

Efecto de las cepas nativas *Paecilomyces* sp. (Bainier) y *Lecanicillium* sp. (Zimm) en el control de *Carmenta foraseminis* Eichlin (Lepidoptera: Sesiidae) en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Effect of native strains *Paecilomyces* sp. (Bainier) and *Lecanicillium* sp. (Zimm) on the control of *Carmenta foraseminis* Eichlin (Lepidoptera: Sesiidae) on cocoa (*Theobroma cacao* L.) crops

Wilmer Figueroa Medina¹, Jesús Arturo Ramírez Sulvarán² y Alina Katil Sigarroa Rieche³

¹Joven investigador, Grupo de Investigación Ambiente y Vida (GIAV), Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Colciencias-UFPS. ^{2,3} Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Grupo de Investigación Ambiente y Vida (GIAV), Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS). Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.
Autor para correspondencia: wfm2611@hotmail.com

Rec.:20.01.12 Acep.: 17.12.13

Resumen

El pasador del fruto, *Carmenta foraseminis* Eichlin, es un insecto que ha acentuado su ataque en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en los últimos años en Norte de Santander (Colombia). El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de las cepas nativas Giav-3 *Paecilomyces* sp. y Giav-4 *Lecanicillium* sp. sobre larvas de *C. foraseminis*. Para el efecto, se realizaron aislamientos a partir de muestras de suelo recolectadas en el municipio de Tibú, Norte de Santander. Después de obtenidos los cultivos puros se procedió a la caracterización macroscópica y microscópica para la identificación del género de los aislados mediante claves taxonómicas. La infección fue realizada mediante inmersión de larvas en las suspensiones de los aislados en concentraciones de 0, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ conidios/ml. En ambos aislados se observó una tendencia lineal respecto a la mortalidad, la cual fue directamente proporcional a las concentraciones del inóculo. La CL₅₀ y CL₉₀ para Giav-3 fue de 10^{6.95} y 10^{8.70} conidios/ml y para Giav-4 de 10^{6.6} y 10^{8.04} conidios/ml, respectivamente. Lo cual indica que esta última requirió la menor concentración de inóculo para eliminar el 50% y 90% de la población tratada, lo que supone una mayor efectividad contra las larvas.

Palabras clave: Control ecológico, *Lecanicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Theobroma cacao*.

Abstract

The fruit borer, *Carmenta foraseminis* Eichlin, is an insect that has increased up its attack in cocoa (*Theobroma cacao* L.) in recent years in northern Santander, Colombia. The objective was to evaluate the pathogenicity of two native strains *Paecilomyces* sp. Giav-3 and *Lecanicillium* sp. Giav-4, on larvae of *C. foraseminis*. Isolations were made from soil samples collected in the municipality of Tibú, Northern Santander, Colombia. After obtaining pure cultures, macroscopic and microscopic characterization for gender identification of the strains using taxonomic keys was done. The evaluation was conducted by immersion of larvae in suspensions of the isolates at concentrations of 0, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ conidia/ml. For both strains there was a linear trend in mortality, which was directly proportional to the concentrations of the inoculum. The LC₅₀ and LC₉₀ for Giav-3 were 10^{6.95} and 10^{8.70} conidia/ml, and for Giav-4 was 10^{6.6} and 10^{8.04} conidia/ml, respectively. This indicates that Giav-4 required

the lowest concentration of inoculum to remove 50 to 90% of the treated population, indicating it is more effective against larvae.

Key words: Biological control, *Lecanicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Theobroma cacao*.

Introducción

En Colombia el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es la base y sustento de la economía de más de 35,000 familias. Norte de Santander registra una producción promedio anual de grano de 1756 t (Fedecacao, 2008). En esta región, en los últimos años se ha acentuado el ataque del pasador del fruto *Carmenta foraseminis* Eichlin (Lepidoptera: Sesiidae) (Eichlin, 1995). La hembra del insecto deposita los huevos en la superficie de los frutos; después de la eclosión las larvas perforan la corteza siguiendo la placenta, atrofia los granos y se alimenta de las semillas, al tiempo que deposita sus excrementos y facilita la pudrición interna (Delgado, 2004; Navarro *et al.*, 2004).

