

**EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* E *Isaria* sp.
(*Beauveria brongniartii*) PARA EL CONTROL DE *Stenoma cecropia*
(LEPIDOPTERA: ELACHISTIDAE).**

INÉS JOHANNA GÓMEZ MURILLO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2014

**EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* E *Isaria* sp.
(*Beauveria brongniartii*) PARA EL CONTROL DE *Stenoma cecropia*
(LEPIDOPTERA: ELACHISTIDAE).**

**INÉS JOHANNA GÓMEZ MURILLO
PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN - CENIPALMA
INFORME FINAL**

Pasantía de Investigación para optar al título de BIOLOGA

**Director
JOSE DAVID RUBIO
M.Sc. Entomología
Indupalma**

**Tutor
LUIS GUILLERMO MONTES BAZURTO
Ingeniero Agrónomo
Cenipalma**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2014

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1. <i>Stenoma cecropia</i> MEYRICK.....	13
1.1.1. Descripción.	13
1.1.2. Biología y hábitos.....	14
1.1.3. Daño.	15
1.1.4. Enemigos naturales.	15
1.1.5. Manejo y control.....	15
1.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	16
1.2.1. Generalidades.....	16
1.2.2. Mecanismos de acción.....	16
1.2.3. Propiedades.....	17
2. METODOLOGÍA	19
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	19
2.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE COLONIA.....	19
2.3 BIOENSAYO DE PATOGENICIDAD	20
2.4 BIOENSAYO VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS PATOGENICOS SELECCIONADOS	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. COLONIA DE <i>Stenoma cecropia</i>	23
3.2 BIOENSAYO DE PATOGENICIDAD	24
3.3 BIOENSAYO DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS PATOGENICOS SELECCIONADOS	26

4. CONCLUSIONES	28
5. RECOMENDACIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Hongos entomopatógenos evaluados sobre larvas de <i>Stenoma cecropia</i>	20
Tabla 2. Relación de las generaciones obtenidas en la colonia de <i>Stenoma cecropia</i> en palmas bajo umbráculo.	24
Tabla 3 Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> 4 días después de la inoculación y porcentaje de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> esporulados 10 días después de ser colocados en cámara húmeda.	25
Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> 7 días después de la aplicación y porcentaje de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> esporulados 10 días después de ser colocados en cámara húmeda.	26

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Porcentaje diario de mortalidad de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> luego de 4 días de la inoculación en el bioensayo de patogenicidad.	25
Figura 2 Porcentaje diario de mortalidad de larvas de <i>Stenoma cecropia</i> en el bioensayo de virulencia 7 días después de la aplicación de los tratamientos.	27

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* E *Isaria* sp. (*Beauveria brongniartii*) PARA EL CONTROL DE *Stenoma cecropia* (LEPIDOPTERA: ELACHISTIDAE).*

PALABRAS CLAVE: Defoliador. Palma de aceite. Hongos entomopatógenos.**

AUTORES: INÉS JOHANNA GÓMEZ MURILLO. LUIS GUILLERMO MONTES BAZURTO. JOSE DAVID RUBIO. ALEX ENRIQUE BUSTILLO PARDEY.

DESCRIPCIÓN:

Stenoma cecropia es uno de los defoliadores más importantes de la palma de aceite. Causa un daño directo al raspar y consumir la lámina foliar e indirectamente al abrir el punto de ingreso del añublo foliar. Con el fin de evaluar la patogenicidad y virulencia de los aislamientos IPIsp1201 y CPIsp1201 de *Isaria* sp. y CPBb0404 de *Beauveria bassiana* se realizó un bioensayo de patogenicidad y una evaluación de virulencia bajo condiciones de un umbráculo evaluando los aislamientos promisorios seleccionados en el primer bioensayo. Para realizar los bioensayos se estableció una colonia de *S. cecropia* de la que se obtuvieron las larvas para las evaluaciones. Los dos bioensayos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorio, con cinco repeticiones. En el primer bioensayo la inoculación se hizo aplicando una alícuota de 5 µl con una concentración de 1×10^7 esporas/ml en la entrada de la capsula de protección de cada larva y en el segundo bioensayo se hizo simulando una aspersión de 1×10^{13} esporas/ha. La variable de respuesta fue el porcentaje de mortalidad de las larvas. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0,05$). En el primer bioensayo la prueba de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los aislamientos IPIsp1201 y CPIsp1201 ($p = 0,0001$), que registraron la mayor virulencia a larvas de *S. cecropia*. Los dos aislamientos se seleccionaron como promisorios por su patogenicidad y virulencia mayor al 80% a larvas de *S. cecropia*. En el segundo bioensayo la prueba de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los dos aislamientos evaluados ($p = 0,0001$), pero debido a la alta mortalidad registrada en el testigo, mayor al 30% y a la contaminación se debe replicar el bioensayo tomando medidas para evitar la contaminación del testigo al momento de la aplicación de los tratamientos.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director. José David Rubio

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF ISOLATES OF *Beauveria bassiana* AND *Isaria* sp. (*Beauveria brongniartii*) TO CONTROL OF *Stenoma cecropia* (LEPIDOPTERA: ELACHISTIDAE).*

KEY WORDS: Defoliator. Oil palm. Entomopathogenic fungus.**

AUTHORS: INÉS JOHANNA GÓMEZ MURILLO. LUIS GUILLERMO MONTES BAZURTO. JOSE DAVID RUBIO. ALEX ENRIQUE BUSTILLO PARDEY.

