

REACTIVACION DE CEPAS NATIVAS DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* COMO BIOCONTROLADORES DE *Stenoma cecropia* EN CULTIVOS DE PALMA DE ACEITE

VIVIANA DUEÑAS BOHÓRQUEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

REACTIVACION DE CEPAS NATIVAS DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* COMO BIOCONTROLADORES DE *Stenoma cecropia* EN CULTIVOS DE PALMA DE ACEITE

VIVIANA DUEÑAS BOHÓRQUEZ

Monografía de grado para optar al título de Especialización en Química Ambiental

Director
ALFONSO VILLALOBOS MORENO
Entomólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
ESPECIALIZACION EN QUIMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA

2013

DEDICATORIA

*A mis padres que con su amor y apoyo incondicional
me han ayudado a alcanzar las metas
que me he propuesto.*

*A mi hija Isabella,
mi mayor bendición y el motivo de
alegría e inspiración en cada paso
de mi vida.*

Viviana Dueñas

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido disfrutar esta etapa de mi vida junto a mi esposo e hija.

A mis padres por su apoyo fundamental e importante para la realización de este sueño.

A la Universidad Industrial de Santander, alma mater que abrió sus puertas a mi búsqueda de conocimientos. A la empresa Palmas del Cesar S.A por su disponibilidad en este proceso de investigación. A mis profesores, quienes compartieron generosamente su conocimiento y en especial a mi Director Alfonso Villalobos Moreno por brindarme su ayuda incondicional.

A mis compañeros(as) especialmente a Patricia Pico, los aprecio, valoro y admiro.

Y a todas aquellas personas, que de una u otra forma me han brindado su apoyo.

Viviana Dueñas.

CONTENIDO

INTRODUCCION	14
1. JUSTIFICACION.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MARCO TEORICO	19
3.1 DEFOLIADOR <i>Stenoma cecropia</i> Meyrick.....	19
3.1.1 Descripción general	19
3.1.2 Ciclo de vida	20
3.1.3 Biología y hábitos.....	20
3.1.4 Enemigos naturales	21
3.1.5 Control biológico	21
3.2 GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS	22
3.2.1 Clasificación de los hongos entomopatógenos	24
3.2.2 Uso de hongos entomopatógenos en cultivos de palma de aceite	25
3.2.3 <i>B. bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin	25
3.2.4 <i>M. anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin	28
3.2.5 Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos.....	29
3.2.6 Producción de micotoxinas	30
3.2.7 Factores que afectan la viabilidad de las conidias	30
4. MATERIALES Y METODOS.....	32
4.1 ZONA DE ESTUDIO	32
4.1.1 Ubicación del área de ensayo.....	32
4.2 PATOGENICIDAD DE DOS AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LARVAS DE <i>S. cecropia</i>	32
4.2.1 Selección de cepas.....	32
4.2.2 Producción de conidias.....	32

4.2.3 Preparación de los aislamientos por dilución seriada	34
4.2.4 Inoculación de <i>Stenoma cecropia</i> con las cepas a reactivar	34
4.2.5 Montaje en cámara húmeda de larvas de <i>S. cecropia</i> infectadas.....	34
4.3 PRODUCCIÓN DE HONGOS <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> SOBRE SUSTRATO A BASE DE ARROZ	35
4.4 EVALUACION DE CEPAS PRODUCIDAS EN ARROZ PARA EL CONTROL DE <i>S. cecropia</i> EN CONDICIONES DE CAMPO.....	37
4.4.1 Evaluación de viabilidad y pureza del hongo	37
4.4.2 Lectura de concentración en cámara de Neubauer	37
5. MONITOREO POBLACIONAL DE <i>S. cecropia</i>	39
5.1 LECTURA DE <i>STENOMA CECROPIA</i> EN LOTES DE R2006.....	39
5.2 CONTROL CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN CULTIVO R06	41
6. RESULTADOS Y DISCUSION	43
6.1 PATOGENICIDAD DE DOS AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LARVAS DE <i>S. cecropia</i>	43
6.1.1 Resultados obtenidos en la inoculación de <i>Stenoma cecropia</i> con las cepas a reactivar	43
6.1.2 Montaje en cámara húmeda de larvas de <i>S. cecropia</i> infectadas.....	44
6.2 PRODUCCIÓN DE HONGOS <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> SOBRE SUSTRATO A BASE DE ARROZ	46
6.2.1 Evaluación de viabilidad y pureza del hongo	48
6.2.2 Lectura de concentración en cámara de Neubauer	51
6.3 MONITOREO POBLACIONAL DE <i>S. cecropia</i>	52
6.3.1 Control con hongos entomopatógenos en cultivo R06.....	52
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Duración de ciclo de vida en días de <i>S. cecropia</i> (Chinchilla, 2005).....	20
Tabla 2. Muestras a evaluar Lote 1 R06 controladas con <i>M. anisopliae</i>	39
Tabla 3. Muestras a evaluar lote 2 R06 controladas con <i>M. anisopliae</i>	40
Tabla 4. Muestras a evaluar lote 3 R06 controladas con <i>B. bassiana</i>	40
Tabla 5. Muestras a evaluar lote 4 R06 controladas con <i>B. bassiana</i>	41
Tabla 6. Muestras a evaluar lote 5 R06 controladas con <i>B. bassiana</i>	41
Tabla 7. Conteo de conidias de <i>B.bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> reproducidos en arroz	51
Tabla 8. Porcentaje de eficiencia obtenido sobre larvas de <i>S. cecropia</i> utilizando hongos entomopatógenos en cultivo R06.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas principales del hongo <i>Beauveria bassiana</i> . A. Esporas esféricas levemente ovaladas. B. Hifas septadas. C. Conidióforo simple. D. Proliferación simpodial del conidióforo. E. Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda). Figuras A-D modificadas de: Castillo, 2005. Figura E modificada de: Solter, 2004.	27
Figura 2. Producción de conidias del aislamiento de <i>B. bassiana</i> seleccionado para el control de <i>S. cecropia</i> . Foto: Viviana Dueñas, 2013.	33
Figura 3. Producción de conidias del aislamiento de <i>M. anisopliae</i> seleccionado para el control de <i>S. cecropia</i> . Foto: V. Dueñas, 2013.....	33
Figura 4. Montaje en cámara húmeda de larvas <i>S. cecropia</i> infectadas con <i>B. bassiana</i> . Foto: V. Dueñas, 2013.....	35
Figura 5. Diagrama. Proceso de producción y control de calidad de hongos	36
Figura 7. Resultados de mortalidad de larvas de <i>S. cecropia</i> con soluciones de conidias de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio.....	44
Figura 9. Esporulación de <i>M. anisopliae</i> sobre larva de <i>S. cecropia</i> después de periodos de incubación en cámara húmeda Foto: V. Dueñas, 2013.....	46
Figura 11. Crecimiento de <i>M. anisopliae</i> sobre arroz. Foto: V. Dueñas, 2013.....	47
Figura 12. Resultados de pruebas de viabilidad sobre producción de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en sustrato arroz.....	49
Figura 13. Resultados de pruebas de pureza sobre producción de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en sustrato arroz.	50
Figura 14. Estructuras morfológicas principales del hongo <i>B. bassiana</i> observadas mediante tinción con azul de lactofenol. Foto: V. Dueñas, 2013.	50
Figura 15. Conidias del hongo <i>M. anisopliae</i> observadas mediante tinción con azul de lactofenol. Foto: V. Dueñas, 2013.....	51
Figura 16. Porcentajes de eficiencia en el control de <i>S. cecropia</i> obtenidos en el cultivo R06.	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Registro de evaluación de plagas Lote 1 R06	62
Anexo B. Registro de evaluación de plagas Lote 2 R06	63
Anexo C. Registro de evaluación de plagas Lote 3 R06	64
Anexo D. Registro de evaluación de plagas Lote 4 R06	65
Anexo E. Registro de evaluación de plagas Lote 5 R06	66

RESUMEN

TÍTULO: REACTIVACION DE CEPAS NATIVAS DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* COMO BIOCONTROLADORES DE *Stenoma cecropia* EN CULTIVOS DE PALMA DE ACEITE*

AUTORA: VIVIANA DUEÑAS BOHÓRQUEZ**

PALABRAS CLAVES: Defoliador, parénquima, lepidóptero

DESCRIPCIÓN:

Stenoma cecropia ha sido registrada como plaga en cultivos de palma de aceite en Colombia, siendo las zonas más afectadas por este defoliador Tumaco, Puerto Wilches y el sur del Cesar. Este lepidóptero en su etapa larval se alimenta del parénquima causando graves defoliaciones, a su vez al roer el tejido facilita la entrada de hongos fitopatógenos como *Pestalotiopsis sp* (Manual de plagas de palma de aceite en Colombia, Aldana et al., 2009). Este ensayo evaluará la patogenicidad de dos cepas de hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Stenoma cecropia* en el cultivo Renovación 2006 de la plantación Palmas del Cesar S.A la cual se encuentra ubicada en el corregimiento de Minas, municipio de San Martín, Cesar.

Se utilizará una lectura de plagas tomando dos muestras por hectárea, es decir 134 muestras en total, para determinar el nivel poblacional del insecto antes de realizarse la aplicación de biológicos, los cuales se reproducirá masivamente en sustrato arroz para efectuar liberaciones aéreas sobre el cultivo; posteriormente se efectuará una verificación de la eficacia del control, mediante monitoreo de poblaciones 15 días después de la liberación de las cepas de interés; la variable a evaluar será el porcentaje de mortalidad de larvas y la esporulación de los hongos sobre los individuos muertos.

Utilizar como sustrato para la reproducción de los hongos arroz es un método económico y eficiente para propagar los hongos en campo; con los resultados obtenidos se evidencia la calidad de las conidias producidas sobre este sustrato.

El desarrollo de formulaciones con hongos entomopatógenos constituye una alternativa diferente al control químico.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: ALFONSO VILLALOBOS MORENO. Entomólogo

ABSTRACT

TITLE: NATIVE STRAINS REACTIVATION *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Biocontrol AS OF *Stenoma cecropia* IN OIL PALM CULTIVATION*

AUTHOR: VIVIANA DUEÑAS BOHÓRQUEZ**

KEYWORDS: defoliator, parenchyma, lepidopteran

DESCRIPTION:

Stenoma cecropia has been recorded as a pest in oil palm cultivation in Colombia, being the most affected by the defoliant Tumaco, Puerto Wilches and south of Cesar. This lepidopteran in their larval stage feeds on the parenchyma causing severe defoliation turn to crack the tissue facilitates the entry of fungal pathogens as *Pestalotiopsis* sp (Manual pest of oil palm in Colombia, Aldana et al., 2009). This trial will evaluate the pathogenicity of two strains of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on larvae of the cecropia *Stenoma* 2006 crop planting Renewal Palmas del Cesar SA which is located in the village of Minas, municipality of San Martin, Cesar.

Reading is used pest taking two samples per hectare, or 134 total samples, to determine the level of the insect population before undergoing biological application, which is played massively rice substrate to effect air releases the cultivation; subsequently for verification of the effectiveness of the control, monitoring populations by 15 days after the release of the strains of interest, the variable to be evaluated is the percentage mortality of larvae and sporulation of fungi on dead individuals.

Used as a substrate for the reproduction of fungi rice is economical and efficient method for propagating field fungi, the results obtained evidenced quality of conidia produced on this substrate.

The development of formulations with entomopathogenic fungi constitute an alternative to chemical control.

* Work degree

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Directed by ALFONSO MORENO VILLALOBOS. entomologist

INTRODUCCION

El uso de agentes de control biológico representa una alternativa importante y compatible como estrategia de manejo de plagas. En los cultivos de palma de aceite (*Elaeis guinensis* Jacquin) se ha llevado a cabo en muchas plantaciones que tienen como finalidad reducir el control químico y adoptar prácticas ambientales más efectivas (Calvache, 1993). Un ejemplo de manejo integrado de plagas es el control biológico con hongos entomopatógenos, insectos depredadores, entre otros (Aldana *et al.*, 2005). El uso de hongos entomopatógenos se ha convertido en diversas plantaciones de palma de aceite del país en un método alternativo y efectivo.

Los numerosos aislamientos de diversas cepas de hongos que afectan a insectos de cultivo de palma de aceite ofrecen amplias posibilidades de uso en la regulación de sus poblaciones. En este sentido es importante desarrollar ensayos que permitan su selección e incorporación en manejos integrados de plagas (Calvache, 1993).

