

# Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache)

## Pathogenicity evaluation of native isolates of entomopathogenic fungi against andean weevil, *Premnotrypes vorax* (Hustache)

Giselle Rivera\*, Lucía Pinto\*\*

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la capacidad patogénica de aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, obtenidos de áreas naturales y de papa almacenada, sobre adultos del gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) (COLEOPTERA: Curculionidae), insecto plaga de gran importancia en el cultivo de la papa en Colombia y otros países andinos. La evaluación fue realizada mediante bioensayos en condiciones de laboratorio, utilizando insectos adultos obtenidos en cría y capturados en campo. Se presentan datos sobre el establecimiento del pie de cría. Para la evaluación de la patogenicidad, se evaluó la mortalidad expresada por los aislamientos en relación con el tiempo, estimándose el tiempo letal cincuenta,  $TL_{50}$ , y el tiempo letal noventa,  $TL_{90}$ , y para dos de los aislamientos fue evaluada la mortalidad en relación con la concentración del inoculo, estimada mediante la concentración letal media,  $CL_{50}$ . En todos los casos se presentaron porcentajes de mortalidad mayores del 45%. Se observaron diferencias en la mortalidad de los insectos dependiendo de su origen. De acuerdo con los resultados obtenidos el aislamiento de *Beauveria bassiana* 9770, aislado de larva de *Premnotrypes vorax* ( $TL_{50}$ : 4.7 días - 9.8 días;  $TL_{90}$ : 14.1 días - 20.8 días;  $CL_{50}$ :  $7.03 \times 10^4$  esporas/ml), se destacó como promisorio. Mediante el presente trabajo se evidenciaron diferencias en la mortalidad presentada por adultos del gusano blanco de la papa, *R vorax*, en relación con el aislamiento del hongo entomopatógeno evaluado y en relación con el origen de los insectos utilizados en los bioensayos.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Premnotrypes vorax*, gusano blanco de la papa, hongos entomopatógenos.

### ABSTRACT

The main goal of this study was pathogenicity evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* native isolates, obtained from natural habitats and stocked potato, against potato andean weevil, *Premnotrypes vorax* (Hustache) (COLEOPTERA: Curculionidae), and important potato insect pest in Colombia and other Andean countries. Pathogenicity was determined by laboratory bioassays, using either reared insects or field captured insects. Insect rearing data are presented. Pathogenicity evaluation was express as mortality against time, estimating  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  for all the fungal isolates, and mortality against spore concentration, estimating  $CL_{50}$  for two selected isolates. In all cases, total mortality percentils were above 45%. Differences between reared and field captured insects were evident. According to obtained data one of the fungal isolates: *B. bassiana* 9770, obtained from *R vorax* larva ( $TL_{50}$ : 4.7 days - 9.8 days;  $TL_{90}$ : 14.1 days - 20.8 days;  $CL_{50}$ :  $7.03 \times 10^4$  spores/ml) appears as a promisory fungal isolate for further studies. Out of this study, differences in the andean weevil, *P. vorax*, adult mortality, with regard to entomopathogenic fungal isolate and insect origin were manifest.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Premnotrypes vorax*, andean weevil, entomopathogenic fungi.

---

\* Microbióloga, M.Sc. Dir. Técnica, Fundación Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez. Bogotá, Tel: 287 8611. E-mail: giselariver@hotmail.com

\*\*Bióloga, M.Sc. Profesional III, Fundación Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa es la principal actividad agrícola de las zonas andinas de Colombia, donde se cultivan alrededor de 164.759 hectáreas, según estadísticas del Ministerio de Agricultura (1998), MinAgricultura (1999). Uno de los soportes más importantes para mantener la productividad en el cultivo de la papa es su alto grado de dependencia en el empleo de agroquímicos. Una de las razones para el uso intensivo de agroquímicos es la presencia de diferentes plagas que atacan el cultivo durante el período de siembra, establecimiento y almace-namiento del tubérculo. Dentro de las plagas más importantes cabe destacar al gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) (COLEÓPTERA: Curculionidae), debido a su alto grado de infestación en la mayoría de zonas cultivadas y su dificultad para ser controlado, ya que su ciclo biológico se desarrolla básicamente a nivel del suelo y rizosfera. Actualmente se encuentra en todas las zonas productoras de papa de los departamentos de Marino, Cauca, Tolima, Cundinamarca, Boyacá, Santander del Sur y del Norte, Caldas y Antioquia, desde los 2.100 msnm en adelante. En Suramérica se encuentra en las partes altas de la cordillera de los Andes, desde la zona del Perú, en el estado de Junín, hasta el Estado del Táchira en Venezuela. El control del gusano blanco de la papa tradicionalmente se ha basado en el uso de plaguicidas químicos utilizados en forma de aplicaciones calendario, acarreado grandes costos económicos y ambientales. Estas razones han llevado a explorar nuevas formas de control, entre las cuales se encuentra el control biológico, y dentro de éste, los hongos entomopatógenos son excelentes candidatos. El gusano blanco de la papa, *P. vorax*, es atacado por diferentes hongos entomopatógenos entre los que se destacan *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

En Colombia el laboratorio de Control Biológico de Corpoica ha desarrollado varios trabajos sobre el control biológico del gusano blanco de la papa. Han realizado ensayos en casa de malla (Torres *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2000) registrando mortalidades hasta del 96,55% con un aislamiento del hongo *Beauveria bassiana*. Igualmente, se han hecho ensayos a nivel de campo logrando controles hasta del 37%, utilizando dosis del orden de  $10^{10}$  esporas de *B. bassiana* por planta, confirmando las posibilidades de éxito con su utilización (Torres *et al.*, 1998). Otros

autores han evaluado la patogenicidad de cepas de hongos entomopatógenos sobre larvas del gusano blanco de la papa, obteniendo porcentajes de mortalidad variables dependiendo de la cepa, de la concentración del inoculo y del estadio del insecto (Castro, 1997).