DESCRIPTION:

Stenoma cecropia is one of the most important defoliator of oil palm. It causes a direct damage when scraped and eat the leaf blade and indirect damage to open the entry point of the leaf blight. To evaluate the pathogenicity and virulence of isolates *Isaria* sp. IPIsp1201 and CPIsp1201 and *Beauveria bassiana* CPBb0404 was performed a pathogenicity bioassay and a evaluation of virulence under conditions of shade house evaluating the promising isolates selected in the first bioassay. To perform the bioassay, was established *S. cecropia* colony for obtain larval for evaluations. The two bioassays were established under completely randomized design, with two repetitions. In the first bioassay, the inoculation was apply 5 µl with the concentration 1 x 10⁷ spores/ml at the input of the protective capsule of each larva and in the second bioassay, the inoculation was simulation a spray of 1 x 10¹³ spores/ha. The response variable was the larval mortality percentage. Results were analyzed by variance analysis and Tukey's comparison test (p<0,05). In the first bioassay, Tukey's test showed no significant differences between isolates CPIsp1201 and IPIsp1201 (p = 0,0001), which showed the greatest virulence at larvae *S. cecropia*. Both isolates were selected as promising for its pathogenicity and virulence greater than 80% at *S. cecropia* larvae. In the second bioassay, Tukey's test showed no significant differences between the two isolates tested (p = 0,0001), but due to the fact that the control showed a high mortality greater than 30% and pollution must be replicated by the bioassay in order to prevent the control's contamination at the moment of application of treatments.

* Work degree

** Faculty School of Biology. Director. José David Rubio

INTRODUCCIÓN

El gusano cuernito *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Elachistidae), es uno de los insectos defoliadores más importantes del cultivo de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacquin (Arecales: Areaceae) en Colombia especialmente en Tumaco, Puerto Wilches y el Sur del Cesar (Aldana et al. 2010). El daño en la palma lo causa en el estado de larva, en los primeros instares raspa la lámina foliar causando una herida por la que entran hongos como los causantes del añublo foliar. A partir del cuarto instar la larva inicia el consumo de la lámina foliar y puede consumir $36,7 \pm 12,3 \text{ cm}^2$ (Barrios et al. 2013).

El cultivo de palma de aceite y las condiciones ecológicas del cultivo facilitan el establecimiento de un programa de control biológico microbiano de las plagas del cultivo, varios aislamientos de diferentes especies de hongos afectan a insectos plaga del cultivo de palma de aceite, ofreciendo posibilidades de uso en la regulación de las poblaciones de plaga, por lo cual es importante desarrollar ensayos que permitan la selección e incorporación en manejos integrados de plagas (Calvache 1993).

Existen diversas alternativas de control biológico para implementarlos en programas de manejo integrado de plagas. En los últimos años se han realizado estudios que implican el uso de hongos entomopatógenos como mecanismo de control de diferentes plagas en diversos cultivos a nivel mundial (Luna y Lecuona 2002; Sánchez et al. 2002; Vargas 2003; Pariona 2006; Cova et al. AIA. 2009; Cova et al. 2009; Falconi et al. 2010; Hernández-Velázquez et al. 2011.)

En Colombia los estudios de hongos entomopatógenos como biocontroladores de plaga se han realizado en los últimos años en cultivos como caña, café y palma entre otros (Bustillo 2005; Herrera 2006; Mena 2010; Obando et al. 2013.)

En cultivos de palma de aceite en Colombia encontramos estudios de diversas alternativas de control de poblaciones de *S. cecropia* como la identificación y multiplicación de parasitoides de huevos (Cenipalma 1997), evaluaciones de técnicas de liberación de parasitoides de huevos (Castillo et al. 2000), uso de plantas arvenses benéficas para el control de plagas (Delvare y Genty 1992; Aldana et al. 1997) y activación de cepas nativas de hongos entomopatógenos (Dueñas 2013).

El control biológico con hongos entomopatógenos en los sistemas productivos requiere de la utilización de aislamientos patogénicos y altamente virulentos, los cuales pueden ser seleccionados mediante bioensayos. Tomando como base que hongos de los géneros *Beauveria* e *Isaria* tienen una alta importancia controlando y causando mortalidades en diferentes plagas en diversos cultivos, se planteó como hipótesis de trabajo que alguno de los aislamientos colectados y depositados en el laboratorio de microorganismo entomopatógenos de Cenipalma, son patogénicos y con una virulencia mayor al 50% en condiciones semicontroladas a larvas de *S. cecropia*.

En las diferentes zonas palmeras del país se han realizado colectas de diferentes insectos plagas afectados por hongos entomopatógenos. Los hongos aislados de estos insectos se encuentran conservados en el laboratorio de microorganismos entomopatógenos de Cenipalma y es necesario evaluar la patogenicidad de estos aislamientos sobre larvas de *S. cecropia* para su control. Si los hongos son promisorios se incluirían en un programa de manejo integrado de plagas (MIP).

