

Patogenicidad de hongos Hyphomycetes sobre *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) chinche subterránea de la yuca¹

.....

Pathogenicity of Fungi Hyphomycetes on *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) cassava burrowing bug

.....

David Sánchez S.²
Anthony C. Bellotti³

Resumen

En bioensayos de laboratorio se evaluaron suspensiones de conidias de los hongos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil; *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin y *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre adultos de *Cyrtomenus bergi*; (Hemiptera: Cydnidae), combinados con tres sustratos y dos métodos de inoculación; los insectos del tratamiento testigo se inocularon con agua destilada estéril, más Tween 40 al 0.1%. Con respecto a la mortalidad se encontraron diferencias significativas de $X^2=11.9$; $p \leq 0.01$ y de $X^2=6.39$; $p \leq 0.05$ entre las especies de hongos utilizados y el método de inoculación, respectivamente. La especie *M. anisopliae* fue la más virulenta y el método de inoculación, más efectivo correspondió al de contacto tarsal; el papel filtro húmedo se escogió como sustrato para futuros experimentos. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a la susceptibilidad entre ninfas y adultos. Las ninfas fueron más susceptibles a *M. anisopliae* que los adultos. Se escogió el quinto instar para evaluar trece aislamientos de *M. anisopliae*, de los cuales los más promisorios fueron el 9206, 9236 y el 9501 con mortalidades del 62, 84 y 70%, respectivamente. El aislamiento 9236 mostró mayor control de los insectos tratados; con éste se determinó la LD_{50} de 1.19×10^8 conidias viables ml^{-1} , con límites de confianza entre 5.91×10^3 y 3.36×10^9 y tiempo letal

entre 4.7 y 8 días. Otra metodología consistió en utilizar suelo esterilizado como sustrato tratado con los tres mejores aislamientos en formulación granulada, se detectó que el aislamiento 9206 fue superior a los aislamientos 9236 y 9501 con niveles de control de 63.9, 57.2, y 54.5%, respectivamente. Se destaca el aislamiento 9206 porque fue el más efectivo en el hábitat de la chinche.

Palabras claves: Hongos entomopatógenos, Control biológico, Bioensayo, *Cyrtomenus bergi*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

Summary

Suspensions of conidia from the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* Sorok and *Paecilomyces lilacinus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) were evaluated in experiments with three media and two inoculation methods under laboratory conditions on adults of *Cyrtomenus bergi*. The insects of the control treatment were inoculated with sterilized distilled water plus tween 40 at 0.1%. Regarding the mortality, significant differences of $X^2=11.9$; $p \leq 0.01$ and $X^2=6.39$; $p \leq 0.05$ were found between the species of fungus used and the inoculation method respectively. *M. anisopliae* was chosen as the most effective control agent and the most effective inoculation method corresponded to tarsal contact; the moist filter paper was chosen as the media for future experiments. Significant differences in mortality ($p \leq 0.05$) were found regarding the susceptibility between the nymphs and adults; nymphs were more susceptible than the adults to *M. anisopliae*. The fifth instar was chosen to evaluate thirteen isolates of *M. anisopliae*, of which the most promising were 9206, 9236 and 9501 with mortality of 62, 84 and 70% respectively. The isolate 9236 showed greater

control, and the LD_{50} was determined as 1.19×10^8 viable conidia ml^{-1} with confidence limits between 5.91×10^3 and 3.36×10^9 between 4.7 and 8 days. Through another methodology in which sterilized soil was used as medium and the three best isolates in granulated formulation, it was detected that the isolate "9206" was superior to the isolates "9236" and "9501" with control levels of 63.9, 57.2, and 54.5% respectively. The isolate "9206" was the most effective within the habitat of the burrowing bug.

Key words: Fungi entomopathogenus; Biological control, Bioassay, *Cyrtomenus bergi*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

Introducción

Cyrtomenus bergi Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) es un insecto que se encuentra ampliamente distribuido en América Latina, afectando diferentes cultivos. En Colombia se registró como plaga en el cultivo de yuca, a mediados de 1980, alimentándose de la raíz de la planta. El daño se caracteriza por la degradación de los tejidos araderdor de cada una de las lesiones causadas por el insecto (García 1982). *C. bergi* no ocasiona disminución del rendimiento; su daño reduce considerablemente el valor comercial del cultivo, por su efecto sobre la apariencia del producto y decrecimiento del contenido de almidón (Castaño *et al.* 1985). En el CIAT se han realizado estudios básicos sobre este insecto tales como la biología y comportamiento (García 1982), fluctuación poblacional (Riis 1990), ensayos de control botánico con la leguminosa *Crotalaria juncea* (Castaño *et al.* 1985), de control químico (Vargas *et al.* 1986) y de control biológico del insecto con nemátodos parásitos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Caicedo 1993; Barberena 1996). Hasta el momento estos controles no han sido implementados por no ajustarse a las exigencias sociales y ambientales. García (1982) encontró a la especie *C. bergi* parasitados por el hongo *Metarhizium* sp., en las colonias establecidas en el laboratorio. En Colombia, *M. anisopliae* se ha registrado parasitando 24 especies de insectos de 12 familias de los órdenes Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera y Hemiptera (Hernández y Rodríguez 1992). Los hongos entomopatógenos se presentan como una alternativa de control natural de la chinche subterránea. Teniendo en cuenta que hasta el momento ningún tipo de estudio se había realizado para evaluar la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre este insecto, se propuso desarrollar una metodología para evaluar la patogenicidad de hongos entomopatógenos de la clase Hyphomycetes sobre *C. bergi*; determinar el estado biológico de la chinche más susceptible al patógeno; seleccionar en-