El éxito en la utilización de un hongo entomopatógeno como agente biocontrolador requiere considerar los siguientes factores: 1. Selección de una cepa con una alta capacidad patogénica y alta capacidad esporulativa. 2. Selección de un proceso de producción que permita una alta eficiencia en la obtención de esporas y una alta calidad de las esporas. 3. Selección de una formulación que confiera protección a las esporas en campo en condiciones adversas, como son exposición a rayos U.V. y humedades muy bajas, y 4. Aplicación enmarcada dentro de un programa de manejo integrado del cultivo. El presente trabajo está relacionado con el primer factor enunciado. Este trabajo constituye el paso inicial para el desarrollo de un agente biocontrolador para el gusano blanco de la papa. En este artículo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad patogénica de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre adultos del gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache), en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Mantenimiento del pie de cría de *Premnotrypes vorax*

Para la implementación y mantenimiento del pie de cría se recolectaron insectos por dos métodos:

- Captura de adultos de gusano blanco, *P. vorax*, en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) infestados. Los adultos fueron capturados manualmente, mediante recolección nocturna por observación directa de los insectos sobre las hojas, tallo o al pie de las plantas de papa, con ayuda de linterna. Los insectos capturados fueron depositados en recipientes plásticos que contenían suelo estéril, papa y pajillas de pasto kikuyo, debidamente esterilizado.

- Adquisición de papa (*S. tuberosum*) en la Central de Abastecimiento de Bogotá (Corabastos), procedente de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. La papa fue colocada en canastas plásticas,

debajo de las cuales eran colocadas bandejas plásticas con una capa de suelo estéril para recolectar las larvas que emergían de las papas.

El pie de cría fue mantenido en instalaciones de la Universidad Distrital, Sede Macarena B., con una temperatura entre 16 °C y 20 °C y una humedad relativa promedio de 75%. El método de cría utilizado fue una modificación del método utilizado por Garzón *et al.*, (1996) y desarrollado previamente en instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Uribe *et al.*, 1998).

### Aislamientos de hongos entomopatógenos

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron seleccionados a partir del banco de aislamientos nativos obtenido por Uribe *et al.* (1998), así como de aislamientos realizados a partir de larvas emergidas de papa adquirida en la Central de Abastos de Bogotá. Las características de los aislamientos son presentadas en la tabla 1.

La selección de los aislamientos se realizó teniendo en cuenta su lugar de procedencia y el orden del insecto del cual fueron aislados. También se consideró su capacidad esporulativa durante la multiplicación en arroz, estableciendo como base una concentración de  $5 \times 10^9$  esporas (conidios) por gramo de arroz.

Los hongos entomopatógenos aislados fueron almacenados siguiendo varias metodologías: papel de filtro (Aricapa y Correa, 1992), suelo estéril (Smith, 1991) y arroz estéril. Este último método consiste en el almacenamiento de los hongos en su mismo sustrato de multiplicación, con una humedad inferior al 10% y una temperatura de 4 °C.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PATOGENICA

### Reactivación de los aislamientos

Todos los aislamientos fueron reactivados en larvas de último instar, antes de iniciar la evaluación de la patogenicidad en adultos, de acuerdo con el siguiente procedimiento: las larvas fueron recolectadas de la cría, desinfectadas en hipoclorito de sodio al 0,5% y lavadas con agua estéril. Posteriormente fueron colocadas en

contacto directo con una suspensión de esporas del aislamiento respectivo en una concentración de  $10^8$  c/ml, por un (1) minuto y transferidas a cámara húmeda hasta el desarrollo de la micosis. Aquellas larvas que desarrollaron la micosis fueron transferidas a cajas petri con agar Saboureaud dextrosa (ASD) y agar trigo (Sneh, 1991), e incubadas por 10 días a  $26 \pm 2$  °C, utilizando una incubadora BINDER 240L.

### Multiplicación de los aislamientos

A partir de los cultivos reactivados en larvas de *P. vorax*, se preparó el inóculo, el cual consistió en una suspensión de esporas en solución de tween 80 al 0,03%. Esta suspensión es inoculada en medio líquido e incubado en agitación continua por 72 horas, obteniéndose micelio y blastosporas (Rivera, 1993). Esta primera fase sirve de inóculo a la fase de superficie, donde el hongo da origen a los conidios sobre un sustrato de arroz estéril en un período de 10-12 días (Olarte, 1994). Rutinariamente se realizaron controles de calidad de los hongos producidos, en cuanto a concentración, viabilidad y pureza, de acuerdo con el protocolo descrito por Vélez *et al.* (1997). Las suspensiones y controles de calidad fueron realizados en una cabina de flujo horizontal PAMAS2436; las observaciones microscópicas, en un microscopio OLYMPUS CH30 TRPT y la multiplicación de los aislamientos en la Planta de producción del Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez. Esta multiplicación en arroz es realizada una sola vez, y a partir de este cultivo son preparados los inóculos para la evaluación de la patogenicidad.

### Preparación de las suspensiones fúngicas

A partir de cultivos obtenidos en arroz estéril, se suspendieron los conidios en solución de tween 80 al 0,03% y la concentración fue ajustada mediante diluciones sucesivas. La concentración de cada suspensión se determinó mediante recuento microscópico de la suspensión, en cámara de Neubauer (Vélez *et al.*, 1997).