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Stenoma cecropia* MEYRICK

S. cecropia es un lepidóptero de la familia Elachistidae. Es una plaga polífaga que afecta a *Coffea arábica* (Café), *Psidium guajaba* (guayaba), *Theobroma cacao* (cacao), cítricos, árboles forestales y ha sido registrado como plaga de palma de aceite en Colombia, Ecuador, Honduras, Panamá, Perú y Venezuela (Genty 1978).

1.1.1. Descripción. El huevo mide aproximadamente 1mm, su forma es ovalada, ligeramente aplanado y ligeramente más áspero en el centro con dos polos asimétricos, el corión es transparente permitiendo observar el color amarillo del embrión (Genty 1978; Barrios et al. 2013) y está constituido por bandas longitudinales. El huevo tiene una duración de 3 a 6 días (Genty 1978; Barrios et al. 2013).

Al nacer las larvas no tienen casi pigmentos, pero después del primer estado de desarrollo la cápsula cefálica y el protórax son de color marrón claro y aparecen unas bandas longitudinales dorsales de color rojo claro en los dos últimos segmentos torácicos y en los tres primeros segmentos abdominales; en los siguientes estados de desarrollo la cápsula cefálica y el tórax pueden oscurecerse (Mexón y Chinchilla 2004). Las larvas alcanzan de 18 a 25 mm, son de color amarillo con bandas longitudinales color vinotinto (Genty 1978), a través de todo su desarrollo, construyen con secreciones y restos vegetales una capsula o cuerno para protegerse; poseen tres pares de cerdas largas en los segmentos uno, dos y ocho con función táctil que permanecen en contacto con la cubierta de seda que se extiende más allá de la abertura del túnel (Mexzón y Chinchilla 2004). La larva

atraviesa ocho o nueve instares con una duración de 36 a 45 días (Genty 1978; Barrios et al. 2013)

La pupa es de tipo obcteta; color amarillo al inicio y luego rojo marrón (Mexzón y Chinchilla 2004; Barrios et al. 2013). Presenta movilidad parcial del abdomen, con ganchos en los uritos cinco, seis, siete y nueve, que la fijan en la capsula protectora; la pupa se observa cerca del orificio de salida, donde se desarrolla cerca del orificio y transcurren de 7 y hasta 22 días, la pupa llega a medir de 60 a 80mm (Genty 1978; Barrios et al. 2013).

Los adultos son pequeñas polillas con dimorfismo sexual poco marcado, los machos miden entre 23 y 25 mm de envergadura alar, mientras las hembras pueden medir entre 26 y 30 mm; sobre el tórax poseen un penacho de escamas color marrón oscuro muy característico de su especie (Genty 1978). La duración del adulto varía entre 1 y 6 días (Barrios et al. 2013).

1.1.2. Biología y hábitos. El adulto es de hábito nocturno, durante el día se encuentra en el nivel de estrato herbáceo sobre plantas epífitas y hojas bajas; son poco ariscos y normalmente se les encuentra posados en el haz de las hojas; el apareamiento se realiza sobre hojas jóvenes (Genty 1978). Las hembras ovipositan sobre el haz de los folíolos muy cerca de la nervadura central (Mezón y Chinchilla 2004), en campo predominan las posturas individuales, sin embargo, cuando las poblaciones son altas es frecuente encontrar hileras de huevos (Barrios et al. 2013).

Al eclosionar las larvas migran al envés iniciando con el raspado de la lámina foliar y construcción del cuernito o cápsula, la cual aumenta en longitud y diámetro a medida que la larva se desarrolla; toma una forma curvada a manera del cuerno de la abundancia (Mexón y Chinchilla 2004).

1.1.3. Daño. Los daños son muy característicos por la presencia de las cápsulas construidas por la larva, pegadas a las nervaduras, rodeadas de zonas secas o recortadas. El daño principalmente es causado por las larvas cuando se alimentan del parénquima foliar, preferiblemente de la parte apical de las hojas de cualquier nivel de la palma (Aldana et al. 2010; Barrios et al. 2013). Las larvas jóvenes se alimentan del envés de los folíolos produciendo raspaduras y facilitando la entrada de hongos, después del cuarto o quinto instar, consumen completamente la lámina foliar dejando solo la nervadura central (Genty et al. 1978; Barrios et al. 2013). La gran densidad de larvas por hoja, que puede superar los mil individuos causa que la mitad apical de las hojas queden reducidas a nervaduras (Mezón y Chinchilla 2004). Cada larva puede consumir en promedio $36,7 \pm 12,3$ cm² de lámina foliar (Barrios et al. 2013).

1.1.4. Enemigos naturales. *Rhysipolis* sp. (Braconidae) parece ser la avispa ectoparásitoide de larvas de *S. cecropia* más importante, parasitando larvas de quinto instar y desarrollando de tres a ocho individuos por larva, causando mortalidades entre 7 a 20 % (Mezón y Chinchilla 2004). Para el control de huevos se han realizado evaluaciones de técnicas de liberación de *Trichogramma pretiosum* Riley (Trichogrammatidae) para el manejo de esta plaga (Castillo et al. 2000). La mosca *Euphocera floridensis* (Tachinidae) puede también ser un parásitoide común (Delvare y Genty 1992). Además existe un buen número de depredadores de las familias Carabidae, Dermestidae, Reduviidae, Pentatomidae, Formicidae y Vespidae (Genty et al. 1978).