1 Tesis de grado del primer autor.

2 Ingeniero Agrónomo, Investigador Visitante, Entomología de Yuca, CIAT, A.A. 6713, Cali, Colombia.

3 Ingeniero Agrónomo, Entomólogo, Ph.D., Investigador Principal, Entomología de Yuca, A.A. 6713, Cali, Colombia.

tre aislamientos de *M. anisopliae* y determinar la DL_{50} , en condiciones de laboratorio.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en el laboratorio de Manejo Integrado de plagas en Yuca del CIAT Palmira, a una temperatura promedio de 23° C y 65% de HR. Los especímenes *C. bergi* se tomaron de la colonia del laboratorio, establecida en bandejas plásticas cuyo sustrato consta de suelo estéril al 20% de humedad. Se usaron doce aislamientos de *M. anisopliae* y uno de *B. bassiana* provenientes de diferentes hospederos y zonas colombianas, cedidos por CENICAFE. El aislamiento nativo de *M. anisopliae* fue obtenido directamente de *C. bergi*. El aislamiento de *P. lilacinus* fue cedido por CORPOICA Palmira (Tabla 1). Los aislamientos se multiplicaron en medio nutritivo artificial compuesto de Sabouraud destrosa agar + extracto de levadura al 0.1% SDAY; los cuales crecieron a temperatura ambiente por 20 días; una vez esporulados se cosecharon las conidias de cada aislamiento en 20 ml de agua destilada estéril + Tween 40 al 0.1% (ADET). Mediante pruebas de germinación se determinó la viabilidad de las conidias con la metodología propuesta por Dillon y Charnley (1990), los cuales definieron la conidia germinada como aquella que produce un tubo germinal igual o mayor al tamaño de la conidia, la cual fue adoptada para este ensayo.

Determinación de metodología: Se utilizó la metodología propuesta por González *et al.* (1993), en un bioensayo para determinar patogenicidad de *B. bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, mediante la cual se evaluaron tres aislamientos de las especies *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. lilacinus* sobre *C. bergi*. Los insectos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos y sometidos a "cuarentena" en cajas de petri, papel filtro húmedo con ADE y semillas de maní durante diez días. Se probaron tres sustratos constituidos por papel filtro humedecido con ADE, suelo esterilizado y no esterilizado traído de Santander de Quilichao, donde el insecto es considerado plaga en cultivos de yuca. El inóculo se utilizó en formulación líquida de conidias en ADET a una concentración de 1×10^8 conidias ml^{-1} . Se utilizaron dos métodos de inoculación, uno de los cuales fue el de contacto tarsal el cual consistió en dejar que los insectos caminaran sobre una superficie inoculada por un tiempo de 2,5 minutos; la superficie estuvo representada por una caja de petri y el inóculo por 500 microlitros de la suspensión del hongo. Otro método consistió en aplicar el mismo volumen de inóculo en los sustratos antes mencionados. La combinación de las especies de hongos, métodos de inoculación y sustratos representaron los tratamientos, y en cada uno

se evaluaron 10 especímenes individualizados en viales para un total de 200 especímenes. Los insectos del tratamiento testigo se inocularon con ADET en los sustratos papel filtro y suelo estéril. Las variables medidas después de la inoculación fueron día de muerte y esporulación del hongo sobre el insecto muerto.

Estado biológico más susceptible: La susceptibilidad de los seis estados biológicos de la chinche fue evaluada con el aislamiento de *M. anisopliae* nativo de *C. bergi*; los insectos se inocularon con suspensión de 1×10^{10} conidias viables ml^{-1} , esta concentración se consiguió mediante centrifugación por 10 minutos a 6000 rpm (Moorhouse *et al.* 1992). De cada uno de los estados biológicos de la chinche se inocularon 20 insectos los cuales representaron una repetición; el testigo fue inoculado con ADET. Se realizaron cuatro repeticiones en el tiempo, para un total de 960 especímenes evaluados.

Selección entre aislamientos de *M. anisopliae*: El primer bioensayo se realizó sobre chinches de quinto instar, en el cual se evaluaron trece aislamientos colombianos de *M. anisopliae* sin reactivar, incluido el aislamiento nativo obtenido de *C. bergi*. Los 14 tratamientos estuvieron representados por los trece aislamientos del hongo y el tratamiento testigo; con cuatro repeticiones. En cada repetición se evaluaron 20 insectos para un total de 1120 especímenes.

Un segundo bioensayo de selección se realizó con los aislamientos de *M. anisopliae* 9206; 9236 y 9501 seleccionados en el bioensayo anterior, los cuales fueron masificados en arroz precocido en bolsas plásticas autoclavables (Londoño y Aterhortua 1995; Hernández y Rodríguez 1992). La producción de conidias en cada aislamiento se determinó por gramo de arroz esporulado. Para la selección entre aislamientos se utilizaron dos metodologías, una de las

Tabla 1. Origen de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*.

