoide en la reducción del daño causado por la plaga. Posiblemente porque a las densidades utilizadas pudo presentarse el fenómeno de interferencia intraespecífica que disminuye la eficiencia parasítica de la avispa.

Recomendaciones

- Se recomienda seguir experimentando a densidades bajas del parasitoide y mantener la frecuencia de liberación cada tres días para el control de la polilla en almacenamiento.

- Así mismo, continuar con la evaluación del parasitoide en condiciones de almacenamiento en finca del agricultor con las adaptaciones pertinentes.

- Igualmente, efectuar un proceso de experimentación similar a éste con el propósito de determinar las densidades y frecuencias de liberación del parasitoide en condiciones de cultivo en campo.

Literatura citada

- AMAYA, M. 1998. *Trichogramma* spp. Producción Uso y Manejo en Colombia. Buga, Valle del Cauca. Colombia. Imprectec Ltda. 176 p.
- ESPITIA, E. 1999. Hacia un manejo integrado de la polilla guatemalteca en Colombia.

- Memorias. XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 228-238. Bogotá.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 1998. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas. MIP Memorias. I Curso – Taller Internacional Control Biológico. p. 9-18. Bogotá.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 2001. Evaluación y ajuste de tecnologías para el uso del parasitoide de huevos *Trichogramma lopezandinensis* como controlador biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Informe de Avance Convenio Corpoica - Cevipapa. Diciembre. Tibaitatá. Ed. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas. MIP. Corpoica. 44 p.
- PORRAS, P. 1999. La papa en Colombia. Desarrollo de una cadena agroalimentaria estratégica. Revista Papas Colombianas 3 (1-2): 14-17.
- RINCÓN, C. 1999. Estudios biológicos del parasitoide *Trichogramma lopezandinensis* (Sarmiento) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Trabajo de Grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. 106 p.
- SALAZAR, J.; W. ESCALANTE. 1984. La polilla guatemalteca de la papa *Scrobipalopsis solanivora*, nueva plaga del cultivo de la papa en Venezuela. Resúmenes. XI Jornadas Agronómicas. p. 24-28. Maracaibo. Venezuela.
- SAGARRA, L. A.; VINCENT, C.; STEWART, R. 2000. Mutual interference among female *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae) and its impact on fecundity, progeny production and sex ratio. Biocontrol Science and Technology 10 (3): 239-244.
- SARMIENTO, C. 1993. Una nueva especie de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de los Andes Colombianos. Revista Colombiana de Entomología 19 (1): 3-5.

Recibido: Abr. 22/2003

Aceptado: Ago. 30/2003

Importancia del manejo agrícola para la biodiversidad: caso de las hormigas en caña de azúcar

Importance of agricultural management for biodiversity: case of ants in sugar cane

MÓNICA RAMÍREZ R.¹, INGE ARMBRECHT P.², MARTHA LUCÍA ENRÍQUEZ L.³

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 115-123 (2004)

Resumen. Teniendo en cuenta que las hormigas responden a diferentes prácticas generadas por la agricultura, este artículo analiza y compara la información de dos estudios realizados en cañaduzales del Valle del Cauca. En ambos estudios se ubicaron dos transectos lineales, en los que se colocaron diez estaciones equidistantes (10 m) para un total de 20 estaciones; cada estación contó con un cebo de atún y una trampa de caída que se dejaron actuar 83,3 y 441,6 días continuos, respectivamente. Para predecir y comparar la riqueza de los cañaduzales y sus sitios vecinos se utilizaron diferentes estimadores de riqueza que trabajan con la abundancia de especies; se realizaron pruebas de comparación múltiple y análisis de aglomeración. Se capturaron 97 especies distribuidas en 22 géneros y 6 subfamilias. Los cañaduzales más ricos fueron los que tuvieron en su manejo un menor impacto sobre el suelo y mejor cuidado de los sitios adyacentes. Se encontró que los cañaduzales de El Hatigo y Roma fueron más similares debido probablemente al efecto regional que tiene el mosaico de hábitats de la Reserva sobre sus alrededores, mientras que El Medio y San Julián, que presentan condiciones degradadas, se ubicaron en otro grupo. Este análisis resalta la importancia del manejo de la caña de azúcar como matriz dominante del Valle del Cauca y la diversificación del paisaje con el fin de preservar la biodiversidad de las comunidades de hormigas.

Palabras clave: Ensamblajes de hormigas. Manejo de la matriz. Parches de bosque. Guaduales. Contexto regional y local.

Summary. Given that ants respond to different practices, generated by agriculture, this paper analyses and compares information from two studies conducted in sugar cane fields of the Cauca Valley. In both studies, two lineal transects were situated in which ten equidistant (10 m) stations were placed for a total of 20 stations; each station had one tuna bait and one pitfall trap, that were operated for 83,3 and 441,6 continuous days, respectively. To predict and compare richness in sugar cane fields and their neighbouring sites, different richness estimators were used that work with species abundance; multiple comparisons analyses and cluster analyses were conducted. We captured 97 species distributed in 22 genera and 6 subfamilies. The richest sugar cane fields were those whose management had less impact on the soil and better care of adjacent sites. The sugar cane fields of El Hatigo and Roma were more similar probably due to the regional effect that the habitat mosaic of the Reserve had on its surroundings, while El Medio and San Julian, which represent degraded conditions, were placed in another group. This analyses highlights the importance of sugar cane management as the dominant matrix in the Cauca Valley and the diversification of the landscape in order to preserve the biodiversity of ant communities.

Key words: Ant assemblages. Matrix management. Forest patch. Guadua stands. Local and regional environment.

Introducción

Al inicio de la década de los cincuenta, la industria azucarera se ubicaba en la parte central y norte del Valle del Cauca, zona que contaba con buenas condiciones climáticas, del suelo y los recursos hídricos ofreciendo así condiciones favorables para el surgimiento y estructuración de este sector (Guardiola 1995).

Posteriormente, la quema de la caña implementada en la década de los setenta, generó un gran impacto ambiental (Molina *et al.* 2000) e inconformidad en-

tre los habitantes de las poblaciones vecinas a los cultivos (CENICAÑA 1997). La expansión de este cultivo creó así grandes cambios en las comunidades naturales, tanto florísticas como faunísticas del valle geográfico del río Cauca, dejando solo algunos remanentes de hábitats naturales como parches aislados de bosque y algunos humedales siendo el paisaje dominante extensos monocultivos de caña de azúcar (Naranjo 1992).

Resultado de esta preocupación ambiental y presión social, la industria azucarera ha movido rápidamente sus esfuerzos para

implementar la cosecha en verde (Cock y Torres 1998) y en menor grado el manejo orgánico, que ha mostrado ventajas a nivel ambiental (Molina *et al.* 2000). Se ha encontrado por ejemplo, que las poblaciones de bacterias y hongos son tres veces mayores en la caña con manejo orgánico que en la caña con manejo convencional (Delgadillo *et al.* 1994) y en el contenido de materia orgánica casi le dobla (Arias 1994). Entre tanto las emisiones de partículas tóxicas como monóxido de carbono, hidrocarburos y dióxido de azufre en caña con manejo convencional le exceden en promedio en un 60% a la

1 Autor para correspondencia: I. A. Investigadora Asociada. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). A. A. 20591. Cali, Colombia. E-mail: moramire73@hotmail.com

2 M. Sc. Profesora Asociada. Facultad de Ciencias, Universidad del Valle. A. A. 25360 Cali, Colombia. E-mail: iarmbrec@umich.edu

3 I. A. Investigadora Asociada. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). E-mail: malu@cipav.org.co.

caña con manejo orgánico (Universidad de la Salle y CENICAÑA 1991).

Cabe aclarar que en la caña con cosecha en verde se elimina la quema pre y post cosecha, práctica que debe estar implantada en todo el Valle del Cauca en el 2005 como un convenio entre el sector y el Ministerio del Medio Ambiente. En la caña con manejo orgánico se elimina además la aplicación de insumos químicos que se sustituye por el uso de abonos orgánicos u orgánico-minerales, se implementa la labor manual, el uso de carneros para limpiar los callejones y el acomodo de hojarasca entre surcos (E. Murqueitio, com. pers.).

Puesto que en la actualidad se está generando un proceso de reconversión de caña con manejo convencional a caña con cosecha en verde y manejo orgánico, surge la necesidad de valorar estos sistemas de producción desde el punto de vista biológico y ecológico de los macroorganismos presentes en ellos.