### Material entomológico

Debido a las limitaciones en la obtención de adultos en el pie de cría establecido, fue necesario utilizar adultos capturados en campo para algunos de los

**Tabla 1. Características de los aislamientos de hongos entomopatógenos**

Código	Especie	Hospedero	Lugar
9915	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> , larva	Corabastos, Bogotá, D.C.
9723	<i>Beauveria bassiana</i>	Coleóptera, adulto	Parque Natural Chicaque San Antonio del Tequendama, C/marca
9924	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> , larva	Corabastos, Bogotá, D.C.
9728	<i>Beauveria bassiana</i>	Homóptera	Parque Natural Chicaque San Antonio del Tequendama, C/marca.
9738	<i>Beauveria bassiana</i>	Coleóptera, adulto	Parque Natural Chicaque San Antonio de Tequendama, C/marca.
9755	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> , larva	Corabastos, Bogotá, D.C.
9759	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Hypothenemus hampei</i> , adulto	Cafetal, San Francisco, C/marca.
9770	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Corabastos, Bogotá, D.C.
9779	<i>Beauveria bassiana</i>	Homóptera, adulto	Laguna Pedro Palo, Tena, C/marca
9786	<i>Beauveria bassiana</i>	Lepidóptera, adulto	Laguna Pedro Palo, Tena, C/marca
9790	<i>Beauveria bassiana</i>	Coleóptera, adulto	Laguna Pedro Palo, Tena, C/marca
97135	<i>Beauveria bassiana</i>	Hemiptera, adulto	Pandi, Cundinamarca
97151	<i>Beauveria bassiana</i>	Arácnida	Parque Natural Chicaque San Antonio de Tequendama, C/marca

bioensayos realizados. Esta acción fue realizada con la ayuda de estudiantes de la vereda Sote Panelas en el municipio de Motavita, Boyacá, gracias a la colaboración de la Umata de Motavita. Los individuos recolectados en campo fueron mantenidos en observación por un período de 30 días, antes de iniciar los bioensayos.

### Evaluación de la patogenicidad

Para la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos fúngicos se registró la mortalidad de adultos y la aparición de micelio diariamente hasta el día 30.

La patogenicidad de los hongos entomopatógenos se realizó en tres fases:

- Primera fase: evaluación del tiempo letal,  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ , utilizando insectos adultos de cría.
- Segunda fase: evaluación del tiempo letal,  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ , utilizando insectos adultos capturados en campo.
- Tercera fase: evaluación de la concentración letal,  $CL_{50}$ , de dos aislamientos elegidos de acuerdo con los resultados obtenidos en las dos primeras fases, utilizando insectos adultos capturados en campo.

### Evaluación del tiempo letal 50, $TL_{50}$

Para cada uno de los aislamientos se utilizó un total de 30 adultos. Cada uno de los insectos se individualizó en vasos plásticos de 2 onzas. El tratamiento testigo consistió en 30 adultos tratados con solución de Tween 80 al 0,03%. Los adultos fueron previamente lavados en hipoclorito de sodio al 0,5% por un minuto, lavados



**Figura 1.** Montaje de bioensayo para la evaluación de patogenicidad

con agua destilada estéril y posteriormente sumergidos en la suspensión con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios por mililitro, durante un minuto. Se eliminó el exceso de humedad depositándolos sobre papel estéril, y se transfirieron a vasos plásticos con trozos de papa (*S. tuberosum*) desinfectada. En el fondo de cada vaso se colocó un círculo de papel estéril humedecido con 500 ml de agua destilada estéril (figura 1).

Las variables evaluadas fueron la mortalidad y la aparición de micelio sobre el cuerpo del insecto. El registro se realizó diariamente, hasta el día 30.

Se aceptó una mortalidad en el testigo hasta del 10% (tres insectos).

### Evaluación de la concentración letal 50, $CL_{50}$

A partir de los resultados obtenidos en la primera fase de evaluaciones, se escogieron dos aislamientos para determinar sus concentraciones letales 50,  $CL_{50}$ , utilizando las siguientes concentraciones:  $1 \times 10^5$  conidios / ml;  $1 \times 10^6$  conidios / ml;  $1 \times 10^7$  conidios / ml y  $1 \times 10^8$  conidios / ml.

Fueron evaluadas la mortalidad diaria y la aparición de micelio sobre el cuerpo del insecto. Las observaciones se realizaron hasta el día 30.

Para estimar el tiempo letal 50,  $TL_{50}$ , el tiempo letal 90,  $TL_{90}$  y la concentración letal 50,  $CL_{50}$ , se utilizó el modelo estadístico Probit (Finney, 1972), mediante el programa de LeOra Software de 1987.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### CRÍA DE *Premnotrypes vorax*

Se obtuvieron todos los estadios de *P. vorax* (figuras 2 y 3). En la tabla 2 se presentan los datos comparativos de la duración de los diferentes estadios del insecto, y en la tabla 3 se presentan los registros de la mortalidad de la cría de *P. vorax* durante un período de 13 meses, con un total de 7.330 larvas obtenidas a partir de tubérculos de papa infestados, adquiridos en la Central de Abastos de Bogotá, Corabastos.

Los valores de duración de los diferentes estadios de desarrollo de *P. vorax*, presentados en el presente

artículo, se sitúan en general dentro de los rangos obtenidos por otros autores, a excepción del estadio de pupa, el cual fue más corto (7-18 días) y su mortalidad menor (20%) que la registrada por Uribe *et al.* (1998) (50%). El porcentaje de fertilidad promedio del estadio de huevo, 40%, fue menor al reportado por Navarro (1995), quien obtuvo un 76,23% de fertilidad.

Al igual que lo reportado por Navarro, las causas más comunes de mortalidad en la cría, y particularmente en el estadio de pupa, fueron los hongos (*Beauveria* spp., *Metarhizium* spp, *Fusarium* spp.) y los ácaros. Por otra parte, algunos de los insectos capturados en campo presentaron infección con nemátodos durante el período de observación.

