

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

Any Mercedes Lucero Mafla,<sup>1</sup>  
Luis Alberto Peña Villamil,<sup>1</sup>  
Tito Bacca Ibarra<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Title: Evaluation of the biocontrol activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, on larvae of *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae).**

High grub populations of coleopteran, frequently attack crops of wheat and potato in the Department of Nariño, Colombia. Reports indicate that infestations levels reach more than 350 larvae/m<sup>2</sup>, which severely reduce crop yields. Use of biological control measurements as fungal entomopathogens seems to be a promising alternative for management of this pest. The present work aimed to evaluate the effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of *Ancognatha scarabaeoides* both in laboratory and greenhouse conditions. Isolates of entomopathogen fungus were obtained from infected larvae in the municipalities of Yacuanquer and Ospina. A sample of 5 isolates, which previously had shown to cause mortality rates higher than 50%, was selected in the laboratory: Mt1, Bb cosmo, Mt2, Bb4 and Bb10. Isolates concentrations from 1x10<sup>5</sup> to 1x10<sup>10</sup> spores/ml were tested. The cumulative mortality percentage (at 18 days after the inoculation) ranged from 100% with Bb cosmo, Mt1 and Mt2 at concentrations of 1x10<sup>10</sup> spores/ml to 90% with Bb4 and Bb10 at concentrations of 1x10<sup>9</sup> spores/ml. Lethal doses 90 (LD<sub>90</sub>) of 1.1x10<sup>10</sup>, 7.3x10<sup>9</sup>, 2.2x10<sup>10</sup>, 3.9x10<sup>10</sup> and 4.3x10<sup>10</sup> spores/ml were calculated for each isolate, respectively. An evaluation of the biocontrol activity of the isolates was carried out under greenhouse conditions. Mortality percentages obtained reached 76%, 67.5%, 63.5%, 59% and 53.5% for Mt1, Bb cosmo, Mt2, Bb4 and Bb10, respectively. These results suggest that the use of native biocontrollers is a promising alternative to be included in the integrated management for white grubs in Nariño.

**Key words:** Fungal entomopathogens, *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Mt), *Ancognatha scarabaeoides*.

1. Investigadores Programa Agrícola. C.I. Obonuco - CORPOICA. Pasto, Colombia.  
2. Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

## Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae)

## RESUMEN

Actualmente, en los municipios del departamento de Nariño (Colombia), en los cultivos de trigo y papa que son los principales sistemas de producción, se presentan altas infestaciones de poblaciones de chisas encontrándose hasta 350 larvas/m<sup>2</sup>, representando un factor limitante para la producción de los cultivos. Una alternativa promisorio para el manejo de esta plaga es la utilización de métodos biológicos que incluyen el uso de hongos entomopatógenos. El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en laboratorio e invernadero. Los aislamientos de hongos se obtuvieron de larvas infectadas en los municipios de Yacuanquer y Ospina. En el laboratorio, se seleccionaron 5 de 9 aislamientos de hongos: Mt1, Bb cosmo, Mt2, Bb4 y Bb10 que presentaron mortalidades superiores al 50%, éstas se evaluaron a concentraciones de 1x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>10</sup> esporas/ml. El porcentaje acumulado de mortalidad a los 18 días después de la inoculación fueron: del 100% para Bb cosmo, Mt1 y Mt2 en la concentración de 1x10<sup>10</sup> esporas/ml y del 90% para Bb4 y Bb10 en la concentración de 1x10<sup>9</sup> esporas/ml, presentando concentraciones letales 90(CL<sub>90</sub>) de 1.1x10<sup>10</sup>, 7.3x10<sup>9</sup>, 2.2x10<sup>10</sup>, 3.9x10<sup>10</sup> y 4.3x10<sup>10</sup> esporas/ml respectivamente. En invernadero se evaluaron los mismos microorganismos con sus respectivas concentraciones letales 50(CL<sub>50</sub>) y 90(CL<sub>90</sub>), encontrándose porcentajes de mortalidad del 76.00%, 67.50%, 63.50%, 59.00% y 53.50% para Mt1, Bb cosmo, Mt2, Bb4 y Bb10. Estos resultados indican la posibilidad de incluir estos biocontroladores nativos en el manejo integrado de las chisas en Nariño.

**Palabras claves:** hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Mt), *Ancognatha scarabaeoides*.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos de trigo y papa ocupan un lugar muy importante dentro de los sistemas de producción agrícola del Departamento de Nariño, no sólo por los aspectos económicos que involucran, sino por los sociales, pues son los principales cultivos de la zona. Esta actividad involucra especialmente a pequeños productores quienes dedican sus propiedades, que generalmente no sobrepasan las cinco hectáreas, al desarrollo de dicha actividad derivando de ésta su bienestar y calidad de vida, pues es su principal fuente de ingresos. El trigo y la papa a pesar de su gran importancia económica, social y de ser productos básicos de la dieta nariñense, se ven amenazadas por una serie de problemas fitosanitarios cuyo control incrementa los costos de producción y afecta directamente el presupuesto de los productores y consumidores (Sañudo y Castillo, 1994).

*Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae), se considera como una de las plagas más importantes del cultivo de papa y trigo, si se tiene en cuenta su amplia distribución en las zonas productoras y el costo que su control implica, lo cual ocasiona pérdidas en áreas cultivadas que pueden ir entre 75% y 100% (Pumalpa, 1987; Yépez, 1994). En la actualidad el control de la chisa se realiza por medio de prácticas culturales y la aplicación de diferentes insecticidas químicos. Debido al incremento e incidencia de la plaga, la frecuencia en la aplicación de los insecticidas se ha intensificado, lo que ha incrementado los costos de producción, la contaminación ambiental y, en general, un desequilibrio en los agroecosistemas (Londoño y Pérez, 1994; Sañudo y Guzmán, 1995). Esta problemática ha generado la necesidad de buscar otras alternativas de control

de la plaga, como el uso de microorganismos entomopatógenos; los hongos *Beauveria* y *Metarhizium* han mostrado buenos resultados en el control de otras plagas tropicales (Fuertes y Chamorro, 1994; Ruíz y Posada, 1985; Salazar y Salazar, 1997).

El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar el control de la plaga mediante el uso de biocontroladores, como una alternativa eficaz y económica para el beneficio del sector productivo y el ecosistema en general; se recurrió a los aislamientos de hongos entomopatógenos regionales, ya que algunos estudios recomiendan utilizar aislamientos nativos extraídos del insecto, puesto que existen modificaciones específicas del hongo hacia el hospedero que pueden mejorar su acción patogénica (Roberts y Humbre, 1984).

Para el control microbiológico de las chisas, se buscaron alternativas dirigidas al estado larval, mediante la utilización de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, realizándose pruebas a nivel de laboratorio e invernadero.

#### Materiales y métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación Obonuco-CORPOICA en el Departamento de Nariño, ubicado a una altura de 2710 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 13° C (Plan de Desarrollo de Nariño, 2001).

Los aislamientos de los hongos utilizados fueron obtenidos a partir de larvas infectadas en campo de los municipios de Ospina y Yacuanquer. Las larvas recolectadas se montaron en cámaras húmedas, a una temperatura aproximada de 23° C, entre 5 y 8 días, al cabo de los cuales se observó el crecimiento micelial sobre el tegumento larval; su aislamiento se realizó en agar-agua y la identificación siguiendo las claves taxonómicas de Samson *et al.*, (1988).

*Activación y selección de cepas de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae sobre larvas de Ancognatha scarabaeoides.* Las cepas de *Beauveria* y *Metarhizium* fueron cultivadas durante 10 días en agar papa-dextrosa (PDA), acidificado al 1% con ácido láctico suplementado con antibiótico (estreptomina) para evitar la contaminación bacteriana. La remoción de las esporas de los cultivos se realizó con Tween 80 al 0.05%; a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas y, con ayuda de un hemoci-

tómetro y un microscopio de luz con aumento de (40x), se realizó el recuento de propágulos infectivos por mililitro, a fin de calcular la concentración de la suspensión madre.

La activación de cada una de las cepas se realizó sobre 10 larvas de *Ancognatha scarabaeoides*. Antes de infectar las larvas con el hongo, éstas fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 0.5% y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. La activación se realizó de acuerdo con algunos parámetros enunciados por López, (1994): una vez obtenida la concentración de la suspensión madre para cada una de las 9 cepas, se ajustó a la concentración de  $1 \times 10^7$  propágulos/ml. Posteriormente, las larvas previamente desinfectadas se sumergieron en la suspensión durante dos minutos y luego se colocaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante un período de 10 días, y día de por medio se registró la mortalidad, durante este período no se les suministró alimento a las larvas para que fuera más ágil la infección y proliferación del hongo en el cuerpo de las mismas. Las larvas muertas se llevaron a cámara húmeda a 23°C observándose el crecimiento del hongo sobre el cuerpo larval. Terminadas las observaciones se seleccionaron las mejores cepas respecto a la mortalidad de las larvas.

*Producción masiva del inóculo.* Para la multiplicación masiva de *Metarhizium* se tomaron las pautas mencionadas por Torres y otros (1993), empleando arroz precocido, y la multiplicación masiva de las cepas de *Beauveria*, se realizó en granos de trigo, empleando la metodología reportada por Peña y otros (2000) y Londoño (1993). Una vez se presentó crecimiento de los hongos, se calculó la concentración de esporas presentes en un gramo de sustrato.

