

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS POTENCIALES CONTROLADORES DE
Bephratelloides maculicollis PLAGA DE *Annona muricata* L. EN ALGUNOS
CULTIVOS DE LOS DEPARTAMENTOS DE TOLIMA Y CUNDINAMARCA.

DENYS ADRIANA MURCIA CHIBUQUE
MÓNICA FERNANDA SALAMANCA ROJAS

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D. C.
Julio 2006

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS POTENCIALES CONTROLADORES DE
Bephratelloides maculicollis PLAGA DE *Annona muricata* L. EN ALGUNOS
CULTIVOS DE LOS DEPARTAMENTOS DE TOLIMA Y CUNDINAMARCA.

DENYS ADRIANA MURCIA CHIBUQUE
MÓNICA FERNANDA SALAMANCA ROJAS

APROBADO

Amanda Varela Ramírez, PhD
Bióloga y Microbióloga
Directora

Edison Valencia
Jurado

Armando Angarita
Jurado

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS POTENCIALES CONTROLADORES DE
Bephratelloides maculicollis PLAGA DE *Annona muricata* L. EN ALGUNOS
CULTIVOS DE LOS DEPARTAMENTOS DE TOLIMA Y CUNDINAMARCA.

DENYS ADRIANA MURCIA CHIBUQUE
MÓNICA FERNANDA SALAMANCA ROJAS

APROBADO

Angela Umaña Muñoz, M. Phil.
Decana Académica

Luis David Gómez Méndez, M. Sc.
Director de Carrera

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	8
2.	MARCO TEORICO	10
2.1	Aspectos botánicos y fisiológicos de la guanábana	10
2.2	Insectos-plaga en frutales	12
2.3	<i>Bephratelloides maculicollis</i>	17
2.4	Generalidades control Biológico	18
2.5	Microorganismos agentes de control biologico	21
2.5.1	Generalidades de los hongos entomopatógenos	25
2.5.2	Bacterias	28
2.5.3	Parasitoides	31
3.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	33
3.1	Formulación del problema	33
3.2	Justificación	33
3.3	Pregunta de investigación	34
4.	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo General	35
4.2	Objetivos Específicos	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1	Diseño de la Investigación	36
5.1.1	Área de estudio	36
5.2	Fase de campo	36
5.2.1	Recolección de muestras	36
5.3	Fase de laboratorio	37
5.3.1	Procesamiento de muestras	37
5.3.2	Identificación de los aislamientos	40
5.3.3	Conservación	41
5.3.4.	Activación de las enzimas del hongo	41
5.3.5	Pruebas de patogenicidad de los microorganismos	
	Potenciales controladores sobre la avispa	41
5.3.5.1	Obtención de adultos de <i>B. maculicollis</i>	41
5.3.5.2	Establecimiento de insectos adultos en casa malla	41

5.3.5.3	Bioensayo	42
5.3.5.4	Toma de datos	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1.	Muestras analizadas	45
6.2.	Caracterización morfológica de la cepa <i>Paecilomyces lilacinus</i>	49
6.3.	Parasitoides encontrados en el estudio	55
7.	CONCLUSIONES	59
8.	RECOMENDACIONES	60
9.	REFERENCIAS	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida y duración de los estados de desarrollo de <i>B. maculicollis</i>	14
Figura 2. Diferencias entre la hembra y el macho de <i>B. maculicollis</i>	16
Figura 3. Control físico-mecánico con bolsas plásticas de polietileno para evitar oviposición del insecto.	18
Figura 4. Cámaras de emergencia utilizadas para la captura de los insectos	39
Figura 5. Casamalla para el cautiverio de <i>B. maculicollis</i> en el ensayo experimental	42
Figura 6. Cámara húmeda para verificar la acción del hongo sobre la avispa por su crecimiento	44
Figura 7. Distribución en porcentaje de bacterias analizadas de las muestras de suelo y hojarasca en Agar Tripticasa de soya y Agar nutritivo.	45
Figura 8. Porcentaje de los grupos bacterianos obtenidos de las muestras de suelo y hojarasca en las fincas muestreadas	46
Figura 9. Distribución en porcentaje de hongos analizados de las muestras de suelo, hojarasca e insectos muertos, en Agar Extracto de malta y Agar papa dextrosa	47
Figura 10. Proporción de los géneros de hongos obtenidos de las muestras de suelo y hojarasca en cultivos de	

guanábana de los municipios Carmen de Apicalá y Mesitas del Colegio	48
Figura 11. Morfología de <i>P. lilacinus</i> a. morfología macroscópica del anverso de <i>Paecilomyces lilacinus</i> . b. Morfología macroscópica del reverso de <i>Paecilomyces lilacinus</i> en medio salvado de trigo quitina, a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 días.	49
Figura 12. Morfología microscópica de <i>Paecilomyces lilacinus</i> con azul de lactofenol con un aumento de 40X.	50
Figura 13. Efecto biocontrolador en condiciones confinadas en campo sobre adultos de <i>B. maculicollis</i> de la cepa <i>P. lilacinus</i> , con base en el porcentaje de mortalidad corregida Abbot a los 6 días y a $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$.	52
Figura 14. <i>B. maculicollis</i> colonizada por el hongo <i>P. lilacinus</i> en cámara húmeda a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 8 días	54
Figura 15. Familia: Evaniidae, Suborden Apocrita encontrados en cámaras de emergencia	56
Figura 16. Familia: Proctotrupidae Superfamilia Proctotrupoidea encontrados en cámaras de emergencia	57
Figura 17. Familia: Branconidae Superfamilia Ichneumonoidea encontrados en cámaras de emergencia	58