Entre los artrópodos, las hormigas son componentes importantes del ecosistema por que cumplen una variedad de funciones ecológicas; además se han considerado útiles en la evaluación de respuestas bióticas frente a diversas prácticas generadas por la agricultura como la fertilización, el arado convencional, las fumigaciones y las quemadas (Folgarait 1998) y han sido usadas como el mejor grupo indicador de riqueza de organismos en agroecosistemas (Roth *et al.* 1994). Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo pretende comparar la riqueza de hormigas en cultivos de caña con manejo orgánico y convencional dependiendo del contexto local (Hacienda o Reserva Natural) y regional.

Materiales y Métodos

Este artículo analiza la información de dos estudios, usando la misma metodología y realizado en una zona de vida común (Armbrecht y Ulloa-Chacón 1999; Ramírez y Enríquez 2002). Los predios comprendi-

dos en estos estudios se encuentran en el valle geográfico del río Cauca que cuenta con una extensión de 420.000 ha en la zona definida por Holdridge como bosque seco tropical (bs-T), se da en alturas fluctuantes de hasta 1.000 msnm, temperatura media superior a los 24°C y precipitación media anual entre 1.000-2.000 mm (Espinal 1968). Tales estudios se realizaron en haciendas ubicadas en diferentes localidades. En el municipio de Santander de Quilichao se ubica la hacienda San Julián, en el municipio El Cerrito la hacienda Roma y La Reserva Natural El Hatío y en el municipio de Zarzal la hacienda El Medio (Fig. 1). Cada hacienda involucra un parche de bosque y su caña vecina a excepción de la hacienda Roma que se encuentra totalmente rodeada de otros lotes de caña (Tabla 1).

Muestreo de hormigas

En cada sitio se delimitaron dos transectos lineales de 100 m, en cada uno de ellos se

Tabla 1. Descripción de unidades de cobertura vegetal muestreadas en el Valle del Cauca, Colombia. Armbrecht (1995)*, Ramírez y Enríquez (2002)**, común para ambos estudios***.

SITIO	COORDENADAS	CARACTERÍSTICAS DE CADA CAÑA
** Caña de azúcar Hatío	3° 40' N 76°17' W	<ul style="list-style-type: none"> Cultivos de caña de azúcar bajo manejo 100% orgánico (sin quemadas ni agroquímicos), en proceso de agroforestación con árboles como ébano y <i>Schizolobium</i> 10 % del terreno (10 hectáreas) corresponde a áreas marginales: acequias y callejones. Estas áreas son pastoreadas por carneros africanos, que efectúan control de malezas Asociación de 12 variedades de caña Fertilización con leguminosas, principalmente <i>Crotalaria</i> sp. Lotes rodeados de cercas vivas (en callejones) de árboles como ébano, chiminango <i>Pithecellobium dulce</i>, guácimo <i>Guazuma ulmifolia</i>, <i>Casuarina equisetifolia</i> y caoba <i>Swietenia macrophylla</i> Pequeño rodal de 70 tecas <i>Tectona grandis</i> Cercanía al fragmento de bosque y a los guaduales
** Caña de azúcar Guadual El Hatío	3° 40' N 76°17' W	<ul style="list-style-type: none"> Igual a la descripción de caña de azúcar. El Hatío, es un lote diferente
*** Bosque El Hatío	3° 40' N 76°17' W	<ul style="list-style-type: none"> Dosel entre 25 y 35 m de altura, dominado por árboles como caracolí <i>Anacardium excelsum</i>, higuerón <i>Ficus insípida</i>, palma real de Cuba <i>Roystonea regia</i>, ceiba <i>Ceiba petandra</i>, jigua negro o laurel amarillo <i>Nectandra</i> sp., cedrillo <i>Guarea trichilioides</i>, capote <i>Machaerium capote</i>, iguá <i>Pseudosamanea guachapele</i>, dinde <i>Chloropora tinctoria</i>, tachuelo <i>Fagara</i> sp., mestizo <i>Cupania</i> sp., Zurrumbo <i>Trema micrantha</i>, y en los bordes del fragmento, chiminango <i>P. dulce</i>
** Guadual El Hatío	3° 40' N 76°17' W	<ul style="list-style-type: none"> Señalados en los mapas de El Hatío desde 1866 como guaduales cultivados Dosel entre 16 y 20 m de altura, dominado por guadua <i>Bambusa guadua</i>, con árboles como elemento de soporte (higuerones <i>Ficus insípida</i>, cedros macho <i>Guarea ulmifolia</i>, tachuelos <i>Fagara</i> sp., dindes <i>C. tinctoria</i> y palmas reales <i>R. regia</i>) Sotobosque rico en platanillos <i>Heliconia</i> spp. y guaduilla o matamba
* Caña El Medio	4° 20' N 76 04' W	<ul style="list-style-type: none"> Fertilización química Quemadas antes y después de la cosecha Uso excesivo de agua para el riego, que ocasiona salinización de los suelos Uso de maquinaria pesada para la extracción de caña cortada en los lotes

(Continuación Tabla 1)

SITIO	COORDENADAS	CARACTERÍSTICAS DE CADA CAÑA
* Bosque El Medio	4° 20' N 76 04' W	<ul style="list-style-type: none"> • Se originó como cacaotal abandonado • Completamente rodeado por caña de azúcar • Con dominancia de algunos árboles como caracolí <i>A. excelsum</i>, palmas <i>Aiphanes caryoteaefolia</i> y platanillos <i>Heliconia</i> spp.
* Caña San Julián	2°98' N 76° 30' W	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilización química • Quemadas antes y después de la cosecha • Uso excesivo de agua para el riego, que ocasiona salinización de los suelos • Uso de maquinaria pesada para la extracción de caña cortada en los lotes
* Bosque San Julián	2°98' N 76° 30' W	<ul style="list-style-type: none"> • Bosque secundario. Dosel 30 m. Domina el burillico <i>Xitopia ligustrifolia</i>, guadua <i>B. guadua</i> • Enmarañado y húmedo
** Caña Roma y Roma 2	3° 40' N 76°17' W	<ul style="list-style-type: none"> • Algunos sectores circundantes de la Reseva Natural El Hatico conservan este tipo de manejo, característico de la mayor parte del área de cultivos de caña de azúcar del Valle del Cauca • Fertilización química • Control de malezas a través de herbicidasquímicos • Quemadas antes y después de la cosecha • Uso excesivo de agua para el riego, que ocasiona salinización de los suelos • Uso de maquinaria pesada para la extracción de caña cortada en los lotes • Estos lotes se encuentran rodeados de cañaduzales que presentan manejo orgánico

ubicaron 10 estaciones equidistantes (10 m) teniendo un total de 20 estaciones por sitio. En cada una se colocó una trampa de caída (pitfall) y un cebo de atún. Las trampas de caída consistieron en un vaso de plástico de 6 cm de diámetro por 6 cm

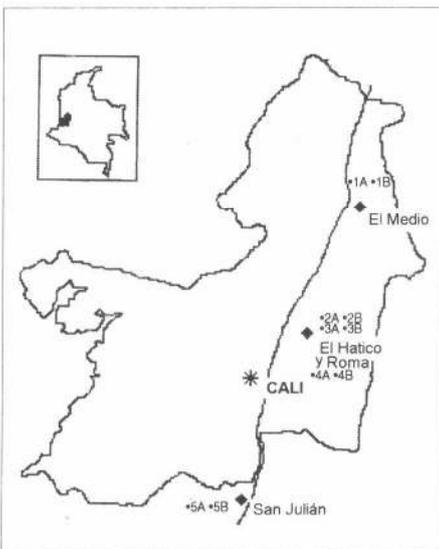


Figura 1. Ubicación de las haciendas donde se encuentran los lotes de caña y sus sitios vecinos. Distancia entre hacienda y hacienda (de sur a norte): San Julián-104 Km – El Hatico – Roma (colinda con El Hatico) – 104 Km El Medio. 1A bosque El Medio, 1B caña vecina El Medio, 2A bosque El Hatico, 2B cañaduzal del bosque El Hatico, 3A guadua El Hatico, 3B cañaduzal del guadua El Hatico, 4A caña Roma 1, 4B caña Roma 2, 5A bosque San Julián, 5B caña vecina San Julián.

de profundidad, semilleno con alcohol etílico y agua, enterrado a ras del suelo y disimulado con material vegetal. Las trampas se dejaron actuar por un período de 26,5 horas en cada sitio para un total de 441,6 días continuos de muestreo. Los cebos contenían tres a cuatro g de atún sobre una hoja de papel bond de 22 cm x 8 cm y fueron colocados a nivel del suelo por un período de 5 h cada uno, invirtiendo 83,3 días continuos de muestreo total. Las hormigas capturadas se introdujeron en frascos con alcohol al 70%, que fueron rotulados con fecha y lugar de colección.