*Pruebas de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en laboratorio sobre larvas de Ancognatha scarabaeoides.* Las pruebas de patogenicidad en laboratorio se llevaron a cabo utilizando los aislamientos monospóricos de *Beauveria*, Bb4, Bb10, Bb cosmo y de *Metarhizium* Mt1 y Mt2. Los cuales fueron seleccionados de los nueve aislamientos incluidos en las pruebas de activación sobre larvas de la plaga.

Cada uno de los cinco aislamientos, fue cultivado durante 10 días en cajas petri con agar Papa-dextrosa (PDA) acidificado al 1% con ácido láctico y

suplementado con (estreptomina) para evitar la contaminación bacteriana.

Una vez cultivados los aislamientos, se obtuvo el inóculo, de acuerdo con la metodología explicada anteriormente. Obtenida la concentración de las suspensiones madres, se ajustaron todos los aislamientos, a las concentraciones de:  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{10}$  propágulos/ml. Cada concentración se ajustó en un volumen de 25ml donde se suspendieron los insectos de cada tratamiento durante un minuto y medio (1'30").

Para el desarrollo de las pruebas de patogenicidad en el laboratorio, se utilizó la metodología propuesta por González y otros (1993) con algunas modificaciones, con el fin de determinar la variabilidad en la patogenicidad de los tres aislamientos de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae*.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 35 tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 10 unidades experimentales por repetición, para un total de 30 unidades experimentales por tratamiento.

Los tratamientos estuvieron formados por tres aislamientos de *B. bassiana* (Bb4, Bb10, Bb cosmo) y dos de *M. anisopliae* (Mt1, Mt2) y cada tratamiento con su respectivo testigo. Cada cepa se evaluó en 6 concentraciones diferentes (con tres repeticiones para cada dosis).

Para realizar el experimento las larvas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.5%) durante dos minutos y luego fueron lavados tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de desinfectante.

La metodología utilizada para la inoculación de los tratamientos consistió en colocar en inmersión determinado número de larvas en una caja petri en la cual previamente, se colocó la suspensión de esporas/ml, agitando durante cinco minutos. Cumplido el tiempo de exposición, se retiró el exceso de inóculo de las larvas por inversión, de la caja petri sobre una toalla de papel seca.

Cada larva de segundo instar inoculada se colocó en un recipiente plástico previamente esterilizado, semitransparente, de 25 ml de capacidad con tapa que posee una ventana circular en el centro facilitando el intercambio gaseoso, y el fondo recubierto con papel filtro al que se le agregó 0.5 ml de una solución de papa + dextrosa + agua 1: 10000, favoreciendo el desarrollo del hongo y la supervivencia de la larva.

La evaluación de la mortalidad de las larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, se

realizó cada 48 horas (dos días) durante 18 días después de la inoculación, utilizando para esto un estereoscopio que permite observar la mortalidad causada por el hongo; además durante cada observación se adicionó 0.5 ml de la solución papa-dextrosa + agua 1: 10000 a cada uno de los frascos manteniendo así la humedad relativa alta dentro de éste ( $T=15^{\circ}C \pm 4^{\circ}C$ ; H.R. = 90%).

Los datos obtenidos de la mortalidad se sometieron a un análisis de varianza y prueba múltiple de Duncan y por el método estadístico Probit se encontraron las concentraciones letales media ( $CL_{50}$ ) y 90 ( $CL_{90}$ ) para cada uno de los aislamientos en estudio.

*Pruebas de patogenicidad con tres aislamientos de Beauveria bassiana y dos aislamientos de Metarhizium anisopliae sobre larvas de Ancognatha scarabaeoides en invernadero.* Para la realización de las pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, se utilizaron tres cepas de *Beauveria bassiana* y dos cepas de *Metarhizium anisopliae*. Las cuales se aislaron de larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, infectadas en campos ubicados en las regiones de Yacuanquer y Ospina. Las cepas mencionadas fueron designadas como *Beauveria bassiana* (Bb4, Bb10 y Bb cosmo) y *Metarhizium anisopliae* (Mt1 y Mt2) respectivamente y corresponden a las cepas que mostraron los mejores resultados en la mortalidad de las larvas en las pruebas de patogenicidad en el laboratorio.

Las pruebas de patogenicidad en invernadero, se llevaron a cabo en materos con suelo estéril, empleando plantas de *Solanum tuberosum* variedad Diacol Capiro y *Triticum* variedad Obonuco-Obando 98 que poseían una altura de 15 cm, 5 parejas de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* y la aplicación líquida de los entomopatógenos de *Beauveria bassiana* (Bb4, Bb10, Bb cosmo) y *Metarhizium anisopliae* (Mt1 y Mt2) para un total de 12 tratamientos, incluyendo los testigos. Cada tratamiento tenía 4 repeticiones, 5 materos por repetición, para un total de 20 materos por tratamiento.