RESUMEN

Una de las plagas más limitantes del cultivo de la guanábana (*Annona muricata*) es *Bephratelloides maculicollis* (perforador del fruto) que ataca el fruto causando daño mecánico, favoreciendo el crecimiento de hongos, lo que contribuye al deterioro de la fruta y por lo tanto al rechazo comercial y a pérdidas económicas. En el presente trabajo se realizó la búsqueda de agentes potenciales de control microbiológico en suelo, material vegetal e insectos muertos de *B. maculicollis* en dos fincas productoras de guanábana ubicadas en los departamentos de Tolima y Cundinamarca. La selección de las fincas se realizó con base en el conocimiento previo que se tenía de los dueños, la producción de guanábana y a la incidencia de la avispa *B. maculicollis* en el cultivo. En cada finca se recolectaron cinco muestras compuestas de suelo, diez muestras de material vegetal dentro del cultivo y muestras de insectos. Estas muestras fueron sembradas por el método de dilución en placa en medios de cultivo: Agar Tripticasa Soya y Agar Nutritivo y se incubó a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ de 24 a 48 horas para bacterias y Agar Extracto de Malta y Rosa de Bengala, incubándose a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por 5 a 7 días para hongos. Dentro de los microorganismos aislados se encontraron bacterias de tipo bacilo, esporulados, en suelo y hojarasca en un 2% respecto al total de bacterias encontradas, pero no se utilizaron en el bioensayo porque lo ideal para controlar a *B. maculicollis* es impedir que ovipositará en el fruto y las bacterias entomopatógenas invaden a sus hospederos al ser ingeridas. Se encontraron insectos Hymenoptera pertenecientes a las familias: Aulacidae, Proctotrupidae, y Braconidae, que pueden ser posibles parasitoides controladores de *B. maculicollis*. En las muestras analizadas se encontraron 10 géneros diferentes de hongos no entomopatógenos, de los cuales los más comunes fueron: *Penicillium* 19%, *Trichoderma* 16%, *Aspergillus* 10% y *Fusarium* 7%. Se determinó una especie de hongo con reconocido potencial entomopatógeno, aislado a partir de muestras de suelo del cultivo de guanábana, representando el 1% de los aislamientos, determinado como *Paecilomyces lilacinus* el cual se conservó en agua destilada estéril. Posteriormente se realizó un bioensayo bajo condiciones controladas de temperatura de $25\text{-}28^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 60-80%, para determinar la capacidad de control del hongo hacia *B. maculicollis*, utilizando dos concentraciones dentro del mismo orden de magnitud ($3,3 \times 10^7$ conidios/ml y $6,4 \times 10^7$ conidios/ml). De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó la concentración de $6,4 \times 10^7$ conidios/ml como la adecuada para ser utilizada en el control de *B. maculicollis*, ya que provocó una mortalidad del 100% en 4 días. El resultado de la colonización de la cepa *P. lilacinus* sobre las avispas se evidenció con la aparición del micelio el cual al ser colocado en condiciones de cámara húmeda a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, esporuló a los 8 días sobre los cadáveres de *B. maculicollis* adquiriendo un aspecto pulverulento. Este es el primer registro de un microorganismo entomopatógeno de *B. maculicollis* lo cual se constituye en un hallazgo importante para el control de esta plaga. Debido a que en el país no se cuenta con un producto registrado a base de hongos entomopatógenos para el control de *B. maculicollis* y dado que *P. lilacinus* es un microorganismo que se encontró en campo, se propone el estudio y realización de ensayos en campo para la formulación de este hongo, con el fin de reducir los costos y el impacto ambiental negativo generado por el control con productos químicos y bolsas que se realiza actualmente de esta plaga.

ABSTRACT

One of the most limiting pests of the Soursop crop (*Annona muricata*) is the fruit borer *Bephratelloides maculicollis*, which attacks the fruit, causing a mechanical damage, favoring the growth of fungi, thus contributing to the deterioration of the fruit as well as to the commercial rejection and serious economic losses. In the present work the search for potential Microbial Biological Control Agents was performed in soil, plant material and dead insects corresponding to *B. maculicollis* in two sour sop production farms located in the Departments of Tolima and Cundinamarca. The selection of the farm was made based on the previous knowledge about the owners, the sour sop crop production and the incidence of the wasp *B. maculicollis* in the crop. In each farm five samples composed of soil were collected, ten samples composed of plant material and additionally, insect samples. These samples were transferred by means of the method of plate dilution in the following culture media: agar-triptone-soy and nutritive agar. The samples were incubated at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, between 24 and 48 hours for bacteria. In contrast, Agar-Malt extract and Rose Bengal Agar were used for fungi, with incubation at the same temperature between five to seven days for fungi. Among the isolated microorganisms were found spore-forming bacteria in soil and plant debris in a 2% in respect to the total of bacteria found. However, these bacteria were not used in the bioassay, because the ideal situation to control *B. maculicollis* is to avoid its oviposition onto the fruits; but entomopathogenic bacteria normally invade their hosts by means of ingestion. Hymenopteran insects belonging to the families Aulacidae, Proctotrupidae and Braconidae were found, which might be possible parasitoid biocontrol agents against *B. maculicollis*. In the analyzed samples, 10 different genera of non-entomopathogenic fungi were found, from which the most common ones were: *Penicillium* (19%), *Trichoderma* (16%), *Aspergillus* (10%) and *Fusarium* (7%). One species of fungus with recognized entomopathogenic potential was determined, isolated from soil samples from the soursop crop, representing the 1% of the isolates. This fungus was identified as *Paecilomyces lilacinus*, which was maintained in sterile-distilled water. Later on, a bioassay under controlled temperature conditions was performed, with a range between 25 and 28 °C and a Relative Humidity between 60% and 80% to determine the capacity of the fungus to control *B. maculicollis*. In this case, two concentrations were used within the same magnitude order, corresponding to $3,3 \times 10^7$ conidia/ml and $6,4 \times 10^7$ conidia/ml. According to the results obtained, the concentration of $6,4 \times 10^7$ conidia/ml was selected as the best one to be used in the control of *B. maculicollis*, since this concentration was able to produce a mortality of 100% in four days. The result of the colonization of this strain of *P. lilacinus* on the wasp, was expressed as a mycelial growth, which once placed under wet chamber conditions at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, was able to sporulate at 8 days after the inoculation on the *B. maculicollis* cadavers, acquiring a dust aspect. We propose the study and performance of field trials for the development and formulation of this fungus, aimed to the reduction of costs and negative environmental impact generated by the non-rational control with chemical insecticides, due to the fact that in our country there is not available a registered product based on entomopathogenic fungi for the control of *B. maculicollis*.