Una de las plagas de mayor importancia económica en el cultivo de palma de aceite es el defoliador *Stenoma cecropia* (Lepidoptera: Stenomidae), las larvas prefieren la parte apical de las hojas y pueden atacar todos los niveles de la palma. Cada larva puede consumir entre 32 y 60 cm² de follaje. Puede causar grandes defoliaciones y facilita la entrada de hongos foliares como *Pestalotiopsis* (Genty *et al.*, 1978).

El manejo de poblaciones de *S. cecropia*, se realiza de acuerdo al estado de desarrollo, generalmente se utilizan insecticidas inhibidores de síntesis de quitina los cuales pueden actuar por ingestión o contacto.

Una alternativa para la regulación de las poblaciones de *S. cecropia* en su estado larval es la aplicación de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* y *Metarhizium*. El efecto de estos hongos sobre estados inmaduros se ha evaluado en diferentes órdenes de insectos y en diversos cultivos (Rodríguez *et al.*, 2004). Las diferencias entre mortalidad causada por aislamientos del mismo género, e inclusive de la misma especie de hongos, aplicados en dosis similares y bajo las mismas condiciones, es el resultado de factores como la capacidad de adherencia y penetración del hongo a la cutícula del insecto, la producción de toxinas que degraden la cutícula del insecto y la capacidad de respuesta inmune del insecto (Tanada y Kaya, 1993; Butt y Goettel, 2009).

La eficiencia en la implementación del control con hongos entomopatógenos en los sistemas productivos requiere de la utilización de aislamientos altamente patogénicos, los cuales deben ser identificados mediante la realización de pruebas de laboratorio. En esta investigación se evalúa la patogenicidad de aislamientos del género *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, sobre larvas de *Stenoma cecropia* en condiciones naturales del cultivo de palma.

1. JUSTIFICACION

Actualmente el cultivo de palma de aceite ocupa el tercer lugar de área sembrada en el país y el primer lugar en América latina y el cuarto a nivel mundial; los cultivos se encuentran ubicados en los departamentos de Caquetá, Casanare, Cundinamarca, Meta, Magdalena, Cesar, Santander, Norte de Santander y Nariño, cubriendo un área sembrada de 243.037 hectáreas (Fedepalma, 2007).

En Colombia la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) representa una alternativa agrícola de gran perspectiva económica, sin embargo por ser un monocultivo, presenta mayor susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades, lo que conlleva a la aplicación de diversos productos químicos para su control, estos ocasionan graves daños a la biodiversidad por ser en su mayoría de amplio espectro, contribuyendo en la disminución de las poblaciones microbianas benéficas.

Por esta razón surge un gran interés en otro tipo de soluciones que conlleven a una agricultura más limpia, en las cuales se plantean estrategias más amigables con el medio ambiente, creando sistemas de manejos integrados de plagas y enfermedades, donde el uso de controles biológicos como la aplicación de hongos entomopatógenos, ofrecen una solución viable en el manejo de diversos cultivos (Faria y Wraight, 2001).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado y como una forma de contribuir con la preservación del medio ambiente, la empresa Palmas del Cesar S.A cuenta con un laboratorio de microbiología donde se conservan y reproducen cepas de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, microorganismos capaces de atacar gran cantidad de insectos plagas.

Para lograr una mayor eficiencia de los hongos entomopatógenos, se plantea el aislamiento de cepas en campo, con el fin de obtener microorganismos con mayor capacidad virulenta, para poder combatir con efectividad la mayor cantidad de plagas presentes en los cultivos de palma de aceite y afianzar los sistemas de producción de biológicos como alternativas de manejo integrado de plagas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Reactivar las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para utilizarlas como controladores biológicos de lepidópteros de la especie *Stenoma cecropia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensayos en laboratorio con las cepas antes y después de ser reactivadas para determinar la concentración de esporas, viabilidad y porcentaje de germinación que tiene cada una.
- Probar la eficiencia en campo de las cepas después de la reactivación para el control de *Stenoma cecropia*.

3. MARCO TEORICO

3.1 DEFOLIADOR *Stenoma cecropia Meyrick*

S. cecropia se encuentra clasificado taxonómicamente en el Orden Lepidoptera, Familia Stenomidae, conocido comúnmente como Gusano cuernito menor; ha sido registrado como plaga de palma de aceite en Colombia, Ecuador, Honduras, Panamá, Perú y Venezuela (Genty et al., 1978) y es plaga grave en Costa Rica. En Colombia muestra mayor importancia en la zona de Tumaco, Puerto Wilches y sur del Cesar. Es una plaga polífaga ataca *Coffea arábica* (Café), *Psidium guajaba* (guayaba), *Theobroma cacao* (cacao), cítricos y arboles forestales (Zenner de Polanía y Posada, 1992).

3.1.1 Descripción general

Los machos miden entre 23 y 25 mm de envergadura alar, mientras las hembras pueden medir entre 26 y 30 mm. Sobre el tórax tienen un penacho de escamas de color negro muy característico de su especie. Las alas anteriores son de color marrón y presentan una línea diagonal sobre cada ala, las cuales, cuando la mariposa esta en reposo, forma una “V”. Las alas posteriores son de color rodado. Los huevos son de forma ovalada, ligeramente aplanado, con un diámetro cerca de 1,0 mm. El corión es transparente y tiene bandas longitudinales y a medida que avanza el desarrollo se torna oscuro (Genty et al., 1978; Polanía y Posada, 1992).

Las larvas pueden alcanzar de 18 a 25 mm de longitud; se desarrolla dentro de una capsula a manera de cuerno, construida con sus propios excrementos y pasa por ocho a diez instares larvales (Moreno, 1997; Genty et al., 1978). Son de color amarillo con bandas longitudinales color vinotinto.

Las pupas se encuentran dentro del cuernito, la crisálida es desnuda, de tipo exarata y coloración amarilla o marrón-rojo brillante, según la madurez. Presenta movilidad parcial del abdomen, con ganchos en los uritos 5,6,7,9, que se fija dentro de la cápsula protectora, donde se desarrolla cerca del orificio y transcurren de 18 a 22 días, la pupa llega a medir de 60 a 80 mm .

3.1.2 Ciclo de vida

La duración del ciclo de vida en días de *S. cecropia* es de aproximadamente 52 a 60 días, en la tabla 1 se especifica la duración en cada etapa del ciclo:

Tabla 1. Duración de ciclo de vida en días de *S. cecropia* (Chinchilla, 2005)

ESTADO	DIAS
Huevo	3 a 5
Larva	36 a 40
Pupa	13 a 15
Adultos	5 a 10
Total	52 a 60

3.1.3 Biología y hábitos

El huevo eclosiona a los cuatro o cinco días, y las larvas se trasladan al envés de los folíolos; raspan la epidermis foliar y con sus excreciones inician la construcción de una capsula en forma de cuerno, la cual va ampliando con más excreciones en la medida que crece. Esta cápsula le sirve de protección durante el ciclo de larva y pupa (Genty *et al.*, 1978).

La larva durante los primeros días extiende una red de seda hacia el exterior desde el orificio de salida, a una distancia igual o superior a la longitud del cuernito, una vez cerca del límite de la red la larva sale y delimita una nueva zona de consumo en la superficie. La larva posee sobre el cuerpo tres pares de macrocerdas táctiles muy desarrolladas, que permanentemente están en contacto con la

red de seda, de modo que al percibir la menor vibración la larva regresa rápidamente al estuche. La parte interna de la capsula se encuentra revestida de una capa de seda de la cual se fija con sus ganchos abdominales (Moreno, 1997). La primera infestación de la plaga se localiza en las hojas de los niveles 25 y 33, pero en la medida que avanzan nuevas generaciones de la plaga, las larvas se van localizando en hojas jóvenes de los niveles 17 y 9 respectivamente. La larva empupa dentro del mismo cuerno o cápsula, el cual queda adherido al follaje aún después de la emergencia del adulto.

3.1.4 Enemigos naturales

Se registró *Trichogramma pretiosum* Riley, parasitando huevos de *S. cecropia* en forma natural (Grijalva, 2000).

En estado larval se le conocen dos parasitoides muy importantes: *Elasmus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) y *Rhysipolis* sp. (Hymenoptera: Braconidae), este último ataca larvas del segundo al quinto instar; durante la época seca puede contribuir con el 35% de la mortalidad natural. Las larvas parasitadas por *Rhysipolis* se detectan al observar un taponamiento en la boca de la capsula protectora (Cenipalma, 1998). Las larvas también son atacadas por un virus de la poliedrosis nuclear. En el estado de pupa se han detectado los parasitoides *Brachymeria* sp. (Hymenoptera: Chalcididae).

3.1.5 Control biológico

Se realizan aplicaciones para el control de *S. cecropia* utilizando algunos hongos entomopatógenos, entre ellos se destacan aislamientos de *Beauveria bassiana* los cuales en épocas de alta humedad produce hasta un 70% de control y cepas de *Metarhizium anisopliae* hasta un 60%. Por otra parte los controles con *Bacillus thuringiensis* pueden ejercer resultados similares.

3.2 GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS

El termino entomopatógenos se ha definido por varios autores de distintas maneras, algunos lo definen como aquellos microorganismos (bacterias, hongos, nematodos, virus) que son capaces de atacar insectos (Devotto *et al.*, 2000), o como los que reducen las poblaciones de plagas a niveles que no causan daño económico en los cultivos (Tanzini *et al.*, 2000). También los han definido como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia y sus mayores ventajas están en la adaptación, especificidad y capacidad de penetración directa a través del integumento (Allendes, 2007).

En el grupo de los microorganismos entomopatógenos sobresalen los hongos, los cuales por su facilidad de de multiplicación son los más utilizados en el control de plagas, en la actualidad se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. A nivel mundial las dos especies más frecuentes y estudiadas son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación (Allendes, 2007). Estos hongos tienen alta efectividad, ya que infectan más de 100 especies diferentes de insectos en varios órdenes (Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Homoptera) y lo más importante no contaminan el medio ambiente, no destruyen insectos benéficos, no son tóxicos para humanos, no desarrollan resistencia y no dejan residuos en los alimentos; por esta razón representan una alternativa de gran interés económico en el manejo integrado de plagas que afectan los cultivos.

Las características representativas de este tipo de hongos provienen de su capacidad de generar enzimas hidrolíticas, compuestos antimicrobianos y toxinas los cuales le confieren su capacidad patogénica, en el caso de *M. anisopliae* ha sido estudiado filogenéticamente y se han identificado genes que codifican una serie de sustancias, las cuales le confieren adaptaciones ambientales específicas,

como por ejemplo nutrientes de barrido y penetración en el integumento del insecto huésped, a su vez se ha identificado que el ADNc en cepas de *M. anisopliae* puede proporcionar información sobre los procesos fisiológicos que ocurren en las interacciones insecto-hongo (Wang *et al.*, 2009).

B. bassiana y *M. anisopliae* forman parte de la clase Hiphomycetes, se caracterizan porque forman micelio que originan esporas asexuales denominadas conidias a partir de las células conidiógenas especializadas, formadas en hifas simples o ramificadas denominadas conidióforos o en agrupamiento de conidióforos llamados sinema , aunque algunas especies pueden producir esporas de reposo llamadas clamidosporas (Inglis *et al.*, 2001).

A pesar de la diversidad taxonómica de los hongos entomopatógenos, hay muchas similitudes en su biología y ecología. En general el ciclo de vida de los hongos entomopatógenos comienza con la germinación de la spora y penetración del hospedante a través de la cutícula, seguido de una rápida proliferación de las células fúngicas en el interior del insecto causando la muerte, la cual puede ir seguida de la producción de esporas infectivas para repetir inmediatamente el ciclo, la producción de esporas no móviles, o de estructuras de resistencia que requieren de un periodo de inactividad. Así de un modo general, los hongos entomopatógenos presentan varias fases en el desarrollo de una micosis. La adhesión es el primer paso para la infección y consiste en la unión del propágulo fúngico a la cutícula del hospedero .Dicha unión implica mecanismos de adhesión controlados por las propiedades hidrofóbicas de la pared celular de la conidia (Boucias *et al.*, 1988) la cual contiene proteínas ricas en cisteína llamadas hidrofobinas (Inglis *et al.*, 2001).

Otro factor importante es la formación de toxinas las cuales son producidas por una gran mayoría de especies de hongos entomopatógenos. Estas sustancias pueden, en muchos casos, originar la muerte del insecto debido a sus propiedades

biocidas; además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del hospedero por alteraciones en los hemocitos y retraso en la agregación de las células de la hemolinfa (Vey y Götz, 1986). Las toxinas que producen los hongos entomopatógenos pueden ser macromoléculas proteicas o moléculas de tamaño medio a pequeño con bajo peso molecular (Roberts, 1981; Vey *et al.*, 2001).