La aplicación del inóculo en estas pruebas fue en una solución de 40ml de Tween 80 al 0.05% a las concentraciones letales 50 y 90 respectivamente para cada aislamiento. La suspensión del inóculo se obtuvo a partir de la filtración de los granos de trigo y arroz donde fue cultivado cada uno de los aislamientos.

Una vez aplicados los entomopatógenos, se contabilizó el número de indivi-

duos muertos, durante un período de 21 días. Dichas observaciones se realizaron a los 7, 14, 21 días después de aplicados los tratamientos.

Los datos obtenidos de mortalidad se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de Duncan.

## Resultados y discusión

*Activación y selección de cepas de Beauveria y Metarhizium sobre larvas de Ancognatha scarabaeoides.* Los resultados de mortalidad de los nueve aislamientos empleados en el estudio, registrado durante un período de 10 días, se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Ancognatha scarabaeoides* tratadas con los aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Aislamientos	(%) Mortalidad
Bb cosmo *	80
Bb 7	40
Bb 8	40
Bb 5	30
Bb 10*	60
Bb 12	40
Bb 4*	60
Mt 1*	90
Mt 2*	70

\*Aislamientos con los mayores porcentajes de mortalidad.

Los aislamientos que presentaron los mayores porcentajes de mortalidad en las larvas tratadas fueron: Bb cosmo con un 80%, Bb4 y Bb10 con un 60%, Mt1 con un 90% y Mt2 con un 70%. Además estos aislamientos fueron, los que presentaron mejor esporulación sobre el cuerpo de las larvas infectadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existieron diferencias en el desarrollo y esporulación de los aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium*. Las esporas de los aislamientos de *Metarhizium* cubrieron uniformemente el cuerpo de las larvas infectadas; además, fue más fácil remover las esporas de los aislamientos de *Metarhizium* del cuerpo de las larvas infectadas con dicho aislamiento, en comparación con las larvas infectadas con los aislamientos de *Beauveria*, los cuales presentaron esporas con mayor adherencia al cuerpo de la larva. Esto podría deberse a la variabilidad natural de los aislamientos (Evans, 1986 y Ferrón, 1967).

*Producción masiva del inóculo.* La concentración de esporas por mililitro presentes en un gramo de arroz donde se cultivó el hongo, fue para Mt1 de  $2.0 \times 10^8$  esporas/ml y para Mt2 de  $1.4 \times 10^8$  esporas/ml.

Las cepas de *Beauveria*, aprovechando los nutrientes que le proporcionó el trigo, crecieron cubriendo totalmente el sustrato con hifas y esporas, y presentaron las siguientes concentraciones de esporas por gramo de trigo: Bb cosmo de  $5.0 \times 10^9$  esporas/g, Bb4 de  $3.0 \times 10^8$  esporas/g y Bb10 de  $2.5 \times 10^8$  esporas/g.

Lo anterior podría deberse a que la capacidad de adherencia de las esporas a los sustratos difirió entre las cepas (Bustillo, 1984; Evans, 1986).

*Pruebas de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en laboratorio sobre larvas de Ancognatha scarabaeoides.* La toma de datos de la mortalidad se realizó cada 48 horas (2 días) durante 18 días, tiempo en el cual se alcanzó el 100% de mortalidad en las larvas con el tratamiento correspondiente a la cepa Bb cosmo, Mt1 y Mt2 evaluadas a la concentración de  $1 \times 10^{10}$  esporas/ml. Se observó que a mayor concentración aplicada a las larvas, fue mayor el porcentaje de mortalidad obtenido.

Al someter a un análisis de varianza, los datos de mortalidad acumulada obtenidos para cada uno de los tratamientos en los ensayos, se encontraron diferencias significativas entre aislamientos x concentraciones, con respecto a la mortalidad de las larvas ( $Pr > f 0.0001$ ) (Tabla 2). Es así, que cuando se aplicó Bb cosmo a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  esporas/ml, se obtuvo el 100% de la mortalidad hacia el día 18 (Figura 1). En contraste, con los tratamientos restantes se obtuvieron porcentajes de mortalidad por debajo del 50% a excepción del correspondiente a la concentración  $1 \times 10^9$  esporas/ml que produjo una mortalidad del 70%. Tales porcentajes fueron del 10%, 16%, 33% y 40% respectivamente para las concentraciones  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  esporas/ml.