1. INTRODUCCIÓN

El guanábano *Annona muricata* L. es un árbol tropical de gran potencial económico gracias a las ventajas comparativas para su producción en algunas regiones del país (Escobar y Sánchez 2000). En Colombia esta especie ha presentado una gran demanda a nivel nacional. Las propiedades alimenticias que tiene la guanábana hacen que se comercialice en fresco o que se utilice en la fabricación de bebidas, mermeladas, néctares y otras conservas (Guzmán 1997).

En Colombia los cultivos de guanábana están siendo afectados por plagas de diferente índole, que los atacan ocasionando graves daños al nivel del fruto, lo que genera grandes pérdidas económicas (Escobar y Sánchez 2000). Una de las plagas más limitantes de los cultivos de guanábana es la avispa *Bephratelloides maculicollis* (perforador del fruto). Esta plaga además de causar daño mecánico favorece el crecimiento de hongos en las lesiones dejadas, las cuales deterioran la fruta. Esto conlleva a un rechazo comercial y por tanto a pérdidas económicas, si se tiene en cuenta su amplia distribución en las zonas productoras y el costo que implica su control (Escobar 1992).

Los agricultores, por la falta de información se han visto en la necesidad de utilizar diferentes métodos de protección contra esta plaga, como el uso de bolsas plásticas de polietileno desde los primeros estados de desarrollo del fruto (Corporación Colombiana Internacional 1999) y la aplicación de plaguicidas, frecuentemente de forma inadecuada y excesiva, lo cual ha representado severos daños en el ambiente y ha incrementado los costos de producción. También han utilizado en forma exagerada e inadecuada los plaguicidas, aumentando la contaminación del suelo, agua, frutos y produciendo alteraciones en las poblaciones de sus enemigos naturales. Por estas razones se buscan actualmente alternativas para contrarrestar dichos efectos negativos. El control de la plaga es difícil debido a que el tamaño de los huevos es muy reducido y porque el sitio donde son colocados dificulta su observación. Otro factor es que la avispa deposita los huevos cuando el fruto es muy pequeño y se va desarrollando protegido por éste (Arbeláez 2002).

Adicionalmente, otro inconveniente es el largo tiempo de maduración de la guanábana (355 días aproximadamente) (Arbeláez 2002), por lo cual los recolectores sólo se dan cuenta que el fruto ha sido dañado por la plaga cuando se observa el orificio de salida de la avispa.

Para lograr un equilibrio biológico en las poblaciones de insectos que se convierten en plaga por la falta de enemigos naturales que controlen sus poblaciones o porque sus controladores naturales se han visto reducidos o eliminados por prácticas antrópicas, es importante para su control el reconocimiento previo de los patógenos existentes bajo condiciones naturales, en las poblaciones donde se encuentra la incidencia de estos insectos plaga (Rodríguez 1984).

El control biológico de esta plaga sería una buena opción, pero el primer paso implica el aislamiento y reconocimiento de enemigos naturales y agentes entomopatógenos que potencialmente la puedan controlar. Debido a la ausencia de información acerca de microorganismos que puedan servir para el control de la avispa el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de potenciales agentes controladores que puedan contribuir a disminuir las poblaciones de *B. maculicollis*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos botánicos y fisiológicos de la guanábana:

La guanábana es una fruta netamente tropical, tanto en las Antillas como en diversos puntos de la Amazonía, por lo que el centro de origen puede ser compartido entre varios lugares (Flores 1995).

Las características del suelo apropiadas para el cultivo de la guanábana son: textura media, franco o limo-arcillosa-arenosa de fácil laboreo, buen drenaje para una mayor porosidad y buen contenido de nutrimentos. Se adapta bien en altitudes desde 500 hasta 1250 m.s.n.m., rango en el cual se obtiene un desarrollo adecuado, alta productividad y buena calidad. La guanábana es la anonácea comestible menos resistente al frío y requiere una temperatura entre los 25 y 33°C (Fourque 1992).

El guanábano se comporta muy bien en gran variedad de suelos, aunque su productividad no sea la misma en cada uno de ellos. Como en todos los cultivos, los suelos francos son los que brindan la mejor posibilidad de desarrollo; sin embargo, son pocos los suelos que presentan estas características. El suelo franco arcilloso tiene por lo general buena fertilidad y buena retención de líquidos; se debe manejar el drenaje y la buena aireación del suelo, de lo contrario se favorece el desarrollo de enfermedades (Corporación Colombiana Internacional 1999).

Como el follaje del guanábano es amplio con tendencia a la elongación, los árboles se deben sembrar a distancias que permitan el mayor aprovechamiento de la radiación solar en toda el área foliar, para favorecer la fotosíntesis y la formación de sustancias orgánicas (Flores 1995).

El porcentaje de polinización y fecundación se incrementa cuando la humedad relativa es superior al 80% (Guzmán 1988). Sin embargo, cuando dicha humedad es alta (por encima del 85 %), se favorece la presencia de enfermedades epidémicas, especialmente la antracnosis, la cual limita la producción de este frutal (Zárate 1981).