1.1.5. Manejo y control. El monitoreo de las poblaciones de *S. cecropia* se realiza muestreando una palma por hectárea aproximadamente, contando las poblaciones del insecto discriminando por estado de desarrollo y si está o no parasitada. El muestreo en la palma se realiza en el nivel foliar 25 (hojas viejas o tercio bajo de la palma); sin embargo, es posible encontrar larvas en el niveles foliar 17 (tercio medio de la palma) y nueve (hojas jóvenes o tercio alto de la palma) cuando hay

altas infestaciones en los lotes. Los monitoreos se llevan a cabo cada 15 días (Aldana et al. 2010).

El control de este defoliador se puede realizar mediante la recolección manual de larvas y pupas, la liberación de *T. pretiosum* parasitoide de huevos o aplicando hongos entomopatógenos para el manejo de larvas. El éxito del control con enemigos naturales está en el monitoreo y en la aplicación de las medidas de control en bajas poblaciones. El establecimiento de plantas nectaríferas y arvenses en los lotes, evitando la competencia entre estas y el cultivo es otra alternativa exitosa del manejo integrado de *S. cecropia*. La fertilización manteniendo un adecuado balance entre nitrógeno y potasio ayudan a reducir el nivel de las poblaciones del insecto (Aldana et al. 2010).

1.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

1.2.1. Generalidades. Los hongos entomopatógenos son organismos de importante valor ecológico al desempeñar funciones de regulación sobre insectos (Pucheta et al. 2006, Delgado y Murcia-Ordoñez 2011). Debido al mal manejo de pesticidas realizado por el humano para su control de insectos, se han convertido en plagas incontrolables y resistentes, convirtiendo a los hongos entomopatógenos en una opción viable para la elaboración de bioplaguicidas que permitan el control de los mismos sin contaminación y deterioro del medio ambiente (Delgado y Murcia-Ordoñez 2011). Hasta el momento se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y el aislamiento de nuevas cepas continúa (Téllez-Jurado et al. 2009; Pucheta et al. 2006).

1.2.2. Mecanismos de acción. El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: la adhesión y germinación de la espora en la cutícula del

insecto, la penetración en el hemocele y el desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Téllez-Jurado et al. 2009).

La primera fase corresponde al momento en el cual la espora del hongo entomopatógeno llega a la superficie del insecto, es decir, el primer contacto entre ellos; una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por el haustorio provocando el rompimiento de las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula; mientras que el mecanismo químico consiste en la acción enzimática que producen la degradación del tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón 2001); la fase final del mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos corresponde al desarrollo de este dentro del hemocele del insecto cuando luego de evadir el sistema inmune del insecto se produce una septicemia (Téllez-Jurado et al. 2009).

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis (Téllez-Jurado et al. 2009). La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo 2001).

1.2.3. Propiedades. Los hongos entomopatógenos cuentan con unas características especiales que hacen que sean propicios para ser utilizados como controladores biológicos en programas de manejo integrado de plagas. Estas características son: patogenicidad, virulencia, infectividad, especificidad, persistencia en espacio y tiempo e inocuidad ambiental.

La patogenicidad es la condición biológica que le da a un microorganismo sus características de plaguicida; depende de las condiciones existentes entre el

patógeno, el hospedero y las condiciones ambientales, así como de características intrínsecas del microorganismo, por lo cual es sumamente variable (Jiménez 1992). La patogenicidad es la capacidad del patógeno para causar enfermedad en su huésped generando una reacción mórbida del hospedero (Madrigal 2001).

La virulencia es la capacidad relativa de un microorganismo para vencer las defensas del huésped; mientras que la infectividad es la habilidad del patógeno para producir la infección y su capacidad para dispersarse de un organismo a otro (Madrigal 2001).

Por otro lado los hongos entomopatógenos, han demostrado una alta especificidad hacia sus hospederos; esta condición permite su utilización con amplia seguridad de no estar causando daño a otros organismos vivos distintos a las plagas (Jiménez 1992).

La persistencia en tiempo y espacio está relacionada con el período que puede permanecer en el ambiente un microorganismo después de ser liberado. Es deseable una alta permanencia, lo cual se logra en algunos casos, pero en muchos otros no; su biodegradabilidad por factores ambientales como: radiación, temperatura, limitan el empleo de microorganismos para el control de plagas (Jiménez 1992). Además también es propia la característica de inocuidad ambiental de los seres vivos, que son necesariamente biodegradables, haciendo a los microorganismos elementos óptimos para el control de plagas desde el punto de vista ecológico; esta última característica es considerada la mejor del control microbiológico de plagas (Jiménez 1992).

2. METODOLOGÍA

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

El establecimiento de la colonia de *S. cecropia* y los bioensayos de patogenicidad y virulencia, se llevaron a cabo en una instalación acondicionada para los ensayos en la Plantación Indupalma en San Alberto Cesar, con una temperatura promedio de $27 \pm 2,6^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $64,5 \pm 12\%$ en laboratorio y en umbráculo una temperatura $27,1 \pm 3,6^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $87,5 \pm 16,1\%$. Las palmas utilizadas para la colonia y la evaluación de virulencia estaban localizadas bajo un umbráculo de polisombra, a 87 msnm, y las condiciones climáticas anuales en promedio fueron $33,6^{\circ}\text{C}$, y 70% de HR (información plantación Indupalma).

