

## Notas del Director

En el campo es común la presencia de controladores biológicos como hongos entomopatógenos que contribuyen a mantener bajas las poblaciones de insectos plaga. Cuando una plaga alcanza altas poblaciones es porque estos han perdido eficacia o la población ha disminuido por factores bióticos o abióticos.

La búsqueda de individuos afectados por estos microorganismos es una alternativa para el manejo comercial de insectos plaga. Es así como la continua detección y recuperación en campo estos controladores permitirá generar bancos de potenciales controladores biológicos.

Seleccionar los microorganismos promisorios evaluando su capacidad de control, en condiciones de laboratorio y posteriormente en condiciones semicontroladas y de manera semicomercial es básicamente cumplir los postulados de Koch, comprobar que el microorganismo está enfermando y controlando la plaga.

Un paso importante dentro de la investigación es el trabajo de laboratorio que permite seleccionar los aislamientos promisorios de hongos entomopatógenos, determinar los instares más susceptibles y las dosis que posteriormente se escalan a condiciones de campo. En este sentido, Cenipalma ha ido construyendo una colección de hongos entomopatógenos del Banco de Entomopatógenos de Cenipalma (BEC).

Este CenIaVances se presenta un ejemplo del proceso de selección de hongos entomopatógenos promisorios en condiciones de laboratorio que posteriormente deben continuar el proceso hasta llegar a pruebas semicomerciales de campo antes de ser recomendadas como alternativas de control biológico.

José Ignacio Sanz  
Director Ejecutivo

## Evaluación de hongos entomopatógenos para el control de larvas de *Leucothyreus femoratus* Burmeister (Coleoptera: scarabaeidae) defoliador de palma de aceite\*



Adulto de *Leucothyreus femoratus*

Diferentes estudios han mostrado la eficiencia de los hongos entomopatógenos en el control de insectos de suelo, siendo los estados de larva y adulto reportados como los más susceptibles a las infecciones fúngicas (Shannon, 1994; Gillespie, 1988; Rodríguez *et al.*, 2004; Rodríguez, 2006).

En consecuencia, el uso de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* con alta patogenicidad se convierte en una alternativa eficiente para el control de insectos plaga, ya que afectan los diferentes estados de desarrollo de coleópteros escarabeidos (Cenipalma, 1992). *M. anisopliae* causa mortalidades hasta del 100% en larvas de *Oryctes rhinoceros* L. plaga de la palma de aceite y de coco en África, Asia y el Pacífico (Gopal *et al.*, 2005). Así mismo, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) y *Beauveria bassiana* (Bals) han sido reportados junto a hongos del género *Cordyceps*, afectando larvas de *L. femoratus* en condiciones naturales (Aldana *et al.*, 2005).

*L. femoratus* es considerado un insecto de gran importancia económica en las zonas Oriental y Central, donde los adultos atacan especialmente palmas jóvenes entre 0 y 6 años de edad, afectando cualquiera de sus niveles foliares (Martínez *et al.*, 2000), mientras que las larvas se alimentan del sistema radical de gramíneas asociadas al cultivo (Martínez *et al.*, 2000).

En la actualidad, el manejo del insecto se ha encaminado al control de adultos mediante aplicaciones de insecticidas químicos durante la época seca, las cuales se realizan entre las 5:00 y la 7:00 pm, horas en las que empieza la actividad del insecto a nivel foliar (Aldana *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2000). El costo de manejo puede ascender a \$48.000 por hectárea/mes en las áreas más críticas (Gómez, 2006). Este es el primer estudio realizado en Colombia que muestra el efecto de los hongos entomopatógenos provenientes del Banco de Hongos Entomopatógenos de Cenipalma (BEC) sobre larvas de *L. femoratus* bajo condiciones controladas, como contribución al desarrollo de alternativas para el manejo de este insecto.



Daño causado por *L. femoratus* en palma de aceite

## Materiales y Métodos

### Recolección y mantenimiento de larvas

El ensayo se realizó en la plantación Unipalma de los Llanos S.A., localizada en el municipio de Cumaral, departamento del Meta, a 350 m.s.n.m. Se colectaron larvas de segundo instar en lotes con altas poblaciones del insecto; éstas se llevaron al laboratorio y se mantuvieron en cuarentena por un periodo de 15 días. Posteriormente, se confinaron en recipientes plásticos con una capa de suelo estéril de dos cm. de profundidad, donde previamente se sembró maíz como fuente de alimento para las larvas y la humedad del sustrato se mantuvo mediante aplicación directa de agua.