Código patógeno	Hospedero original	Localidad
<i>M. anisopliae</i> *		
9001	Desconocido	CIMIC
9004	Chisas (COLEOP:Scarabaeidae)	Antioquia
9108	<i>Cargdia arana</i> (LEPID:Geometridae)	Caldas
9206	<i>Aenolamia reducta</i> (HOMOP:Cercopidae)	ICA Carimagua
9207	<i>Mocis</i> sp. (LEPID:Noctuidae)	Carimagua
9211	<i>Zulia colombiana</i> (HOMOP:Cercopidae)	S. Quilichao
9236	Desconocido	Colombia
9237	<i>Plectris</i> sp. (COLEOP:Scarabaeidae)	Colombia
9301	<i>Ancognatha scarabaeidae</i> (COLEOP: Scarabaeidae)	Antioquia
9303	<i>Hypothenemus hampei</i> (COLEOP:Scolytidae)	Antioquia
9304	<i>Cosmopolites sordidos</i> (COLEOP: Curculionidae)	Colombia
9401	Desconocido	Colombia
9501	<i>Cyrtomenus bergi</i> (HEMIP:Cydnidae)	CIAT Palmira
<i>B. bassiana</i> *		
9002	<i>Hypothenemus hampei</i> (COLEOP:Scolytidae)	Caldas
<i>P. lilacinus</i> ¹		
9502	Desconocido	ICA Palmira

* Aislamientos cedidos gentilmente por CENICAFE.

¹ Aislamiento cedido gentilmente por CORPOICA.

cuales correspondió a la del bioensayo anterior, bajo los mismos parámetros. La otra consistió en evaluar la formulación granulada del hongo en arroz, en cajas plásticas de 25x32x10 cm con tapa, en las cuales se depositó 1 Kg de suelo de Santander de Quilichao, tamizado, esterilizado con vapor de agua y secado al horno a 90°C por 72 horas. De cada aislamiento se pesaron 50 gramos de arroz esporulado, mezclado con el suelo. A cada bandeja se le adicionaron 300 ml de ADE quedando el suelo con una humedad aproximada del 30% la cual se corrigió semanalmente. En cada bandeja se colocaron 20 insectos de cada estado biológico de *C. bergi* previamente encuarentenados, para un total de 120 insectos por caja que representaron la población inicial. Los tratamientos estuvieron identificados por los aislamientos 9236; 9206; 9501 y el testigo con cinco repeticiones distribuidas en bloques completos al azar. A los 30 días se evaluó, contando los insectos vivos de III, IV, V instar y el estado adulto. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza.

Dosis letal media: Se evaluó el efecto de doce concentraciones de conidias del aislamiento 9236 cuyo logaritmo en base 10 fue desde 1 hasta 11; y el tratamiento testigo se tomó como concentración cero. Cada concentración representó un tratamiento en el cual se evaluaron 20 chinches de V instar; con cuatro repeticiones para un total de 960 insectos de todos los tratamientos. Los datos obtenidos en las evaluaciones fueron sometidos a un análisis Probit para calcular DL_{50} .

Resultados y Discusión

Todos los aislamientos presentaron porcentajes de germinación superiores al 92%, por lo cual se confirmó que el inóculo utilizado en el bioensayo fue viable y cumplió con los requisitos de calidad sugeridos por Bernal *et al.* (1994) donde el inóculo de *M. anisopliae* debe cumplir como mínimo 70% de germinación en medios nutritivos, a las 24 horas.

Determinación de la metodología: Se detectaron diferencias significativas en la variable "especies de hongo utilizadas" con respecto a la mortalidad ($X^2=11.9$, $gl=3$, $p \leq 0.01$) entre los insectos tratados y el tratamiento testigo. La mortalidad total promedio de la población tratada con las diferentes cepas fue del 20%, distribuidas en cada especie de la siguiente manera: *M. anisopliae* 47.5%; *B. bassiana* 35%; *P. lilacinus* 12.5% y el tratamiento testigo 5%. No se detectaron diferencias estadísticas significativas con respecto a los diferentes sustratos usados; el análisis de la variable "método de inoculación" mostró diferencias significativas, con probabilidades de $X^2=6.39$; $gl=2$; $p \leq 0.05$. La mortalidad total del 20% se distribuyó de

la siguiente manera: Inoculación por contacto tarsal 12.5%; inoculación al sustrato 6.5%; contra el testigo que registró el 1%. En la figura 1 se observan manchas negras sobre el integumento de los insectos muertos coincidiendo con lo observado por Lacht (1976) en bioensayos con *M. anisopliae* sobre *Oryctes rhinocerus*; además de un insecto muerto con esporulación superficial verde que concuerda con observaciones de Alves (1986) y Hernández y Rodríguez (1992). Los insectos muertos por *B. bassiana* presentaron poca esporulación y los muertos por *P. lilacinus* no esporularon. Esto demuestra la especificidad de *M. anisopliae* con respecto a *C. bergi* bajo las condiciones anteriormen-

te descritas, y la capacidad de formar epizotias como registraron Roberts y Humber (1983) en aislamientos que desarrollaron abundante esporulación sobre otros insectos.