Entre las toxinas producidas por hongos entomopatógenos destacan las destruxinas producidas por *M. anisopliae* como las más estudiadas. Posteriormente ocurre la muerte del insecto la cual se produce por una serie de factores incluyendo agotamiento de nutrientes, obstrucción física o invasión de órganos y liberación de toxinas, aunque el insecto muere, el hongo sigue su crecimiento saprofiticamente e invade los tejidos y los órganos internos, el cadáver ya colonizado se convierte en una momia, resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente debido a la acción de metabolitos producidos por el hongo, como por ejemplo oosporeina producida por *B. bassiana* (Inglis *et al.*, 2001) es así como se logra la diseminación de las esporas por acción de factores ambientales u otros organismos. Esta etapa reproductiva ocurre 24 a 48 horas después de que la espora atraviesa el integumento, pero depende de la humedad relativa. Las hifas forman conidióforos que dan origen a esporas asexuales (conidias) que son unidades infectivas con función de dispersión. Los factores ambientales controlan la formación de conidias, su supervivencia y su germinación, por lo que son críticos para el desarrollo de las epizootias (Carruthers y Soper, 1987).

3.2.1 Clasificación de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados taxonómicamente en el phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, subclase Hipocreomycetidae (Rehner y Buckley, 2005). Pertenecen al orden Hypocreales de la familia Clavicipitaceae (Hawksworth *et al.*, 1983) donde ejercen un papel

importante en la reducción natural de poblaciones de insectos y ácaros fitófagos en la agricultura, silvicultura y otros agrosistemas (Humber, 1989).

Entre los géneros más importantes se destacan *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Monzón, 2001).

3.2.2 Uso de hongos entomopatógenos en cultivos de palma de aceite

Los hongos capaces de causar enfermedades en insectos plaga son abundantes en Colombia y son considerados importantes reguladores de poblaciones de plagas en forma natural (Rodríguez, 1992).

En el país como resultado de diferentes investigaciones realizadas en insectos plaga de la palma de aceite se han encontrado diversas especies de hongos como *B. bassiana* que afecta larvas de *S. cecropia* Meyrick (Lepidoptera: Stenomidae), *Loxotoma elegans* Zeller (Lepidoptera: Stenomidae), *Opsiphanes cassina* Felder (Lepidoptera: Brassolidae), *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Brassolidae), *Anteotricha* sp. (Lepidoptera: Stenomidae). *B. brongniartii* en larvas de *L. elegans*; *M. anisopliae* Sorokin en larvas de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterigidae), *O. cassina*, *S. Cecropia*, larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae); *Paecilomyces lilacinus* en adultos de *Leptopharsa gibbicarina* Froeschner (Hemiptera: Tingidae) *Nomouraia rileyi* a larvas de *O. cassina*; *Hirsutella thompsoni* Fisher en adultos y estados inmaduros de *Retracrus elaeis* (Acari: Tetranychidae) y *Cordyceps* sp., en larvas de *S. aloeus* (Calvache, 2009).

3.2.3 *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

Es un hongo filamentoso de la clase Hyphomycete, división Deuteromicetes (hongo imperfecto o asexual). Al igual que los demás hongos entomopatógenos,

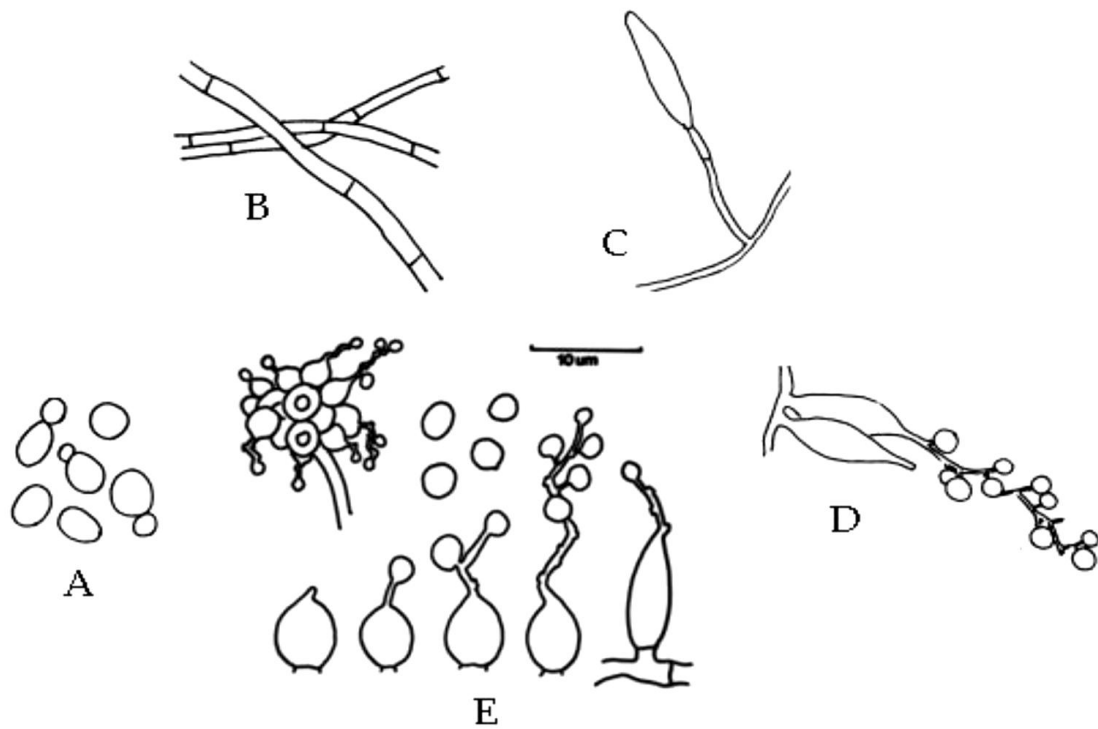
es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas y parasita insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección.

Fue descrita por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis bassiana*. Un año más tarde, Vuillemin la clasificó en su clase actual. Ensayos enzimáticos posteriores determinaron el género *Beauveria* sp, y diferenciaron seis especies: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata*, *B. vermiconia* y *B. caledonica*. Además se reporta en la literatura la existencia de otras especies, como *B. densa*, *B. stephanoderis*, *B. vermiconia* y *B. sulfurescens* (Viaud *et al.*, 1998; Kouassi, 2001).

Morfológicamente, está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 µm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis (Barron, 2001; Carrillo, 2005; Kouassi, 2001) así como se observa en la figura 3.

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas (Kouassi, 2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca a simple vista (Barron, 2001).

Figura 1. Estructuras morfológicas principales del hongo *Beauveria bassiana*. A. Esporas esféricas levemente ovaladas. B. Hifas septadas. C. Conidióforo simple. D. Proliferación simpodial del conidióforo. E. Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda). Figuras A-D modificadas de: Castillo, 2005. Figura E modificada de: Solter, 2004.



En cuanto a su reproducción, se sabe que los hongos que pertenecen a esta clase no les han sido posible determinar la fase sexual, limitándose únicamente al estado vegetativo. Sin embargo, (Viaud *et al.*, 1998) reportan que existe recombinación parasexual en el género *Beauveria* sp, así como en otros como *Aspergillus* sp y en las clases Ascomicete, Basidiomicete y Deuteromicete. Este tipo de proceso genético, consiste en primera instancia, en la formación de un heterocarión (una célula con dos o más núcleos genéticamente diferentes), donde se produce la fusión de dos núcleos haploides diferentes para formar un núcleo diploide heterocigoto. Luego se produce una recombinación mitótica, reduciendo la

información genética por núcleo al nivel original del haploide. Este tipo de proceso genera grandes variaciones genéticas, debido a cruces intercromosómicos, pero se ve limitado muchas veces por incompatibilidad vegetativa (Jenkins, 1990; Viaud *et al.*, 1998).

3.2.4 *M. anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin

El género *Metarhizium* presenta conidias alargadas de color verde, producidas en forma aglomerada a partir de fiálides; las conidias son ramificadas en forma simple, en pares o verticilos, están en forma alineada formando una capa esporógena. La pared celular de este hongo ofrece propiedades lipofílicas puesto que su capa bilipídica está compuesta especialmente por ácidos grasos poli insaturados que contienen de 16 a 18 carbonos (Griffin, 1981).

M. anisopliae es el agente causal de la Muscardina verde. Esta especie sufre con frecuencia de heterocariosis, dando como resultado muchas diferencias en cuanto a virulencia de las variedades. Produciendo quitinasa, lipasa y proteasa para la penetración de la cutícula y vía bucal, de tal forma que los insectos mueren debido a la pérdida de nutrientes y por la acción de las toxinas (Kuno *et al.*, 1982).

Este hongo tiene generalmente las conidias unidas formando una estructura llamada sinemata, probablemente se genera por la necesidad ecológica para expandirse sobre el hospedero, ya que no es muy frecuente su presencia cuando el hongo se cultiva en medios artificiales (Griffin, 1981).

En Colombia el hongo *M. anisopliae* ha sido registrado parasitando 24 especies de insectos pertenecientes a 12 familias de los órdenes Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera y Hemiptera (Hernández y Rodríguez, 1992). En cultivo de palma *M. anisopliae* ha sido aislado de larvas de *S. valida* en palmas de Tumaco, además se ha encontrado afectando larvas de *O. cassina* en el municipio de Puerto Wilches (Calvache, 2002).

3.2.5 Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos

B. bassiana como *M. anisopliae* presenta la habilidad de vivir de manera parasítica y saprofítica lo que les permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos huésped, respectivamente.

Cuando se encuentran en suelo con materia orgánica, su morfología micelial genera redes de filamentos originados a partir de conidios; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina y una vez dentro del insecto, forman redes de hifas, las cuales colonizan y pasan nuevamente a una forma similar a la de levadura (blastóspora) (Wong, 2003).

El ataque de este hongo sobre el insecto huésped, se realiza en diferentes etapas divididas en: Adherencia, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi, 2001).

El primer paso se produce cuando el conidio se adhiere a la cutícula. Para ello es necesario el reconocimiento y compatibilidad (por ejemplo de enzimas y glicoproteínas) entre el conidio y las células del tegumento del insecto, influida por dos acciones, una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas, y otra activa, en la cual se secretan mucílagos, que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana y generan un ambiente favorable para la secreción de enzimas (Kouassi, 2001; Wong, 2003; Duperchy, 2003). Una vez que se haya adherido, inicia la germinación, que es dependiente de las condiciones que le pueda brindar el insecto y el ambiente (Kouassi, 2001; Duperchy, 2003).

La diferenciación del hongo, inicia con la formación de un tubo germinativo, similar a un apesorío, el cual ayuda a la penetración de la cutícula por actividad enzimática extracelular (quitinasas, lipasas, esterases, y proteasas) y presión mecánica (Kouassi, 2001; Wong, 2003; Duperchy, 2003).

Este mismo facilita la invasión de la epidermis e hipodermis. Finalmente, se produce la invasión y proliferación de las hifas en el tracto digestivo. Este paso ocurre luego de la muerte del insecto, ocasionado por daño mecánico, desnutrición y toxicidad, y es cuando las hifas secretan un antibiótico (oosporina) que ataca las bacterias del intestino (Wong, 2003). Suprimidas las barreras inmunes del insecto, el hongo invade el tracto digestivo, se alimenta de su interior y lo momifica.

3.2.6 Producción de micotoxinas

En el proceso de multiplicación de los hongos, en el hemocele del insecto se producen toxinas, que pueden causar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas y además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones en los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (López, 1994). Entre las principales toxinas producidas por los hongos entomopatógenos se destacan la beauvericina, beauverolides, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas a, b, c y d y Cytochalasinas.

3.2.7 Factores que afectan la viabilidad de las conidias

La humedad y la temperatura son requeridas generalmente para la esporulación rápida y posterior germinación de las conidias. La infección del insecto puede ser independiente de la humedad ambiental siempre y cuando el insecto disponga en su superficie de suficiente humedad; esto conduciría a la suposición de que el fenómeno físico de la capa límite del integumento del insecto, facilita la germinación de las conidias (Ferron, 1978).

El rango de temperatura óptima para el crecimiento y esporulación de los hongos Entomopatógenos se encuentra entre los 25 y 30 °C y la humedad relativa óptima es del 94%; sin embargo el hongo es capaz de sobrevivir a una humedad relativa del 45% (Ávila y Umaña 1988).