Actualmente para el combate de este insecto se utiliza un manejo cultural que consiste en disponer los frutos afectados en bolsas plásticas por espacio de 3 meses para asegurar la muerte de larvas y adultos, y evitar así la reinfestación del cultivo (Montes, 2010). El control etológico por medio de trampas con la feromona (Z, Z)-3,13-octadecadienol acetato, específica para la familia Sesiidae, no ha demostrado ser efectivo para atraer adultos de *C. foraseminis* (Mirelles, 2005). Aunque no existen estudios sobre control ecológico de esta plaga, Navarro y Cabaña (2006) recomiendan liberar entre 100,000 y 500,000 adultos por hectárea de avispas *Trichogramma pretiosum* (Riley).

Bajo el concepto de un manejo integrado de plagas (MIP), una alternativa es el uso de hongos entomopatógenos los cuales pueden propagarse en la población de insectos, constituyendo un grupo de gran interés para el control de plagas (Vergara, 2004). Aproximadamente el 80% de las enfermedades que atacan los insectos tienen como agente causante un hongo (Badii y Abreu, 2006). Estos presentan mecanismos de invasión únicos, que les permite atravesar la cutícula del insecto, actuando como agentes importantes de control en forma similar a los insecticidas de contacto (Téllez *et al.*, 2009). Se conocen

aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los más importantes se encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoopthera*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Monzón, 2001). Debido a la importancia del control ecológico mediante hongos entomopatógenos, el objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos con potencial para el control ecológico de *C. foraseminis* o pasador del fruto de cacao.

Materiales y métodos

Origen de los aislamientos

Los aislamientos *Paecilomyces* sp. y *Lecanicillium* sp. –denominados respectivamente Grupo de Investigación Ambiente y Vida -Giav-3 y Giav-4– utilizados en este estudio fueron obtenidos de muestras de suelo recolectadas en el municipio de Tibú (8° 39' N y 72° 59' O, a 75 m. s. n. m) departamento de Norte de Santander. Se recolectaron 10 muestras compuestas/ha, a una profundidad entre 10 y 15 cm de profundidad. De cada una de estas muestras se tomaron submuestras de 500 g que fueron conservadas en bolsas plásticas con cierre hermético debidamente identificadas por fecha, sitio y finca de recolección, antes de depositarlas a una temperatura de 4 °C para su transporte y conservación en laboratorio.

Identificación de las cepas

Los aislamientos y la identificación de las cepas de los hongos se realizó en el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente de la Universidad Francisco de Paula Santander. Para el efecto se utilizó el protocolo propuesto por Murcia y Salamanca (2006), con incubación a 28 °C, seguido de propagación en cultivos monospóricos para garantizar la autenticidad y pureza de la muestra.

Una vez se obtuvieron los cultivos puros se hizo la caracterización morfológica y la identificación de los aislamientos, de acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas de crecimiento utilizando las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Samson *et al.* (1981). Para la caracterización macroscópica se realizaron pases de los cultivos puros del hongo sobre medio agar papa dextrosa (PDA) más Cloranfenicol (1g/lt) y se incubaron a 28 °C. Ocho días después se registraron las características culturales de color de ambas caras de la colonia, borde y textura. Para la caracterización microscópica se utilizó una técnica de cultivo similar a la anterior, no obstante 5 días después se realizó tinción simple con azul de lactofenol y con la ayuda de un microscopio Olympus binocular (aumento 1000 X) se observó la morfología y disposición de los conidióforos y conidios (Rodríguez y Del Pozo, 2003).

Pruebas de patogenicidad

El inóculo se obtuvo a partir de los aislamientos cultivados sobre PDA e incubados a 28 °C hasta su esporulación. Las suspensiones fúngicas se prepararon con conidios recolectados en la superficie del cultivo, adicionando agua destilada estéril. Las concentraciones conidiales fueron determinadas en una cámara de Neubauer.