\*Francisco Rodríguez Ingeniero Agrónomo  
Rosa Aldana Programa de Manejo Integrado de Plagas, División de Agronomía, Cenipalma.  
Gerardo Cayón. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.

**Prueba de viabilidad de conidias**

Para las pruebas de viabilidad de conidias se utilizó el criterio de porcentaje de germinación; para ello se realizaron diluciones en serie; de la dilución 10<sup>-8</sup> se tomaron cinco muestras de 1 µL cada una y se depositaron en cinco puntos equidistantes entre sí, en la superficie de una caja petri que contenía agar agua al 1% peso / volumen. Las cajas se llevaron a incubación durante 24 horas a 26,5°C ± 2°C; después de este tiempo se adicionaron 5µL de azul de lactofenol sobre el agar en el área donde previamente se depositaron las muestras con el fin de detener el proceso de germinación y colorear las conidias para facilitar su observación.

En el microscopio con el objetivo de 40x se realizó el conteo de conidias germinadas y no germinadas, por cada campo óptico. Como criterio de germinación se consideró la emisión de un tubo germinal de igual o mayor longitud que el tamaño de la conidia; para el cálculo matemático de la viabilidad se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Conidias Germinadas}}{\text{Conidias Germinadas} + \text{Conidias No Germinadas}} \times 100.$$

**Proceso de Inoculación**

Inicialmente se realizó la desinfección de las larvas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante tres segundos. Posteriormente, se realizaron lavados con agua estéril; para retirar el exceso de agua las larvas se colocaron sobre papel filtro.

En el proceso de inoculación de cada uno de los hongos se utilizó una suspensión en agua destilada con Tween 80 al 0,1%, ajustando la concentración a 10<sup>8</sup> conidias.mL<sup>-1</sup>. Las larvas se sumergieron durante cuatro segundos en la suspensión, luego se colocaron en los recipientes que contenían el alimento de acuerdo a cada tratamiento. Las larvas del testigo fueron sumergidas en una solución de agua destilada con Tween 80 al 0,1% durante el mismo tiempo.

**Diseño experimental**

Se evaluaron siete aislamientos provenientes del BEC, y un testigo, para un total de ocho tratamientos (Tabla 1); la unidad experimental fue un recipiente plástico con 20 larvas del insecto; cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones, bajo un diseño de bloques incompletos al azar. Las lecturas de la mortalidad en los tratamientos se tomaron cada cuatro días hasta cumplir 24 días. Se registró la sintomatología y el porcentaje de mortalidad. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (Anava) y a una prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey.

Tabla 1. Registro de los siete aislamientos de hongos entomopatógenos evaluados del BEC.

Tratamiento	Aislamiento	Origen	Hospedero
Mt 001	<i>Metarhizium</i> sp.	Puerto Wilches (Santander)	N.D.
Mt 006	<i>Metarhizium</i> sp.	Barrancabermeja	<i>Demotissa neivai</i>
Mt 009	<i>Metarhizium</i> sp.	Barrancabermeja	<i>Demotissa neivai</i>
B002	<i>Beauveria</i> sp.	San Carlos de Guaroa (Meta)	<i>Equatome</i> spp.
B017	<i>Beauveria</i> sp.	Puerto Wilches (Santander)	<i>Diptera gragatus</i>
B025	<i>Beauveria</i> sp.	Puerto Bogotano (Santander)	<i>Stenomacrocopis</i> (PUPA)
B032	<i>Beauveria</i> sp.	Puerto Bogotano (Santander)	<i>Demotissa neivai</i>
Testigo	Agua	N.A.	N.A.

N.D: No disponible. N.A: No Aplica

**Resultados y discusión**

**Prueba de viabilidad de conidias**

Los aislamientos evaluados presentaron porcentajes de viabilidad entre 89% y 95% (Tabla 2), cumpliendo con las condiciones necesarias para ser aplicados en campo, ya que las formulaciones comerciales deben tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Esto se debe a que el hongo que va a ser aplicado en campo debe tener un efecto rápido sobre la población del insecto objetivo y presentar un corto período de exposición a condiciones ambientales adversas (Vélez *et al.*, 1997).