Las conidias se ven principalmente afectadas por longitudes de onda inferior a 320 nanómetros; esta radiación puede causar retardo en la germinación o muerte del conidio debido a la inducción de cambios en la división celular, actividad enzimática, permeabilidad de la membrana, transporte iónico y metabolismo de los fosfatos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 ZONA DE ESTUDIO

4.1.1 Ubicación del área de ensayo

El presente ensayo se realizó bajo condiciones de laboratorio y campo en lotes de palma de aceite *Elaeis guinensis* con edad de siete años (Renovación 2006), en la empresa Palmas del Cesar S.A, ubicada en el corregimiento de Minas, municipio de San Martín (Cesar); la reactivación de cepas de hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal en los meses de enero y febrero del año 2013.

4.2 PATOGENICIDAD DE DOS AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LARVAS DE *S. cecropia*

4.2.1 Selección de cepas

El laboratorio de Sanidad Vegetal de la empresa Palmas del Cesar S.A cuenta con cepas colectadas en campo de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, hongos que fueron encontrados afectando larvas de *S. cecropia*; estos aislamientos se utilizaron como cepas madre.

4.2.2 Producción de conidias

Los aislamientos se sembraron en un medio comercial de cultivo papa dextrosa (PDA), se utilizaron 39 g de medio aforados en 1.000 ml de agua destilada estéril, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 120 libras de presión durante 15 min. Posteriormente se vertió en cajas de petri de 52 mm de diámetro y se dejó solidificar. La siembra de cada aislamiento se hizo raspando las conidias con un asa redonda metálica dejándolas caer sobre el medio. Las cajas fueron selladas

con plástico vinipel y se incubaron a 25°C, durante 15 días, tiempo que tardan los hongos en esporular en la figura 2 y 3 se observa el crecimiento de los hongos sobre el medio de cultivo.

Figura 2. Producción de conidias del aislamiento de *B. bassiana* seleccionado para el control de *S. cecropia*. Foto: Viviana Dueñas, 2013.

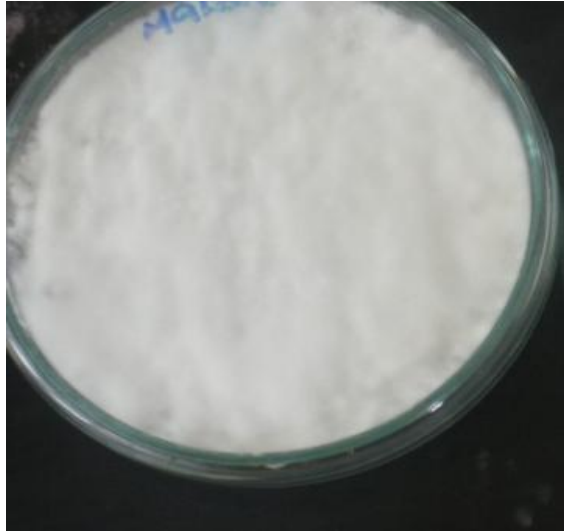


Figura 3. Producción de conidias del aislamiento de *M. anisopliae* seleccionado para el control de *S. cecropia*. Foto: V. Dueñas, 2013.



4.2.3 Preparación de los aislamientos por dilución seriada

Se realizó un raspado de la superficie del micelio, obteniendo una extracción máxima de conidias. Se colocaron las conidias en un erlenmeyer con 50 ml de agua destilada estéril y tween 80 al 0,1%, esta suspensión se agitó por 20 minutos. La mezcla resultante fue una suspensión concentrada de inóculo, la cual fue considerada como solución madre, con esta solución se prepararon diluciones en serie de 10^{-1} , 10^{-2} hasta 10^{-3} con el fin de realizar el conteo de conidias presentes en la suspensión.

El conteo de conidias se realizó con la cámara de Neubauer. Los recuentos fueron observados al microscopio con el objetivo 40x y se contaron cinco cuadrantes de la cuadrícula central, los ubicados en los extremos y el del medio, estos conteos se realizaron en la dilución 10^{-3} .

4.2.4 Inoculación de *Stenoma cecropia* con las cepas a reactivar

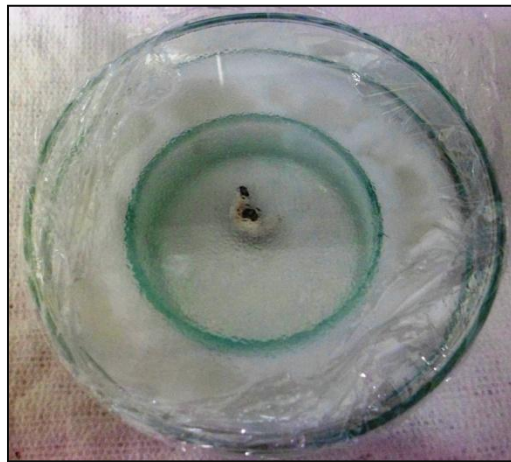
Para la inoculación de los aislamientos seleccionados, se desinfectaron 60 larvas de *S. cecropia* en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se colocaron sobre recipientes de vidrio, la suspensión 10^{-3} fue inoculada directamente sobre el integumento del insecto en un volumen de 1 μ l. Los insectos infectados fueron alimentados con folíolos de palma previamente desinfectados con una solución de hipoclorito al 0.5 %, se evaluaron las dos cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y un testigo con agua destilada. Las evaluaciones se realizaron a partir del primer día, los datos de mortalidad se tomaron a partir del día de inoculación por intervalos de tiempo de 24 horas durante 10 días después de la infección.

4.2.5 Montaje en cámara húmeda de larvas de *S. cecropia* infectadas

Los insectos que presentaron esporulación, fueron remojados en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces y se

secaron sobre papel filtro estéril, después fueron colocados en una caja de petri pequeña, la cual fue introducida en una caja de petri grande rodeada por algodón estéril humedecido y se incubaron a temperatura ambiente durante 8 días como se observa en la figura 3.

Figura 4. Montaje en cámara húmeda de larvas *S.cecropia* infectadas con *B. bassiana*. Foto: V. Dueñas, 2013.

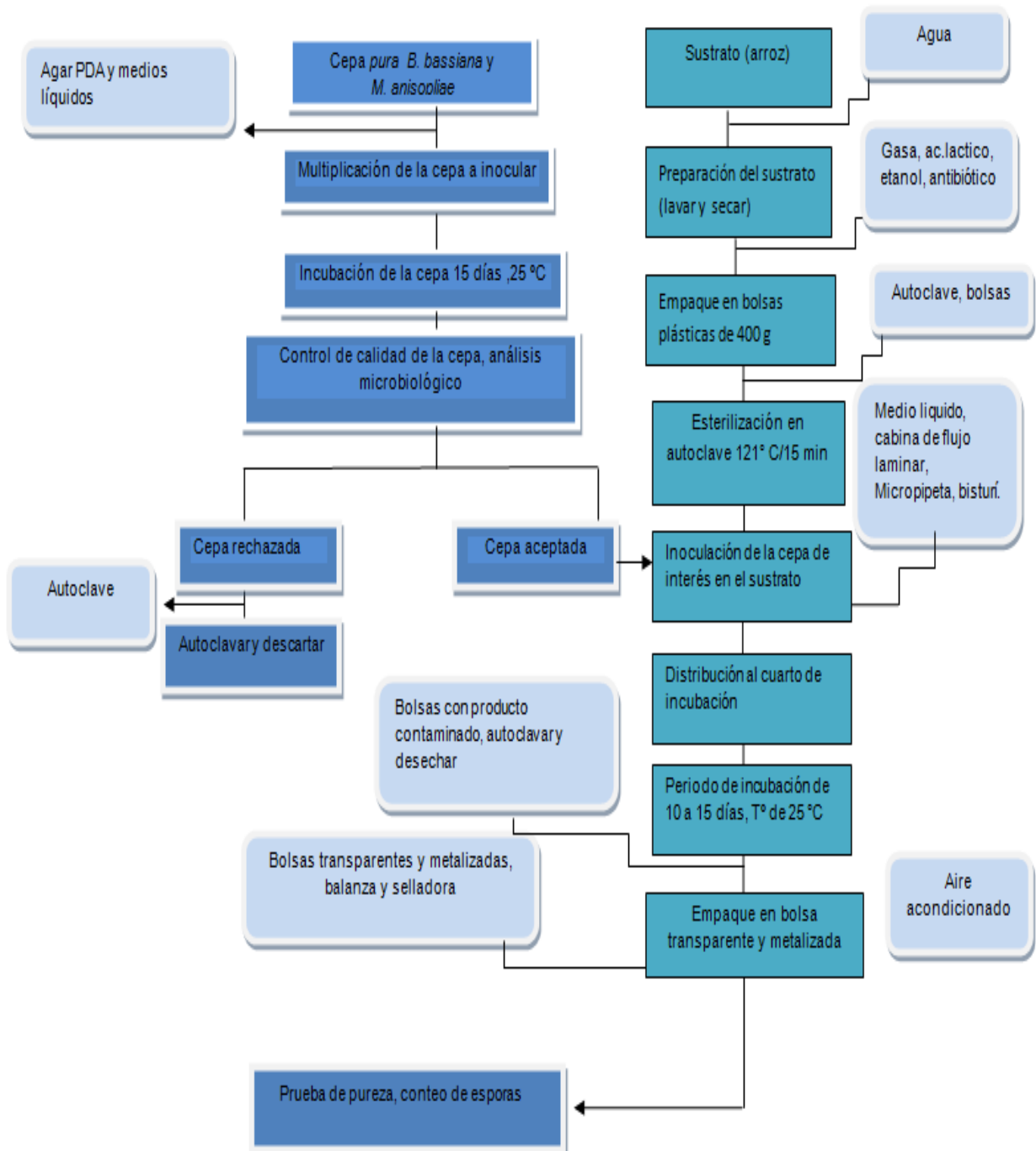


4.3 PRODUCCIÓN DE HONGOS *B. bassiana* y *M. anisopliae* SOBRE SUSTRATO A BASE DE ARROZ

Se bioaugmentaron en medios líquidos que contenían 50 g de papa, 100 gramos de azúcar y 1g de sal por cada litro de agua destilada estéril. Se retiró la cáscara de la papa, se cortó en pequeños trozos y ablandó calentando a 90 °C en una plancha de calentamiento. Se homogenizó la muestra en una licuadora. El medio líquido se vertió en un erlenmeyer y fue esterilizado a 120 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Sobre el medio se dispersaron las conidias obtenidas del raspado de las cajas que contenían los hongos, esta muestra se agitó en un agitador magnético durante 45 minutos y posteriormente fue inoculado sobre

arroz; el proceso llevado a cabo sobre el sustrato utilizado es descrito en el diagrama 1.

Figura 5. Diagrama. Proceso de producción y control de calidad de hongos



4.4 EVALUACION DE CEPAS PRODUCIDAS EN ARROZ PARA EL CONTROL DE *S. cecropia* EN CONDICIONES DE CAMPO

4.4.1 Evaluación de viabilidad y pureza del hongo

Se realizó para determinar el porcentaje total de conidios que se encuentran viables en el producto, es decir que tienen la capacidad de germinar. Para esto se tomaron 10 gramos de sustrato con el hongo ya esporulado y se diluyeron en una solución de 90 ml de tween 80 al 0,1 %, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-3} , se obtuvieron conteos de esporas en la dilución 10^{-3} de 10^9 esporas/ml. Esta solución se aplicó sobre cuatro puntos en cajas de petri que contenían agar bacteriológico, la cantidad inoculada fue de 50 μ l por cada punto; la evaluación se realizó a las 24 horas, para ello se tomó la caja de petri y colocó sobre el estereoscopio en el objetivo 10x; se contaron las esporas germinadas y no germinadas, tomando como referencia 100 esporas, se evaluó como conidia germinada aquella que presento tubo germinativo.

Para determinar la pureza del producto se tomó 1 ml de la solución y se inoculó sobre agar PDA con la ayuda de un asa de vidrio se expandió el líquido por toda la superficie del agar; las cajas fueron incubadas a 25°C durante 15 días, posteriormente se realizó tinción de los hongos esporulados con azul de lactofenol para identificación de estructuras características, para ello se agregó una gota de azul de lactofenol sobre una laminilla de vidrio, con la ayuda de una cinta transparente delgada se tomó cuidadosamente de la superficie del agar una muestra y se pegó sobre la laminilla; este montaje fue observado en el microscopio en el objetivo 40 X.