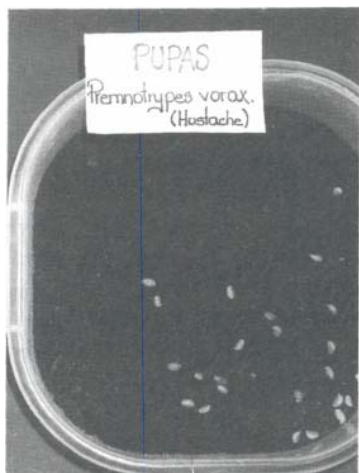
## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PATOGENICA

### Primera fase: evaluación de $TL_{50}$

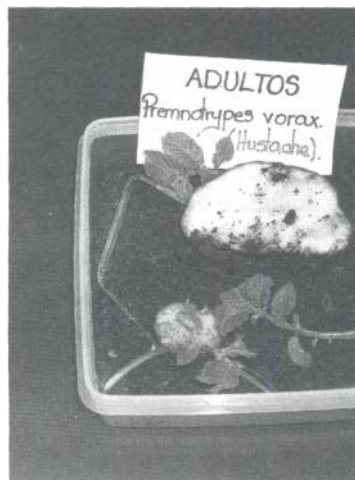
En la tabla 4 se presentan los resultados de mortalidad total,  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  de los nueve aislamientos evaluados en la primera fase de bioensayos realizados utilizando insectos adultos del pie de cría.

En esta primera fase todos los nueve aislamientos evaluados presentaron una mortalidad acumulada del 100% antes de los 16 días. Sin embargo manifestaron amplias diferencias en la distribución de la mortalidad en el tiempo (figura 4), estimada en el tiempo letal medio,  $TL_{50}$ , oscilando éste entre 2.1 días para *B. bassiana* 9728, aislamiento obtenido de un insecto del orden Homóptera del Parque Natural Chicaque y 11.8 días para *M. anisopliae* 9924, aislamiento obtenido de larvas de último instar de *P. vorax* obtenidas a partir de papa de la Central de Abastos de Bogotá, Corabastos.

Los tiempos letales medios obtenidos en esta fase fueron en general bastante cortos comparados con los obtenidos por otros autores. Castro (1997) obtuvo mortalidades entre 11,3% y 46% utilizando concentraciones de  $1 \times 10^7$  e/ml de 23 aislamientos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, sobre adultos de cría; Torres *et al.* (1996) obtuvo mortalidades también del 100% en períodos de 9 a 11 días, con una concentración de  $1 \times 10^9$  e/ml y en períodos de 21 días para una concentración de  $1 \times 10^7$  e/ml (1997).



**Figura 2.** Estadio de pupa de *Premnotrypes vorax* obtenido en cría de laboratorio.



**Figura 3.** Estadio de adulto de *Premnotrypes vorax* obtenido en cría de laboratorio

Los tiempos tan breves de mortalidad obtenidos pueden estar relacionados al hecho de que todos los aislamientos fueron reactivados en larvas de *P. vorax*, previamente. Esta reactivación, de acuerdo con numerosos estudios, potencia la capacidad patogénica de un aislamiento fúngico. González *et al.* (1994) encontraron un mayor porcentaje de mortalidad y un menor tiempo letal medio en la broca del café, *Hypothenemus hampei*, cuando utilizaron un aislamiento del hongo *B. bassiana* reactivado en el insecto, al comparar con el mismo aislamiento sin reactivar.

Otro factor que tiene influencia en la expresión de la patogenicidad de un hongo entomopatógeno es el sustrato de cultivo. Aponte (1999) encontró diferencias significativas en la patogenicidad de aislamientos de *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp.

sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, de acuerdo con el medio de cultivo utilizado.

Zuluaga *et al.* (1998) encontraron un mejor comportamiento de características como patogenicidad y viabilidad del aislamiento 9205 de *B. bassiana* cuando era cultivado sobre sustrato arroz en comparación con sustrato soya.

En cuanto a la relación entre el origen del aislamiento y su patogenicidad, reflejado en el tiempo letal medio, se destacan los siguientes resultados: los aislamientos que presentaron tiempos letales más cortos fueron Bb9728, aislado de un insecto del orden Homóptera, Bb9738 aislado de un insecto del orden Coleóptera, y Bb9755 y Bb9770, aislados de larvas de *P. vorax*. Los aislamientos Ma9924 y Bb97151

**Tabla 2.** Cuadro comparativo de la duración de estadios de *P. vorax*.

	<b>Autores</b>	<b>Uribe et al. 1998</b>	<b>Otros investigadores</b>
Huevo	14-32	14-16	19 (Calvache, 1986) 25 Garzón, 1996) 30 (Fedepapa, 1999)
Larva	44-52	59-72	38-51 (Calvache,1986) 51 (Fedepapa, 1999)
Pupa	7-8	16-22	26 (Calvache, 1986) 30 (Garzón,1996) 20 (Fedepapa, 1999)
Ciclo total	65-102	89-110	95-161 (Calvache,1986) 126 (Fedepapa,1999)

**Tabla 3. Mortalidad de los estadios de *P. vorax* en cría de laboratorio.**

Estadios	Mortalidad
De huevo a larva 1er. instar	40%
De larva 1er. instar a larva último instar	58%
De larva último instar a pupa	46%
De pupa a adulto	20%

presentaron los tiempos letales más largos y fueron aislados de *P. vorax* y de un organismo perteneciente a la clase Arácnida, respectivamente.

Otros autores como por ejemplo Torres *et al.* (1997) reportaron mortalidades de larvas y adultos de *P. vorax* más altas, cuando utilizaron aislamientos del hongo *B. bassiana*, aisladas del mismo insecto; por otra parte, el aislamiento de *B. bassiana* seleccionado por Cenicafé para el programa de control biológico de la broca del café, *H. hampei* (Coleóptera) fue aislado de *Diatraea saccharalis*, un insecto del orden Lepidóptera (González, 1994).