2.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE COLONIA

Para el establecimiento de la colonia de *S. cecropia*, se realizó la adecuación del umbráculo, en el que se colocaron 40 palmas de vivero *E. guineensis*.

La colonia de *S. cecropia* inició colectando pupas en lotes con altas infestaciones. Las pupas colectadas se llevaron a la instalación acondicionada para los ensayos en donde se mantuvieron en recipientes aireados con un algodón humedecido como fuente de humedad hasta la emergencia de los adultos.

Una vez emergidos los adultos, se separaron por sexo y se introdujeron en mangas entomológicas colocadas en las palmas del umbráculo. Previo al montaje de las mangas entomológicas, se limpiaron los foliolos de cada palma con agua

destilada para eliminar el polvo acumulado y reducir los posibles contaminantes presentes.

Después de la liberación de los adultos en las mangas de muselina se llevó un registro de la cantidad y duración de los estados de *S. cecropia*.

2.3 BIOENSAYO DE PATOGENICIDAD

La evaluación de patogenicidad se realizó con aislamientos previamente reactivados sobre larvas de *S. cecropia* y reproducidos en medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) con integumento de larva de *S. cecropia* (Tabla 1).

Tabla 1. Hongos entomopatógenos evaluados sobre larvas de *Stenoma cecropia*.

Aislamiento	Hongo	Localidad de colecta	Hospedero original
CP lsp1201	<i>Isaria</i> sp.	Barrancabermeja (Santander)	Larva de <i>Stenoma cecropia</i>
CPBb0404	<i>Beauveria bassiana</i>	San Andrés de Tumaco (Nariño)	Larva de <i>Stenoma cecropia</i>
IP lsp1201	<i>Isaria</i> sp.	San Alberto (Cesar) Nativa de plantación Indupalma	Larva de <i>Stenoma cecropia</i>

La preparación del inóculo, se llevó a cabo cosechando conidias de una caja Petri con la ayuda de un asa estéril, luego se agregó Tween 80 al 0,1% estéril y con un vortex se agitó hasta tener una suspensión uniforme. Con el fin de verificar la concentración de la suspensión madre se realizó una dilución en serie hasta 10-3.

Para la dilución se tomó 1 ml de solución madre y se colocó en 9 ml de solución Tween 80 al 0,1 % (10-1), luego de la dilución 10-1 se tomó 1ml y se colocó en 9 ml de Tween 80 al 0,1 % (10-2) y de la dilución 10-2 se tomó 1 ml y se colocó en 9

ml de Tween 80 al 0,1 % obteniendo la dilución 10⁻³. De la dilución 10⁻³ de cada hongo, se tomaron 20 µl y se colocaron en un hemocitómetro en el que se contó la cantidad de esporas. Una vez determinada la concentración de cada suspensión madre, todas las suspensiones se ajustaron a 1 x 10⁷ esporas/ml utilizando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$.

Las larvas de *S. cecropia* que se utilizaron en el bioensayo de patogenicidad se obtuvieron de la colonia de *S. cecropia*. La inoculación de cada aislamiento se hizo aplicando una alícuota de 5 µl/larva de cada suspensión en la entrada de la capsula que la larva hace con sus excrementos. Luego las larvas de *S. cecropia* se individualizaron en tubos de acetato que en sus extremos tenían tapones de algodón y en su interior se colocó un foliolo de palma adulta como fuente de alimento.

El bioensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorio con cuatro tratamientos incluido un testigo absoluto y cinco repeticiones. La unidad experimental la conformaron 10 larvas individualizadas. Después de la inoculación, se realizaron evaluaciones diarias durante 4 días, registrando las larvas de *S. cecropia* encontradas muertas y ubicándolas en cámara húmeda durante 10 días registrando la presencia de estructuras características de cada hongo. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey $p < 0,05$).

2.4 BIOENSAYO VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS PATOGENICOS SELECCIONADOS

La evaluación de virulencia se realizó en el umbráculo de polisombra de la plantación Indupalma, en palma de vivero de *E. guineensis*. Se evaluaron los aislamientos CPIsp1201 y IPIsp1201 de *Isaria* sp., seleccionados en el bioensayos

de patogenicidad. Los dos aislamientos se reprodujeron en sustrato de arroz a partir de cultivos de primer pase en medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) con integumento de larvas de *S. cecropia*.

Se utilizaron larvas obtenidas de la colonia establecida en la plantación Indupalma. Se colocaron 15 larvas en las hojas de palmas de vivero que estaban cubiertas con una manga de muselina y se dejaron 24 horas para verificar que se establecieran. Luego se prepararon las suspensiones en 480 cc de agua con un coadyuvante (Carrier®), volumen necesario para una aplicación uniforme de las palmas. En la evaluación por virulencia se simuló la aplicación de una dosis de 1×10^{13} esporas/ha. Para la aplicación de los tratamientos se utilizó una bomba manual de 1,5 L calibrada previamente.

El bioensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorio con tres tratamientos incluido un testigo absoluto y cinco repeticiones. La unidad experimental la conformó cada manga de muselina con 15 larvas. Después de la inoculación, se realizaron evaluaciones diarias durante 7 días, registrando las larvas de *S. cecropia* encontradas muertas y ubicándolas en cámara húmeda durante 10 días registrando la presencia de estructuras características de cada hongo. La variable de respuesta fue el porcentaje de mortalidad de las larvas de *S. cecropia*.