Tabla 2. Germinación de los siete aislamientos de hongos evaluados.

Aislamiento	Viabilidad (Porcentaje de germinación 24)
Mt001	94
Mt006	95
Mt009	93
B002	92
B017	89
B025	89
B032	90

**Proceso de Infección**

Las larvas en todos los tratamientos mostraron síntomas de afección por hongos entomopatógenos, después de 12 días de aplicados. Las larvas presentaron puntos de melanización, manchas oscuras en el cuerpo, y pérdida de su actividad locomotora. Esto coincide con los reportes realizados por Lecuona *et al.* (1996) y Alves (1998) citados por Rodríguez *et al.* (2004), además se presentó una disminución en el consumo de alimento. La presencia de áreas melanizadas en el integumento del insecto se debe a la acción enzimática del hongo, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración (Monzón, 2001). En varios aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, la enzima principal es una endoproteasa que disuelve la proteína matriz que cubre la quitina cuticular, por lo tanto la protección de quitinasa ocurre después del proceso de infección y una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del mismo (Guillespie, 1998). Cuando el hongo no vence el sistema inmunológico, se presenta una acumulación de quitina alrededor de los puntos de entrada del hongo, como mecanismo de defensa del insecto (Hidalgo, 2001).

Las larvas que presentaron síntomas iniciales de infección tomaron una consistencia dura. En las revisiones posteriores, algunas larvas presentaron coloraciones blancas en la cutícula, coincidentes con lo reportado por Hidalgo (2001), Shannon (1994) y Castañeda (1999), donde larvas de escarabajos toman un color rosado antes de la producción del micelio, y los conidios presentan una coloración blanca o blanca cremosa.



Larva de *L. femoratus* afectada por el aislamiento de *Beauveria* (B017).

En las larvas tratadas con *Metarhizium* sp. se observó la producción de un micelio de color blanco amarillo cubriendo algunas estructuras del cuerpo del insecto, similares a los reportes realizados por Castañeda (1999), Shannon (1994) y Cenipalma (1992).

La mortalidad más alta fue causada por el aislamiento Mt 009 con 87,5%, seguido por Mt 001 con el 82,5% y los tratamientos Mt 006 y B017, con mortalidades similares del 76,3% y B025 con 72.5% de mortalidad. Los aislamientos B032 y B002 causaron los menores porcentajes de mortalidad, 26,3% y 32,5%, respectivamente, mientras que en el testigo la mortalidad presentada fue de 2.5% (Figura 1).

Al realizar el análisis estadístico se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo, formando cinco grupos de acuerdo con la prueba de comparación Tukey ( $p < 0,05$ ). El primer grupo está conformado por el aislamiento Mt009, el segundo por los aislamientos Mt006, Mt001 y B017, el tercero por B025, el cuarto por los tratamientos B032 y B002, y como último grupo, el testigo.

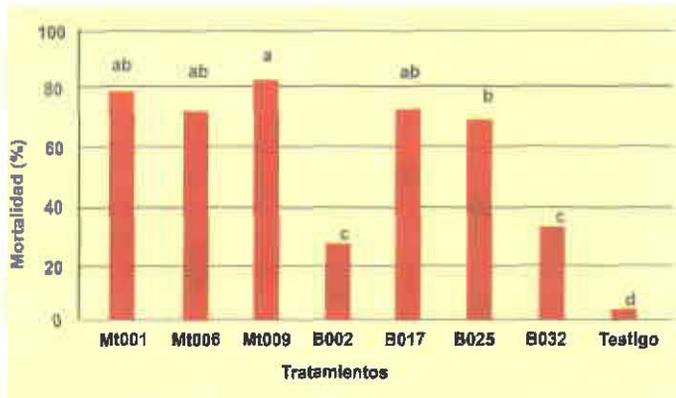


Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada causado por siete aislamientos evaluados sobre larvas de *Leucothyreus femoratus*, en condiciones de laboratorio, a los 24 días después de la inoculación. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