Estado biológico más susceptible: El análisis estadístico mostró significancia para la variable mortalidad de la chinche tratados con *M. anisopliae* y en todos los estados tratados y los no tratados. Los insectos muertos esporularon aproximadamente entre los 8 y los 12 días después de ser inoculados. Los resultados muestran dos grados definidos de susceptibilidad; el análisis no detectó diferencias significativas entre los estados inmaduros de la chinche, mientras que éstas

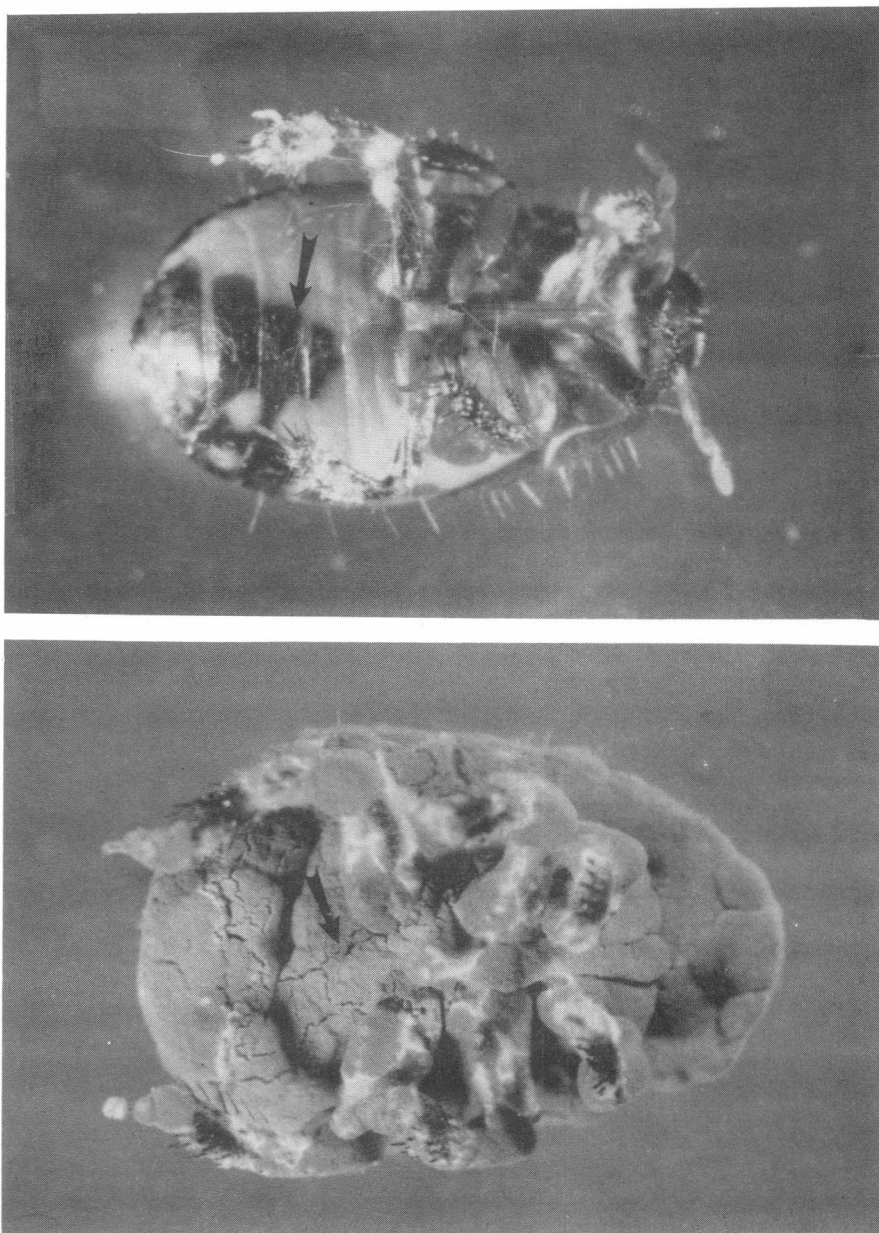


Figura 1. *Cyrtomenus bergi* F. afectado por *M. anisopliae*. Arriba sitio de penetración del hongo. Abajo insecto completamente esporulado. Fotografía Guillermo Guzmán, CIAT.

fueron significativas entre la susceptibilidad del estado adulto (mortalidad del 62,5%) y los estados inmaduros (mortalidad del 86 al 92%) (Tabla 2). La mayor susceptibilidad de los estados inmaduros se debió probablemente a que éstos insectos no han alcanzado su máxima quitinización y los requerimientos energéticos del hongo para ejercer presión mecánica y acción enzimática sobre la cutícula, deben ser menores que los que necesita para penetrar la cutícula del insecto adulto; a diferencia de lo concluido por Vestergaard *et al.* (1995), quienes mencionan que el estado adulto es el más susceptible por la afinidad entre el hongo y la constitución química bien definida de la quitina. Por otra parte, los insectos tienen el menor número de hemocitos en su hemolinfa, al iniciar o terminar el instar. El sistema inmunológico del insecto se encuentra debilitado; las observaciones registradas por Patton y Flint (1959) citados por Mullet (1979) mencionan el fenómeno en *Periplaneta americana* que presenta reducción del número de hemocitos en los períodos de pre y post muda. Por lo anterior, la acción tóxica de *M. anisopliae* puede aumentarse considerablemente durante los períodos de pre y post muda en ninfas de *C. bergi*. Los resultados de esta investigación muestran que es posible cortar el ciclo del insecto, reduciendo las futuras poblaciones de la chinche. Los valores de mortalidad natural de *C. bergi* se encontraron dentro de los límites registrados por Riis (1990) y se ajustaron a los publicados por González *et al.* (1993) y Vestergaard *et al.* (1995) sobre otros insectos (Tabla 2). Se eligieron ninfas de V instar para continuar la 2ª parte del estudio.