Con Mt1 a la concentración de  $1 \times 10^{10}$  esporas/ml, se obtuvo el 100% de la mortalidad de las larvas tratadas hacia el día 18. Sin embargo, con los tratamientos correspondientes a las concentraciones de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  esporas/ml, se alcanzaron en este tiempo porcentajes inferiores al 50% siendo éstos de



**Tabla 2.** Análisis de varianza para el promedio acumulado de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en condiciones de laboratorio.

Fuente de variación	GL	CM	F	Pr > F
Aislamiento	5	4581.89***	610.58	0.0001
Concentración	5	6397.53***	852.53	0.0001
Aislamiento x Concentración	25	296.68***	39.54	0.0001
Error	70	7.50		
C.V	7.24			
R <sup>2</sup>	0.99			

C.V = Coeficiente de variación  
 R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación múltiple  
 \*\*\* = P < .001

20%, 23%, 43% y 46% respectivamente. En el tratamiento restante, se encontró un porcentaje de mortalidad del 80% para la concentración 1 x 10<sup>9</sup> esporas/ml.

Con Bb4, se obtuvieron los siguientes porcentajes de mortalidad en las diferentes concentraciones: 1 x 10<sup>5</sup> esporas/ml: 16%; 1 x 10<sup>6</sup> esporas/ml: 20%; 1 x 10<sup>7</sup> esporas/ml: 30%; 1 x 10<sup>8</sup> esporas/ml: 40%; 1 x 10<sup>9</sup> esporas/ml: 73% y 1 x 10<sup>10</sup> esporas/ml: 90% de mortalidad.

Con Mt2, a la concentración de 1 x 10<sup>10</sup> esporas/ml, se obtuvo el 100% de mortalidad hacia el día 18; con la concentración de 1 x 10<sup>9</sup> esporas/ml se presentó el 70% de mortalidad. Sin embargo, con los tratamientos corres-

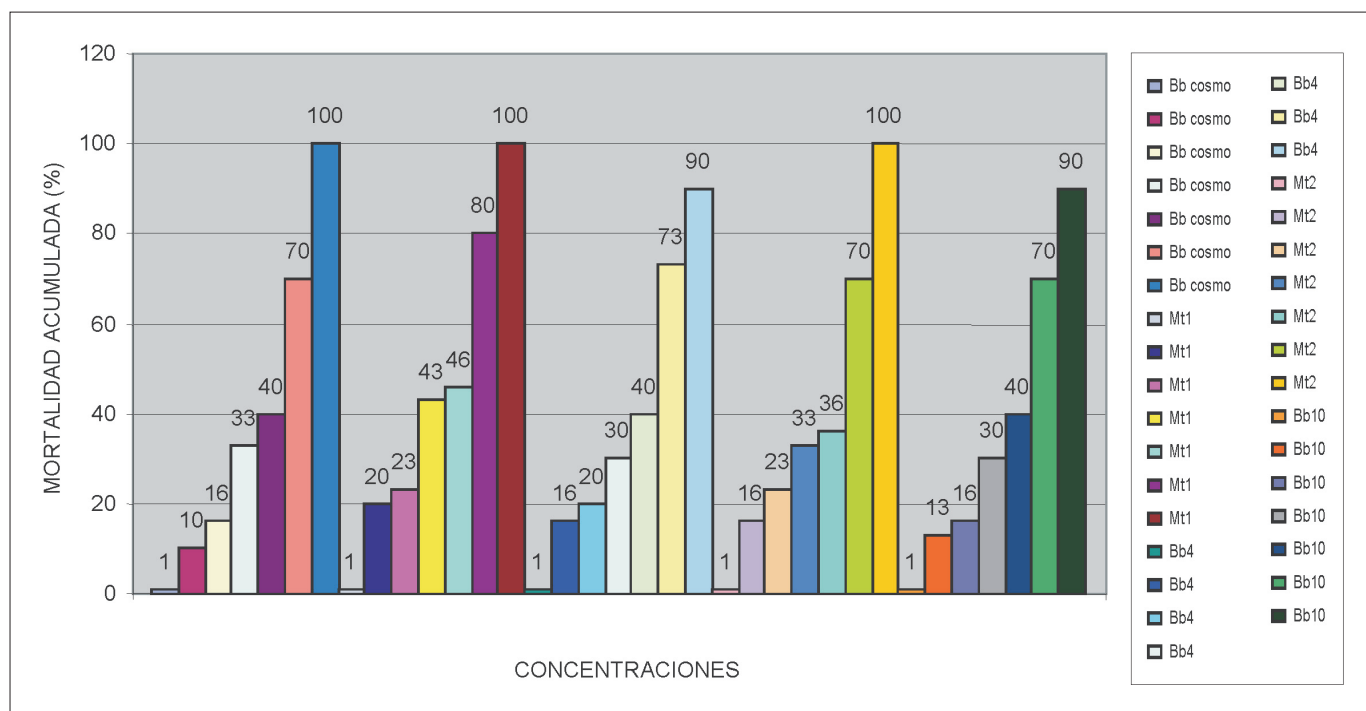
pondientes a las concentraciones 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup> y 1 x 10<sup>8</sup> se alcanzaron en este tiempo porcentajes inferiores a 50%, siendo estos de 16%, 23%, 33% y 36%.