La mortalidad acumulada de los aislamientos Mt 009 y Mt 001 presenta una tendencia lineal donde se aprecia que después de 24 días estos afectaron a la mayor parte de la población del insecto (Figura 2). Mediante análisis de regresión lineal simple, se observó el efecto letal producido por cada aislamiento como variable única y explicativa en función del tiempo. La línea de regresión expresa la mortalidad acumulada de larvas de *L. femoratus*, expresada durante los 24 días después de la evaluación. De acuerdo con los resultados obtenidos, el patrón de respuesta de cada aislamiento se ajusta al modelo de regresión y es altamente significativo ( $r = 0.9899$ ;  $y = 2.964x$ ). Esto demuestra que existen diferencias en la interacción de tiempo de infección-mortalidad, indicando la susceptibilidad del insecto no solo entre los diferentes aislamientos, sino también entre los diferentes periodos de tiempo de evaluación.

Teniendo en cuenta el potencial de control de los hongos entomopatógenos y los resultados obtenidos bajo condiciones controladas sobre *L. femoratus*, se plantea realizar pruebas de campo donde se evalúe la efectividad de los aislamientos de *Metarhizium* spp, Mt 009 y Mt 001 y su combinación, con el fin de conocer el efecto sobre las poblaciones larvales de *L. femoratus*.

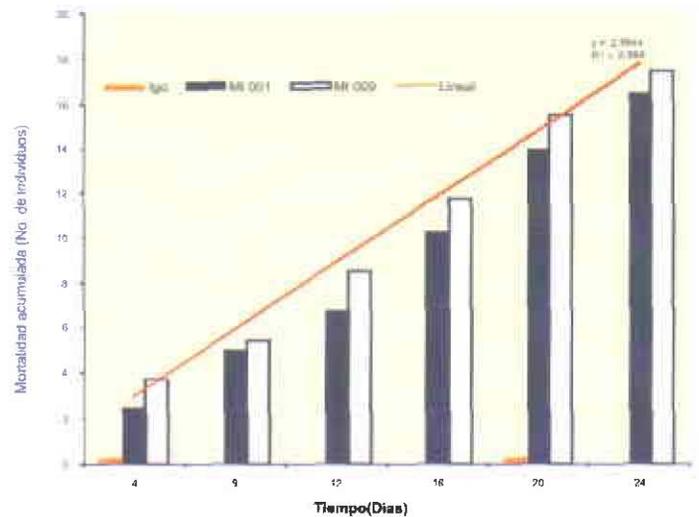


Figura 2. Porcentaje de mortalidad acumulada causado por los aislamientos Mt 009 y Mt 001 sobre *Leucothyreus femoratus* en los 24 días evaluados en condiciones de laboratorio.

### Agradecimientos

A las plantaciones Unipalma de los Llanos S.A., Barro Blanco e Inversiones Sol de Llano, que facilitaron las instalaciones para la recolección del material y el desarrollo de la investigación; a los Investigadores Carolina Valencia Cortés y Luis Carlos Martínez, quienes revisaron el manuscrito. Esta investigación fue financiada por el Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma.

### Bibliografía

Aldana, R.; Aldana, J.; Calvache, H.; Franco, P. N. 2005. Plagas de la Palma de Aceite en Colombia. 3ª edición. CENIPALMA. Bogotá. Colombia. 102 p.

Cenipalma, 1992. Control Microbiano de Insectos. Ed. Kimpres Ltda. Bogota. Colombia. 136 p.

Castañeda, D. 1999. Cenipalma. Procedimientos Básicos de Laboratorio. Memorias IV Curso Nacional sobre Control Biológico de las Plagas de la Palma de Aceite. 87 - 111 p. 3 y 5 de noviembre. Tumaco. Colombia.

Guillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England., 269 p.

Gómez, P. L. 2006. Investigación e innovación tecnológica. Memorias de los eventos gremiales. Cenipalma. Villavicencio. Colombia.

Gopal, M.; Gupta, A.; Thomas, G.V. 2005. Prospects of using *Metarhizium anisopliae* to check the breeding of insect pest, *Oryctes rhinoceros* L. in coconut leaf vermicomposting sites. Bioresource Technology. 1-6 p.

Hidalgo, E. 2001. Uso de Microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. Revista Manejo Integrado de Plagas. Hoja Técnica N° 37. CATIE. Turrialba. Costa Rica 1-7 p.