La guanábana es una planta arbustiva que mide de 5 a 8 m de altura, tiene hojas elípticas, de color verde oscuro, flores que crecen sobre ramas y tallos y son hermafroditas. Frutos carnosos generalmente acorazonados, de sabor agradable que pueden pesar hasta 8 Kg (Ramírez *et al.* 1998, Miranda *et al.* 1996)

El desarrollo comercial del cultivo de guanábana en nuestro país se inició en la década de los 80 con cultivos tecnificados principalmente en el Tolima, Valle del Cauca, Huila y Cundinamarca (Ramírez 1998, Miranda *et al.* 1996).

Se puede definir la época de cosecha principalmente para dos zonas del país. Para la zona central Andina donde presenta épocas de recolección entre diciembre y marzo y entre junio y agosto. Para el Caribe y los Llanos Orientales se presenta entre noviembre y marzo (Corporación Colombiana Internacional 1999).

La clasificación taxonómica de la guanábana es (Escobar y Sánchez 2000, Guzmán 1997):

Reino: Vegetal

Subreino: Embryophyta

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiosperma o latifoliada

Clase: Dicotiledonea

Subclase: Archylamudeae

Orden: Ranales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *muricata* L.

Sinonimia: *Annona bomplandiana* H.B.K.

Annona cearensis Barb.Rodr.

Annona macrocarpa Werkl.

Guanabanus muricata Gómez

Nombres comunes: guanábana (Perú, Ecuador y Colombia); graviola, coração de rainha (Brasil); catoche, catuche (Venezuela); soursop (inglés) (Escobar y Sánchez 2000).

2.2. Insectos- plaga en frutales

En diversos países existen organismos nocivos que afectan frutales como anón, chirimoya y guanábana. Estos constituyen una limitante de importancia económica por cuanto afectan la producción al disminuir la calidad y productividad de los frutos, al atacar prácticamente todas las estructuras de la planta. Pero hay grupos especializados como los que afectan los frutos para los cuales el cultivador debe tener consideraciones especiales (Vergara 1991).

Las especies de insectos de los frutales son clasificadas bien sea por su importancia económica, sus hábitos alimenticios, por su ubicación taxonómica, por el grupo que representan (barrenadores, chupadores etc.) o de conformidad con otros aspectos que en ocasiones obedecen más a observaciones elementales que a un riguroso análisis científico (Vergara 1991).

Varios de los insectos que afectan el fruto del guanábano son chinches, polillas, cucarrones, avispas e incluso abejas. Cualquiera de estos se puede convertir en un problema serio desde el punto de vista fitosanitario. Dentro de este grupo de plagas, los perforadores del fruto son considerados los de mayor importancia y se conocen los insectos del orden Homoptera, entre ellos la cochinilla *Saissetia coffeae* y *Phylephedra* sp. de la familia Diaspididae, la mosca algodonosa *Aleurodicus giganteus*, de la familia Aleyrodidae y *Bephratelloides maculicollis*, himenóptero de

la familia Eurytomidae, también conocido como perforador de las anonáceas (Escobar y Sánchez 2000).

Estos insectos perforan los frutos, consumen la pulpa y su daño se constituye en la puerta de entrada de otros patógenos causantes de enfermedades. Teniendo en cuenta que las plagas más importantes son los perforadores del fruto, se destacan sus características, su taxonomía, su ciclo de vida, su ubicación geográfica, sus hábitos y el daño que representan para realizar así en detalle su control (Escobar y Sánchez 2000).

Dentro de los insectos más importantes, causantes de daño en los frutos se encuentra *B. maculicollis*, perforador del fruto o barrenador de la semilla del guanábano. Este además de causar daño mecánico permite que por las lesiones hechas se introduzcan hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* que produce antracnosis del fruto o pudrición seca, *Fusarium coeruleum* que genera momificación y pérdida de los frutos. En casos menos graves producen la maduración desuniforme en los mismos y *Rhizopus stolonifer* produce la pudrición parda que se presenta como lesiones o manchas pardo-verdosas que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Estas enfermedades entran al fruto por las galerías de salida que deja el insecto adulto, contribuyendo al deterioro de la fruta y por lo tanto a su rechazo comercial (Zárate 1987, Escobar y Sánchez 2000).

En Colombia el uso combinado de insecticidas y fungicidas químicos para el control de insectos plaga ha sido una opción para el manejo de enfermedades en cultivos, los cuales se han utilizado para evaluar la compatibilidad con hongos entomopatógenos. Estudios recientes han mostrado que el Furadan (insecticida), Manzate (fungicida) y Malathion (insecticida) causan una reducción de crecimiento de hongos como *Beauveria bassiana* en un porcentaje de 29%, 39% y 26%, respectivamente, con el fin de establecer la viabilidad para ser incorporados en programas de manejo integrado de plagas. No se han realizado trabajos de compatibilidad con *P.lilacinus* pero se podría suponer que respondería de la misma manera que *Beauveria bassiana*; sin embargo es necesario realizar este tipo de evaluaciones (Ibarra y Varela 2002).

La clasificación taxonómica de *B. maculicollis* es (Amaya y Roldán 1992):

Orden: Hymenoptera

Familia: Eurytomidae

Género: *Bephratelloides*

Especie: *maculicollis*

B. maculicollis oviposita en la semilla de frutos jóvenes (a partir de erizos de 3 cm de largo), hasta cuando ocurren cambios en la consistencia de la semilla o esta no puede ser alcanzada por el ovipositor, el cual mide $1,3 \pm 0,20$ cm (Veloza 1991).

En el ciclo de vida el adulto coloca los huevos bajo la corteza de los frutos y la larva recién eclosionada hace galerías en la pulpa en busca de las semillas que prefieren como alimento. Generalmente empupan en el interior de las semillas pero también pueden hacerlo fuera de estas. Cuando el adulto emerge se alimenta de la pulpa de la semilla ayudado por sus mandíbulas, dejando en el exterior de los frutos una perforación pequeña y regular de 2 a 3 mm de diámetro, lo cual caracteriza el síntoma del ataque de este insecto (Nuñez y Dela Cruz 1982, Escobar y Sánchez 2000).