Se identificaron las morfoespecies colectadas hasta el nivel de género con la ayuda de las claves taxonómicas de Jaffé *et al.* (1993), Hölldobler y Wilson (1990) y Bolton (1994) y con comparaciones hechas con las colecciones de referencia de la Universidad del Valle. Simultáneamente se elaboraron colecciones de referencia que sirvieron de base de comparación de todo el estudio. Posteriormente, con el fin de establecer las morfoespecies en común para ambos estudios, se hizo una comparación con las colecciones de referencia.

Análisis de los datos

Para realizar los análisis estadísticos de las hormigas, se tomó como unidad de muestreo la trampa de captura. Se calcularon varios estimadores de riqueza que trabajan con la abundancia de especies (ACE, Chao 1 y Michaelis Menten Mean), los cuales permitieron predecir y comparar la riqueza de hormigas en la caña y su respectivos sitios vecinos. Este análisis se realizó mediante el programa EstimateS 5 (Colwell 1997).

La densidad de especies de hormigas por unidad muestral fueron comparadas mediante una prueba de Kruskal – Wallis, además la densidad promedio de hormigas (número de especies por estación) entre los lotes de caña fue confrontada mediante una comparación múltiple por rangos de medias. Posteriormente, entre la densidad y la riqueza de hormigas de los lotes de caña, se hicieron análisis de correlación y regresión con el programa Statix para Windows (Statistix 1998). Para visualizar diferencias en la composición de las comunidades de hormigas se utilizó análisis de aglomeración (cluster) con el programa STATISTICA (Statsoft 1995). Para validar el presente trabajo, se usaron los datos de ambos estudios en el bosque El Hatico. Mediante una tabla de contingencia de 2 x 3 (Zar 1996) se examinó la independencia de los dos muestreos (es decir, el de Armbrrecht 1995 y el de Ramírez y Enríquez 2002) y la proporción de especies exclusivas y compartidas en los dos períodos de muestreo implicados en ambos estudios. Si la prueba de Chi cuadrado no fuera significativa, se asumiría que los estudios abarcaron especies de hormigas comparables.

Resultados

Como primer paso y para determinar si los períodos de trabajo de campo de los dos estudios reflejaron de una manera confiable la mirmecofauna presente en los sitios incluidos en este artículo, se realizó una comparación de la composición de especies (teniendo en cuenta las compartidas y exclusivas) en los dos períodos de mues-

treo del bosque El Hatico. Se encontró que no hubo una diferencia significativa ($X^2 = 4,56$; $g.l = 2$; $0,1 < p < 0,25$) lo que indica que las comunidades de hormigas del bosque para estos dos momentos de muestreo pertenecen a la misma población, sugiriendo que se pueden utilizar, con confianza, los datos de ambos estudios.

Se capturaron 97 especies distribuidas en 22 géneros de 6 subfamilias, de las cuales 60 estuvieron presentes en la caña de azú-

car y 64 en los sitios vecinos. Se encontró que los cañaduzales con mayor número de especies de hormigas fueron los de El Hatico, seguidos de la Hacienda La Roma y en último lugar El Medio y San Julián (Tabla 2). De acuerdo con los estimadores de riqueza que permiten estimar el porcentaje de especies que hay en los cañaduzales (Tabla 3), el índice de ACE es un estimador de cobertura basado en la abundancia, indica que se muestreó entre un 41 y 88% de las especies (faltaron por co-

nocer entre 3 y 17 especies), mientras que el índice de Jackknife 1, que se basa en la incidencia y las especies únicas (Colwell 1997), indica que se muestreó entre un 63 y 98% (faltaron por conocer 25 especies).

Estos dos índices se ven más afectados por la diferencia entre los llamados "singletons" y "doubletons" con base en los cuales trabajan los estimadores no paramétricos (Mc Kamey 1999). Los "single-

Tabla 2. Especies y número de capturas registradas en cada uno de los cañaduzales y sitios vecinos en el Valle del Cauca, Colombia. (*) Especies registradas por Armbrrecht (1996)

Código	Especie	C.B	B	C.G	G	C	B	C. San	B. San	C	C
		Hatico	Hatico	Hatico	Hatico	Medio	Medio	Julián	Julián	Roma	Roma 2
DOL-01	<i>Linepithema dispertitum</i>	26	7	2		6				6	1
DOL-02	<i>Azteca</i> sp.		4								
DOL-03	<i>Dolichoderus</i> sp.		1								
DOL-04	<i>Dolichoderus bispinosus</i>		5								
DOL-05	<i>Linepithema</i> sp.	2	13		24	1					
ECI-01	<i>Labidus</i> sp.		2	3	3					4	2
ECI-02	<i>Eciton burchelli</i>	1									
FOR-01	<i>Camponotus</i> sp. 1		4	2		1					
FOR-02	<i>Camponotus</i> sp. 2	3	4	5							
FOR-03	<i>Brachymyrmex</i> sp. 1			6						29	11
FOR-04	<i>Camponotus novogranadensis</i>	9	4	3	1		4				
FOR-05	<i>Camponotus abdominalis</i>	2	3	2	3						
FOR-07	<i>Camponotus indianus</i>	7	4	8							
FOR-10	<i>Paratrechina</i> sp. 1	3	3		2					1	
FOR-11	<i>Paratrechina</i> sp. 2	18		4							
FOR-12	<i>Camponotus</i> sp. 3	2								12	9
FOR-13	<i>Paratrechina</i> sp. 3	11		3							2
FOR-14	<i>Paratrechina</i> sp. 4	10			1					3	1
FOR-15	<i>Camponotus</i> sp. 4			1							
MYR 01	<i>Solenopsis geminata</i>	34		12	2	3		9		9	4
MYR- 41	<i>Pheidole</i> sp. 9		1		2						
MYR-02	<i>Atta cephalotes</i>	5	21	3						5	3
MYR-03	<i>Pheidole</i> sp.1	1		2							
MYR-04	<i>Wasmannia auropunctata</i>	28	9	36	38	17	32	4	62	11	26
MYR-05	<i>Solenopsis</i> sp. 1	2	12	7	3		1		2	6	8
MYR-06	<i>Cyphomyrmex rimosus</i>	8		6	3	1				1	9
MYR-07	<i>Pheidole</i> sp. 2	8		7	1					10	3
MYR-08	<i>Pheidole</i> sp. 3	14	2	24	1					10	3
MYR-10	<i>Solenopsis</i> sp. 2	2									
MYR-13	<i>Mycocepurus smithii</i>	1		1	1					3	2
MYR-14	<i>Pheidole</i> sp. 4	2	3	4						4	
MYR-15	<i>Pheidole sussanae</i>	21	16	34	4					15	10
MYR-16	<i>Pheidole</i> sp. 5		25								
MYR-18	<i>Solenopsis</i> sp. 3	1									
MYR-19	<i>Monomorium</i> sp.	6		1	1						1
MYR-20	<i>Pheidole</i> sp. 6		4		5						
MYR-21	<i>Strumigenys</i> sp.	1									1
MYR-26	<i>Cardiocondyla</i> sp. 1	3									
MYR-27	<i>Cephalotes</i> sp. 2	1									
MYR-29	<i>Leptothorax</i> sp.	2		2							
MYR-31	<i>Pheidole</i> sp. 7	2		3							

(Continuación Tabla 2)