Selección entre aislamientos de *M. anisopliae*: En el primer bioensayo, se seleccionaron todos los aislamientos de *M. anisopliae* evaluados sobre *C. bergi*, por su patogenicidad contra el insecto determinado por mortalidades del 20 a 56,66%; a pesar de no encontrarse diferencias significativas al nivel de $p \leq 0.05$. Los criterios para seleccionar los mejores aislamientos se fundamentaron en los menores valores del coeficiente de variación y la media aritmética ($\geq 40\%$) de las mortalidades obtenidas con cada aislamiento (Tabla 3). Es necesario realizar previamente la selección de los aislamientos patogénicos contra un insecto plaga dentro de un programa de control biológico como fue sugerido por Bernal *et al.* (1994) y otros autores. Los resultados de este estudio corroboran dicha sugerencia debido a que se confirmaron diferentes grados de susceptibilidad de la chinche a los aislamientos evaluados; el criterio de estabilidad de la patogenicidad de los aislamientos de *M.*

anisopliae sobre un insecto hospedero nativo, se midió con el coeficiente de variación entre las repeticiones y fue importante para la selección de los aislamientos con patogenicidad semejante. A pesar de que existen registros sobre la alta efectividad patogénica de aislamientos de *M. anisopliae* sobre su insecto hospedero nativo (Farges y Robert 1976, 1978; Farges y Remaudière 1977 citados por Bernal *et al.* 1994), los resultados de este estudio al igual que los de Bernal *et al.* (1994) indican que no son tan específicos. La patogenicidad fue independiente del hospedero de origen y aparentemente el aislamiento de *M. anisopliae* nativo de *C. bergi* fue el mejor; sin embargo, con este hongo se obtuvo un mayor coeficiente de variabilidad entre repeticiones; posiblemente una de las causas de esta variabilidad está relacionada con la heterocariosis de la

especie citada por Alves (1986) quien propuso que dicha recombinación genética influye sobre la patogenicidad de los diferentes aislamientos de *M. anisopliae*. Por los criterios de patogenicidad confirmada se seleccionaron los aislamientos 9206 y 9236; y el 9501.

La concentración de conidias por gramo de arroz esporulado probada en el 2º bioensayo, fue de 5.94×10^9 ; 2.21×10^9 y 1.3×10^{10} para los aislamientos 9206, 9236 y 9501 respectivamente, con porcentajes de germinación superiores al 92%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bernal (1992), citado por Posada (1993), donde se comprobó que la mayor producción de conidias de *M. anisopliae* se obtuvo en arroz (2.2×10^9 conidias gramo⁻¹). Todos los aislamientos de *M. anisopliae* preseleccionados sobre *C.*

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de los seis estados biológicos de *C. bergi* inoculados con *M. anisopliae* a 1×10^{10} conidias ml y no inoculados, evaluados en viales plásticos. Análisis hecho sobre la variable porcentaje de mortalidad transformado como Arc Sen $\sqrt{\text{Proporción de muertos}}$.

Estados	n	% de Mortalidad	
		Inoculados	Testigo
I	80	95.00 a	23.20
II	80	86.20 a	20.00
III	80	93.75 a	15.00
IV	80	91.25 a	14.00
V	80	93.75 a	8.75
A	80	62.50 b	3.75

Promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes según prueba de Ryan, Elliot, Gabriel, Welsch.

Tabla 3. Porcentaje promedio de mortalidad causada por trece aislamientos de *M. anisopliae*, a una concentración de 1×10^{10} conidias viales ml sobre *C. bergi*.

Aislamiento	n	% Mortalidad	c.v.
Testigo	80	10.00	50.19
9001	80	20.00	30.19
9108	80	23.33	30.00
9304	80	28.33	24.01
9207	80	30.00	26.45
9211	80	31.66	37.09
9237	80	31.66	16.36
9303	80	31.66	18.33
9301	80	33.33	20.00
9401	80	33.33	24.97
9404	80	36.66	23.04
9236	80	40.00	13.09
9206	80	45.00	20.35
9501	80	56.66	36.56

bergi fueron patogénicos a la chinche, destacándose el aislamiento 9236 (origen desconocido) con el 84% de mortalidad, del chinche, comparado con los aislamientos 9501 (*C. bergi*) y 9206 (*Aenolamia reducta*) con los que se obtuvieron 70 y 62% de mortalidad, respectivamente. Lacht en 1976 encontró resultados similares con una cepa de *M. anisopliae* introducida, con la cual obtuvo mayor porcentaje de patogenicidad comparados con un aislamiento nativo de *O. rhinocerus*. La mortalidad de chinche obtenida en el tratamiento testigo no pasa del 10% (Fig. 2, Tabla 4). Con respecto a la mortalidad de *C. bergi*, obtenida con cada aislamiento, se observó un incremento en la virulencia de las mismas contra la chinche, debido probablemente a que los aislamientos del segundo bioensayo provenían de *C. bergi*, lo que se denomina "aislamiento reactivado" y por consiguiente al ser evaluados de nuevo, expresaron su máximo potencial patogénico (Londoño y Atehortúa 1995).