Martínez, L.; Aldana, J.; Calvache, H.; Villanueva, A. 2000. Biología de *Leucothyreus* sp. defoliador de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. en San Vicente de Chucurí (Santander). Revista Palmas, Colombia, 21 (Tomo 1): 212-220.

Monzón A. 2001. Producción uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (63) Costa Rica 95- 103 p.

Rodríguez, F. 2006. Patogenicidad de *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp sobre larvas de *Leucothyreus femoratus* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae) defoliador de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq). Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. 32 p.

Rodríguez, M.; France, A.; Gerding, G. M. 2004. Evaluación de dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) para el control de larvas de

gusano blanco *Hylamorpha elegans* Buró (Coleoptera: Scarabaeidae). Agricultura Técnica. 64(1): 1 - 9. Chillán, Chile.

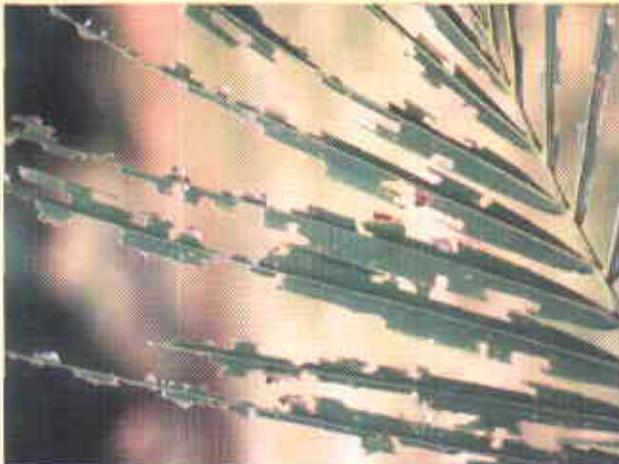
Shannon, P. J. 1994. Control microbiano de *Phyllophaga* spp. Memorias del Seminario taller centroamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga* spp. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 80- 93 p.

Vélez, P.; Posada, F.; Marín, P.; González, M.; Osorio, E.; Bustillo, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía". Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. 37 p.

## Ceninotas

### Muestreo de *Leucothyreus femoratus*

La presencia de este insecto en campo se detecta por el daño que produce en el follaje de la palma. La principal característica que identifica el daño causado, es el área consumida en forma de cuadros o rectángulos irregulares, siendo la hembra la mayor consumidora de follaje.



Daño ocasionado por *Leucothyreus femoratus*

*L. femoratus* está asociado con cultivos comerciales de arroz y áreas dedicadas a ganadería extensiva. Además, se ha detectado su presencia en gramíneas entre las que se encuentran *Imperata cilindrica* (vendeaguja), *Cyperus diffusus* (pasto coquito), *Homolepsis aturensis* (pasto comino), *Panicum laxum* (pasto guinea bajo), *Hyparrhenia rufa* (yaragua o puntero) y *Paspalum virgatum* (maciega) de las cuales se alimentan las larvas.

Cuando hay presencia de gramíneas en el plato de la palma, el muestreo se realiza en esta zona, en caso contrario, a 1.5m del estípote de la palma. El muestreo se hace mediante una calicata

Dependiendo de la presencia de gramíneas en el plato de la palma, se realiza el muestreo, cuando en la zona de plato hay presencia de gramíneas, el muestreo se hace mediante una calicata de 75 x 50 x 5 cm de profundidad, a 30cm del estípote y cuando la zona del plato se encuentra libre de

gramíneas, esta calicata se hace a 1,5 m del estípote en lugares con presencia de gramíneas. Se deben contabilizar todos los individuos presentes (larvas, pupas y adultos), de acuerdo al estado de desarrollo predominante en el lote se realiza la práctica de control. Con el fin de obtener información confiable se sugiere muestrear dos palmas por hectárea.



Muestreo de *Leucothyreus femoratus*



Director: José Ignacio Sanz Scovino

Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma

Coordinación editorial: Oficina de Comunicaciones

Diseño y diagramación: Bricelño Gráfico

Impresión: Molter Ltda. Impresores

Esta publicación contó con el apoyo del Fondo de Fomento Palmero