Durante los bioensayos se registró con un Data Logger Watch dog A-series la humedad relativa, la temperatura actual temperatura mínima y máxima diaria.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. COLONIA DE *Stenoma cecropia*

Se continuó con la colonia de *S. cecropia* que se tenía establecida en la plantación Indupalma y se obtuvieron dos generaciones de individuos (Tabla 2). Durante el desarrollo de la colonia se observó depredación de larvas por hormigas. Para evitar la depredación se colocó en la base de las hojas en las que estaba instaladas las mangas entomológicas grasa previo a la liberación de adultos. Cuando la grasa se colocó cerca de heridas en el peciolo se presentó el secamiento de las hojas.

Debido al número variable de adultos obtenidos diarios a partir de las colectas de pupas, se colocaron en las mangas diferente número de adultos pero conservando la proporción 1:1 en machos y hembras, al igual que el número de adultos totales por manga.

El porcentaje de mangas con larvas y posturas viables obtenidas fue mayor al 70%, una tercera generación se descartó debido a depredación por arañas. Las larvas obtenidas se utilizaron en los bioensayos de patogenicidad y virulencia.

Tabla 2. Relación de las generaciones obtenidas en la colonia de *Stenoma cecropia* en palmas bajo umbráculo.

Generación	Total mangas instaladas	Mangas con posturas y larvas viables	% de mangas con posturas y larvas viables	Total de larvas vivas
Primera	11	8	72,72	232
Segunda	17	13	76,47	235

3.2 BIOENSAYO DE PATOGENICIDAD

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0,0001$) y la prueba de comparación de medias (Tukey $p<0,05$) mostró que no hay diferencias estadísticas entre los aislamientos IPIsp1201 y CPIsp1201 (Tabla 3).

De las larvas muertas colocadas en cámara húmeda el 60,9%, en los tratamientos IPsp1201 y CPIsp1201 mostraron signos de esporulación del entomopatógeno. El testigo registró mortalidad del 10% pero ninguna de las larvas muertas mostró signos característicos de los entomopatógenos en los montajes de cámara húmeda (Tabla 3).

El aislamiento CPIsp1201 al tercer día alcanzó el 80 % de mortalidad mientras que el aislamiento IPIsp1201, al tercer día alcanzó el 70 % de mortalidad. Luego de cuatro días de evaluación el aislamiento CPBb0404 había causado una mortalidad menor al 50%. La mortalidad del testigo fue del 10% y se presentó al día cuarto de evaluación (Figura 1).

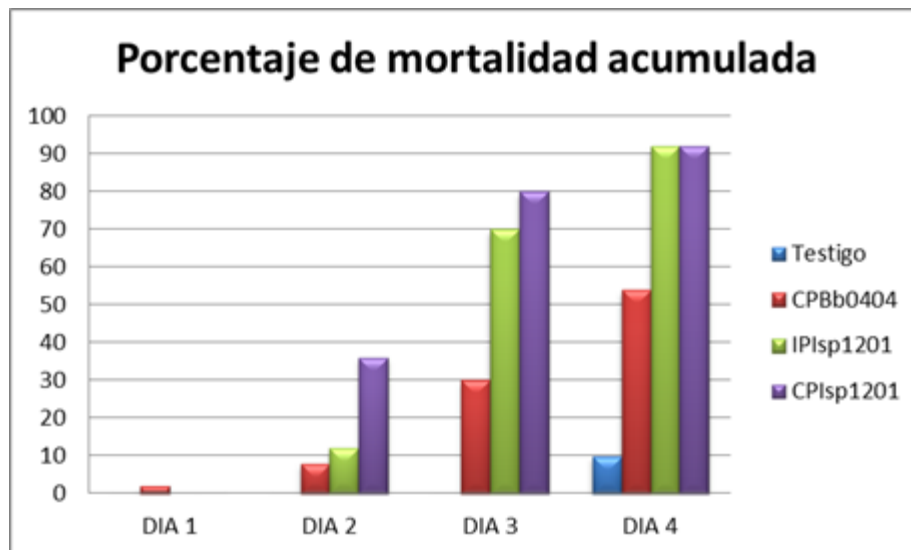
Los aislamientos fueron patogénicos, sin embargo se seleccionaron los aislamientos del género *Isaria* sp. por causar los mayores porcentajes de mortalidad en la evaluación.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Stenoma cecropia* 4 días después de la inoculación y porcentaje de larvas de *Stenoma cecropia* esporulados 10 días después de ser colocados en cámara húmeda.

Tratamiento	Número de larvas por tratamiento	Total de larvas muertas	de % de larvas muertas	Número de larvas esporuladas	de % de larvas con signos de esporulación
IPIsp1201	50	46	92,0 a	28	60,9
CPISp1201	50	46	92,0 a	28	60,9
CPBb0404	50	27	54,0 b	6	22,2
Testigo	50	5	10,0 c	0	0,0

**Letras diferentes en la misma columna indican que se encontraron diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$)

Figura 1. Porcentaje diario de mortalidad de larvas de *Stenoma cecropia* luego de 4 días de la inoculación en el bioensayo de patogenicidad.