En el análisis de varianza del porcentaje de mortalidad de hongos entomopatógenos, por tratamiento del suelo con inóculo desarrollado en arroz, se identificaron tres grupos, de acuerdo con el valor de la media; se destaca el aislamiento 9206 con 63.9% de mortalidad. El tratamiento testigo mostró diferencias significativas con respecto a los aislamientos 9236 y 9206, pero no con respecto al aislamiento 9501 nativo de *C. bergi*. Así mismo, se encontraron diferencias entre los aislamientos 9501 y 9206; por el contrario, entre los aislamientos 9236 y 9206 no se detectaron diferencias estadísticas significativas (Fig. 3, Tabla 5). La formulación granulada de los tres aislamientos causaron mortalidad en *C. bergi*, bajo condiciones favorables al insecto, en lo que respecta a los requerimientos de humedad registrados por Riis (1990); la temperatura, bajo la cual se trabajó, favoreció a ambos organismos (chinche y hongo) y corresponde a las temperaturas registradas en el Municipio de La Tebaida (Quindío) y en el corregimiento de la Bella (Risaralda) donde el insecto es problema en diferentes cultivos. Los porcentajes de mortalidad obtenidos con los mejores aislamientos en todos los bioensayos, muestran que la utilización de suelo contaminado con los patógenos desarrollados en granos de arroz, en cajas plásticas, es promisorio, porque simula las condiciones donde *C. bergi* es plaga en cultivos de yuca y porque permitió seleccionar el aislamiento 9206 como superior al 9236 seleccionado en papel filtro húmedo (Tabla 6).

Dosis letal media: La dosis letal media es obtenida con *M. anisopliae* a $1 \times 10^{8.075}$ conidias viables/ml con un límite de confianza de $1 \times 10^{3.7716}$ y $1 \times 10^{9.5268}$, entendiéndose estos valores como la concentración de conidias

viables necesarias para causar el 50% de mortalidad a *C. bergi*. El tiempo que necesitó el hongo para causar la DL_{50} estuvo en un rango estimado de 4.7 a 8 días. Se comprobó que la mortalidad de la chinche está directamente relacionada con el incremento en la dosis del inóculo: con 1×10^1 conidias/ml se obtuvo 12.5% de mortalidad mientras que con 1×10^5 esporas/ml la mortalidad aumenta a 85% (Fig. 4). Estos mismos conceptos los han registrado Butt *et al.* (1994) y otros autores.

Conclusiones

Se determinó que *M. anisopliae* causó mayor mortalidad a *C. bergi* que *B. bassiana* y *P. lilacinus*. La unidad experimental más adecuada para la evaluación de hongos Hyphomycetes sobre *C. bergi* fue el insecto inoculado con una suspensión de conidias contaminado por contacto tarsal y depositado en viales de plástico con papel de filtro húmedo, a temperaturas de 23°C.

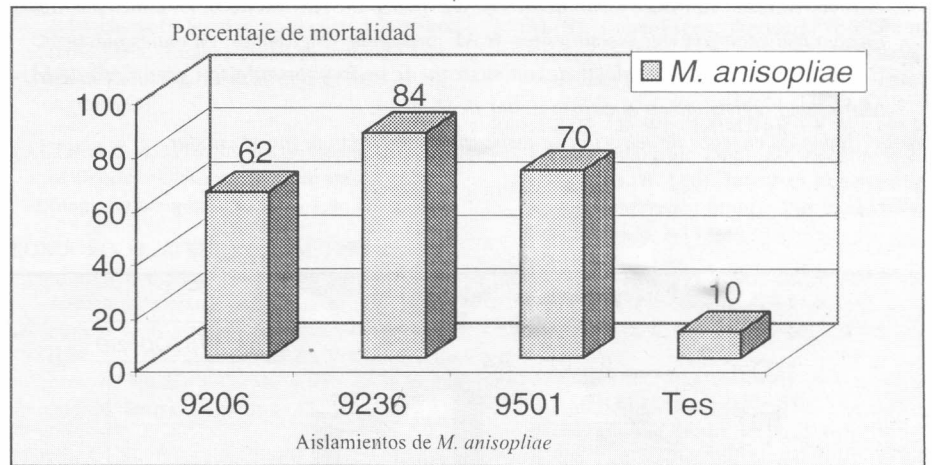


Figura 2. Porcentajes de mortalidad causadas por tres aislamientos promisorios de *M. anisopliae* sobre de *C. bergi* evaluado en viales plásticos.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad causadas por tres aislamientos de *M. anisopliae* seleccionados como promisorios sobre *C. bergi* evaluados en viales plásticos. Análisis hecho sobre la variable porcentaje de mortalidad transformado como Arc Sen $\sqrt{\text{Proporción de muertos}}$.

Aislamientos	n	Porcentaje de Mortalidad
9236	80	83.75 a
9206	80	66.25 b
9501	80	73.75 ab
Testigo	80	12.5 c

Promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes según prueba de Ryan, Elliot, Gabriel, Welsch.