Veloza (1991) encontró sincronización entre la emergencia del adulto y la maduración del fruto y consideró que el ciclo de vida del insecto desde huevo a emergencia del adulto, dura entre 100-114 días, distribuidos así: de huevo a larva 28-32 días, de larva a pupa 56-60 días y de pupa a la emergencia del adulto 26-28 días, siendo el estado de larva el que mayor tiempo ocupa y el período en el que el fruto llega a madurez de cosecha a partir de erizo es aproximadamente de 120 días (Figura 1).

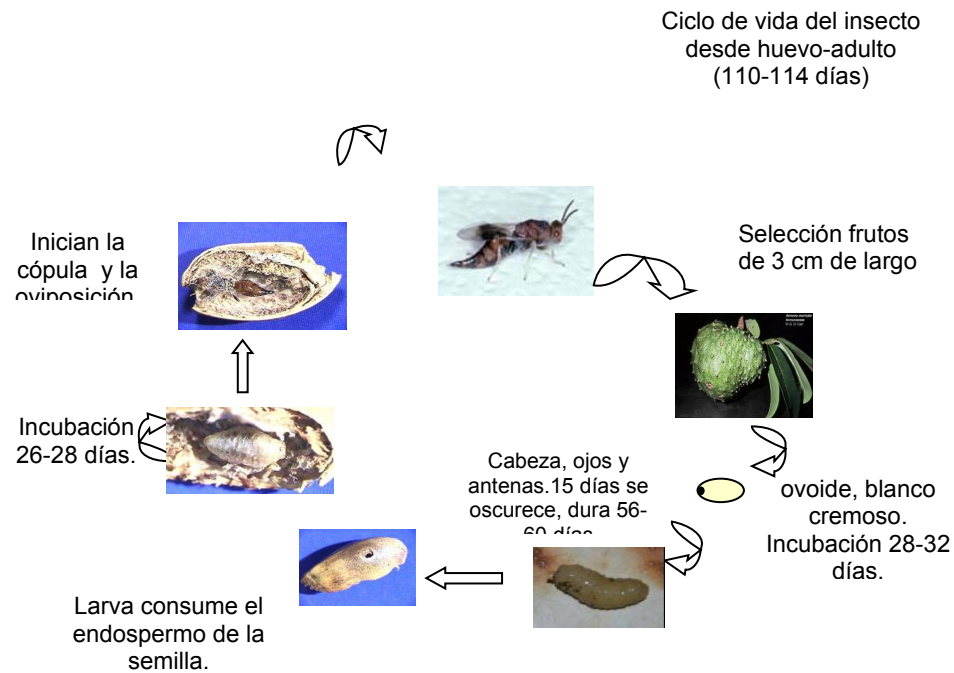


Figura 1. Ciclo de vida y duración de los estados de desarrollo de *B. maculicollis*.

Dentro del ciclo de vida de la avispa el huevo es colocado en forma individual dentro de la semilla, tiene forma ovoide, mide 0,7 mm sin apéndices, alcanzando una longitud total de 3,5 mm, es de color blanco cremoso con un punto oscuro notorio que corresponde a la cabeza de la larva y que sirve para definir la posición de la misma (Vergara 1991). Está provisto de dos pequeños apéndices a manera de cilios (pedicelos). En la parte anterior es más corto y mide 0,1 mm y el de la parte posterior es más largo dispuesto a manera de espiral con septas, su longitud es de 2,7 mm aproximadamente (Nadel y Peña 1991; Vergara 1991).

Las larvas carecen de patas torácicas o verdaderas, así como de las abdominales o pseudopatas (ápoda); tienen forma de huso, es decir, de tipo himenopteriforme; de color blanco hialino en los primeros instares, posee fuertes mandíbulas, opuestas y presenta color café oscuro. Cuando alcanza 5,5 mm de largo (27 días luego de la eclosión), la superficie se vuelve lisa, tomando un color blanco homogéneo. En este período ha consumido completamente el endospermo de la semilla, su color cambia

de color blanco a crema. En la parte posterior de la semilla se acumulan los restos de mudas y excrementos de la larva (Nadel y Peña 1991, Escobar y Sánchez 2000, Vergara 1991).

La pupa es pequeña y de tipo exarata. Se desarrolla normalmente dentro de la semilla sin formar cámara pupal. Inicialmente es del mismo color de la larva, blanco cremoso, donde se puede observar cabeza, ojos y antenas. En el tórax se aprecian las patas y alas pegadas al cuerpo y posteriormente cerca de los 15 días se oscurece a medida que se acerca al estado adulto, tomando un color café oscuro, momento en el cual pueden diferenciar perfectamente entre hembra y macho. La duración de este estado es en promedio de 27 días. Como característica principal la cabeza de la pupa siempre está orientada hacia el extremo distal (Nadel y Peña 1991, Reyes 1967, Escobar y Sánchez 2000, Vergara 1991).

La hembra adulta es diferente al macho, pues aquella es de color café oscuro y brillante, salpicada de manchas amarillas en la cabeza, tórax y abdomen; el macho es amarillo oscuro casi mostaza y brillante. Además la hembra es más grande que el macho; esta mide cerca de 10 mm y posee el abdomen pedunculado grueso, terminado en punta, donde guarda un oviscapto de gran longitud, que excede el largo de las alas. El macho en cambio tiene el abdomen pedunculado pero truncado en su extremo apical y con una longitud igual a la de sus alas y mide de 5-7 mm. También se reconocen otras diferencias en el cuerpo: la longitud de las antenas en los machos, ya que son más largas y delgadas, articuladas solamente en ocho segmentos con abundantes pubescencias; la hembra posee antenas más cortas y gruesas pero con mayor número de segmentos (nueve en total), el tipo de antenas es geniculado; alas transparentes con tonos amarillentos hacia el borde tanto en hembras como en machos, los ojos son grandes y cuenta con un aparato bucal masticador fuerte y bien desarrollado que le permite al adulto salir al exterior de la semilla una vez que se cumple el ciclo (Escandón *et al.* 1982, Nuñez 1980, Reyes 1967, Vergara 1991) (Figura 2).