4.4.2 Lectura de concentración en cámara de Neubauer

Para el conteo de conidios, se utilizó la solución de esporas obtenidas de la dilución 10^{-3} . Para realizar el conteo, solo se utilizó el cuadrante central, que está dividido a su vez, en 25 cuadrantes secundarios, de los cuales se tomaron los 5

cuadrantes, 4 cuadrantes de los extremos y el del medio. Para obtener el total de conidias, se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo de conidias} = \frac{P \times FD}{Sr \times PC \times D}$$

Donde

P: Suma de las conidias contadas

FD: Factor inverso de dilución

Sr: Superficie recontada: 5 cuadrados ($5 \times 0,04 \text{ mm}^2 = 0,2 \text{ mm}^2$)

PC: Profundidad de la cámara: 0,1mm

D: Dilución: 1:1.000

5. MONITOREO POBLACIONAL DE *S.cecropia*

5.1 LECTURA DE *STENOMA CECROPIA* EN LOTES DE R2006

Se realizaron lecturas de plagas en el mes de abril con el fin de determinar el nivel poblacional del insecto, se utilizó una guía en la cual se especificó el número de hectáreas que tiene cada lote que conforma la renovación 2006 (cultivo de 67 hectáreas), para este ensayo se tomaron 124 muestras al cultivo en dirección oriente-occidente-sur-norte. Las guías utilizadas para la toma de muestras fueron las mismas a evaluar en la verificación del control después de realizar la aplicación de los hongos entomopatógenos. Las muestras tomadas para los controles realizados con *M. anisopliae*, se describen en las tablas 2 y 3, de igual forma para *B. bassiana* en las tablas 4, 5 y 6 respectivamente.

Tabla 2. Muestras a evaluar Lote 1 RO6 controladas con *M. anisopliae*

Lote 1 R06	N palmas: 1,645	N muestras: 22	
Or-occ-s-n	N líneas: 63	Área: 11,58 ha	
Línea	Palmas por línea	Primera muestra	Segunda muestra
4	20	4	14
10	23	17	4
16	26	5	19
22	26	19	5
28	27	5	20
33	27	20	5
38	28	6	20
43	27	20	5
48	29	6	21
53	30	22	6
58	32	7	23

Tabla 3. Muestras a evaluar lote 2 R06 controladas con *M. anisopliae*

Lote 2 R06		N palmas: 3,095	N muestras: 36
Or-occ-s-n		N líneas: 98	Área: 21,69 ha
Línea	Palmas por línea	Primera muestra	Segunda muestra
2	42	9	31
6	44	32	10
11	45	10	33
14	44	32	10
18	44	10	32
22	44	32	10
26	44	10	32
30	43	32	9
34	44	10	32
38	44	32	10
42	44	10	32
46	44	32	10
50	44	10	32
54	45	33	10
58	45	10	33
62	45	33	10
74	8	3	3
89	11	6	2

Tabla 4. Muestras a evaluar lote 3 R06 controladas con *B. bassiana*

Lote 3 R06		N palmas: 2,201	N muestras: 32
Or-occ-s-n		N líneas: 96	Área: 15,53 ha
Línea	Palmas por línea	Primera muestra	Segunda muestra
4	22	4	16
11	18	11	4
18	23	4	17
23	23	17	4
29	24	5	17
37	24	17	5
42	23	4	17
48	23	17	4
54	24	5	17
60	24	17	5
66	24	5	17
72	24	17	5
78	24	5	17
84	25	18	5
90	24	5	17
95	22	16	4

Tabla 5. Muestras a evaluar lote 4 R06 controladas con *B. bassiana*

Lote 4 R06		N palmas:1,917	N muestras: 26	
Or-occ-s-n		N líneas: 94	Área: 13,62 ha	
Línea	Palmas por línea	Primera muestra	Segunda muestra	
4	22	4	16	
11	22	16	4	
18	22	4	16	
25	23	17	4	
32	22	4	16	
39	22	16	4	
46	20	4	16	
53	19	13	4	
61	22	4	16	
68	22	16	4	
75	22	4	16	
82	22	16	4	
89	18	3	13	

Tabla 6. Muestras a evaluar lote 5 R06 controladas con *B. bassiana*

Lote 5 R06		N palmas:613	N muestras: 8	
Or-occ-s-n		N líneas: 51	Área: 4,30 ha	
Línea	Palmas por línea	Primera muestra	Segunda muestra	
5	15	3	10	
14	13	8	3	
28	10	2	6	
41	8	3	3	

5.2 CONTROL CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN CULTIVO R06

Por medio de fumigaciones aéreas fueron tratadas las 67 hectáreas pertenecientes al cultivo renovación 2006, la dosis utilizada fue 1 Kg/ha de los hongos a evaluar. En el proceso de lavado se utilizaron 12 litros de agua por kilo de producto, esta solución se aforo en un tanque de mezcla junto a un Coadyuvante de carácter no iónico (Cosmo in 160 cc/ vuelo) para garantizar una mayor cobertura y adherencia del biológico sobre las hojas.

Inicialmente se realizaron mediciones de pH con tirillas indicadoras, las cuales marcaron 6 en el agua, la temperatura se midió con un termómetro de mercurio y se obtuvo un promedio de 28°C de 6 a 9:30 a.m.; tiempo transcurrido de fumigación. Los operarios contaban con los elementos de protección necesarios para realizar este tipo de labores como se observa en la figura 6.

Figura 6. Fumigación con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en cultivos R06. Foto: V. Dueñas, 2013.



6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 PATOGENICIDAD DE DOS AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LARVAS DE *S. cecropia*

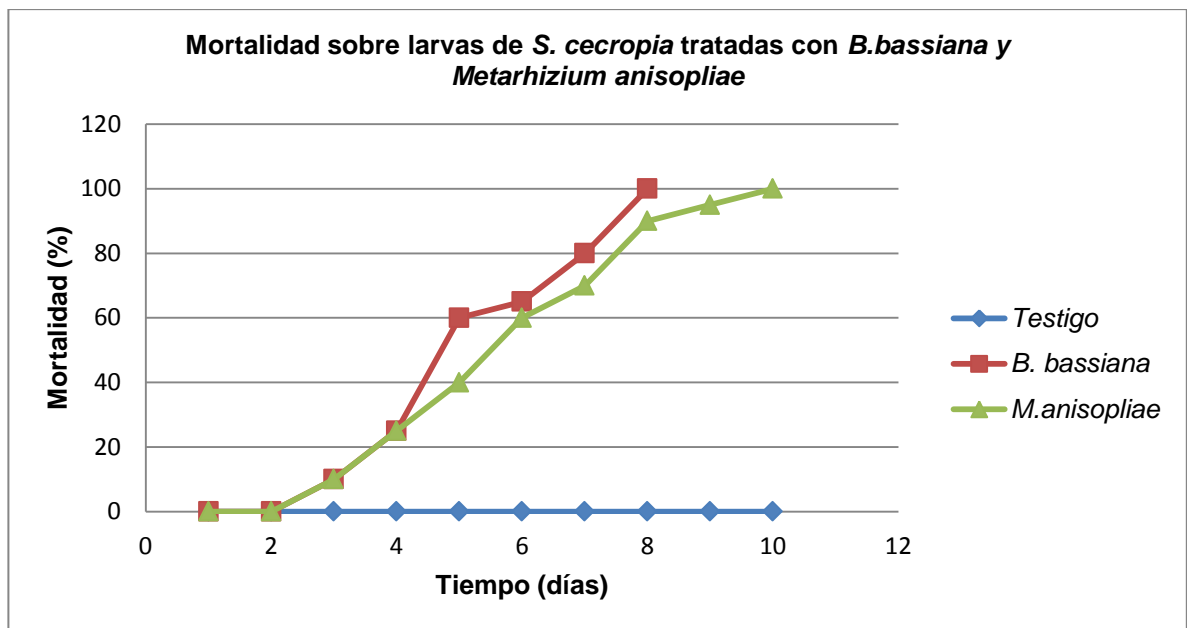
Las concentraciones obtenidas en cada aislamiento fueron: *B. bassiana* 1×10^9 conidias/ml y *M. anisopliae* $1,9 \times 10^9$ conidias/ml. Los aislamientos obtenidos bajo condiciones de laboratorio, presentaron colonias con crecimiento moderadamente rápido para *B. bassiana*, obteniéndose esporulación a los 9 días de realizada la siembra y crecimiento lento para *M. anisopliae* el cual esporulo 15 días después de la siembra. Esto permitió observar características de crecimiento de cada cepa como su aspecto, color y velocidad de crecimiento. De igual manera las larvas de *S. cecropia* colocadas en cámaras húmedas permitieron observar la emisión de conidias de color blanco en larvas infectadas por *B. bassiana* y de color verde en larvas infectadas por *M. anisopliae*, descrito en diversos trabajos (Samson et al., 1988; Humber, 1981). Con respecto a los síntomas que presentaron las larvas de *S. cecropia* como disminución en su actividad locomotora y en la ingesta de tejido foliar. Una explicación de este tipo de cambios durante la etapa de infección del hongo, podría estar ligada con la acción de toxinas como beauvericina producida por *B. bassiana* y la destruxina producida por *M. anisopliae* que durante el periodo de infección reduce la actividad fisiológica inhibiendo la formación de aminoácidos (Nation, 2002), degradación de proteínas, lípidos y polisacáridos (Troughakos y Margaritis, 2002).

6.1.1 Resultados obtenidos en la inoculación de *Stenoma cecropia* con las cepas a reactivar

Con respecto a la mortalidad de las larvas en los ensayos realizados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio, se observó que la población disminuyó a partir del tercer día. En los tratamientos evaluados excepto

el testigo, la mortalidad fue del 100% a los ocho días en larvas tratadas con *B. bassiana* y diez días para larvas tratadas con *M. anisopliae*. (Figura 7); de igual forma se demostró la susceptibilidad del insecto expuesto a una concentración de esporas de 1×10^9 conidias/ml de *B. bassiana* y $1,9 \times 10^9$ conidias/ml de *M. anisopliae*, esto concuerda con los ensayos descritos por Butt y Goettel, 2000; donde se estipula que la concentración mínima de conidias para obtener controles significativos sobre insectos considerados plaga debe ser mayor o igual a 10^8 conidias/ml.

Figura 7. Resultados de mortalidad de larvas de *S. cecropia* con soluciones de conidias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio.



6.1.2 Montaje en cámara húmeda de larvas de *S. cecropia* infectadas

La esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fue muy similar sobre las larvas de *S. cecropia*, después de someterlas a un periodo de incubación (Figura 8 y 9). Existen también diversas razones que puedan explicar la alta esporulación que presentaron las larvas en los dos tratamientos evaluados, tales como la

temperatura y humedad relativa en el ambiente de incubación de las larvas infectadas, presencia de nutrientes u otros factores ideales para el desarrollo de las conidias (Tanada y Kaya, 1993). La capacidad de esporulación de los hongos entomopatógenos sobre su hospedero es fundamental para la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo, permitiendo reinfecciones a partir de insectos parasitados.

Figura 8. Esporulación de *B. bassiana* sobre larva de *S. cecropia* después de periodos de incubación en cámara húmeda Foto: V. Dueñas, 2013.

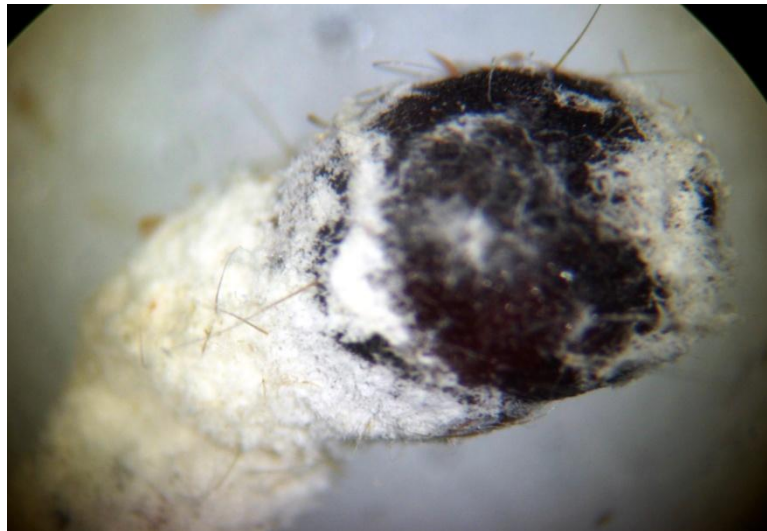
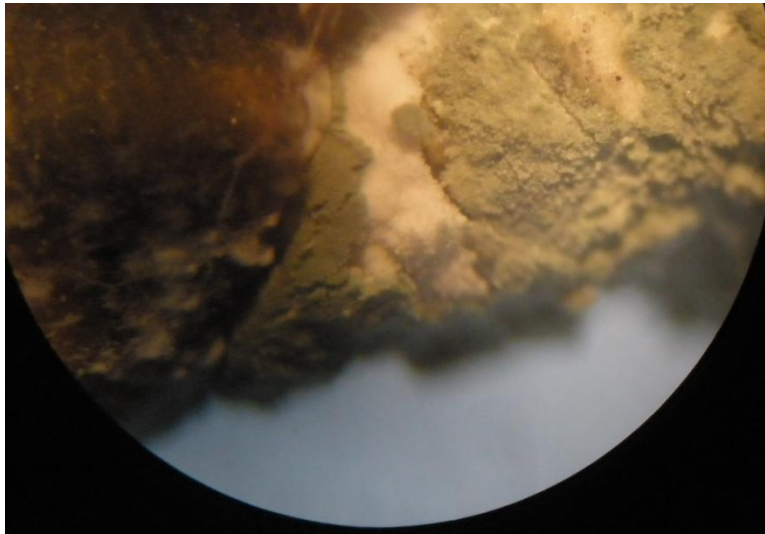


Figura 9. Esporulaci3n de *M. anisopliae* sobre larva de *S. cecropia* despu3s de periodos de incubaci3n en c3mara h3meda Foto: V. Dueñas, 2013.