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad causadas por tres aislamientos promisorios de *M. anisopliae*, evaluados con suelo en cajas plásticas y formulación granulada sobre *C. bergi*. Análisis hecho sobre la variable porcentaje de mortalidad transformado como Arc Sen $\sqrt{\text{Proporción de muertos}}$.

Aislamiento	n	% Mortalidad
9236	600	57.2 ba
9206	600	63.9 a
9501	600	44.5 b
Testigo	600	27.5 c

Promedios seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes según prueba de Ryan, Elliot, Gabriel, Welsch.

Tabla 6. Comparación del comportamiento de tres aislamientos de *M. anisopliae* seleccionados como promisorios para controlar *C. bergi* en condiciones de laboratorio.

Código y hospedero del hongo de <i>M. anisopliae</i>	Conidias por gramo de arroz esporulado	% Mortalidad Estado más susceptible*	% Mortalidad Selección ¹	% Mortalidad Selección ²	% Mortalidad Selección ³
9206 <i>Aenolamia reducta</i>	5.94 x 10 ⁹	-	45	62	63.9
9236 Desconocido	7.21 x 10 ⁹	-	40	84	57.2
9501 <i>C. bergi</i>	1.3 x 10 ¹⁰	95	56.66	70	54.5
Testigo	8.71	10.00	10	27.5	

¹ Ensayo realizado con trece aislamientos de *M. anisopliae* sin reactivar, en viales plásticos.
² Ensayo realizado con tres aislamientos de *M. anisopliae* reactivados, en viales plásticos.
³ Ensayo realizado en cajas plásticas con sustrato de suelo y formulación granulada de *M. anisopliae*.
 Mortalidad registrada en el quinto instar de *C. bergi*.

Nota: Todos los ensayos de selección se realizaron con ninfas de quinto instar.

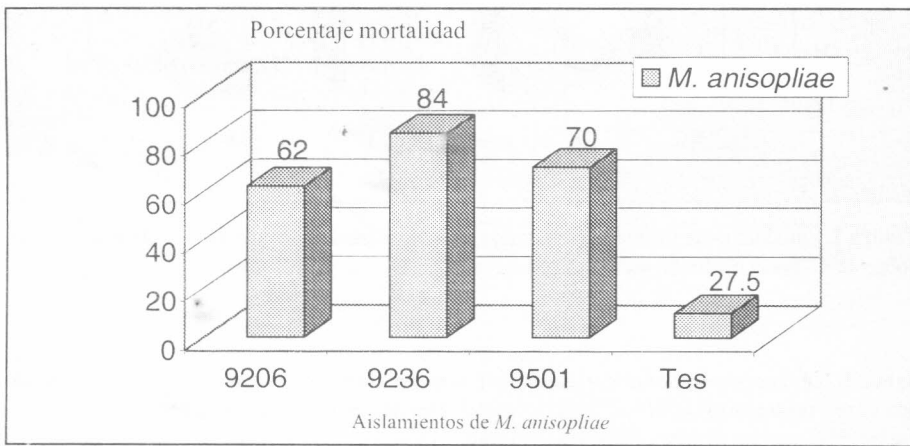


Figura 3. Porcentajes de mortalidad de *C. bergi* causada por tres aislamientos de *M. anisopliae* en formulación granulada, evaluada en cajas plásticas con sustrato de suelo.

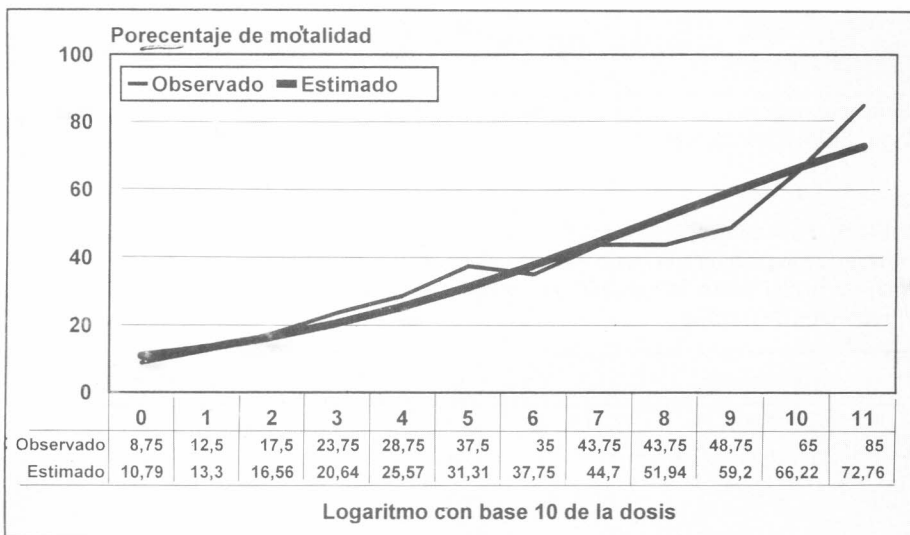


Figura 4. Porcentaje de mortalidad causada por el aislamiento 9236 de *M. anisopliae* sobre *C. bergi*, evaluado con diferentes concentraciones de conidias en viales plásticos.

Los signos de *M. anisopliae* desarrollados sobre *C. bergi* fueron los típicos de la muscardina verde; empezando por pérdida de movilidad, manchas negras en integumento de los estados inmaduros, inicio de crecimiento de micelio blanco (antenas, aparato bucal y tarsos), cubrimiento de micelio en toda la superficie del insecto, finalizando con la esporulación de color verde y dispersión de conidias.