Para la prueba de patogenicidad se utilizaron larvas de último estadio de *C. foraseminis* obtenidas de frutos de cacao infestados que fueron desinfectadas superficialmente según el método usado por García *et al.* (2008) e inoculadas mediante inmersión en las suspensiones de los aislamientos Giav-3 y Giav-4 a concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 conidios/ml. Como testigo se utilizaron larvas tratadas en agua destilada estéril. Las larvas tratadas fueron transferidas a recipientes plásticos que contenían conchas de cacao con tratamiento térmico previo en agua a 100 °C por 30 min y semillas frescas para su alimentación. Las observaciones de mortalidad de larvas se hicieron diariamente durante 12 días. Para confirmar el agente causante, los insectos muertos fueron incubados en placas petri con papel absorbente humedecido en agua destilada estéril.

Se empleó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, consistente en tres concentraciones del inóculo por cada aislamiento, más el control con agua destilada estéril. La unidad experimental consistió en cinco larvas, para un total de 15 unidades experimentales por tratamiento. El número de larvas muertas fue registrado mediante observaciones diarias expresadas como porcentajes de mortalidad en el tiempo. Los resultados se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey, utilizando el paquete de diseños experimentales Statgraphics Centurion XV profesional marca registrada Stat Point, Inc. (2006). La curva sigmoidea de mortalidad se linearizó mediante transformación Probit y se calculó la concentración letal (CL) del 50% (CL₅₀) y 90% (CL₉₀) de la población a través de ecuaciones de regresión (Rodríguez *et al.*, 2006).

Resultados y discusión

Caracterización morfológica de los aislamientos

El aislamiento Giav-3 *Paecilomyces* sp. en medio PDA más Cloranfenicol (1g/lt), incubado a 28 °C durante 8 días presentó colonias de color rosado-grisáceo, aspecto pulverulento, bordes regulares, (Foto 1A) y reverso incoloro o con tono blancuzco; mientras que el aislamiento Giav-4 *Lecanicillium* sp. presentó color blancuzco a crema, borde irregular, aspecto algodonoso (Foto 1B) y reverso con pigmentación crema o amarillo-pálido. Estas características concuerdan con las descritas por Rodríguez y Del Pozo (2003) para los hongos entomopatógenos *P. fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, [= *Lecanicillium lecanii* (Zimm)] respectivamente. En las observaciones microscópicas realizadas a los 5 días de crecimiento a 28 °C, se observó que el aislamiento Giav-3 presentaba conidióforos erectos, ramificados en el ápice, fiálides ensanchadas en la base adelgazándose en el ápice, conidios en cadena (Foto 1C). Giav-4, por su parte, presentó conidióforos erectos alargados y ramificados, fiálides delgadas y alargadas, conidios alargados solitarios o en parejas (Foto 1D). Las