6.2 PRODUCCI3N DE HONGOS *B. bassiana* y *M. anisopliae* SOBRE SUSTRATO A BASE DE ARROZ

Durante la reproducci3n de las cepas seleccionadas sobre el arroz, se realiz3 la inoculaci3n de los hongos sobre arroz esterilizado en proporci3n de 200 g, para cada microorganismo evaluado se inocularon 335 bolsas, las cuales fueron sometidas a un proceso de incubaci3n a temperatura ambiente durante 15 d3as (figura 10 y 11) periodo en el cual se realizaron las pruebas de calidad necesarias para determinar si el producto cumpl3a con las caracter3sticas necesarias para ser liberado en campo, obteni3ndose concentraciones de esporas de 1×10^9 conidias por gramo de producto inoculado con *B. bassiana* y $1,9 \times 10^9$ conidias por gramo de producto inoculado con *M. anisopliae*, porcentaje de germinaci3n mayor al 90% y pureza superior al 95% en las dos cepas evaluadas.

Figura 10. Crecimiento de *B. bassiana* sobre arroz. Foto: V .Dueñas, 2013.

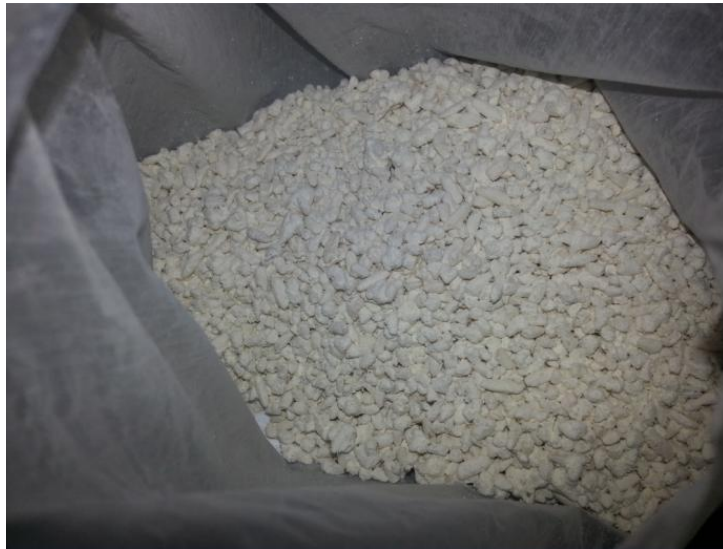


Figura 11. Crecimiento de *M.anisopliae* sobre arroz. Foto: V .Dueñas, 2013.



Una etapa importante para obtener buenos resultados es la formulación del producto que consiste en conjunto de ciertas actividades organizadas conducentes a la determinación de las características de principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que este puede sufrir solo o al combinarlo con auxiliares de formulación necesarios para la elaboración de producto final (Gómez y Villamizar 2000; Morales, 1993).

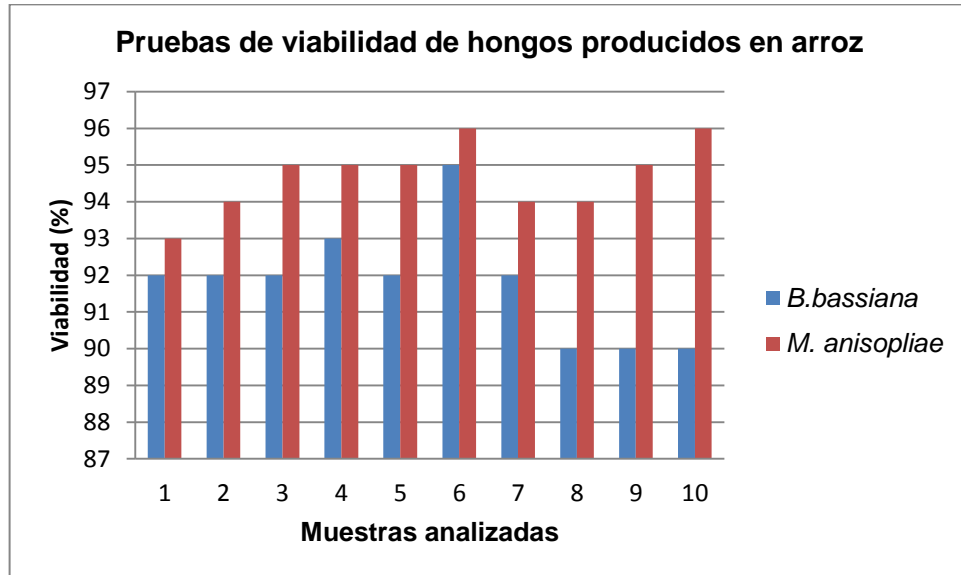
Diferentes estudios han comprobado que los bioinsecticidas formulados en sustratos sólidos, la materia activa se encuentra dispersa en un vehículo inerte sólido, presentando mayor fluidez y estabilidad de sus componentes (Barbera, 1976; Díaz y Forero, 1997; Marino, 2001).

6.2.1 Evaluación de viabilidad y pureza del hongo

Se realizaron conteos de conidias germinadas sobre 10 muestras al azar de los 67 kilos producidos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, para realizar los ensayos se tomaron 10 bolsas al azar de cada hongo, la viabilidad de las conidias fueron evaluadas a las 24 horas, en la figura 10 se especifica los porcentajes de viabilidad obtenidos.

Según los datos obtenidos se observa que los conteos realizados alcanzaron un porcentaje de viabilidad en promedio del 92% en muestras de *B. bassiana* y del 95% en muestras de *M. anisopliae*, estos resultados concuerdan con lo descrito por Gómez y Villamizar quienes especifican que el porcentaje de germinación de hongos producidos sobre sustrato debe ser mayor al 90% para lograr un control biológico eficiente.

Figura 12. Resultados de pruebas de viabilidad sobre producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato arroz.



La pureza se determinó realizando siembra de la dilución 10^{-3} de los hongos en crecimiento sobre arroz, esta solución fue sembrado sobre cuatro puntos en agar PDA y se incubo por 15 días, las cajas fueron evaluadas para determinar si hubo crecimiento de otros hongos de tipo ambiental, a su vez se realizó tinción de las conidias para determinar características microscópicas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en la figura 11 se especifican los porcentajes de pureza obtenidos y en las figuras 13 y 14 se observan características microscópicas de los hongos producidos.

Figura 13. Resultados de pruebas de pureza sobre producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato arroz.

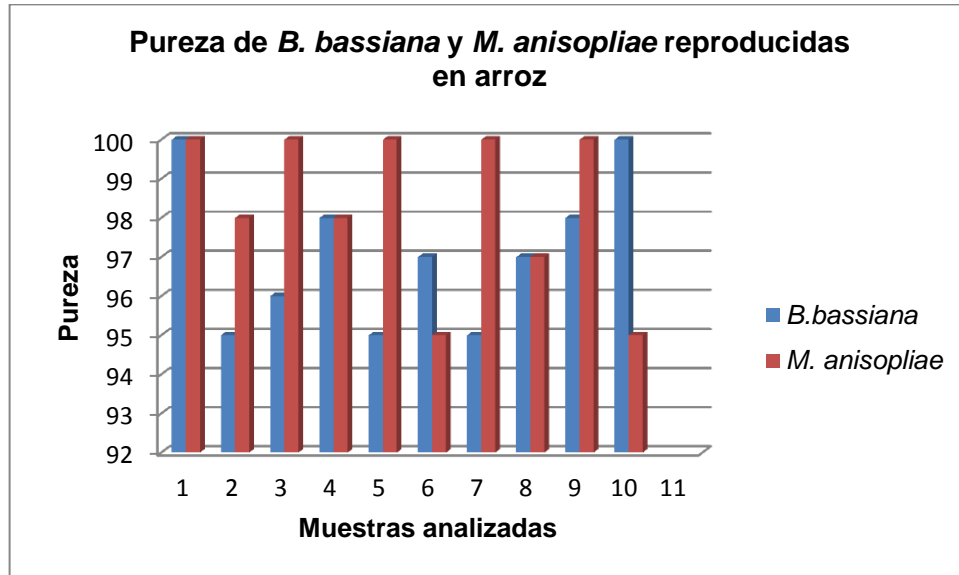


Figura 14. Estructuras morfológicas principales del hongo *B. bassiana* observadas mediante tinción con azul de lactofenol. Foto: V. Dueñas, 2013.

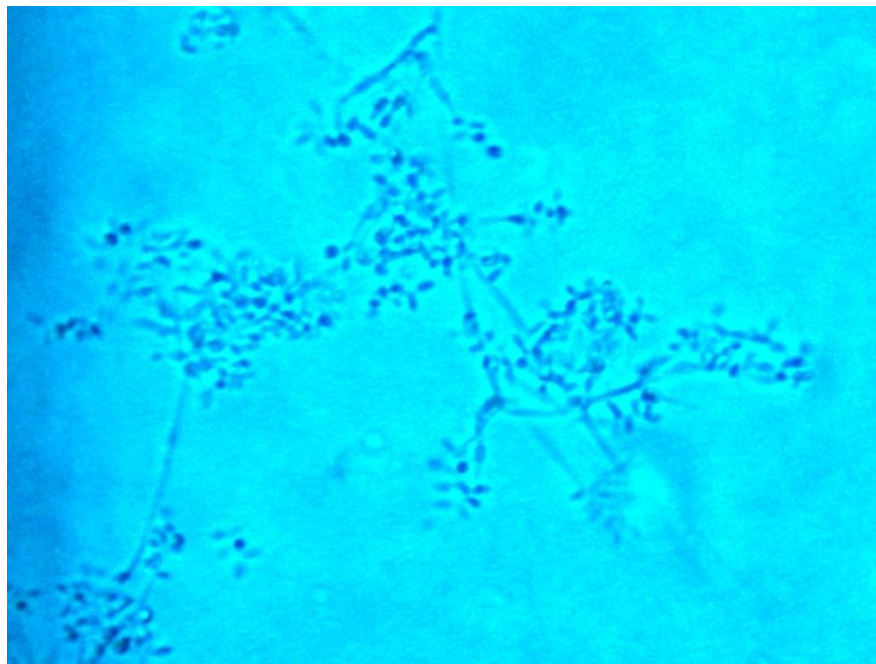
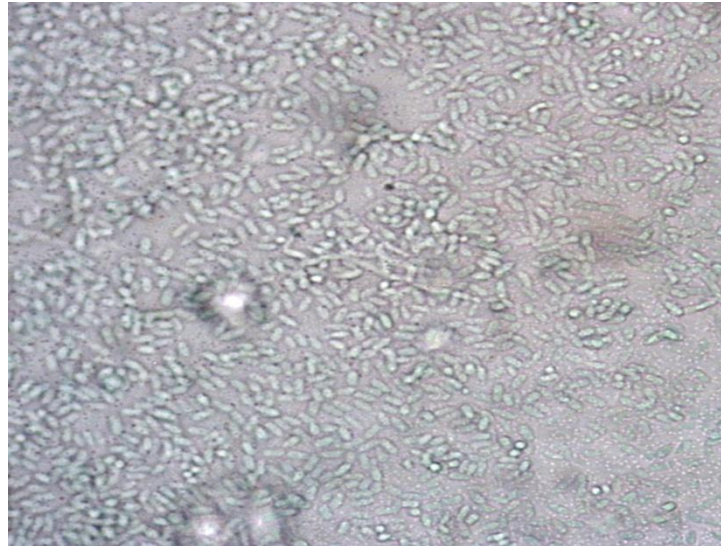


Figura 15. Conidias del hongo *M. anisopliae* observadas mediante tinción con azul de lactofenol. Foto: V. Dueñas, 2013.