Con Bb10, se obtuvo el 90% de mortalidad a la concentración 1 x 10<sup>10</sup> esporas/ml; en las demás concentraciones se obtuvieron porcentajes de mortalidad del 13%, 16%, 30%, 40% y 70% para las concentraciones 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>8</sup> y 1 x 10<sup>9</sup> esporas/ml respectivamente. Fue notorio que la infección y posterior muerte de las larvas tratadas aumentó en proporción con la cantidad de esporas infectivas del inóculo aplicado. Explicación que concuerda con los estudios reali-

zados por Storey and Gardner (1988), Ferron (1978), Rodríguez y Fargues (1983), que confirmaron lo descrito anteriormente.

Al aplicar la prueba múltiple de Duncan, se encontró que los aislamientos Mt2, Bb cosmo y Bb4, no presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de mortalidad correspondientes al día 18, después de la inoculación de las larvas (Tabla 3). De igual manera sucedió cuando se comparó el porcentaje de mortalidad correspondiente a los aislamientos Bb cosmo, Bb4 y Bb10. En contraste, si presentaron diferencias significativas (P=0.05) entre el aislamiento Mt1 y el testigo con respecto a los demás aislamientos. El testigo presentó una media de mortalidad del 1.0%.

Al analizar los resultados obtenidos por el método estadístico Probit con grados de significancia de 0.95, se encontró para la cepa Bb cosmo una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 6.1 x 10<sup>7</sup> esporas/ml y una concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) de 1.1 x 10<sup>10</sup> esporas/ml. Para Mt1 éstos fueron 2.0 x 10<sup>7</sup> y 7.3 x 10<sup>9</sup> esporas/ml, respectivamente. Bb4 presentó una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 8.0 x 10<sup>7</sup> esporas/ml y una concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) de 3.9 x 10<sup>10</sup> esporas/ml. Mt2 presentó concentraciones letales de



**Figura 1.** Efecto biocontrolador de las diferentes concentraciones de los entomopatógenos seleccionados sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides*, determinado a los 18 días después de haber sido inoculadas con Bb cosmo, Mt 1, Bb 4, Mt 2 y Bb 10, respectivamente, en condiciones de laboratorio.

50 y 90 de  $4.9 \times 10^7$  y  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml respectivamente. Finalmente, Bb10 registró una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de  $8.8 \times 10^7$  esporas/ml y una concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) de  $4.3 \times 10^{10}$  esporas/ml.

Los límites de confianza para las concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) y para las concentraciones letales 90 (CL<sub>90</sub>), correspondientes a cada aislamiento, se encuentran en las Tablas 4 y 5.

Pruebas de patogenicidad de los hongos entomopatógenos sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en invernadero

La mortalidad de las larvas de *Ancognatha scarabaeoides* sometidas a los 18 tratamientos fue evaluada durante 21 días, período en el cual se llevaron a cabo tres registros después de aplicados los tratamientos. La mortalidad acumulada de cada uno de los registros fue evaluada estadísticamente por un análisis de varianza, encontrándose diferencias significativas entre aislamientos por concentraciones con respecto a la mortalidad de las larvas (Pr > F 0.0001) (Tabla 6).

De acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan, los promedios de mortalidad acumulada a los 21 días de aplicados los tratamientos se presentan en la Tabla 7. Encontrándose que los aislamientos Mt1 y Bb cosmo, no presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de mortalidad correspondientes al día 21, después de la inoculación de las larvas (Tabla 7). De igual manera sucedió cuando se comparó el porcentaje de mortalidad correspondiente a los aislamientos Bb cosmo, Mt2 y Bb4. Los aislamientos Mt2, Bb4 y Bb10 tampoco presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de mortalidad. Solamente el testigo presentó una diferencia altamente significativa en su porcentaje de mortalidad (2.8%) respecto de los demás aislamientos.

El mayor porcentaje de mortalidad de larvas lo presentó Mt1. Entre los factores que pudieron favorecer la efectividad de este tratamiento se pueden mencionar: la alta producción de metabolitos secundarios por parte del aislamiento, los cuales pudieron influir sobre la actividad insecticida, y a los cuales se les atribuyó la fuerte coloración y compactación de los granos de arroz donde se cultivó el aislamiento correspondiente a Mt1. (Sañudo y Castillo, 1994; Torres y López, 1997).