Código	Especie	C.B Hatico	B Hatico	C.G Hatico	G Hatico	C Medio	B Medio	C. San Julián	B. San Julián	C Roma	C Roma 2
MYR-32	<i>Strumigenys</i> sp. 2				1						
MYR-34	<i>Procryptocerus regularis</i>		1								
MYR-36	<i>Apterostigma</i> sp.		1								
MYR-37	<i>Crematogaster</i> sp.		1								
MYR-38	<i>Crematogaster</i> sp. 5		1								
MYR-39	<i>Pogonomyrmex</i> sp.		1								
MYR-40	<i>Crematogaster</i> sp. 6		1								
MYR-43	<i>Pheidole</i> sp. 10			1							
MYR-44	<i>Cardiocondyla</i> sp. 2	3									
MYR-45	<i>Smithistruma</i> sp.	1		1							
MYR-46	<i>Pogonomyrmex</i> sp.	1									
MYR-47	<i>Pheidole</i> sp. 11	1								5	
MYR-49	<i>Pheidole</i> sp. 12			1							
PON-01	<i>Ectatomma tuberculatum</i>	6								11	6
PON-03	<i>Pachycondyla</i> <i>obscuricornis</i>		1	4	11						
PON-04	<i>Odontomachus chelifer</i>		1		1						
PON-05	<i>Pachycondyla unidentata</i>		1								
PON-06	<i>Pachycondyla</i> sp. 1	1	1	1	2					1	
PON-06	<i>Pachycondyla</i> sp. 1	1	2	1						1	
PON-07	<i>Pachycondyla</i> sp. 2		1	1							
PON-08	<i>Pachycondyla impressa</i>	2		1	2		7				
PON-10	<i>Gnamptogenys</i> sp.				2						
PSE-02	<i>Pseudomyrmex elongatus</i>		1		1		1				
PSE-03	<i>Pseudomyrmex boopis</i>		6		24						
PSE-04	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 2		1								
PSE-05	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 3	1		1							
PSE-06	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 4		1								
PSE-08	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 5									2	1
PSE-09	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 6										1
PSE-10	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 7		1								
PSE-11	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 8		1								
PSE-12	<i>Pseudomyrmex</i> sp. 9			1							
*DOL-06	<i>Linepithema</i> - 06							2			
*FOR-02	<i>Paratrechina</i> - 02									2	
*FOR-03	<i>Brachymyrmex</i> - 03								6		
*FOR-06	<i>Paratrechina</i> sp.						5	2			
*FOR-13	<i>Camponotus</i> - 13							2		1	
*FOR-16	<i>Brachymyrmex</i> - 16						1				
*FOR-19	<i>Brachymyrmex</i> - 19						1				
*MYR-02	<i>Pheidole</i> - 02							3			
*MYR-03	<i>Pheidole</i> - 03						1	2			
	<i>Crematogaster</i> <i>montezumia</i>							8			
*MYR-08	<i>Pheidole</i> - 08							4		1	
*MYR-12	<i>Crematogaster</i> <i>evallans</i>						1	1			
*MYR-14	<i>Pheidole</i> - 14						1		1		
*MYR-20	<i>Crematogaster acuta</i>							1			

(Continuación Tabla 2)

Código	Especie	C.B Hatico	B Hatico	C.G Hatico	G Hatico	C Medio	B Medio	C. San Julián	B. San Julián	C Roma	C Roma 2
*MYR-25	<i>Crematogaster</i> -25							2			
*MYR-30	<i>Pheidole</i> - 30								5		
*MYR-31	<i>Pheidole</i> - 31						3	4			
*MYR-32	<i>Pheidole</i> - 32						3	3	6	1	
*MYR-33	<i>Solenopsis</i> - 33						1				
*MYR-34	<i>Tetramorium bicarinatum</i>						1				
*MYR-36	<i>Pheidole</i> - 36							1			
*MYR-48	<i>Pheidole</i> - 48					1					
*PON-01	<i>Pachycondyla constricta</i>						2				
*PSE-01	<i>Pseudomyrmex oculatus</i>								1		

Tabla 3. Valores observados y estimados de la riqueza de hormigas ordenados de manera decreciente en diferentes caña de azúcar y sus sitios vecinos (S. obs = riqueza observada)

SITIO	NOMBRE	S. OBS	S. OBS	"SINGLETONS"	"DOUBLETONS"	ACE	JACK 1	MMEAN
		CAÑA	VECINO			%	%	%
1	Caña Bosque El Hatico	39		11	9	77	79	86
2	Bosque El Hatico		38	18	2	62	69	80
3	Caña Guadual El Hatico	34		11	5	80	75	83
4	Guadual El Hatico		25	11	5	59	70	78
5	Caña Roma	22		5	1	88	82	88
6	Caña Roma 2		22	8	4	69	74	83
7	Caña El Medio	16		10	1	43	63	77
8	Bosque El Medio		19	7	6	79	71	70
9	Caña San Julián	7		2	0	71	64	70
10	Bosque San Julián		7	4	1	41	98	65

tons" son aquellas especies que tienen un solo individuo capturado dentro de un hábitat y se convierte en "doubletons" cuando se capturan dos individuos. Cuando el valor de los "singletons" se acerca al de los "doubletons" significa que se está llegando a la asintota en la curva de saturación de especies (Colwell y Coddington 1994). Por otra parte, el índice de MMMean, que trabaja con la media de especies en la curva de acumulación, es más estable frente a la variación de estos dos valores y sugiere que se ha muestreado entre un 65 y 88% (faltaron por conocer en promedio tres especies).

Al observar los valores de la caña se ve que las de menor riqueza presentan mayor fluctuación en el porcentaje de especies conocidas, esto puede ser por la diferencia que hay entre los "singletons" y los "doubletons" como en el caso de la caña El Medio, o por la ausencia de "doubletons" como en la caña San Julián. En la curva de saturación de todos los sitios los cañaduzales de la Reserva El Hatico son las que menos se acercan a la asintota de saturación, en un nivel intermedio se encuentran la caña Roma y El Medio, donde hay

un mejor conocimiento de las especies de estos cañaduzales y muy paralela al eje x se encuentra la de San Julián, lo que indica que se conocen casi todas las especies de éste (Fig. 2A).

Una tendencia similar muestran los sitios vecinos, ya que la curva del bosque El

Hatico indica que aún faltan especies por conocer; más estables se encuentran el guadual El Hatico, la caña Roma 2 y el bosque El Medio. El bosque San Julián al igual que el cañaduzal correspondiente muestra una rápida tendencia a la saturación de especies (Fig. 2B).

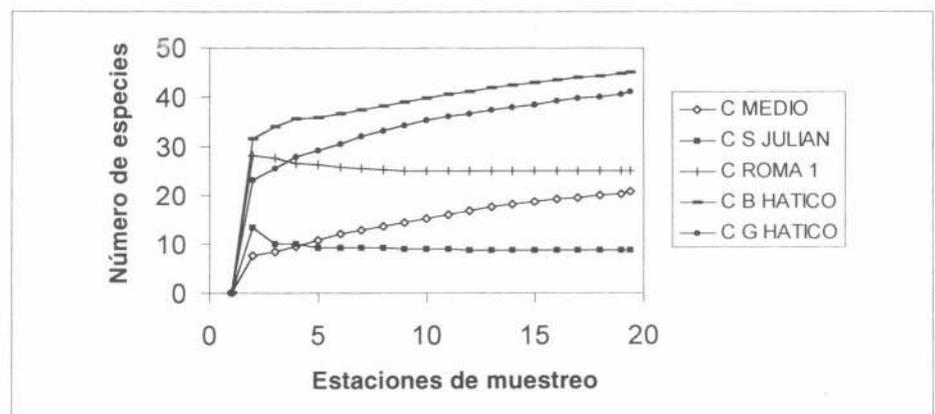


Figura 2A. Curva de saturación realizada con el estimador MMMean para los cañaduzales muestreados en el valle geográfico del río Cauca. C = cañaduzal, C B Hatico = Cañaduzal Bosque Hatico, C G Hatico = Cañaduzal Guadual Hatico.