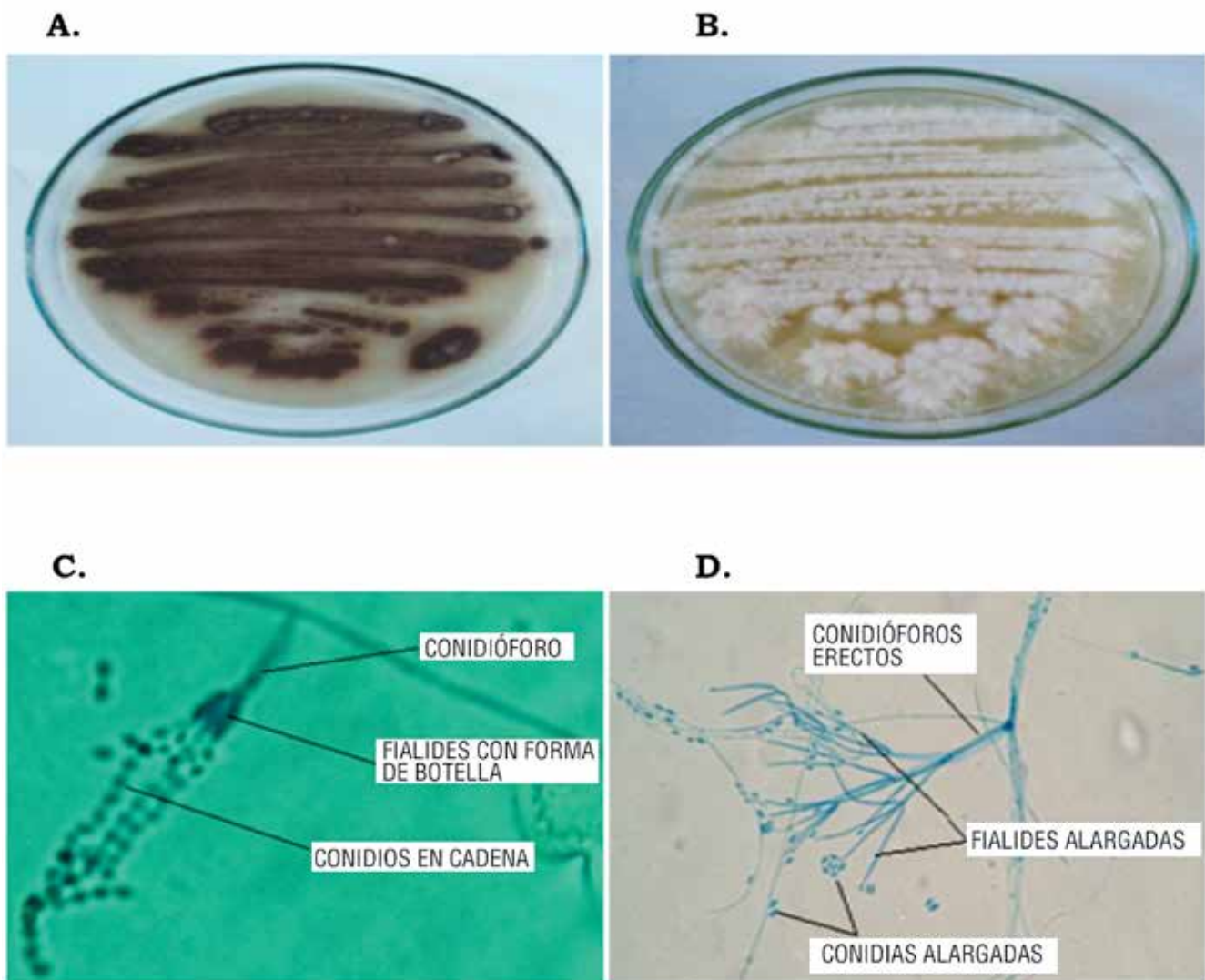


Foto 1. Características morfológicas de los aislados obtenidos del suelo. **A** = Colonias de *Paecilomyces* sp. **B** = Colonias de *Lecanicillium* sp. **C** = Microfotografía de estructuras de *Paecilomyces* sp. **D** = Microfotografía de estructuras de *Lecanicillium* sp.

características anteriores coinciden con las descritas por Barnett y Hunter (1972) y Samson *et al.* (1981) para los géneros *Lecanicillium* y *Paecilomyces*.

Patogenicidad

Las concentraciones de los aislamientos se compararon el día 7 después de la inoculación, que coincidió con una mortalidad de larvas > 90% por el primer aislamiento. De acuerdo con lo anterior, el aislamiento Giav-4 el día 7 post-inoculación presentó mortalidades de larvas de 93.33% con una concentración de 10^8 conidios/ml y de 53.33% cuando la concentración fue de 10^7 conidios/ml (Figura 1A). Por su parte, el aislamiento Giav-3 para el mismo día post-inoculación presentó

80% de mortalidad de larvas con una concentración de 10^8 conidios/ml y 46.66% con una concentración 10^7 conidios/ml (Figura 1B). Los individuos inoculados enfermos presentaban debilidad y desorientación, cambios de color, reducción en la alimentación, y manchas oscuras sobre el tegumento, que corresponden con esporas germinadas del hongo (Badii y Abreu, 2006).