Las larvas que se encontraron muertas en el suelo fueron llevadas a cámaras húmedas, donde se observó el crecimiento de los entomopatógenos.

#### Conclusiones

- Se recolectaron a nivel de campo nueve aislamientos nativos de

hongos entomopatógenos, siete de ellos correspondientes a *Beauveria bassiana* y dos a *Metarhizium anisopliae*.

- En los medios de multiplicación masiva a base de trigo y arroz estériles, los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium ani-*

**Tabla 3.** Prueba múltiple de Duncan de los aislamientos estudiados a nivel de laboratorio.

Aislamientos	Medias (%) mortalidad	Diferencias
Mt 1	52.22	A
Mt 2	46.66	B
Bb cosmo	45.00	BC
Bb 4	45.00	BC
Bb 10	43.33	C
Testigo	1.00	D

Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas a nivel de P=0.05.

**Tabla 4.** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para los aislamientos Bb cosmo, Mt1, Bb4, Mt2 y Bb10.

Aislamientos	CL <sub>50</sub> (esporas/ml)	Límite inferior (esporas/ml)	Límite superior (esporas/ml)
Bb cosmo	$6.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$3.8 \times 10^8$
Mt 1	$2.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$
Bb 4	$8.0 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$7.3 \times 10^8$
Mt 2	$4.9 \times 10^7$	$7.9 \times 10^6$	$3.9 \times 10^8$
Bb 10	$8.8 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$8.2 \times 10^8$

**Tabla 5.** Concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) para los aislamientos Bb cosmo, Mt1, Bb4, Mt2 y Bb10.

Aislamientos	CL <sub>90</sub> (esporas/ml)	Límite inferior (esporas/ml)	Límite superior (esporas/ml)
Bb cosmo	$1.1 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^9$	$1.6 \times 10^{12}$
Mt 1	$7.3 \times 10^9$	$7.2 \times 10^8$	$2.0 \times 10^{12}$
Bb 4	$3.9 \times 10^{10}$	$2.7 \times 10^9$	$3.3 \times 10^{13}$
Mt 2	$2.2 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^9$	$1.4 \times 10^{13}$
Bb 10	$4.3 \times 10^{10}$	$2.9 \times 10^9$	$4.0 \times 10^{13}$

**Tabla 6.** Análisis de varianza para el promedio acumulado de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en pruebas de patogenicidad en el invernadero.

Fuente de variación	GL	CM	F	Pr > F
Cultivo	1	32.54 ns	0.95	0.3331
Aislamiento	5	3125.73***	91.17	0.0001
Concentración	1	10695.00***	311.95	0.0001
Cultivo x aislamiento	5	18.80 ns	0.55	0.7388
Cultivo x concentración	1	0.22 ns	0.01	0.9359
Aislamiento x concentración	5	391.20***	11.41	0.0001
Error	74	34.28		
C.V		16.48		
R <sup>2</sup>		0.91		

C.V = Coeficiente de variación.  
R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación múltiple.  
\*\*\* = P < .001  
ns = No significativo.

**Tabla 7.** Pruebas de comparación múltiple de Duncan cepa por concentración (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) para el promedio acumulado de mortalidad de larvas de *Ancognatha scarabaeoides* después de 21 días de aplicados los tratamientos en pruebas de patogenicidad en invernadero.

Concentración letal media (CL <sub>50</sub> )		
Aislamiento	Media de (%) mortalidad	Diferencias
Mt 1	36.50	A
Bb cosmo	23.00	B
Mt 2	21.00	B
Bb 4	19.00	B
Bb 10	16.50	B
Testigo	2.12	C

Concentración letal 90 (CL <sub>90</sub> )		
Aislamiento	Media de (%) mortalidad	Diferencias
Mt 1	76.00	A
Bb cosmo	67.50	BA
Mt 2	63.50	CB
Bb 4	59.00	CB
Bb 10	53.50	C
Testigo	2.87	D

Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas a nivel de P=0.05.

*sopliae* presentaron un buen crecimiento y alta esporulación.

- Los aislamientos que presentaron mayor actividad biocontroladora a nivel de laboratorio fueron los aislamientos Mt1, Mt2 y Bb cosmo, los cuales arrojaron porcentajes de mortalidad acumulada de 100% a la concentración de  $1 \times 10^{10}$  esporas/ml y porcentajes de 80% (Mt1) y 70% para Mt2 y Bb cosmo a la concentración de  $1 \times 10^9$  esporas/ml a los 18 días de aplicados los tratamientos.
- Las concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>) correspondientes al aislamiento Mt1 fueron de  $2.0 \times 10^7$  y  $7.3 \times 10^9$  esporas/ml; para el aislamiento Mt2 de  $4.9 \times 10^7$  y  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml, respectivamente. Finalmente, Bb cosmo presentó una CL<sub>50</sub> de  $6.1 \times 10^7$  y una CL<sub>90</sub> de  $1.1 \times 10^{10}$  esporas/ml.
- A nivel de invernadero, se obtuvieron porcentajes de mortalidad mayores de 50%: 76.00%, 67.50% y 63.50% para Mt1, Bb cosmo y Mt2, respectivamente.