Hembra



Macho

Foto tomada por Armando Angarita

Figura 2. Diferencias entre la hembra y el macho de *Bephratelloides maculicollis*

A los pocos minutos de emerger los adultos se inicia la cópula, y pocas horas después se inicia la oviposición, para lo cual hembra se eleva y encurva el prominente abdomen, saca su oviscapto y punza varias veces el pericarpio hasta lograr introducirlo e inyectar el huevo (Nadel y Peña 1991, Posada 1989).

El proceso de oviposición conlleva varias etapas: selección, aceptación del sitio, penetración, oviposición del huevo y, posiblemente marcaje, ya que no se ha encontrado más de un huevo por semilla y sí se ha observado más de una hembra ovipositando en un mismo fruto. El proceso descrito puede durar de 70-90 segundos por sitio (Nadel y Peña 1991).

El nivel de daño causado por este insecto puede alcanzar más del 50% de los frutos. Algunas veces un daño más leve en los frutos permite aprovechar parte de la pulpa. El daño es ocasionado por las larvas y los adultos que según Posada (1989), mastican semillas y frutos. Como consecuencia del ataque los frutos se pasman.

2.3. ***Bephratelloides maculicollis***

Se le conoce también como avispita del fruto o perforador del fruto y de las semillas (Zárate 1981). *B. maculicollis* se ha reportado en México, Costa Rica, Venezuela, Brasil, Perú, Chile y Colombia atacando las diferentes especies de Anonáceas excepto *Annona squamosa*.

En Venezuela, en el estado de Zulia, se han hecho importantes trabajos sobre las plagas asociadas con el cultivo de guanábana, destacándose como de gran importancia económica *B. maculicollis* y *Cercanota annonella* (Cantillo y rueda 1986). En Colombia el primer reporte se hizo en 1937 en los departamentos de Caldas y Antioquia; posteriormente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Santander, Tolima, Valle del Cauca y Cauca. Actualmente se encuentra en todas las zonas productoras de Anonáceas (Miranda 1995).

Hoy en día en Colombia se viene manejando *B. maculicollis* utilizando el control físico-mecánico mediante la protección de los frutos con bolsas plásticas de polietileno para evitar la oviposición del insecto, aunque estas bolsas al no ser biodegradables se convierten en un problema para el ambiente además de contribuir al deterioro del fruto, al crear un microclima favorable para hongos fitopatógenos (Figura 3).



Foto tomada por Denys Murcia y Mónica Salamanca

Figura 3. Control físico-mecánico con bolsas plásticas de polietileno para evitar oviposición del insecto.

Otra forma de manejo y control que se ha hecho tradicionalmente para los perforadores es la de hacer aspersiones dirigidas a los frutos en tres o cuatro ocasiones, durante los primeros estados de desarrollo, con insecticidas y fungicidas en dosis bajas de 1cm^3 de cada uno por litro de agua, para evitar el embolse de los frutos. Esta práctica es benéfica pero requiere que sea efectuada con el uso de diferentes productos y determinar la contaminación que se pueda causar al fruto fresco (Escobar y Sánchez 2000). Para evitar el daño al fruto y al ambiente se ha propuesto el control biológico como alternativa para el control de las plagas que atacan los frutos y de esta forma reducir las pérdidas económicas.

2.4. Generalidades control biológico

El hombre se ha visto en la necesidad de proteger sus productos alimenticios del daño de insectos, ácaros y otros microorganismos usando un amplio rango de insecticidas y plaguicidas, controlando las plagas pero creando efectos secundarios negativos en el ambiente, generando diversos problemas que obligan a un control químico cada vez más frecuente (García 1992).

El uso de estos productos químicos provoca mayores costos y contaminación en el medio ambiente (García 1992), haciendo que la opinión pública y el movimiento ambientalista generen un renovado interés por el control biológico al nivel mundial (Rodríguez 1994). Este permite buscar un equilibrio biológico en las poblaciones de las plagas sin tener mayor interferencia en el ecosistema, respetando al máximo los reguladores naturales de control como parasitoides, depredadores o patógenos (Pedigo 1996).

El control biológico se puede definir como la manipulación de enemigos naturales, que incluyen bacterias, hongos, parásitos y depredadores para mantener y controlar organismos considerados plaga para el hombre y mantener la densidad de la población a un promedio más bajo del que ocurriría en su ausencia (De Bach 1964, Jiménez 1992).

La importancia del control biológico se basa en aspectos importantes como en la poca o ninguna patogenicidad para los animales benéficos, poca destrucción del balance natural, seguridad sanitaria y la especificidad de sus hospederos (Kuno 1982). Es necesario tener en cuenta que los enemigos naturales de un lugar no necesariamente funcionarán en otro sitio, es decir que hay que estudiar cada problema de las plagas en particular (Hanson y Hilje 1993).

Un agente biocontrolador debe cumplir con ciertas características como la seguridad para humanos y animales, ser efectivo a bajas concentraciones, eficacia para un amplio rango de patógenos, fácil de producir en un medio económico, fácil de almacenar, usar y que sea capaz de sobrevivir en condiciones adversas (Bustamante 1999). Asimismo para regular las poblaciones de plagas se pueden manipular los enemigos naturales importando enemigos exóticos, criándolos masivamente para hacer liberaciones periódicas o conservando los enemigos naturales nativos mediante el manejo del ambiente en que viven (Hanson y Hilje 1993).