Para el aislado Giav-3 no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre la concentración 10^6 conidios/ml vs. testigo, no obstante los tratamientos 10^7 y 10^8 conidios/ml mostraron los mayores índices de mortalidad – 46.66 y 80.00%, respectivamente– que fueron diferentes en relación con el testigo (Cuadro 1). Para el aislamiento Giav-4 se encontraron

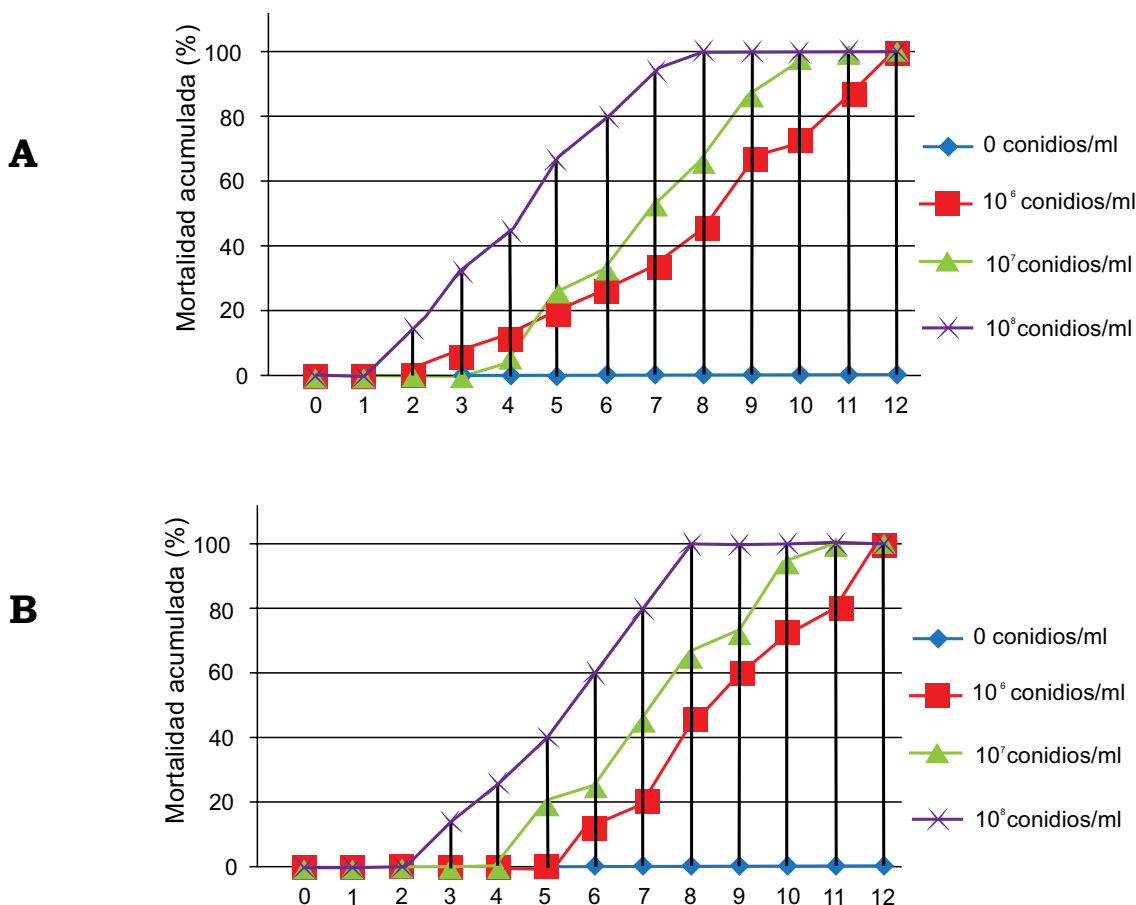


Figura 1. Curvas de mortalidad de larvas de *C. foraseminis*, inoculadas con distintas concentraciones de los aislamientos (A) Giav-4 *Lecanicillium* sp. y (B) Giav-3 *Paecilomyces* sp.