3.3 BIOENSAYO DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS PATOGENICOS SELECCIONADOS

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0,0001$) y la prueba de comparación de medias (Tukey $p<0,05$) mostró que no hay diferencias estadísticas entre los aislamientos IPIsp1201 y CPIsp1201 (Tabla 4).

De las larvas muertas colocadas en cámara húmeda el tratamiento del aislamiento CPIsp1201 registró un 57,1% de esporulación, mientras que el aislamiento IPsp1201 registró un 45,7% de esporulación en las larvas muertas de *S. cecropia*. El testigo registró un porcentaje de esporulación de 17,9% lo que indica que fue contaminado por la deriva de los tratamientos en el momento de la aspersion con los tratamientos de los aislamientos (Tabla 4) (Figura 2).

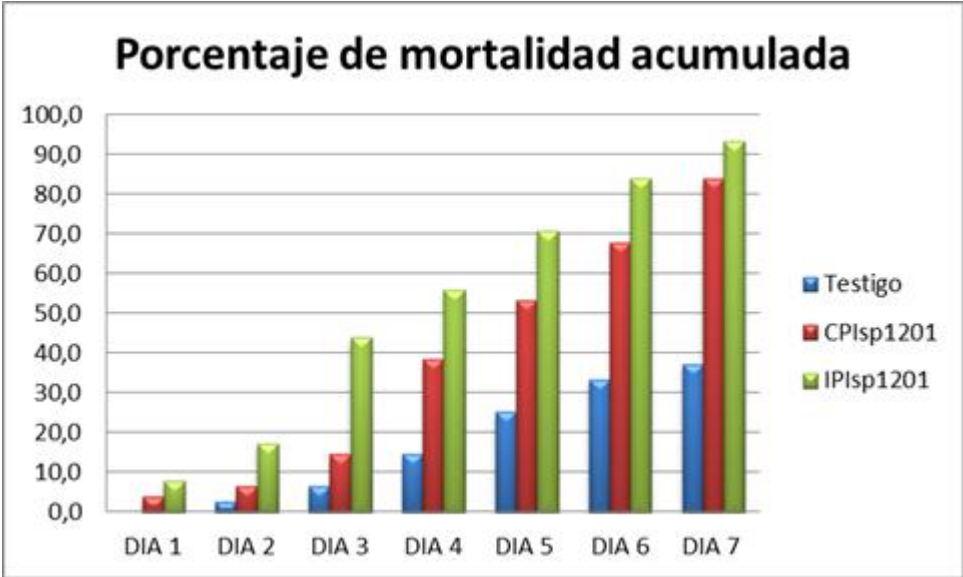
Debido a la contaminación de la prueba se plantea repetir la evaluación de los aislamientos seleccionados como promisorios para el control de *S. cecropia*.

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Stenoma cecropia* 7 días después de la aplicación y porcentaje de larvas de *Stenoma cecropia* esporulados 10 días después de ser colocados en cámara húmeda.

Tratamiento	Número de larvas por tratamiento	Total de larvas muertas	de % de larvas muertas	Número de larvas esporulados	de % de larvas con signos de esporulación
IPIsp1201	75	70	93,3 a	32	45,7
CPIsp1201	75	63	84,0 a	36	57,1
Testigo	75	28	37,3 b	5	17,9

** Números seguidos de letra diferentes en la misma columna indican que se encontraron diferencias significativas (Tukey $p<0,05$)

Figura 2 Porcentaje diario de mortalidad de larvas de *Stenoma cecropia* en el bioensayo de virulencia 7 días después de la aplicación de los tratamientos.



4. CONCLUSIONES

Los tres aislamientos evaluados en el bioensayo de patogenicidad son patogénicos a larvas de *S. cecropia*. Los aislamientos IPISp1201 y CPIsp1201 del genero *Isaria* registraron la mayor virulencia a larvas de *S. cecropia* por lo cual se seleccionan como promisorios para el manejo de *S. cecropia*. Los aislamientos de *Isaria* sp. seleccionados se les debe evaluar la virulencia a larvas de *S. cecropia* en condiciones semicontroladas.

5. RECOMENDACIONES

Repetir la evaluación de virulencia de los aislamientos IPlsp1201 y CPlsp1201 con el fin de evaluar la virulencia de los aislamientos simulando una aspersión en condiciones semicontroladas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDANA, J. A; CALVACHE, H; ESCOBAR, B; CASTRO, H. B. 1997. Las plantas arvenses benéficas dentro de un programa de manejo integrado de *Stenoma cecropia* Meyrick, en palma de aceite. Palmas 18 (1): 11 - 21.
- ALDANA, R. C; ALDANA, J. A; CALVACHE, H; FRANCO, P. 2010. Manual de plagas de la palma de aceite en Colombia. Cuarta edición. Cenipalma – SENA. Bogotá D.C. 198 p.
- BARRIOS, C.E; ALDANA, R.C; BUSTILLO, A. 2013. Biología del defoliador de la palma de aceite, *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Elachistidae). Palmas 12 (3): 13-19.
- BUSTILLO, A. 2001. Hongos en insectos posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: Seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. 30-56.
- BUSTILLO, A. 2005. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 29 (110): 55 – 68.
- CALVACHE, H.1993.El control microbiano, en el manejo de las plagas de la palma de aceite en Colombia. Palmas 18 (2): 13 – 21.
- CASTILLO, S. J; ALDANA, J. A; CALVACHE, H; GRIJALVA, O. 2000. Evaluación de técnicas de liberación de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el manejo de *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Stenomidae) en el cultivo de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Palmas 21(1) especial: 203 – 211.
- CENIPALMA. 1997. Identificación y multiplicación de parasitoides de *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Stenomidae) en palma de aceite. Proyecto manejo integrado de plagas. Ceniavance. 37. 2 p.