6.2.2 Lectura de concentración en cámara de Neubauer

Para el conteo de conidios se tomaron 10 muestras aleatorias de los hongos producidos en arroz posterior a 15 días de incubación, se utilizó la solución de esporas obtenidas de la dilución 10^{-3} , en la tabla 7 se especifica el conteo de conidias por cada muestra analizada

Tabla 7. Conteo de conidias de *B.bassiana* y *M. anisopliae* reproducidos en arroz

producto	Conteo de conidias/g muestra	
	Muestras	B.bassiana
1	1,05x10 ⁹	2x10 ⁹
2	1x10 ⁹	1,5x10 ⁹
3	1x10 ⁹	2x10 ⁹
4	1,05x10 ⁹	1,5x10 ⁹
5	1,05x10 ⁹	2x10 ⁹
6	1x10 ⁹	2x10 ⁹
7	1x10 ⁹	2x10 ⁹
8	1x10 ⁹	2x10 ⁹
9	1x10 ⁹	2x10 ⁹
10	1x10 ⁹	2x10 ⁹

Según los resultados obtenidos el promedio de conidias por gramo fue de $1 \cdot 10^9$ en muestra del hongo *B. bassiana* y $1,9 \cdot 10^9$ en muestras de *M. anisopliae*, esta concentración de conidias permite obtener buenos resultados en aplicaciones realizadas en campo.

6.3 MONITOREO POBLACIONAL DE *S. cecropia*

Se realizaron lecturas de plagas con el fin de determinar el nivel poblacional del insecto, en las muestras se encontraron larvas en tercer instar, para realizar el monitoreo se hicieron lecturas de larvas en la hoja 9 de la palma seleccionada para la toma de muestra, los valores obtenidos en el monitoreo y controles relacionados para cada lote se especifican en los anexos 1, 2, 3 ,4 y 5 respectivamente.

6.3.1 Control con hongos entomopatógenos en cultivo R06

Para realizar el control con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se tuvo en cuenta la población inicial, la cual se obtuvo del análisis de 124 muestras distribuidas en todo el cultivo, una vez realizada la fumigación aérea se tomo la segunda lectura 15 días después sobre las mismas muestras analizadas inicialmente. Para medir el porcentaje de eficiencia de los hongos entomopatógenos sobre las larvas monitoreadas se tuvo en cuenta la disminución de la población, los datos obtenidos se especifican en la tabla 8.

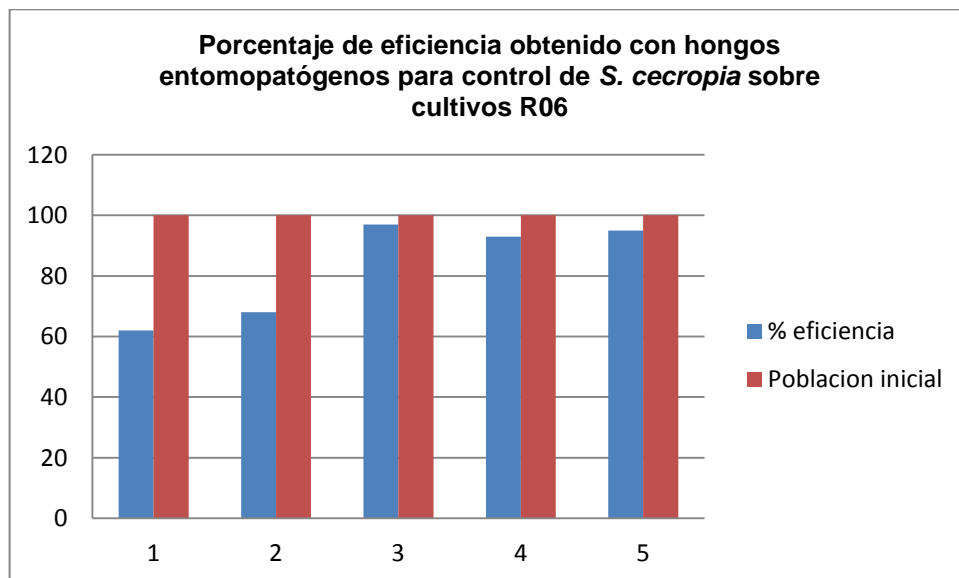
Tabla 8. Porcentaje de eficiencia obtenido sobre larvas de *S. cecropia* utilizando hongos entomopatógenos en cultivo R06.

Lote	Hongo Utilizado	Promedio población inicial	Promedio población final	% eficiencia
1	<i>M. anisopliae</i>	9,8	3,8	62
2	<i>M. anisopliae</i>	12,6	3,97	68
3	<i>B. bassiana</i>	14,4	0,41	97
4	<i>B. bassiana</i>	13,1	0,88	93
5	<i>B. bassiana</i>	11,8	0,63	95

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que los mejores controles se obtuvieron en los lotes a los cuales se le aplicó *B. bassiana*, la mortalidad obtenida fue superior al 90%, alcanzando su mayor control en el lote 3 con un 97% lo que indica que a pesar de tener menor concentración de conidias con respecto a *M. anisopliae* su actividad patogénica fue mayor, esto podría relacionarse con la susceptibilidad de las larvas de *S. cecropia* a la acción de toxinas como beauvericina (Nation, 2002).

Los resultados obtenidos con *M. anisopliae* fueron menos eficientes logrando su máximo control en el lote 2 con un 68%. Aunque los controles se hicieron bajo las mismas condiciones la variación es notoria entre los dos microorganismos evaluados, sobrepasando *B. bassiana* en un 29% el porcentaje de eficiencia frente a los controles realizados con *M. anisopliae*. En la figura 16 se especifica el porcentaje de eficiencia obtenido en cada lote.

Figura 16. Porcentajes de eficiencia en el control de *S. cecropia* obtenidos en el cultivo R06.



Los resultados obtenidos define la importancia de evaluar diferentes microorganismos en condiciones de campo, ya que es bajo condiciones ambientales drásticas en que se podría apreciar las ventajas de la aplicación de cepas específicas, en este caso hubo un mayor efecto controlador por parte de *B.bassiana* sobre las larvas de *S. cecropia*

CONCLUSIONES

Según los resultados, el aislamiento de *B. bassiana* del banco de entomopatógenos de la empresa Palmas del Cesar, fue el más patogénico en larvas de *S. cecropia*, superando el porcentaje de mortalidad obtenida por *M. anisopliae*. La cepa de *B. bassiana* causó una mortalidad en poblaciones de larvas hasta el 97% en condiciones de campo y 100% en condiciones de laboratorio, lo que indica su capacidad virulenta, contrario a los resultados obtenidos con *M. anisopliae* el cual disminuyó su actividad en condiciones de campo a un 67%.

Utilizar como sustrato para la reproducción de los hongos arroz es un método económico y eficiente para propagar los hongos en campo; con los resultados obtenidos se evidencia la calidad de las conidias producidas sobre este sustrato.

El desarrollo de formulaciones con hongos entomopatógenos constituye una alternativa diferente al control químico, especialmente sobre larvas de *S. cecropia* en cultivos de palma, esta cepa podría utilizarse como un componente microbiano en los programas de Manejo Integrado de Plagas en diferentes plantaciones de palma de aceite en Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

Amiri, B.; Khambay, S.; Cameron, M. Deadman, and T.M. Butt 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycol. Res.* 104:447–452.

Avila, E.; Umaña, I. 1988. Aspectos de la biología y patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, sobre *Aenolamia varia* (F). *Revista ICA.* 23: 155-166.

Aldana de la Torre, C.; Aldana de la Torre, J.; Calvache, H.; Bautista, P. Manual de plagas de la palma de aceite en Colombia. Fedepalma. Cuarta edición. 2009.

Allendes, G. Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (metsch) Sorokin.; para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. Pontificia Universidad Católica del Valparaíso. Facultad Agrónoma. 2007.

Bidochka, M.J., A. M.; Lavender, T.M.; Dekoning, J., De Croos, J.N.A 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Environ Microbiology.* 67, 1335-1342.

Barbera, C. 1976. Pesticidas agrícolas. Capítulo 1-2, Ed. Ediciones Omega, S. A. p. 9-46.

Barron, G. George Barron`s Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canada. Consultado 2 mayo 2005. Disponible en: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/may01.htm>.

Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P., Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1795-1805. 1988.

Bruck D.J.; L.C., 2002. *Carpophilus freeman* (Coleoptera: *Nitidulidae*) as vector of *Beauveria bassiana*. *J.invertebr.Pathol.* 80, 188-190.

Butt, T.M.; Goettel, M.S. 2001. Bioassays of entomogenous fungi. p. 141-196. In A-Navon y K.R. Ascher (eds). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. CAB international, Wallingford, UK.

- Callot, G., B. Vercambre, C. Neuveglise & G. Riba. 1996. Hyphasmata and conidial pellets: an original morphological aspect of soil colonization by *Beauveria brongniartii*. J. Invertebr. Pathol. 68: 173-176.
- Calvache, H. 2002. Manejo integrado de plagas en el agrosistema de la palma de aceite. En: Curso Nacional Manejo Integrado de Plagas en Palma de Aceite. Fonade – Cenipalma, 205 pp, p.9-20.
- Calvache, H. 1993. El control microbiano en el manejo de las plagas de la palma de aceite en Colombia. Palmas, volumen 14 (2). Bogotá: Kimpres Ltda. P.13-21.
- Carrillo, L. 2005. Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado 2 mayo 2013. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
- Carruthers, R.I. y Soper, R.S. Fungal diseases. En: Fuxa, J.R. y Tanada, Y. (Eds.) *Epizootiology of Insects Diseases*. John Wiley & Sons, New York, 1987. pp. 357-416.
- Chase, A.R., L.S. Osborne & V.M. Ferguson. 1996. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. Fla. Entomol. 69: 285-292.
- Devotto, L.; Gerding, M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a la adición de un protector solar. Agricultura técnica (Chile) 63(4):339-346.
- Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.
- Díaz, A.; Forero, M. 1997. Producción y purificación del complejo espora cristal de *Bacillus thuringiensis* HD 137 con actividad contra *Spodoptera frugiperda*. Bogotá, Colombia. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 161 p.

Faria, M.; Stephen P. Wraight. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop protection (20) 2011, 767-778.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of Entomology of United States (23). USA: Annual Reviews. 409-442 p.

Genty, P.; Desmier De Chenon, R.; Morin, J. 1978. Les ravages du palmier a huile en Amérique Latine. Oleagineux 33 (7). France: Oleagineux. P. 326-420.

Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Cotes, A. 2005. Evaluación de tres virus de la granulosis nativos aislados a partir de *Tecia solanivora* en el departamento de Cundinamarca. En: Resúmenes del XXXII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Ibagué. pp. 81.

Gottwald, T.R.; Tedders, W. L. 1984. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera:Curculionidae) in the soil. Environ. Entomol. 13:557-560.

Griffin, D. 1981. Fungal Physiology, A While-Interscience Publication, USA,Pp. 102-111.

Humber, R. A. 1981. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (zygomycotina). Mycotaxon (13). USA: Mycotaxon, 1981. 191-240 p.

Ibrahim, L.; Hamieh, A.; Ghanem, H.; Ibahim, S.; Pathogenicity of enthomopathogenic fungi from Lebanese soils against aphids, whitefly and non-target beneficial insects. International Journal of Agriculture Sciences, 2011, 3, 156-164.

Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. Use of Hyphomycetous fungi managing insect pests. En: Butt, T.M., Jackson, C.W. y Magan, N. (eds.) Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial. CABI Internacional, Wallingford, U.K. 2001. pp. 23-69.

Jenkins, John B. 1990. Human Genetics. 2da Ed. Nueva York. Harper y Row. 461p.

Kouassi, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canada. Vertigo. La revista en ciencias ambientales de la web. 2 (2). Consultado 2 mayo 2013. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html.

Kuno, G.; Mullett, J.; De Hernandez, M. 1982. Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. Universidad del Valle. Facultad de Biología. Cali: Univalle, 212 p.

Lecuona, R., Papierok, B., Riba, G. Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R. (Ed.) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. Mariano Talleres Gráficos, Buenos Aires, 1996, pp. 35-60.

López, M. L. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa de control biológico. San José, Costa Rica. 68 p.

Marino C. 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.

Monzón, A. 2004. Control biológico de la broca (*Hypothenmus hampei*) en el cultivo de café. Universidad Nacional Agraria (UNA). Dirección de Investigación, Extensión y Postgrado.(DIEP). Serie Técnica N° 6. Managua, Nicaragua. pp. 1-16.

Murad, A.; Eliane F. ;Miller, R.; Costa, F.; Pereira, C.; Metha, A.;Caldas,R.; Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insects pest *Callosbruchus maculates*. Microbiology 2008, 154, 3766-3774.