Una prueba de Kruskal Wallis encontró diferencia significativa entre los cañaduzales y sus sitios vecinos ($H = 9$; $N = 200$; $p < 0,0001$). Estas diferencias se evidencian al confrontar la abundancia relativa de todos los cañaduzales en un análisis de aglo-

meración (Fig. 3). Se observa que la caña Roma 1, que se encuentra inmersa en una matriz de caña, está en un grupo aparte pero cercanamente relacionada con la caña San Julián y El Medio que también presentan un manejo convencional. Los caña-

Tabla 4. Comparación múltiple por rangos de medias en cinco cañaduzales, Valle del Cauca, Colombia

Caña	Rango	Grupos
Hatico Bosque	101,63	I
Hatico Guadual	84,400	I I
Roma 2	54,350	I I I
Medio	28,500	I I I
San Julián	18,300	I
Nivel de rechazo	0,050	
Valor crítico de Z	2,94	
Valor crítico para la comparación	32,287	

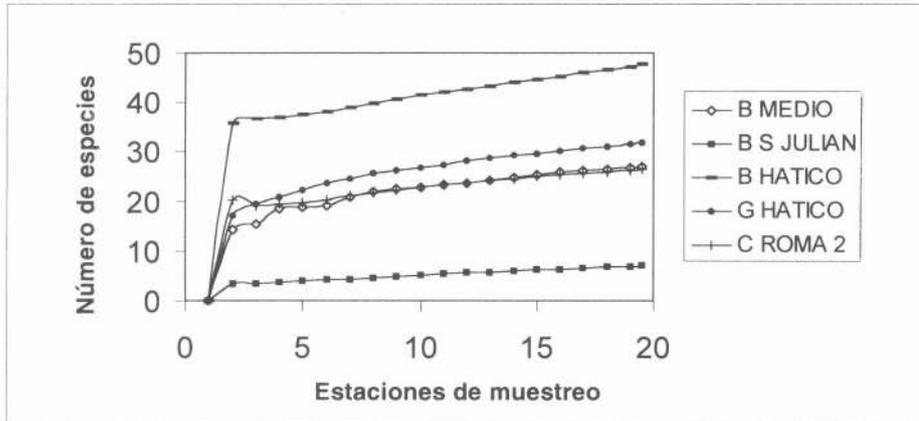


Figura 2B. Curva de saturación con el estimador MMEan de los sitios vecinos a cada cañaduzal de la figura 2A, valle geográfico del río Cauca. B= bosque, G= guadual. C= cañaduzal.

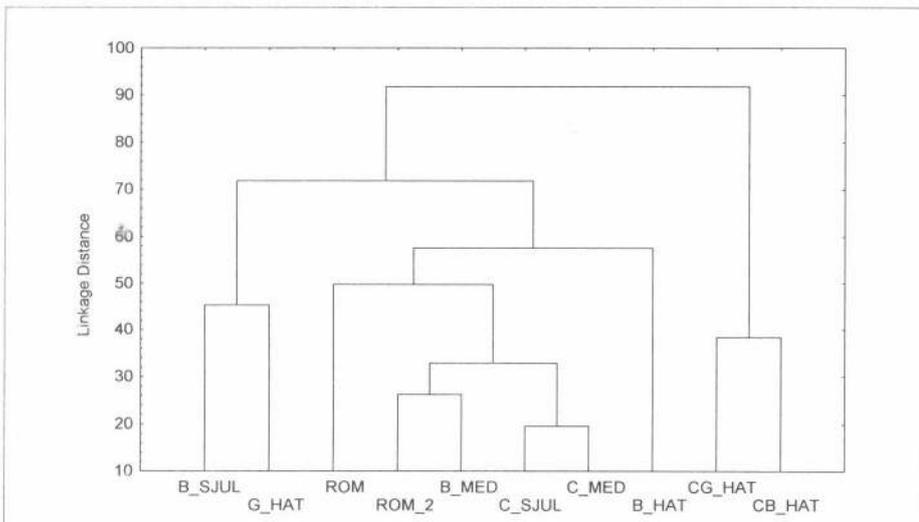


Figura 3. Agrupamiento de los cañaduzales y sitios vecinos con base en la abundancia relativa de la mirmecofauna. Distancias euclidianas (UPGMA).

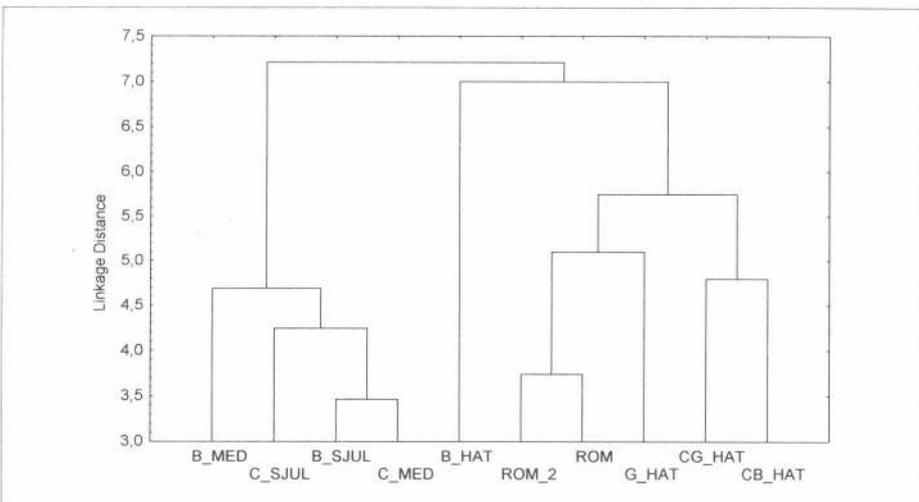


Figura 4. Agrupamiento de los cañaduzales y sitios vecinos con base en la composición de la mirmecofauna. Distancias euclidianas (UPGMA).

duzales que se encuentran más separados de todo el grupo son los de la Reserva Natural El Hatico; es decir, los que presentan un contexto y manejo diferente (orgánico).

De acuerdo con la composición de la mirmecofauna, es decir utilizando para los análisis una matriz de datos que solo da cuenta de las identidades en los diferentes cañaduzales y sitios vecinos, muestran un agrupamiento diferente, pues todos los cañaduzales inmersos y vecinos del área El Hatico se encuentran en un grupo y los cañaduzales El Medio y San Julián en otro grupo (Fig. 4). La tendencia se conserva al hacer la comparación múltiple por rangos de la densidad promedio de hormigas entre los cañaduzales (Tabla 4).

Se observa que hay cuatro grupos en que las medias no son significativamente diferentes; éstos coinciden con el tipo de manejo o influencia que están recibiendo. Por un parte está el manejo orgánico en El Hatico, le sigue Roma que aunque es convencional es cercana a una zona de transición de caña convencional a orgánica y a la reserva El Hatico, por último el manejo convencional en El Medio y San Julián. La comparación de la densidad promedio de los cañaduzales es demostrativa si se tiene en cuenta que la densidad y la riqueza de especies se encuentran estrechamente relacionadas ($p = 0,95$) y además el número de especies por estación explica la riqueza total de cada lote de caña ($R^2 = 0,9169$; $t = 6,66$; $p = 0,0026$).

Discusión

Las especies que fueron capturadas en los cañaduzales presentan una tendencia en su composición. Algunos géneros como *Wasmannia*, *Solenopsis*, *Pheidole*, *Paratrechina* y *Ectatomma*, tienden a predominar y han sido encontrados con frecuencia en cañaduzales del Valle del Cauca en otros estudios (Gutiérrez *et al.* 1996; Lastra y Gómez 1996). Es importante anotar que en ninguno de éstos se contó con la presencia de la hormiga loca *Paratrechina fulva* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae), especie que ha causado impacto ambiental, social y económico en diferentes hábitats (Aldana *et al.* 1995) y principalmente en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca (Gómez y Lastra 1997).

Teniendo en cuenta los valores observados y estimados de la riqueza de Formicidae que se encuentra en los cañaduzales, los de la región El Hatico son los más ricos, en un nivel intermedio se hallan los cañaduzales El Medio y Roma y con una pobreza notable se ve San Julián, esto puede deberse a la combinación de varios factores.

En primer lugar el manejo que recibe cada uno de los cañaduzales puede estar influenciando su riqueza, prácticas como la quema, la aplicación de insumos químicos y la remoción de la hojarasca del suelo pueden tener un impacto negativo sobre las comunidades de hormigas, ya que eliminan todo posible refugio y fuente disponible de alimento y se ha demostrado que a mayor complejidad del hábitat y mayor diversidad de las comunidades de hormigas es menor la incidencia de la hormiga loca (Vargas 2002).

También puede salir afectado el bosque como en el caso de la hacienda El Medio cuando se quema la caña, pues en algunas ocasiones el fuego alcanza los bordes de éste (obs. pers. Inge Armbrrecht 1995). Este tipo de manejo crea un gran impacto sobre el suelo pues primero se hace una quema para dejar el tallo de la caña limpio para cortar y posteriormente se hace una requema con el fin de eliminar la hojarasca para facilitar las labores de preparación del terreno (Molina *et al.* 2000).