Cuadro 1. Prueba de comparación de medias de Tukey para los promedios de mortalidad de larvas de *C. foraseminis*, 7 días después de inoculadas con distintas concentraciones del aislado Giav-3 *Paecilomyces* sp.

Concentración	Casos (no.)	Media ^a	E.E.	Grupos homogéneos
0	3	0.00	7.45	a
10 ⁶	3	26.66	7.45	ab
10 ⁷	3	46.66	7.45	bc
10 ⁸	3	80.00	7.45	c

^a Medias seguidas de letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey, 0.05).
E.E. = Error estándar.

diferencias ($P < 0.05$) entre el testigo y los demás tratamientos; el tratamiento 10^8 conidios/ml con un promedio de mortalidad de 93.33% fue superior a los tratamientos 10^6 y 10^7 conidios/ml (Cuadro 2).

Con ambos aislados se observó una tendencia lineal en los porcentajes de mortalidad de larvas, la cual fue directamente proporcio-

nal a las concentraciones del inóculo. Realizada la transformación Probit, la ecuación de la recta para Giav-3 fue: $Y = -5.06681 + 0.728983x$ ($R^2 = 0.9917$) (Figura 2A) y para Giav-4 fue $Y = -5.97738 + 0.901844x$ ($R^2 = 0.9698$) (Figura 2B). Con estas ecuaciones se obtuvieron valores (conidios/ml) de CL₅₀ ($1 \times 10^{6.95}$) y CL₉₀ ($1 \times 10^{8.70}$) para los aislados

Cuadro 2. Prueba de comparación de medias de Tukey para los promedios de mortalidad de larvas de *C. foraseminis*, 7 días después de inoculadas con distintas concentraciones del aislado Giav-4 *Lecanicillium* sp.

Concentración	Casos (no.)	Media ^a	E.E.	Grupos homogéneos
0	3	0.00	5.77	a
10 ⁶	3	33.33	5.77	b
10 ⁷	3	53.33	5.77	b
10 ⁸	3	93.33	5.77	c

*Medias seguidas de letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey, 0.05).
E.E. = Error estándar.