Para implementar el método de control biológico hay que considerar factores como la interacción entre la densidad de la población de la plaga y el daño que causa, la

producción, la magnitud de las pérdidas y el valor de la cosecha (López 2000). Esto origina la principal preocupación de los agricultores que los lleva a conocer e investigar sobre el uso del fenómeno natural del control biológico y a implementar un nuevo e importante concepto el control biológico clásico. Este se fundamenta en el hecho de que un organismo dañino, intencional o accidentalmente introducido a un país o región donde no existía, normalmente llega sin los enemigos naturales que lo mantienen regulado en su región de origen y por lo tanto, si las condiciones ambientales y las fuentes de alimento que encuentra en sus nuevos hábitats le resultan aceptables, podrá aumentar sus poblaciones y constituirse en una plaga más o menos limitante (Madrigal 2003).

DeBach (1964) define el control biológico clásico como la forma de control biológico aplicado que comprende el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales exóticos con el fin de regular poblaciones de plagas introducidas en un país o región determinada.

El control biológico se practica mediante las técnicas o estrategias consideradas como convencionales (Pedigo 1996):

La introducción es el establecimiento de un agente exótico para la regulación de la población de una plaga a largo plazo (control biológico clásico). La inoculación, que es una estrategia similar a la anterior pero que requiere de liberaciones periódicas del agente de control ya que este no puede persistir y establecerse definitivamente. El aumento, que incluye liberaciones de enemigos naturales ya existentes en forma nativa en el agroecosistema y el propósito es contribuir a la acción de los agentes nativos, principalmente en determinadas épocas cuando la plaga se halla en los estados más susceptibles y, la inundación que se refiere a la liberación de grandes cantidades de agentes de control para regular una sola generación de plaga. En esta última técnica no se espera que las liberaciones tengan efecto sobre las generaciones siguientes de la plaga.

Hay muchos factores que pueden influir en la relación hospedero-parasitoide o depredador-presa y determinar el nivel de acción del enemigo natural y por esto el

éxito o fracaso de un programa de control biológico. Los factores que influyen en ella se clasifican en abióticos tales como la temperatura, la humedad y la luz. Una buena característica de una especie sería la adaptabilidad a cambios físicos del medio ambiente y los bióticos tales como la especie y condiciones de la planta; la cualidad de la especie estaría en atacar al hospedero sobre diferentes especies de plantas (López 2000).

Dentro de las características biológicas intrínsecas se atribuye una buena sincronización con el hospedero, especificidad del hospedero, habilidad para sobrevivir largos períodos al liberarse, habilidad para responder a cambios en la densidad del hospedero y a las propias (respuestas funcionales y numéricas, agregaciones, interferencia, alta capacidad de búsqueda y corto tiempo de manipulación), buen potencial reproductivo expresado por una fecundidad alta, un ciclo de vida corto y facilidad para la propagación masiva. Esta característica es útil principalmente en programas de liberación inoculativa (López 2000).

Es importante tener en cuenta que estos atributos son necesarios para un buen agente de control, pero claramente no son suficientes ni tampoco son todos indispensables y su valor o importancia no es absoluta sino relativa, comparados con los valores de otros enemigos naturales (López 2000).

2.5. Microorganismos agentes de control biológico

Aunque el desarrollo del conocimiento en torno a microorganismos que causan enfermedades a los insectos se remonta a los tiempos de Aristóteles, y por varias décadas se hicieron intentos a través de todo el mundo para reducir la población de insectos mediante la distribución artificial de hongos patógenos (DeBach 1964), su uso en programas de control de plagas apenas inicia su despegue a principios del presente siglo y ha cobrado gran auge en la última década (Madrigal 2001). Las investigaciones han avanzado rápidamente y han permitido encontrar hongos, bacterias, virus, protozoarios, rickettsias, nematodos y otros organismos causales de enfermedades en insectos de diferentes órdenes de importancia económica. Adicionalmente se han identificado características importantes como que los

organismos a utilizar sean altamente patogénicos para la plaga a controlar, teniendo en cuenta la sensibilidad del insecto (tipo de insecto), estado fisiológico, edad, sexo, comportamiento, grado de resistencia o de susceptibilidad (Rodríguez, 1982).

El avance rápido en el campo de la patología de insectos en años recientes, ha dado por consecuencia una mejor valoración del papel que juegan los patógenos de insectos en el control natural, y se ha desarrollado un amplio interés por parte de los entomólogos en las posibilidades de la utilización extensiva de microorganismos para el control de insectos plaga (DeBach 1964).

En los procesos de patogenicidad sobre insectos están involucrados al menos unos 90 géneros de 700 especies correspondientes a los grupos de los Zigomycota e Hyphomycetes. La habilidad de un hongo entomopatógeno para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus hospederos se debe en gran parte a la producción de toxinas, principales componentes de la patogenicidad y a enzimas extracelulares como las lecitinas y coagulasas entre otras, que son sustancias asociadas a entomomicosis. (Delgado 2002, González *et al.* 1993).

Lo ideal en el control de los insectos mediante organismos benéficos es introducir un agente de regulación permanente del insecto plaga, para mantener las poblaciones por debajo del nivel de daño establecido para un cultivo. Por esto es necesario tener en cuenta los elementos que intervienen en el desarrollo de las enfermedades: insecto, organismo patógeno y condiciones en las cuales se efectúa la dispersión del patógeno (Jiménez 1992).

Esto último implica tener en cuenta el tipo de cultivo considerado (perenne, transitorio o semiperenne), y las condiciones ambientales del medio. El patógeno introducido entra en concurrencia con los demás factores biotécnicos de regulación de la población hospedera (entomófagos, parásitos y enfermedades) y su aplicación se debe hacer cuando el estado biológico de la especie, su población y las condiciones ambientales permiten obtener un resultado satisfactorio en la reducción del nivel de población (Jiménez 1992).

Los factores ambientales influyen tanto en el inóculo, como en el insecto y a su vez en el desarrollo de la enfermedad de este (temperatura, humedad, radiación, entre otras). La relación entre el hospedero y el patógeno está ampliamente influenciada por el medio en el que se encuentra (Jiménez 1992).