Una situación contraria es la que se da en El Hatico en donde se han establecido una serie de prácticas que son más amigables con el medio ambiente, como la eliminación de quemados e insumos químicos y la disposición entre surcos de la hojarasca que queda como residuo de la cosecha. Dichas labores, pueden crear condiciones para que se formen microhábitats donde las hormigas puedan anidar y buscar presas disponibles para su alimentación. Por ejemplo, el gremio de las generalistas en la comunidad de hormigas forrajeras muestra cambios frente a alteraciones de las condiciones físicas de la sombra, teniendo la hojarasca un efecto de considerable importancia (Perfecto y Vandermeer 1996).

Por otro lado se ha notado que en cañaduzales que tenían una mayor complejidad espacial (debido a la presencia de malezas) y aumento de sustratos aprovechables para anidar y forrajear, había una mayor diversidad de hormigas y otros organismos depredadores (Hernández *et al.* 2002) y por el contrario se ha encontrado una relación inversa entre la complejidad vegetal y diversidad con la presencia de *P. fulva* (Vargas 2002).

En este sentido esta misma diversidad de Formicidae podría ser utilizada en beneficio propio de los cultivos de caña, ya que existen hormigas de alta eficiencia depredadora. Por ejemplo, la acción depredadora sobre huevos y larvas de barrenadores en el caso de *Solenopsis geminata* (Fabricius) (Hymenoptera: Myrmicinae) ha sido obser-

vada por Velez (1985) y Long *et al.* (1987); además, esta especie ha sido importante consumidora de semillas en agroecosistemas (Saks y Carroll 1980; Torres 1984) y ha sido propuesta para el manejo de malezas en este cultivo en particular (Reagan 1986). La acción de esta especie podría ser un punto de especial interés y en el que valdría la pena profundizar en estudios futuros ya que se ha encontrado una relación significativa de asociación negativa entre *P. fulva* y *S. geminata* (Vargas 2002).

El agrupamiento por abundancia relativa muestra que los cañaduzales tienen una tendencia a agruparse de acuerdo con el manejo que se les da. En el centro del cluster están todos los cañaduzales que presentan un manejo convencional y en transición y en otro grupo están las que presentan un manejo orgánico; esto podría significar que la mayor presencia de ciertas especies o dominancia como la de *Wasmannia auropunctata*, *S. geminata* y *Solenopsis* sp. 1 podría estar influenciando el parentesco entre los cañaduzales.

Comparando los sitios con la composición de especies se encontró que la forma de agruparse es diferente ya que los cañaduzales de la reserva y de la hacienda Roma están en un grupo y los cañaduzales de las haciendas El Medio y San Julián se encuentran en otro grupo; esto puede deberse al efecto local que ejerce cada uno de los sitios. En este caso la riqueza del bosque y el gradual Hatico es mayor a la de los bosques San Julián y El Medio, lo que muestra la dinámica; es decir, el intercambio biótico que existe entre la matriz y los parches de bosque (Armbrrecht 1996; Ramírez y Enríquez 2002). Pero por otro lado la caña podría también estar jugando el papel de fuente para unas especies y sumidero para otras, haciendo posible el aprovechamiento de los recursos de uno u otro lado por parte de las especies de hormigas habitantes. Y una matriz con hábitats muy degradados puede estar poniendo en peligro de extinción las especies del bosque (Perfecto y Vandermeer 2001), por que a pesar de que dos biotopos adyacentes sean muy diferentes entre sí, éstos no se encuentran completamente aislados (Doak y Mills 1994).

Al observar la comparación por rangos de medias entre los cañaduzales se puede pensar que hay un efecto regional (Perfecto y Vandermeer 2001), ya que en los cañaduzales de la hacienda Roma se presenta una riqueza superior a las del Medio y San Julián. Esto posiblemente puede deberse a que estos cañaduzales están rodeados de lotes que están en una transición del manejo convencional al manejo orgánico y segundo al mosaico de El Hatico que cuenta una variedad de biotopos además del bosque y la caña como son potreros arbolados, zonas de frutales, áreas en regeneración y corredores biológicos. Esto puede estar creando refugios temporales para anidar, reproducirse y colonizar áreas adyacentes. Contrario a lo que pasa

en el área donde se encuentra el bosque y la caña San Julián que en el momento de estudio era una zona con una matriz de potreros muy degradada.

Conclusiones

- La riqueza de hormigas de los cañaduzales varía de acuerdo con el contexto local y regional en que se encuentra cada una de ellas ya que el flujo de especies entre los cañaduzales y sus sitios vecinos así como entre localidades pueden estar jugando un papel fundamental en el mantenimiento de la diversidad de hormigas en éstos.

- A nivel local, el manejo que recibe cada cañaduzal es importante ya que prácticas como la acumulación de hojarasca, la eliminación de quemados e insumos químicos pueden favorecer la riqueza de las comunidades de hormigas por la disposición de alimento y sitios para anidar.

- A nivel regional, la diversificación de un área en particular como el caso de El Hatico es de gran importancia ya que puede crear refugios temporales para las hormigas y actuar como un corredor biológico para colonizar áreas adyacentes. Por otro lado, el grado de un área puede influir sobre la riqueza de un cañaduzal como es el caso del Medio y San Julián.

- Una parte de las especies de la comunidad puede cambiar (posiblemente en forma cíclica) a lo largo del tiempo debido posiblemente a la estacionalidad de un recurso o condición dada, para que éstas se queden en un lugar determinado o emigren hacia otros hábitats. Esto da una idea de que puede existir una dinámica a través del tiempo y el espacio. En este análisis se encontró que las comunidades de hormigas del bosque El Hatico se conservan de una manera más o menos estable en el tiempo, permitiendo así hacer comparaciones de los cañaduzales y sus sitios vecinos en dos épocas diferentes.

- Sería útil abordar estudios sobre las comunidades de hormigas, principalmente de aquellas especies que sean conspicuas en un cañaduzal determinado y precisar como éstas traslapan sus nichos con otros depredadores con el fin de dilucidar el papel que ellas tienen dentro de un complejo de enemigos naturales, lo cual sería interesante para implementar programas de control biológico en el año 2005 cuando comienza el sistema de producción de cosecha en verde.

- Por último, dada la gran importancia paisajística de la caña de azúcar como monocultivo dominante en el valle geográfico del río Cauca y con base en los datos de este estudio se recomienda la diversificación del paisaje y protección de la cuenca del río Cauca, así como la protección de vegetación nativa como guaduales y bosque tanto para proteger la fauna relictual del bosque seco como para prevenir invasiones de la hormiga loca a cañaduzales no infestados aún.

Agradecimientos

A Patricia Chacón, Philip Silverstone, Enrique Murqueitío y Enrique Molina las autoras agradecen su valiosa colaboración. A los dueños de las haciendas en especial a la familia Molina Durán de El Hatico por permitir la realización de las investigaciones. Los estudios fueron financiados por el Programa de Becas para la conservación, WCS/GEA/FES/ FEN, Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología Banco de la República y la Universidad del Valle.