En la figura 5 se observa la aparición de micelio sobre el cadáver de un adulto de *P. vorax*, y en la figura 6 se presentan los registros de aparición de micelio en función del tiempo de observación. De acuerdo con estos resultados, los aislamientos Bb9728, Bb9770, Bb9755, Bb9738 y Bb9759, presentaron curvas de

aparición de micelio muy similares a la curva de mortalidad. Por el contrario, los aislamientos Ma9924, Bb9723, Bb9779 y Bb97151 presentaron amplias diferencias, mostrando porcentajes de insectos con micelio menores al porcentaje de insectos muertos.

Una observación importante fue la aparición de micelio previa a la muerte en algunos de los insectos tratados. Esta situación se presentó en algunos insectos (menos del 20%) de los aislamientos Bb9738, Bb9755, Bb9759, Bb97151 y Bb9770, con diferencias entre la aparición y la muerte, entre uno y tres días. Los demás aislamientos presentaron diferencias entre la muerte y la aparición de micelio entre dos y cuatro días.

De los nueve aislamientos evaluados en esta primera fase, el aislamiento Bb9728 se destacó por sus tiempos letales más cortos (TL<sub>50</sub>: 2.13 días; TL<sub>90</sub>: 5.58 días).

## SEGUNDA FASE: EVALUACIÓN DE TL<sub>50</sub>

En una segunda fase de evaluaciones, donde se utilizaron únicamente insectos capturados en campo, se evaluaron nuevamente siete de los aislamientos evaluados en la primera fase y se incluyeron cuatro nuevos aislamientos para un total de once aislamientos, nueve de los cuales pertenecientes a la

**Tabla 4. Evaluación de patogenicidad. Primera fase: insectos de cría.**

Aislamiento	Mortalidad total *	TL <sub>50</sub> **	TL <sub>90</sub> **
Bb9723	100%	5,747 días	14,119 días
Ma9924	100%	11,834 días	19,094 días
Bb9728	100%	2,138 días	5,580 días
Bb9738	100%	3,87 días	18,213 días
Bb9755	100%	4,679 días	14,883 días
Bb9759	100%	7,114 días	16,277 días
Bb9770	100%	4,742 días	14,198 días
Bb9779	100%	9,138 días	16,682 días
Bb97151	100%	8,419 días	43,379 días

\* Mortalidad absoluta (o muerte de todos los insectos). La mortalidad en el testigo siempre fue inferior al 10%.

\*\* Estimado mediante análisis Probit.



especie *Beauveria bassiana* y dos a la especie *Metarhizium anisopliae*.

Los aislamientos Bb9738 y Bb9755 no fueron considerados en la segunda fase porque no mantuvieron estabilidad en las características de esporulación establecidas para su multiplicación en arroz; es decir, su esporulación fue menor de  $5 \times 10^9$  esporas por gramo de sustrato (datos no presentados).

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de mortalidad total, TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>. De acuerdo con los datos presentados, a excepción de los aislamientos Bb9728 y Bb9770, los otros presentaron porcentajes de mortalidad más bajos y tiempos letales más altos con los insectos capturados en campo, en comparación con los insectos de cría, demostrando esto una mayor susceptibilidad al ataque de un hongo entomopatógeno a los insectos de cría.

Tres de los aislamientos evaluados en esta fase, Bb9728, Bb9770 y Ma9915, presentaron mortalidades mayores de 90%. El aislamiento Bb9728 presentó el TL<sub>50</sub> más corto, seguido de Ma9915 y Bb9770. Como se presenta en la figura 7, el aislamiento Ma9915 presentó 27 insectos muertos (90%) en el día 14; el aislamiento Bb9728, 29 insectos muertos (96,66%) el día 19 y el aislamiento Bb9770, 30 insectos muertos (100%) en el día 21. Este último dato coincide con el registrado por Torres *et al.* (1997) para la cepa Bv3.

De acuerdo con los TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub> obtenidos, los aislamientos Bb9786, Bb9723, Ma9924 y Bb9790

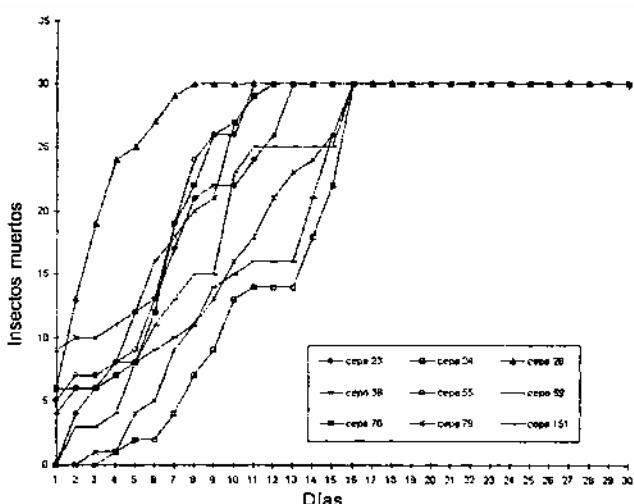


Figura 4. Distribución de la mortalidad. Fase 1. Insectos de cría.

mostraron una mayor "lentitud" en la mortalidad expresada, y los aislamientos Bb9728, Bb9770 y Ma9915, una mayor "rapidez". Esta mayor rapidez en ocasionar la muerte de los insectos estuvo asociada con un mayor porcentaje de mortalidad presentada por esos mismos aislamientos, lo cual sugiere que está directamente relacionada con la capacidad del hongo de vencer los mecanismos de defensa del insecto, posiblemente en la secreción de toxinas en las primeras fases de la infección (Butt, 1990; Roberts, 1981).

Al igual que en la primera fase de evaluaciones, la distribución de la mortalidad (figura 7) y la distribución de aparición de micelio (figura 8) fueron similares, lo cual permite confirmar que la micosis producida por los hongos entomopatógenos fueron la causa de la mortalidad. En esta fase, la aparición de micelio fue siempre posterior a la muerte del insecto.

### EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA, CL<sub>50</sub>

Para la evaluación de la concentración letal media, CL<sub>50</sub>, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la primera y segunda fases de evaluaciones. En consecuencia, fueron seleccionados los aislamientos Bb9728 y Bb9770. Estos dos aislamientos presentaron los tiempos letales más bajos y los porcentajes de mortalidad más altos, tanto con insectos de cría (tabla 4), como con insectos capturados en campo (tabla 5). Los resultados obtenidos en esta tercera fase de evaluaciones se presentan en las tablas 6, 7 y 8, y



Figura 5. Micelio de *Beauveria bassiana* sobre cadáver de adulto de *P. vorax*.



**Tabla 5. Evaluación de patogenicidad. Segunda fase: insectos de campo.**

Aislamiento	Mortalidad total *	TL <sub>50</sub> **	TL <sub>90</sub> **
Ma9915	90%	4,205 días	10,377 días
Bb9723	63,33%	14,245 días	62,031 días
Ma9924	73,33%	17,187 días	114,766 días
Bb9728	96,66%	3,739 días	13,162 días
Bb9759	86,66%	17,813 días	28,056 días
Bb9770	100%	7,966 días	14,234 días
Bb9779	63,33%	17,929 días	42,639 días
Bb9786	46,66%	27,151 días	100,999 días
Bb9790	66,66%	20,278 días	84,07 días
Bb97135	70%	18,182 días	41,072 días
Bb97151	66,66%	14,937 días	35,008 días

\*Mortalidad absoluta. La mortalidad en el testigo siempre fue inferior al 10%.

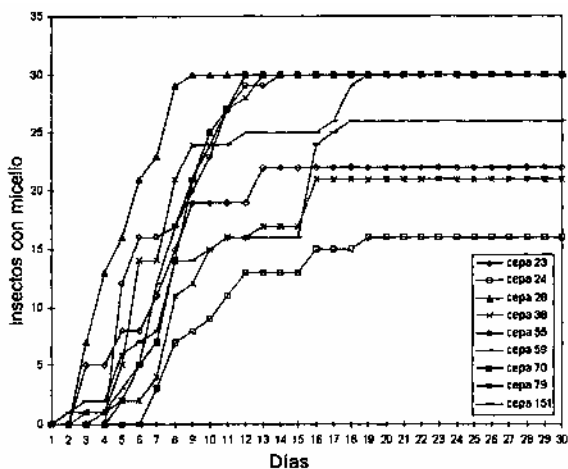
\*\* Estimado mediante análisis Probit.

muestran -tal como se esperaba- una relación directa entre concentración y mortalidad.

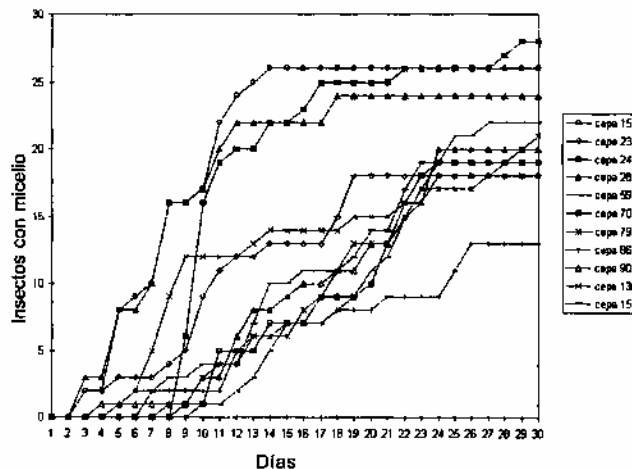
El aislamiento Bb9728 presentó mortalidades mucho menores y tiempos letales más largos que en las dos primeras fases de evaluaciones, alcanzando un máximo de 66,66% de mortalidad con la concentración más alta (1x 10<sup>8</sup> e/ml).

El aislamiento Bb9770, en cambio, mantuvo su nivel de mortalidad en el 100% para las concentraciones 1 x 10<sup>7</sup> e/ml y 1 x 10<sup>8</sup> e/ml y un TL<sub>50</sub> entre los 8 y 9,8 días.

En las figuras 9 y 10 se puede observar la distribución de la mortalidad en relación con el tiempo para las diferentes concentraciones de los aislamientos



**Figura 6. Aparición de micelio. Fase 1. Insectos de cría.**



**Figura 7. Distribución de la mortalidad. Fase 2. Insectos de campo.**

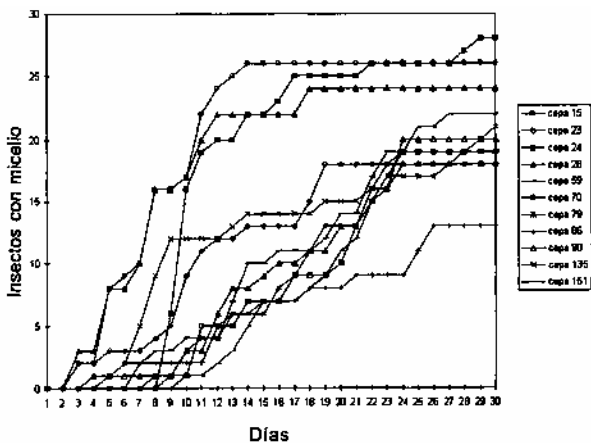


Figura 8. Aparición de micelio. Fase 2. Insectos de campo.