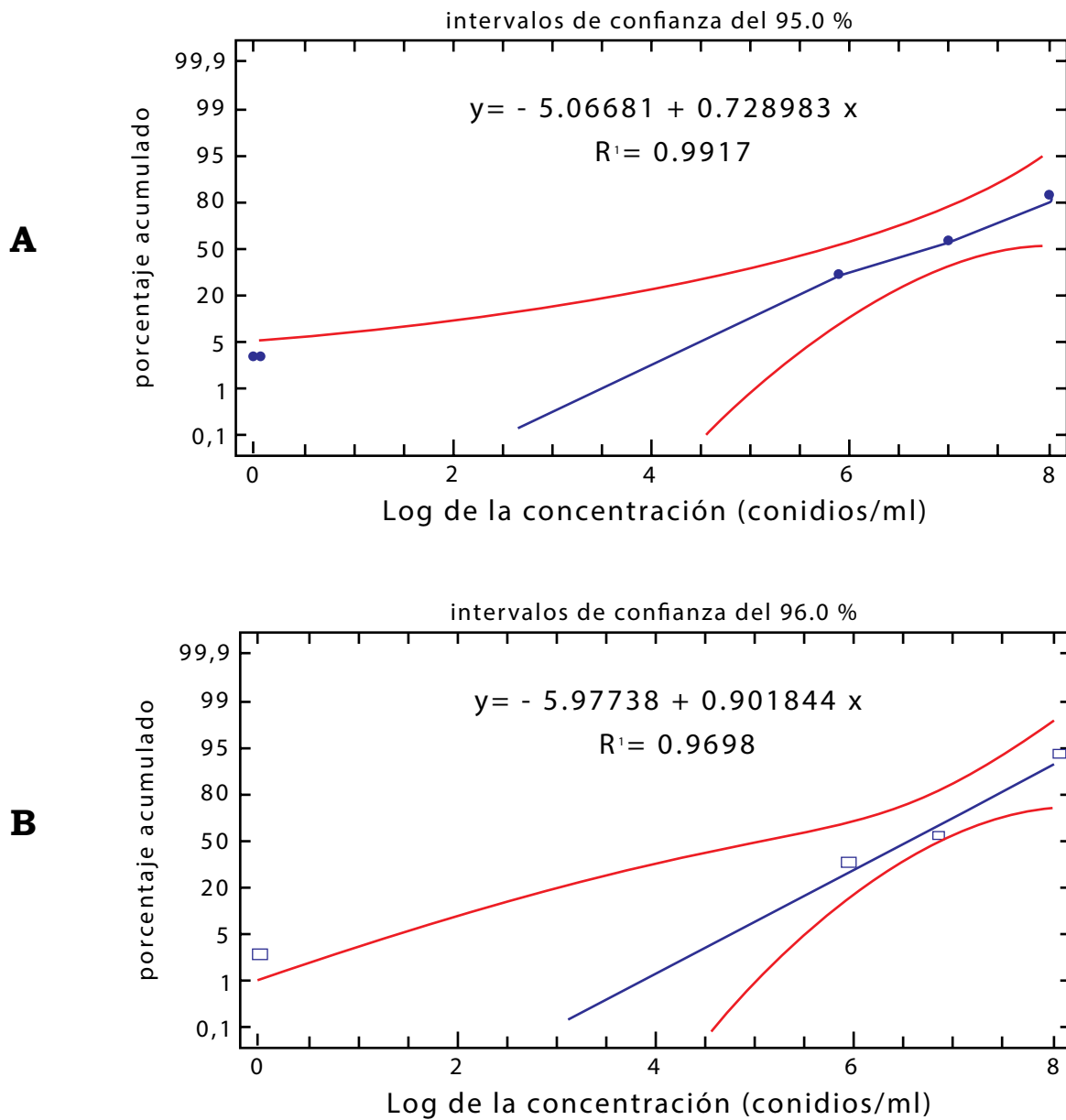


Figura 2. DL₅₀ y DL₉₀ calculada mediante linealización de las curvas de mortalidad de larvas de *C. foraseminis*, al día 7 post-inoculación con diferentes concentraciones de los aislados. **(A)** Giav 3-*Paecilomyces* sp., **(B)** Giav-4 *Lecanicillium* sp.

Giav-3 y de CL₅₀ (1 x 10^{6.6}) y CL₉₀ (1 x 10^{8.04}) para Giav-4. Lo cual indica que el aislamiento Giav-4 requirió la menor concentración de inóculo para eliminar 50% y 90% de la población tratada y por tanto presentó mayor efectividad contra las larvas.

Núñez *et al.* (2008) encontraron que el efecto de mortalidad de *L. lecanii* sobre el segundo estadio ninfal de *Aleurodicus cocois* (Curtis) fue mayor que el de *P. fumosoroseus* y que la mezcla de ambos hongos, lo que corrobora la alta efectividad entomopatogénica de *V. lecanii*. Otras especies de hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* requieren menor concentración de inóculo para eliminar el 50% y 90% de larvas de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en tomate, con valores de CL₅₀ y CL₉₀ de 1 x 10^{4.4} y 1 x 10^{7.6} conidios/ml, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2006). Los resultados del presente estudio muestran que en condiciones *in vitro* los aislados Giav-3 *Paecilomyces* sp. y Giav-4 *Lecanicillium* sp. son patogénicos para *C. foraseminis*, siendo más efectiva la cepa Giav-4.

Estos hallazgos son de importancia para un manejo integrado de la plaga, ya que ambas cepas resultaron ser virulentas a nivel *in vitro*, lo cual hace que potencialmente puedan ser incluidas como una estrategia de control biológico dentro de un manejo integrado de *C. foraseminis*; no obstante la efectividad en campo de esta estrategia deberá ser evaluada en posteriores trabajos.