Literatura citada

- ALDANA, R. C.; BAENA, M. L.; CHACÓN DE ULLOA, P. 1995. Introducción de la hormiga loca (*Paratrechina fulva*) a la reserva natural laguna de Sonso (Valle del Cauca, Colombia). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 3 (1): 15-28.
- ARIAS, J. 1994. Evaluación exploratoria del comportamiento de la materia orgánica por prácticas de quemas en molisoles del Valle del Cauca. Tesis de Postgrado en suelos y aguas. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Valle.
- ARMBRECHT, I. 1995. Comparación de la mirmecofauna en fragmentos boscosos del valle geográfico del río Cauca, Colombia. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 3 (2): 1-10.
- ARMBRECHT, I. 1996. Análisis de la diversidad del ensamblaje de hormigas en fragmentos de bosque seco en el Valle del Cauca, Colombia. Tesis de Magíster en Biología, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Cali. 120 p.
- ARMBRECHT, I.; ULLOA-CHACÓN, P. 1999. Raza y diversidad de hormigas en fragmentos de bosque seco colombiano y sus matrices. Biotropica 31 (4): 646-653.
- BOLTON, B. 1994. Identification guide to the ant genera of the world. Harvard University press. Cambridge, Massachusetts. 222 p.
- CENICAÑA. 1997. Carta Trimestral. Julio-Septiembre Cali, Colombia. Año 19 No. 1.
- COCK, J. H.; TORRES, J. S. 1998. Desarrollo de un Sistema de Producción Tropical para Caña Verde. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA. Cali, Colombia. 14 p.
- COLWELL, R. K. 1997. EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. Versión 5. User's Guide and application published at: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 345: 101-118.
- DELGADILLO, O. L.; MOLINA, E. J.; MOLINA, C. H.; MOLINA C. H.; MOLINA, J. P. 1994. Evaluación de características químicas, físicas y biológicas del suelo bajo cultivo de caña de azúcar manejado con y sin quema en el municipio de El Cerrito, Valle del Cauca. Informe de pasantía de la Universidad del Tolima. Colombia.
- DOAK, D. F.; MILLS, L. S. 1994. A useful role for theory in conservation. Ecology 75 (3): 615-626.
- ESPINAL, L. S. 1968. Visión ecológica del Departamento del Valle del Cauca. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 32 p.
- FOLGARAIT, P.J. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. Biodiversity Conservation 7: 1221-1244.
- GÓMEZ, L. A.; LASTRA L. A. 1997. Avances en el manejo de la hormiga loca *Paratrechina fulva* (Hymenoptera: Formicidae) en el cultivo de la caña de azúcar. Memorias. IV Congreso colombiano de la Asociación de Técnicos de la Caña de Azúcar. p. 121-131. Cali.
- GUTIÉRREZ, Y.; DE PULIDO, C. L.; LASTRA, L. A.; GÓMEZ, L. A. 1996. Reconocimiento de hormigas predatoras que afectan la liberación de *T. exigum* para el control de *Diatraea* spp. en caña de azúcar. Resúmenes. XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 53 p. Cartagena.
- GUARDIOLA, J. 1995. Avances tecnológicos entre 1950 y 1980. En: El Cultivo de la Caña en la Zona Azucarera de Colombia. p. 9-21. Cassalet, D.; Torres J.; Echeverry C.I. (eds.). Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA, Cali, Colombia. 412 p.
- HERNÁNDEZ, C. P.; MARTÍNEZ, Y. C.; INSUASTY, O.; GÓMEZ, L. A.; CAMACHO, J. A.; MANRIQUE, R. 2002. Efecto del control de malezas y la fertilización nitrogenada sobre la población de hormiga loca, *Paratrechina fulva* (Hymenoptera: Formicidae). Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 83-90.
- HOLLOBLER, B.; WILSON, E. 1990. The ants. Harvard University Press. USA. 732 p.
- JAFFE, K.; LATTKE, J.; PÉREZ, E. 1993. El mundo de las hormigas. Equinoccio Ediciones. Universidad Simón Bolívar, Venezuela. 196 p.
- LASTRA, L.; GÓMEZ, L. A. 1996. Reconocimiento de hormigas predatoras que afectan la liberación de *T. exigum* para el control de *Diatraea* spp. en caña de azúcar. Informe trimestral Septiembre - Julio. CENICAÑA 89 p.
- LONG, W. H.; NELSON, L. D.; TEMPLET, P. J.; VIATOR, C. P. 1987. Abundance of foraging ant predators of the soil and other factors. Journal American Society Sugar Cane Technologist 7: 5-14.
- Mc KAMEY, S. H. 1999. Biodiversity of tropical homoptera with the first data from Africa. American Entomologist 45: 213-221.
- MOLINA, E. J.; MOLINA, C. H.; MOLINA C. H.; MOLINA, J. P. 2000. Estudio de caso sobre el manejo convencional y agroecológico del cultivo de la caña de azúcar en el Valle del Cauca, Colombia. <http://www.cipav.org.co/cipav/new/ejmolina/index.html>. Enero 7, 2003.
- NARANJO, L. G. 1992. Estructura de la avifauna en un área ganadera en el Valle del Cauca, Colombia. Calsasia 17: 55-66.
- PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. 1996. Microclimatic changes and the direct loss of ant diversity in a tropical agroecosystems. Oecologia 108: 577-582.
- PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. 2001. Quality of agroecological matrix in a tropical montane landscape: ants in coffee plantations in southern México. Conservation Biology 16 (1): 174-182.
- RAMÍREZ, M.; ENRIQUEZ, M. 2002. Estudio de las comunidades de hormigas en un mosaico de hábitats agroforestales en la Reserva Natural El Hatico. Informe final. Banco de la República. 70 p.
- REAGAN, T. 1986. Beneficial aspects of the imported fire ant: a field ecology approach. En: Fire Ants and Leaf-Cutting Ants. Boulder/London: Westview. p. 58-71.
- ROTH, D.; PERFECTO, I.; RATHCKE, B. 1994. The effects of management systems on ground - foraging ant diversity in Costa Rica. Ecological Applications 4 (3): 423-436.
- SAKS, M. E.; CARROLL, C. R. 1980. Ant foraging activity in tropical agroecosystems. Agro-Ecosystems 6: 177-188.
- STATISTIX for windows. 1998. Version 2. Analytical Software.
- STATSOFT. 1995. CSS: Statistica handbook. Vol.II. Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma.
- TORRES, J. A. 1984. Niches and Coexistence of Ant communities in Puerto Rico: Repeated patterns. Biotropica 16 (4): 284-295.
- UNIVERSIDAD DE LA SALLE; CENICAÑA. 1991. Evaluación de la contaminación ambiental producida por la quema de la caña de azúcar y el manejo de la agroindustria. Cali, Colombia.
- VARGAS, A. G. 2002. Reconocimiento de enemigos naturales de la hormiga loca, *Paratrechina fulva* Mayr (Hymenoptera: Formicidae) en el Valle geográfico del río Cauca. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Palmira, Facultad Ciencia Agropecuarias, Palmira. 113 p.
- VÉLEZ, R. 1985. Notas sinópticas de entomología económica colombiana. Secretaría de agricultura de Antioquia. p. 189-193.
- ZAR, J. 1996. Biostatistical analysis. Tercera edición. Prentice Hall, New Jersey.

Recibido: May. 12/2003

Aceptado: Ago. 19/2003

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES (ver en página electrónica www.socolen.com.co)

La Revista Colombiana de Entomología es el órgano oficial de divulgación científica de la Sociedad Colombiana de Entomología -SOCOLEN- y como tal publica de preferencia artículos científicos, inéditos, basados en resultados de investigaciones en el campo de la entomología o campos afines. Ocasionalmente publica artículos técnicos de naturaleza diferente que no presentan prueba de hipótesis, por ejemplo, descripción de métodos, descripción de especies, notas taxonómicas, notas cortas y revisiones de literatura pero que sean relevantes en el campo de la ciencia entomológica.

La aceptación de los trabajos para su publicación dependerá de la evaluación de los profesionales que conforman el Comité Editorial de la Revista.

Los artículos se deben enviar en original y (2) dos copias en papel, a la secretaría de SOCOLEN. Una vez el trabajo haya sido aceptado para su publicación, se solicitará el correspondiente disquete con la versión final corregida. El trabajo debe venir escrito en Word, las tablas en Excel y las figuras en un programa corriente para que el trabajo de edición sea más rápido. En el disquete se deben indicar los programas de computador empleados.

El manuscrito debe venir impreso en papel tamaño carta, con márgenes de 2.5 cm en todos los lados, páginas numeradas y escrito a espacio y medio en Arial 11 puntos. El trabajo puede tener una extensión máxima de 25 páginas, incluidas figuras, tablas y bibliografía. El lenguaje utilizado debe ser claro y preciso, y las tablas y figuras seleccionadas deben ser bien elaboradas, de alta calidad y aportar información valiosa e ilustrativa para el artículo y no ser redundantes con la información dada en el texto o entre ellas mismas.

Estructura del artículo

Título: Debe ser corto pero ilustrativo, sin exceder de 15 palabras; si ello no es posible se deberá incluir un subtítulo. Además, deben incluirse una traducción del título al inglés y un título breve para los encabezados de página.

Autores: Se deben escribir los nombres completos. Los autores deben ir en orden de acuerdo con la importancia de contribución a la investigación o en la preparación del artículo y no en orden alfabético o de rango. En nota de pie de página se indicarán respectivamente los títulos académicos, la institución a la cual pertenecen, la dirección postal y electrónica.