- COVA, L. J; SCORZA, J. V; GARCIA, D. E; CANIZÁLES, L. M; GUEDEZ, C. C; AVENDAÑO, M.L; MEDINA, M. G.2009. Efecto de *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y la aplicación de gasoil en el control de moscas caseras en galpones avícolas. Avances en investigación agropecuaria 13 (2): 4 – 53.
- COVA, L. J; SCORZA, J. V; GARCIA, D. E; CANIZÁLES, L. M; GUEDEZ, C. C; MAFFEY, M; MEDINA, M. G. 2009.Patogenicidad in vitro de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en *Musca domestica* (L.) como posible estrategia de control biológico en áreas ganaderas. Zootecnia tropical27 (2):113 – 120.
- DELGADO, P. A. M. Y MURCIA-ORDOÑEZ, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Revista Ambiente & Água Ambi-Agua, Taubaté6 (2): 77-90.
- DELVARE, G. Y GENTY, PH. 1992. Interés de las plantas atractivas para la entomofauna benéfica de las plantaciones de Palma, en América tropical. Palmas 13 (4): 23 – 33.
- DUEÑAS, V. 2013. Reactivación de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como biocontroladores de *Stenoma cecropia* en cultivos de palma de aceite. Especialista en química ambiental. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga, Colombia. 66p.
- FALCONI, F; FLORES, A; CASTELLANOS, P. 2010. Letalidad de hongos entomopatógenos sobre *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pirrhocoridae). Facultad de Ciencias biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Revista Peruana de Biología. 17 (2): 225 – 229.
- GENTY, PH. 1978. Morfología y biología de un defoliador de la palma africana en América Latina: *Stenoma cecropia* Meyrick. Oleagineux (Francia) 33 (8 -9): 421- 427.
- GENTY, PH; DESMIER DE CHENON, R; MORIN, J. P. 1978.Las plagas de la palma aceitera en América Latina. Oleagineux (Francia) 33 (7): 326 – 420.

- HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M; CERVANTES, Z; VILLALOBOS, F. J; GARCÍA, L. L; PEÑA, G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s) 27 (3): 591 – 599.
- HERRERA, A. J. 2006. Evaluación de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (B024 y B025) para el control del raspador del fruto de la palma de aceite *Imatidium neivai* Bondar (Coleptera: Chrysomelidae) bajo condiciones de laboratorio y campo. Biólogo. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Bucaramanga, Colombia. 65p.
- JIMÉNEZ, J. 1992. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plaga. En: Control biológico de insectos. Centro de Investigación en Palma de Aceite Cenipalma. Editorial Kimpres Ltda. Bogotá. 115p.
- LUNA, J. A. Y LECUONA, R. E. 2002. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammato ceruspicus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). Instituto nacional de tecnología agropecuaria Argentina. *Revista de investigaciones agropecuarias* 31 (1): 67 – 83.
- MADRIGAL, A. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. 459p.
- MENA, S. V. 2010. Evaluación de hongos entomopatógenos como potencial biocontrolador de la hormiga arriera *Atta colombica* (G.) del municipio de Lloró – Chocó. Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Entomología Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá D.C., Colombia. 88p.
- MEXZÓN, R; CHINCHILLA, C. 2004. El gusano túnel, *Stenoma cecropia* Meyrick en palma aceitera en América central. *ASD Oil Palm* 27: 27-31.
- MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas* 63: 95-103.

- OBANDO, J.A; BUSTILLO, A.E; CASTRO, U; MESA, N.C. 2013. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). Revista Colombiana de Entomología 39 (1): 26 – 36.
- PARIONA, N. 2006. Evaluación de la capacidad entomocida de *Beauveria* sp sobre *Schistocerca piceifrons* peruviana (Lynch arribalzaga, 1963) nativas del departamento de Ayacucho. Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P. de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. 51p.
- PUCHETA, D.M; FLORES, M.A; RODRÍGUEZ, N.S; DE LA TORRE, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 13 (12): 856-860.
- SÁNCHEZ, P; MORILLO, F; CAETANO, F; ITURRIAGA, T; GUERRA, J; MUÑOZ, W. 2002. Detección de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* ((Fr.) Link), 1833 (Ascomycotina: Pyrenomycetes) sobre hormigas del género *Camponotus* Mayr, 1861 (Hymenoptera: Formicidae) en plantaciones de cacao de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. Entomotropica antes/formerly Boletín de Entomología Venezolana 17 (2): 191-195.
- TÉLLEZ-JURADO, A; CRUZ, M.G; MERCADO, Y; ASAFF, A; ARANA-CUENCA, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Revista Mexicana de Micología 30: 73-80.
- VARGAS, M. E. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimae aoperculella* (Zeller) y *Symmetrische matangolias* (Gyen). Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P. de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. 63p.