Conclusiones

- Los aislados nativos Giav-3 *Paecilomyces* sp. y Giav-4 *Lecanicillium* sp. resultaron patogénicos para larvas de *C. foraseminis* de último estadio, en las cuales se observó que, a mayor concentración del hongo más alta es la mortalidad. El aislado Giav-4 *Lecanicillium* sp. requiere la menor concentración de inóculo para eliminar 50% o 90% de la población tratada, lo que indica su mayor efectividad contra las larvas.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó con financiamiento de la propuesta P-2010-0040 convocatoria No 510/10 del Programa Jóvenes In-

vestigadores e Innovadores Colciencias-UFPS para el Grupo de Investigación Ambiente y Vida (GIAV) de la Universidad Francisco de Paula Santander. Los autores agradecen al personal técnico de la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao) seccional Norte de Santander, y a la Ingeniera de Producción Biotecnológica, Ariadna Hazel Vergel.

Referencias

- Badii, M. H. y Abreu, J. L. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *Inter. J. Good Consc.* 1(1):82 - 89.
- Barnett, I. L. y Hunter, B. B. 1972. *Illustrated genera of Imperfect fungi*. 3ed. Burgess Publ. Co. Minnesota. 241 p.
- Delgado, N. 2004. Taxonomía de los perforadores (Lepidoptera: Sesiidae) del fruto del cacao (*Theobroma cacao*) en la región centro costera del estado Aragua. Univ. Central de Venezuela, Fac. Agronomía, Instituto de Zool. Agric. 98p.
- Eichlin, T. 1995. A new panamanian clearwing moth (Sesiidae: Sesiinae). *J. Lepitodterist's Soc.* 49(1):39 - 42.
- Fedecacao (Federacion Nacional de Cacaoteros). 2008. Guía técnica para el cultivo del cacao. Tercera edición. Bogotá D. C. p. 9 - 22.
- García, M.; Capello, S.; Leshner, J.; y Molina, R. 2008. Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. 4 p.
- Mirelles, B., I. A. 2005. Uso potencial de trampas con feromonas para el estudio de especies de Sesiidae (Lepidoptera) y sus efectos sobre la captura de la entomofauna asociada al cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Fac. Agron. Maracay, Venezuela.* 31:87 - 100.
- Montes, M. 2010. Método analítico para identificación taxonómica de *Carmentifora seminis*. Documento Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Norte de Santander, Colombia. 11 p.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). *Rev. Manejo Integrado de Plagas.* 63:95 - 103.
- Murcia, D. y Salamanca, M. 2006. Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de *Bephratelloides maculicollis* plaga de *Annona muricata* L. en algunos cultivos de los departamentos de Tolima y Cundinamarca. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C, Colombia. 79 p.

- Navarro, R.; Clavijo, J.; Vidal, R.; y Delgado, N. 2004. Nuevo insecto perforador del fruto del cacao de importancia económica en Venezuela. INIA Divulga 2:27 - 30.
- Navarro, R. y Cabaña, W. 2006. Control de insectos perforadores de la mazorca del cacao en la zona central de Venezuela. INIA Divulga. 7:19 - 26.
- Núñez, E.; Iannacone, J.; y Gómez, H. 2008. Effect of two entomopathogenic fungi in controlling *Aleurodicus cocois*(CURTIS, 1846) (Hemiptera: Aleyrodidae). Chilean J. Agric. Res. 68(1):21 - 30.
- Rodríguez, A. y Del pozo, E. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. Agroc. 7(2):71 - 78.
- Rodríguez, M.; Gerding, M.; y France, A. 2006. Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polillas del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). Chile. Agricultura Técnica 66(2):1 - 7.
- Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; y Van Oorschot, C. A. 1981. Introduction to food-borne fungi. Centraal Bureau VoorSchimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands, Academy of Arts and Sciences. 247 p.
- Statgraphics Centurion XV professional. 2006. Paquete de diseños experimentales. Marca registrada Stat Point, Inc. Maryland, Estados Unidos
- Téllez, A.; Cruz, M.; Mercado, Y.; Asaff, A.; y Arana, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. México. Rev. Mex. Micología 30:73 - 80.
- Vergara, R. R. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Octavo Seminario de Agroecología Agro-medicina y Medio Ambiente. Tunja 22 y 23 de Noviembre. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 34 p.