Nation J. L. 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press LLCC.USA.

Samson, R.; Evans, H.; Latge, J. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Berlin: Springer – Verlag. 300 p.

Roberts, D. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Microbial control of pest and plant disease. Edit. H. D. Burgues. Chjap. 23. p. 441-464. New York.

Rodríguez, M.; France, A.; Gerding, M. Evaluación de dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de larvas del gusano blanco *Hylamorpha elegans* Burm (coleóptera: *Scarabaidae*) Agricultura técnica. (Chile), 2004. 64, 4-17.

Sossa D.;Katiaires,D.;Moscardi F.;Farias,B. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation system. Neotropical Entomology (3) 2001.

Samuels, R.I.; A.K.Charnley.and S.E. Reynolds 1988.The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco homworm, *Manduca sexta*.Mycopathologia 104: 51-58.

Tanada, Y.; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academy Press. New York: Mc-Graw Hill.

Tanzini, M. R.; Batista, S.; Setten, A.; Toschi, N. 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) No. 59 p. 15 - 18.

Trougakos, I.; Margaritis, L. 2002. Novel morphological and physiological aspects of insect eggs. p. 3-36. In M. Hilker and T. Meiners (Eds.). Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishing Ltd., Berlin, Germany.

Vergara, R. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio ambiente. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2004.

Vey, A.; Gotz, P. Antifungal cellular defense mechanism in insects. En: Gupta, A.P. (Ed.).Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods. John Wiley, New York, 1986. pp. 89-115.

Viaud, M; Counteaudier, Y; Riba, G. 1998. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. Applied and Environmental Microbiology. 64 (1): 88-93.

Wang, S.; Leclerque, A.; Pava, M.; Fand, W.2009. A comparative genomic using microarray reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. American Society for Microbiology. 8: 888-898.

Zeinner de Polania, I. 2006. Actualidad y Divulgación científica. Revista U.D.C.A, volumen 1 (2). Colombia: Litográficos Ltda. P 23- 31.


ANEXOS

Lista de anexos


Anexo A. Registro de evaluación de plagas Lote 1 R06

palmas del cesar el fruto es el destino		REGISTRO EVALUACIÓN DE PLAGAS											
FECHA		R06		MONITOREO		FECHA CONTROL		PRODUCTO APLICADO		Fecha de Verificación		RESPONSABLE	
ARO	MES	DIA		LECTURA	VERIFICACION	ARO	MES	DIA	INSECTO PLAGA	Metabolismo	Verificación	% Efic.	
13	4	01	DR-OC-SAN			13	04	15		Stenomus	14,4	97%	Viviana Dueñas
				Control con Metopropilato 3 inaster									
22	4	4	16										
18	11	11	12										
23	18	4	15										
23	23	17	8										
24	29	5	9										
24	37	17	16										
23	42	4	15										
23	48	17	21										
24	54	5	13										
24	60	17	18										
24	66	5	12										
24	72	17	12										
24	78	5	14										
25	84	18	17										
24	90	5	9										
22	96	16	13										
22	4	16	24										
18	11	4	16										
23	18	17	25										
23	23	4	11										
24	29	17	13										
24	37	5	15										
23	42	17	19										
23	48	4	12										
24	54	17	11										
24	60	5	21										
24	66	17	14										
24	72	5	13										
24	78	17	12										
25	84	5	15										
24	90	17	9										
22	96	4	10										
Promedio										14,4	0,41		
# Eficacia										97,2			


Anexo B. Registro de evaluación de plagas Lote 2 R06

 REGISTRO EVALUACIÓN DE PLAGAS											
FECHA		R06		MONITOREO		FECHA CONTROL		PRODUCTO APLICADO		RESPONSABLE	
ABO	HES	DIA	1	LECTURA	VERIFICACION	ABO	HES	DIA	INSECTO PLAGA	POBLACION INICIAL	POBLACION
13	4	01	OR-OC-SH			13	04	15			
				Control con <i>Stenomacrus</i> <i>Stenopeltis</i> <i>Stenopeltis</i>							
20	4	4	8		4						
23	10	17	10		3						
26	16	5	6		2						
26	22	19	7		3						
27	28	5	5		1						
27	33	20	9		4						
28	38	6	4		0						
27	43	20	16		8						
29	48	6	15		6						
30	53	22	9		0						
32	58	7	3		0						
20	4	14	16		8						
23	10	4	12		5						
26	16	19	11		6						
26	22	5	5		1						
27	28	20	10		3						
27	33	5	16		9						
28	38	20	9		2						
27	43	5	15		8						
29	48	21	12		5						
30	53	6	10		3						
32	58	23	8		2						
Promedio		9,8		3,77							
Eficiencia		61,6									


Anexo C. Registro de evaluación de plagas Lote 3 R06

 REGISTRO EVALUACIÓN DE PLAGAS												RESPONSABLE
FECHA		R06		MONITOREO		FECHA CONTROL		PRODUCTO APLICADO		Fecha de Transmisión	26/04/2013	
ABO	HES	DIA	4	LECTURA	VERIFICACION	ABO	HES	DIA	INSECTO PLAGA	X EFIC.	31X	
13	4	01	DR-OC-S-N			13	04	15	POBLACION INICIAL	13		
				Cualquier Muestreo 3 Insear								
22	4	4	15	1								
22	11	16	18	2								
22	18	4	17	1								
23	25	17	15	1								
22	32	4	12	0								
22	39	16	11	0								
20	46	4	10	0								
19	53	13	15	1								
22	61	4	18	0								
22	68	16	19	1								
22	75	4	12	2								
22	82	16	15	0								
18	89	3	14	1								
22	4	16	9	1								
22	11	4	12	1								
22	18	16	14	2								
23	25	4	16	1								
22	32	16	12	0								
22	39	4	13	1								
20	46	16	11	0								
19	53	4	10	2								
22	61	16	8	1								
22	68	4	5	1								
22	75	16	12	1								
22	82	4	15	1								
18	89	13	13	1								
Promedio		13,1		0,88								
Eficiencia		83,3										

Anexo D. Registro de evaluación de plagas Lote 4 R06

 palmas del cesar <small>el fruto de la sostenibilidad</small>		REGISTRO										RESPONSABLE		
EVALUACIÓN DE PLAGAS												Viviana Dueñas		
FECHA		R06		MONITOREO		FECHA CONTROL		PRODUCTO APLICADO		Fecha de Reevaluación		RESPONSABLE		
AÑO	MES	DÍA	AÑO	MES	DÍA	LECTURA	AÑO	MES	DÍA	INSECTO PLAGA	Motivación	AÑO	MES	DÍA
13	4	01	OR-OC-S-M	13	04	VERIFICACION	13	04	15	POBLACION INICIAL	12,6	X	EPIC.	08
M			S			M			S			M		
1			2			3			4			5		
4			5			6			7			8		
6			7			8			9			10		
7			8			9			10			11		
8			9			10			11			12		
9			10			11			12			13		
10			11			12			13			14		
11			12			13			14			15		
12			13			14			15			16		
13			14			15			16			17		
14			15			16			17			18		
15			16			17			18			19		
16			17			18			19			20		
17			18			19			20			21		
18			19			20			21			22		
19			20			21			22			23		
20			21			22			23			24		
21			22			23			24			25		
22			23			24			25			26		
23			24			25			26			27		
24			25			26			27			28		
25			26			27			28			29		
26			27			28			29			30		
27			28			29			30			31		
28			29			30			31			32		
29			30			31			32			33		
30			31			32			33			34		
31			32			33			34			35		
32			33			34			35			36		
33			34			35			36			37		
34			35			36			37			38		
35			36			37			38			39		
36			37			38			39			40		
37			38			39			40			41		
38			39			40			41			42		
39			40			41			42			43		
40			41			42			43			44		
41			42			43			44			45		
42			43			44			45			46		
43			44			45			46			47		
44			45			46			47			48		
45			46			47			48			49		
46			47			48			49			50		
47			48			49			50			51		
48			49			50			51			52		
49			50			51			52			53		
50			51			52			53			54		
51			52			53			54			55		
52			53			54			55			56		
53			54			55			56			57		
54			55			56			57			58		
55			56			57			58			59		
56			57			58			59			60		
57			58			59			60			61		
58			59			60			61			62		
59			60			61			62			63		
60			61			62			63			64		
61			62			63			64			65		
62			63			64			65			66		
63			64			65			66			67		
64			65			66			67			68		
65			66			67			68			69		
66			67			68			69			70		
67			68			69			70			71		
68			69			70			71			72		
69			70			71			72			73		
70			71			72			73			74		
71			72			73			74			75		
72			73			74			75			76		
73			74			75			76			77		
74			75			76			77			78		
75			76			77			78			79		
76			77			78			79			80		
77			78			79			80			81		
78			79			80			81			82		
79			80			81			82			83		
80			81			82			83			84		
81			82			83			84			85		
82			83			84			85			86		
83			84			85			86			87		
84			85			86			87			88		
85			86			87			88			89		
86			87			88			89			90		
87			88			89			90			91		
88			89			90			91			92		
89			90			91			92			93		
90			91			92			93			94		
91			92			93			94			95		
92			93			94			95			96		
93			94			95			96			97		
94			95			96			97			98		
95			96			97			98			99		
96			97			98			99			100		
97			98			99			100			101		
98			99			100			101			102		
99			100			101			102			103		
100			101			102			103			104		
101			102			103			104			105		
102			103			104			105			106		
103			104			105			106			107		
104			105			106			107			108		
105			106			107			108			109		
106			107			108			109			110		
107			108			109			110			111		
108			109			110			111			112		
109			110			111			112			113		
110			111			112			113			114		
111			112			113			114			115		
112			113			114			115			116		
113			114			115			116			117		
114			115			116			117			118		
115			116			117			118			119		
116			117			118			119			120		
117			118			119			120			121		
118			119			120			121			122		
119			120			121			122			123		
120			121			122			123			124		
121			122			123			124			125		
122			123			124			125			126		
123			124			125			126			127		
124			125			126			127			128		
125			126			127			128			129		
126			127			128			129			130		
127			128			129			130			131		
128			129			130			131			132		
129			130			131			132			133		
130			131			132			133			134		
131			132			133			134			135		
132			133			134			135			136		
133			134			135			136			137		
134			135			136			137			138		
135			136			137			138			139		
136			137			138			139			140		
137			138			139			140			141		
138			139			140			141			142		
139			140			141			142			143		
140			141			142			143			144		
141			142			143			144			145		
142			143			144			145			146		
143			144			145			146			147		
144			145			146			147			148		
145			146			147			148			149		
146			147			148			149			150		
147			148			149			150			151		
148			149			150			151			152		
149			150			151			152			153		
150			151			152			153			154		
151			152			153			154			155		
152			153			154			155			156		
153			154			155			156			157		
154			155			156			157			158		
155			156			157			158			159		
156			157			158			159			160		
157			158			159			160			161		
158			159			160			161			162		
159			160			161			162			163		
160			161			162			163			164		
161			162			163			164			165		
162			163			164			165			166		
163			164			165			166			167		
164			165			166			167			168		
165			166			167			168			169		
166			167			168			169			170		
167			168			169			170			171		
168			169			170			171			172		
169			170			171			172			173		
170			171			172			173			174		
171			172			173			174			175		
172			173			174			175			176		
173			174			175			176			177		
174			175			176			177			178		
175			176			177			178			179		
176			177			178			179			180		
177			178			179			180			181		
178			179			180			181			182		
179			180			181			182			183		
180			181			182			183			184		
181			182			183			184			185		
182			183			184			185			186		
183			184			185			186			187		
184			185			186			187			188		
185			186			187			188			189		
186			187			188								

Anexo E. Registro de evaluación de plagas Lote 5 R06

 REGISTRO EVALUACIÓN DE PLAGAS											
FECHA		R06	MONITOREO		FECHA CONTROL			PRODUCTO APLICADO		Fecha de Verificación	RESPONSABLE
AÑO	MES	DIA	LECTURA		AÑO	MES	DIA	INSECTO PLAGA	POBLACION INICIAL	% EFIC.	
13	4	01	DR-OC-S-N	VERIFICACION	13	04	15	<i>Mecarhizium Senoma</i>	12	95%	Viviana Dueñas
			<i>Stenoma 3</i> instar	Control con <i>Mecarhizium 3</i> instar							
15	5	3	12	1							
13	14	8	15	1							
10	28	2	14	0							
8	41	3	13	0							
15	5	10	10	0							
13	14	3	9	0							
10	28	6	11	2							
8	41	3	10	1							
Promedio			11,8	0,63							
% Eficiencia			34,7								