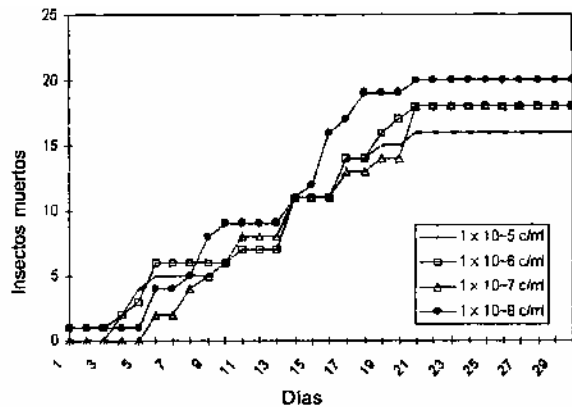


Figura 9. Distribución de la mortalidad con diferentes concentraciones. Aislamiento Bb9728.

Bb9728 y Bb9770. Los dos aislamientos presentan el máximo de mortalidad en todas las concentraciones evaluadas, en el día 21 del bioensayo. Este resultado coincide para el aislamiento Bb9770, con el obtenido en la segunda fase y con el reportado por Torres *et al.* (1997).

Al igual que lo registrado para la fase 2, la aparición de micelio sobre los insectos muertos presentó una distribución similar a la mortalidad (no se muestran los datos).

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos con el análisis Probit para la estimación de la concentración letal media. El aislamiento Bb9728 presentó  $CL_{50}$  de  $1,795 \times 10^5$  e/ml; el aislamiento Bb9770 de  $7,04 \times 10^4$  e/ml y  $CL_{90}$  de  $2,6 \times 10^6$  e/ml.

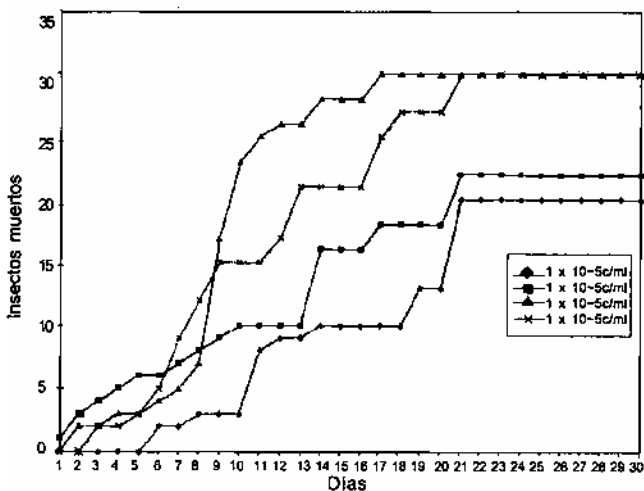


Figura 10. Distribución de la mortalidad con diferentes concentraciones. Aislamiento Bb9770.

## CONCLUSIONES

La implementación del pie de cría de *Premnotrypes vorax* permitió la obtención de todos los estadios del insecto. A partir de ella se obtuvieron las larvas necesarias para la reactivación de los aislamientos, así como los adultos para una fase de evaluaciones.

La metodología utilizada para la evaluación de la mortalidad de insectos adultos de *P. vorax* demostró ser adecuada, puesto que en ningún caso se presentó una mortalidad en el testigo mayor del 10% en un período de 30 días.

Se presentaron diferencias en la mortalidad presentada por los insectos de acuerdo con su origen; los insectos de cría mostraron una mayor susceptibilidad a la micosis producida por los hongos entomopatógenos. Este resultado confirma la gran relevancia que tiene la condición fisiológica de un insecto en la expresión de la patogenicidad de un hongo entomopatógeno, y sugiere estudiar modificaciones al sistema de cría en laboratorio, con el fin de obtener una población de características semejantes a los insectos libres.

En la primera fase de evaluaciones, todos los aislamientos presentaron una mortalidad del 100% en menos de 16 días. En cuanto a los estimativos de  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ , que buscaban evaluar la relativa rapidez de la muerte ocasionada por cada uno de los aislamientos, sí se presentaron amplias diferencias, sobresaliendo el aislamiento Bb9728.

**Tabla 6.** Tercera fase. Mortalidad de *P. vorax* con el aislamiento Bb9728.

Concentración	Mortalidad total	TL <sub>50</sub> *	TL <sub>90</sub> *
1 x 10 <sup>5</sup> e/ml	53,33%	20,649 días	73,844 días
1 x 10 <sup>6</sup> e/ml	60%	21,083 días	95,535 días
1 x 10 <sup>7</sup> e/ml	60%	19,136 días	47,183 días

\* Estimado mediante el análisis Probit.

**Tabla 7.** Tercera fase. Mortalidad de *P. vorax* con el aislamiento Bb9770.

Concentración	Mortalidad total	TL <sub>50</sub> *	TL <sub>90</sub> *
1 x 10 <sup>5</sup> e/ml	66,66%	20,178 días	48,849 días
1 x 10 <sup>6</sup> e/ml	73,33%	14,987 días	77,241 días
1 x 10 <sup>7</sup> e/ml	100%	8,062 días	14,646 días
1 x 10 <sup>8</sup> e/ml	100%	9,811 días	20,821 días

\* Estimado mediante el análisis Probit.

Las diferencias registradas en la primera fase fueron corroboradas en la segunda fase únicamente para los aislamientos Bb9770 y Bb9728, siendo los únicos aislamientos que mantuvieron los mismos niveles de mortalidad en todas las fases de evaluaciones.

Los altos niveles de mortalidad registrados en todas las evaluaciones (mayores de 45%), confirman la capacidad inductora de la patogenicidad, que tiene la práctica de reactivar previamente los aislamientos fúngicos en larvas del insecto blanco, en nuestro caso, *Premnotrypes vorax*.

De acuerdo con las evaluaciones realizadas, el aislamiento *Beauveria bassiana* 9770, aislado de una larva de *Premnotrypes vorax* emergida de papa de la variedad parda pastusa adquirida en la Central de Abastecimiento de Bogotá, Corabastos, presentó el mejor comportamiento como patógeno de *P. vorax*. Este resultado coincide con otros autores que registran mejores

comportamientos con aislamientos obtenidos del insecto blanco (Torres *et al.*, 1997)

El aislamiento Bb9770 presentó una mortalidad del 100% en las tres fases de evaluación; un TL<sub>50</sub> que osciló entre 4,742 días y 9,811 días; un TL<sub>90</sub> entre 14,198 días y 20,821 días. Estos resultados sugieren un rango de variabilidad dependiente del insecto en cuanto a la rapidez de la muerte y dependiente del hongo en cuanto a la expresión de la mortalidad total.