#### AGRADECIMIENTOS

Al doctor Bernardo García y al ingeniero Luis Muñoz, por su apoyo en el desarrollo y revisión del componente estadístico.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Bustillo, A. 1984.** Microorganismos patogénicos a insectos: características y modo de acción. En: Seminario sobre patología de insectos. Medellín, Colombia. pp. 7-50.
- Evans, H.C. 1986.** Uso actual y potencial de los hongos entomopatógenos para el control biológico de artrópodos plagas. Misc. Soc. Ent. 21:9-14.
- Ferron, P. 1978.** Biological Control of Insects Pest by Entomogenous Fungi. Annual Review of Entomology 23:409-442.
- Ferron, P. 1967.** Etude en laboratoire des conditions ecologiques favorisant development de la mycose a *Beauveria tenella* du ver blanc. 12: 257-293.
- Fuertes, E.E. y Chamorro, J. J. 1994.** Control microbiano de la chisa *Ancognatha scarabaeoides* Burmeister con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Sorokin. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.
- González, M.T., Posada, F.F. y Bustillo, A.E. 1993.** Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Revista Colombiana de Entomología 19(4):123-130.
- Londoño, M. 1993.** Multiplicación artesanal de hongos entomopatógenos. En: Primer foro sobre sanidad vegetal. Memorias. Medellín, Colombia. 12 p.
- Londoño, M. E. y Pérez, M. 1994.** Reconocimiento de los enemigos naturales de la chisa o mojoyoy (Coleoptera: Scarabacidae) en el oriente antioqueño. Revista Colombiana de Entomología 20(3):199-206.
- López, J.C. 1994.** Efecto patogénico de cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill. (Hyphomycetes) sobre larvas de *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) en laboratorio. Revista Colombiana de Entomología 20(1):53-60.
- Peña, L.A., Bolaños, M.A., Yepes, B., Mena, J. y Enríquez, J. 2000.** Hongos entomopatógenos para el manejo del gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) de la papa. CORPOICA Regional N°5, Boletín Técnico N°15. San Juan de Pasto, Colombia. 15 p.
- Plan de Desarrollo de Nariño: "Nariño Vive" 2001.** Gobernación de Nariño. Edinar, San Juan de Pasto, Colombia, 154 p.
- Pumalpa, N. 1987.** Estudios biológicos y ecológicos de insectos plagas de trigo y cebada. Aspectos biológicos de las chisas. ICA. Informe de labores. Pasto, Colombia. pp. 188-197.
- Roberts, D. W. y Humbre, R. A. 1984.** Entomopathogenic fungi. In: Roberts, D. W. and James R. (eds.). Infection processes of fungi. Conference report. The Rockefeller Foundation.
- Rodríguez, D. A. y Fargues, J. 1983.** Ciclo de una enfermedad por micosis (*Hiphomycetes*) en insectos. SOCOLEN, Boletín de noticias N° 41. Colombia, 1 p.
- Ruiz, N. y Posada L. 1985.** Aspectos biológicos de las chisas en la Sabana de Bogotá. Revista Colombiana de Entomología 11(1):24-27.
- Salazar, J. C. y Salazar J. 1997.** Efecto patogénico de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre larvas de *Astaena* sp. bajo condiciones controladas. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.
- Samson, R.A., Evans, H.C., and Lateg, J.P. 1988.** Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin, 225 p.
- Sañudo, B. y Castillo, G. A. 1994.** Papel de los microorganismos en el control biológico de las plagas. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Sañudo, B. y Guzmán, G. 1995.** Experiencias en el manejo de chisas en Nariño. Labranza cero 5(1):1-7.
- Storey, K.G. and Gardner, A.W. 1988.** Movement of and aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soil. Environ. Entomol. 17:135-139.
- Torres H., Ortega A., Alcázar J., Ames T. y Palomino L. 1993.** Control biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria brongniartii*. CIP, Guía de investigación N° 8. Perú.
- Torres, R.Y. y López, A. 1997.** Estudios básicos sobre el control microbiológico del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. Revista Colombiana de Entomología 23 (1-2):83-88.
- Yépez, B. 1994.** Aspectos biológicos y manejo de chisas. En: Curso de actualización técnica del cultivo del trigo. Ipiales, Colombia. pp. 189-206.