Resumen: Debe ser conciso y obtener información sobre: la justificación, objetivos, metodología y resultados completos de la investigación. Además, debe indicar los límites de la validez e implicaciones de los resultados. No debe exceder de 250 palabras escritas en un solo párrafo.

Summary: Debe ser una traducción fiel al inglés del resumen.

Palabras clave: Al final del resumen se debe colocar una lista de palabras del artículo, diferentes de las incluidas en el título, que faciliten el uso de los sistemas modernos de catalogación y búsqueda de información por computador. Igualmente, al final del summary se deben incluir las key words.

Capítulos: Cada artículo debe constar principalmente de los siguientes capítulos: Introducción; Materiales y Métodos; Resultados y Discusión (la Discusión puede ir como capítulo aparte); Conclusiones; Agradecimientos y Literatura citada. Si es necesario se pueden incluir subtítulos dentro de los capítulos principales.

Tablas: Las tablas deben estar citadas en el texto. Se deben presentar en páginas separadas. El título debe ir en la parte superior de la tabla. Notas de pie de página sólo se deben utilizar en las tablas.

Figuras: Fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben presentarse en páginas separadas con su correspondiente leyenda en la parte inferior. Se aceptan figuras elaboradas en computador sólo cuando éstas sean impresas con características de alta calidad, en impresora láser. Si no es posible, las figuras deben venir muy bien elaboradas en tinta china y en papel pergamino. Las fotografías se aceptarán en blanco y negro y en papel brillante. Cada ilustración debe venir acompañada de su crédito respectivo. La información que se presenta en las gráficas no debe ser repetición de la presentada en las tablas.

Citas bibliográficas: Solamente se aceptan referencias publicadas, citando el apellido del autor seguido del año de publicación entre paréntesis. Ej.: Rodríguez (1993). Cuando los autores sean tres o más debe usar la expresión latina *et al.* Ej.: López *et al.* (1993). Si la cita se coloca al final de una frase se usa autor y fecha entre paréntesis Ej.: (Rodríguez 1993) o (López *et al.* 1993).

Literatura citada: Se debe presentar en orden alfabético y cronológicamente. La referencia de un artículo en una publicación periódica debe contener los siguientes elementos: Autor = Apellido en mayúsculas (coma) Iniciales del nombre separadas por punto. Año de publicación. Título del artículo. Nombre completo de la revista. Cuando la revista no sea conocida se debe indicar el país de origen entre paréntesis. Volumen (número) Número (entre paréntesis) páginas desde hasta (indicadas por dos puntos). Ejemplo: POSADA, F. J. 1992. Ciclo de vida, consumo foliar y daños en fruto de melón por *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Piralidae). Revista Colombiana de Entomología 18 (1): 26-31.

Si la referencia tiene más de un autor, éstos se separan por punto y coma (;).

La referencia de un libro debe incluir: Autor(es) en mayúsculas y separados por punto y coma. Año de publicación. Título. Editorial o entidad responsable de la publicación, lugar de impresión, páginas.

Ejemplo: GÓMEZ-ARISTIZÁBAL, A.; RIVERA-POSADA, H. 1987. Descripción de malezas en plantaciones de café. CENICAFÉ, Chinchiná (Colombia), 481 p.

Estilo: Se debe escribir en un estilo impersonal, utilizando abreviaturas de uso común y el sistema métrico decimal o internacional.

Artículos técnicos: Se aceptan para ser publicados en la revista cuando sean importantes en la ciencia de la Entomología. Deben seguir, en términos generales, las normas aquí establecidas para los artículos científicos con las modificaciones apropiadas para este tipo de trabajos.

Separatas: Por cada uno de los artículos publicados se entregarán 15 separatas en forma gratuita al autor. Copias adicionales pueden ser ordenadas a los precios vigentes al momento de impresión, para lo cual el autor deberá hacerlo saber cuando reciba la confirmación de aceptación de su artículo para la publicación.

Correos
de Colombia



CAMBIAMOS PARA SERVIRLE MEJOR A
COLOMBIA Y AL MUNDO

ESTOS SON NUESTROS SERVICIOS
VENTA DE PRODUCTOS POR CORREO
SERVICIO DE CORREO NORMAL
CORREO INTERNACIONAL
CORREO PROMOCIONAL
CORREO CERTIFICADO
E.M.S. INTERNACIONAL
SERVICIO POST EXPRESS
RESPUESTA PAGADA
ENCOMIENDAS
FILATELIA
CORRA
FAX

Lo atendemos en los Nos.
4 29 73 20 - 3 34 03 04
980015503 - Fax 2 43 89 62

Visite nuestra página web
www.adpostal.gov.co

Contenido

•••••

Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodida): uso de activadores de patogenicidad <i>Karim Raymond C., Fabiola Rojas B., Efraín Benavides O., Alba Marina Cotes, Laura Villamizar, Vanía Ronderos J., Paola García M.</i>	1
Hongos asociados con termitas y termiteros en plantaciones de eucalipto <i>Ana Isabel Gutiérrez G., Yamillé Saldarriaga O., Sandra Uribe S., Fabio Pineda G.</i>	7
Transformación de <i>Beauveria bassiana</i> cepa Bb9112 con los genes de la proteína verde fluorescente y la proteasa pr1A de <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Carmenza E. Góngora B.</i>	15
Compatibilidad del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> con triflumuron <i>Carmen A. Vásquez P., Yamillé Saldarriaga O., Fabio Pineda</i>	23
Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de <i>Aleurotrachelus socialis</i> (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero <i>Irina Aleán C., Anuar Morales R., Claudia María Holguín A., Anthony C. Bellotti</i>	29
Efecto de la aplicación de insecticidas químicos en el control de la mosca blanca <i>Aleurotrachelus socialis</i> (Homoptera: Aleyrodidae) en el cultivo de yuca <i>Manihot esculenta</i> Crantz <i>Claudia María Holguín A., Anthony C. Bellotti</i>	37
Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de <i>Metarhizium anisopliae</i> para el control de <i>Ancognatha scarabaeoides</i> (Coleoptera: Melolonthidae) <i>Paula Mariño, Laura Villamizar, Carlos Espinel, Alba Marina Cotes</i>	43
Unión de proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> con vesículas de las microvellosidades del tracto digestivo del gusano blanco de la papa <i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae) <i>Wilson Martínez O., Jairo Cerón S.</i>	51
Dinámica de la captura de <i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae) y la polilla guatemalteca <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) en trampas con diferentes tipos de atrayentes en un cultivo de papa criolla (<i>Solanum phureja</i>) <i>Julio Ricardo Galindo P., Jeannette Amparo Español A.</i>	57
Análisis electroforético de las relaciones evolutivas en las especies de <i>Drosophila</i> (Diptera: Drosophilidae) del enjambre <i>martensis</i>: <i>D. martensis</i>, <i>D. starmeri</i> y <i>D. uniseta</i> <i>Marina Ordóñez, Angélica Arenas, Luz Ángela Betancourt, María Magdalena de Polanco</i>	65
Captura de <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) en trampas cebadas con su feromona sexual <i>Jorge Salas</i>	75
Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática de <i>Serratia marcescens</i> contra <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) <i>Carlos Felipe Bosa O., Alba Marina Cotes</i>	79
Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad entomopatógena de <i>Serratia marcescens</i> contra <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) <i>Carlos Felipe Bosa O., Alba Marina Cotes</i>	87
Evaluación de aislamientos nativos de <i>Nomuraea rileyi</i> para el control de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) <i>Carlos Felipe Bosa O., Dora Chávez, Lissette Torres, Alejandro París, Laura Villamizar, Alba Marina Cotes</i>	93
Desarrollo de preformulados a base de <i>Nomuraea rileyi</i> para el control de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) <i>Laura Villamizar, Carolina Arriero, Carlos Felipe Bosa O., Alba Marina Cotes</i>	99
Evaluación de la eficiencia de <i>Trichogramma lopezandinensis</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el control de <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada <i>Silvia Alejandra Rubio C., Blanca Irene Vargas A., Aristóbulo López-Ávila</i>	107
Importancia del manejo agrícola para la biodiversidad: caso de las hormigas en caña de azúcar. <i>Mónica Ramírez R., Inge Armbrrecht P., Martha Lucía Enríquez L.</i>	115