Los resultados obtenidos permiten seleccionar al aislamiento Bb9770 para una fase de evaluación en campo, dirigido a establecer un programa de manejo del gusano blanco de la papa.

**Tabla 8.** Tercera fase. Evaluación de la concentración letal media, CL<sub>50</sub>.

Aislamiento	Concentración letal media, CL <sub>50</sub> *
Bb9728	1,7949 x 10 <sup>5</sup> esporas/ml
Bb9770	7,0379 x 10 <sup>4</sup> esporas/ml

\* Estimado mediante el análisis Probit.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al programa de Biotecnología de Colciencias por su apoyo financiero, al Programa de Biología de la Universidad Distrital por facilitar sus instalaciones, a las estudiantes Adriana Calvan, Fabiola Lozano y Sandra Jiménez, así como a Bercelí Suárez y Carlos Hernández de la Umata del municipio de Motavita.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aponte, L. S. 1999. Evaluación de la actividad insecticida de aislamientos nativos de *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp contra larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) de segundo instar. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C.
- Aricapa, M. G., Correa, F. 1992. *Almacenamiento de hongos sobre papel filtro*. Cali, Colombia: CIAT, Programa de Patología de Arroz.
- Butt, T. M. 1990. Fungi infection processes. A mini-review. Vth Int. Colloq. Invert. Pathol. Adelaide. *Society for Invertebrate Pathology*. pp. 121 -124.
- Calvache, H. 1986. Aspectos biológicos y ecológicos del gusano blanco de la papa *Premnotrypex vorax* (Hustache). Memorias del curso sobre control integrado de plagas de papa. CIP, ICA. Junio 29 - Julio 19.
- Castro, Y. 1997. Evaluación de cepas de *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp para el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypex vorax* (Hustache). Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Federación Colombiana de Productores de Papa, Fedepapa. 1999. El gusano blanco de la papa. *Boletín informativo* No. 151. Órgano de divulgación de la Federación Colombiana de Productores de Papa. Departamento Técnico. Mayo.
- Finney, D. J. 1972. *Probit Analysis*. Cambridge University Press.
- Garzón, C., Aza, B. O., Jiménez, J., Luque, J. E. 1996. Potencial del nemátodo *Steinernema* sp. para el control biológico del gusano blanco de la papa. *Revista Colombiana de Entomología*. 22,1. pp.25-30.
- Gómez, M. I., Valencia, C., Cotes, A. M. 2000. Diseño y evaluación en casa de malla de un bioplaguicida granular con base en el hongo *Beauveria bassiana* para el control del gusano blanco de la papa. En: XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen. Medellín (Colombia), p. 5.
- González, M. T., Posada, F. J., Bustillo, A. E. 1994. Pérdida de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* cultivada sucesivamente en sustrato de arroz. En: XXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. SOCOLEN. Medellín (Colombia), p. 97.
- Ministerio de Agricultura Y Desarrollo Rural. 1999. Anuario Estadístico del Sector Agropecuario y Pesquero, 1998. Oficina de Información y Estadística. Bogotá, D.C.
- Navarro, O. 1995. Estudio de algunos aspectos biológicos y de comportamiento de *Premnotrypex vorax* Hustache. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Olarte, D. E. 1994. Optimización de un medio de cultivo para la producción masiva en superficie del hongo *Beauveria bassiana*. Tesis para optar al título de Tecnóloga Química. Corporación Tecnológica de Bogotá.
- Rivera, G. 1993. Obtención de micelio en forma de pellets del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para su utilización como base de un bioinsecticida contra la broca del café *Hypothenemus hampei*. Tesis para optar al título de Magister Scientiae en Microbiología. Universidad de los Andes. Bogotá.
- Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic Fungi. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. Ed. H. D. Burgues. Chap 23. pp. 441-446.
- Smith, D. 1991. *Maintenance of Microorganisms*. 2nd. Ed. International Mycological Institute, Kew, London, UK. Academic Press, pp.138,150.

- Sneh, B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selectiva medium based on wheat germ. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58, 269-273.
- Torres, P. R., López, A. 1996. Control microbiológico del gusano blanco de la papa *Premnotypes vorax* (Coleóptera: Curculionidae) con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. En: XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Cartagena, p. 58.
- Torres, R., López, A. 1997. Estudios básicos para el control microbiológico del gusano blanco de la papa (*Premnotypes vorax*) con *Beauveria* spp. y *Metarhizium* sp. *Revista Colombiana de Entomología*. 23. pp. 83-88.
- Torres, P. R., López, A., Espitia, E. 1998. Evaluación en campo de dos cepas de *Beauveria bassiana* para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotypes vorax* (Col., curculionidae.) En: XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Cali, Colombia. Julio 16-18.
- Uribe, D., Pinto, L., Martínez, W., Rivera, G., Cerón, J. 1998. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de hongos entomopatógenos con actividad biopesticida contra el gusano blanco de la papa, *Premnotypes vorax* (Hustache) (Col., Curculionidae). En: XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Cali, Colombia. Julio 16-18.
- Vélez, P. E., Posada, F. J., Marín P., González, M. T., Osorio, E., Bustillo, A. E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, Cenicafé. *Boletín Tecn/co*No. 17.
- Zuluaga, D. M., Velásquez, E. 1998. Comportamiento de las características vitales de *Beauveria bassiana* durante su almacenamiento. En: XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Cali, Colombia. Julio 16-18.