La cuarentena es importante tenerla en cuenta en el desarrollo de bioensayos para evaluar aislamientos de *M. anisopliae* sobre *C. bergi*; porque éste es un hongo de ocurrencia natural. Si no es tenida en cuenta puede incrementar el registro real de la patogenicidad del aislamiento evaluado.

Los estados inmaduros de *C. bergi* fueron los más susceptible a *M. anisopliae* en comparación con el estado adulto en *O. rhinocerus* se registró menor mortalidad. Los aislamientos de *M. anisopliae* más eficientes para el control de *C. bergi* en condiciones de laboratorio fueron: el 9236 (origen desconocido), el 9206 (*Aenolamia reducta*) y el 9501 (*C. bergi*). Se determinó una relación directa entre la dosis y el porcentaje de mortalidad, y la dosis letal media se obtuvo con 1.19x10^{8,075} conidias viables/ml, con límites de confianza entre 5.91x10³ y 3.36x10⁹; y el tiempo que necesitó el hongo para causar dicha mortalidad en un rango estimado de 4.7 a 8 días.

Bibliografía

ALVES, S.B. 1986. Controle microbiano de insetos. Ed. Manoloe Ltda. Sao Paulo (Brasil). 407 p.
 BARBERENA, M.F. 1996. Capacidad parasítica de dos razas del nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) sobre la chinche de la viruela de la yuca *Cyrtomenus bergi* Froeschner (He-

- miptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio. Universidad del Valle. Sección Entomología (Tesis de Biólogo).
- BERNAL, M.G.; BUSTILLO, A.E.; POSADA, F.J. 1994. Virulencia de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y su eficacia en campo sobre *Hypothenemus hampei*. Revista Colombiana de Entomología v. 20 no. 4, p. 225-228.
- BUTT, T.M.; IBRAHIM, L.; BALL, B.V.; CLARK, S.J. 1994. Patogenicity of the Entomogenous Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against Crucifer Pests and the Honey Bee. *En: Biocontrol Science and Technology*. v. 4, p. 207-214.
- CAICEDO, A.M. 1993. Evaluación del parasitismo del nemátodo entomógeno *Sterneinema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Sterneinematidae) y reconocimiento de nemátodos nativos asociados a *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. (Tesis, Ing. Agrónomo)
- CASTAÑO, O.; BELLOTTI, A.C.; VARGAS, O. 1985. Efecto del HCN y de cultivos intercalados sobre daño causado por la chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froeschner, al cultivo de la yuca. Revista Colombiana de Entomología v. 11 no. 2, p. 24-26.
- DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. 1990. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* v. 94 no. 3, p. 299-304.
- GARCIA, C.A. 1982. Biología y morfología de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera - Cydnidae). Nueva plaga de la yuca. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira (Tesis Ing. Agrónomo).
- GONZALEZ, M.T.; POSADA F.J.; BUSTILLO P.A. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé*. (Colombia) v. 44 no. 3, p. 93-102.
- HERNANDEZ, A.; RODRIGUEZ, J. 1992. Evaluación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, en el control de chisas (coleoptera: scarabaeidae). Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín (Tesis de Ing. Agrónomo).
- LACTH, G.C.M. 1976. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinocerus* to some entomogenous fungi. *Entomophaga* v. 21 no. 1, p. 31-38.
- LONDOÑO, M.; ATEHORTUA, M. 1995. Establecimiento de una colección de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, hongos biocontroladores de la gallina ciega (Col: Scarabaeidae). RELEZÁ V. Quinta reunión de leguminosas de grano de la zona andina. Ibarra, Ecuador. p. 65.
- MOORHOUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; CHARNLEY A.K. 1992. Effect of potting media on the control of *Otiiorhynchus sulcatus* larvae on outdoor Strawberry plants using the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* v. 2, p. 238-243.
- MULETT, C.J. 1979. La circulación de la hemolinfa en los insectos. Universidad del Valle. Departamento de biología, sección de Entomología. (Monografía).
- POSADA, F.J. 1993. Control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* con hongos. XX Congreso SOCOLEN. Memorias
- RIIS, L. 1990. La chinche subterránea *Cyrtomenus bergi*, una plaga de importancia creciente en América Latina Tropical: Estudios de comportamiento, Fluctuación de la población. Control botánico con especial referencia a Yuca. Tesis M. Sc. Copenhagen, Denmark, Institute of Ecology y Molecular Biology. The Royal Veterinary and Agricultural University, 1990.
- ROBERTS, D.W.; HUMBER, R.A. 1983. Entomopathogenic fungi. *En: Roberts, D.W. and James, R. (Ed). Infection processes of fungi. Conference report. The Rockefeller Foundation.* p. 1-13.
- VARGAS, O.; BELLOTTI, A.; ARIAS, B. 1986. Control de *Cyrtomenus bergi*, chinche de la viruela de la yuca. *Yuca Bol. Inf.* v. 10 no. 1.
- VESTERGAARD, S.; GILLESPIE, T.M.; BUTT, G.; SCHREITER; EILENBERG, J. 1995. Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *M. anisopliae* to the Western Flower, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology* v. 5, p. 185-192.