Los conocimientos del microbiólogo, las condiciones del patógeno y el punto de vista del ecólogo no siempre están de acuerdo con las necesidades del agrónomo y el agricultor. Por consiguiente, el empleo de un organismo patógeno en el control de determinado insecto deberá obedecer a un estudio cuidadoso de las necesidades de control, de su relación con otras alternativas y de la economía de su empleo (Jiménez 1992).

Muchos especialistas han trabajado en el aislamiento, identificación y conocimiento de los procesos patológicos de los microorganismos observados en los insectos enfermos, en la naturaleza o en las crías artificiales. Existe una lista de más de un millar de especies de bacterias, virus, protozoarios, hongos y nematodos. De acuerdo a Jiménez (1992) las principales propiedades de estos organismos para la protección de cultivos son:

1. La especificidad en la mayor parte de los microorganismos, especialmente los virus y las bacterias hacia sus hospederos. Esta condición permite su utilización con amplia seguridad de no estar causando daño a otros organismos vivos distintos a las plagas, especialmente al hombre.
2. La permanencia está relacionada con el período que puede permanecer en el ambiente un microorganismo después de ser liberado. Es deseable una alta permanencia, la cual se logra en algunos casos, pero en muchos otros, su biodegradabilidad por factores ambientales como luz y temperatura, limitan el empleo de microorganismos para el control de plagas.
3. La patogenicidad es la condición biológica que le da a un microorganismo sus características de plaguicida. Depende de las relaciones existentes entre el patógeno, el hospedero y las condiciones ambientales, así como de

características intrínsecas de los microorganismos, por lo cual es sumamente variable.

4. La inocuidad ambiental es una característica propia de los seres vivos, hace a los microorganismos elementos óptimos para el control de plagas desde el punto de vista ecológico. Puede decirse que esta es la mejor característica del control microbiológico de plagas.

Las investigaciones al nivel mundial sobre el uso de microorganismos entomopatógenos para el control de plagas han mostrado resultados promisorios (Fernández 1998). Las ventajas del desarrollo de un programa de control biológico son innumerables, siendo una de las más importantes el que este método no contamina y no causa perjuicio al ambiente (Vargas 2003).

Antes de proponer un microorganismo como agente de control biológico, este debe ser identificado plenamente para garantizar que su utilización no represente riesgo para la sanidad vegetal, ni para la salud humana o animal. Dicho microorganismo debe ser conservado bajo condiciones que garanticen la preservación de sus características genéticas y fisiológicas (López 2000).

El agente de control biológico deberá tener propiedades que permitan su fácil manipulación, dado que muchos de ellos tienen tiempos de vida cortos y son muy sensibles a las manipulaciones en procesos industriales (Cotes 1994).

El logro de un buen agente biocontrolador implica el cumplimiento de diversas etapas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable (Cotes 1994). Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, su conservación, pruebas de infectividad, alergenicidad, toxicidad, y mutagenicidad, la evaluación de su actividad biológica, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, determinación de dosis, formas de aplicación y ensayos de campo (Alatorre 1994).

Ante las dificultades cada vez mayores de controlar plagas por medios químicos y las impuestas al mercadeo de productos con residuos de agrotóxicos, el uso de hongos entomopatógenos se ha venido abriendo espacio como una importante alternativa (Madrigal 2003).

2.5.1. Generalidades de los hongos entomopatógenos

Los hongos constituyen uno de los principales grupos patógenos de insectos. Están ampliamente distribuidos y sus síntomas de ataque son fácilmente reconocibles. Atacan una gran variedad de insectos acuáticos y terrestres así como otros invertebrados y en algunos casos hasta vertebrados superiores. Los más comúnmente encontrados causando enfermedades en insectos pertenecen a las phyla: Basidiomycota, Ascomycota y el grupo artificial de los Deuteromycetes (Alexopoulos 1996).

Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los Órdenes de insectos; la mayoría comúnmente son Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (David 1967 citado por Tanada y Kaya 1993 Ferron *et al.* 1975). En algunos Órdenes de insectos los estados inmaduros (ninfas o larvas) son más a menudo infectados que los maduros o estado adulto; en otros puede suceder lo contrario. Los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados por los hongos (Tanada y Kaya 1993).

Estos microorganismos además de poseer un amplio rango de hospederos y de infectar diferentes estados de desarrollo y edades del hospedero (Ferron 1978), constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de los insectos plaga ya que la mayoría de los insectos son susceptibles a estos hongos. Se reconocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los cuales los géneros mas importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Fusarium*, *Hirsutilla*, *Akanthomyces*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón 2001).

En Colombia se han utilizado algunas especies de hongos para el control de plagas en frutales. Estos organismos existen en los campos agrícolas independientemente de la intervención del hombre, ejerciendo un control biológico natural (Santocoloma 1999).

La especie *Metarhizium anisopliae* es uno de los mayores candidatos para el control microbiológico de insectos plaga ya que posee un amplio rango de hospederos, que involucra más de 200 especies de insectos. Este hongo presenta un amplio espectro, cuenta con más de 300 hospederos en diferentes especies de insectos dentro de los cuales se encuentran plagas de importancia económica. Esta especie cuenta con dos variedades: *Metarhizium anisopliae* var. *major* y *M. anisopliae* var. *anisopliae*, siendo variable su virulencia dado que posee diferentes tipos de dextrinas (Santocoloma 1999).

Existen dos géneros de *Beauveria* utilizados en el control biológico, *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii*. *B. bassiana* está ampliamente distribuido en el orden Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Ortoptera, Hemiptera; esto ha sido reportado tanto en áreas tropicales y templadas como América y las Islas Británicas (Domsch *et al.* 1980). Se encuentra dentro de los hongos más utilizados para el control de plagas del suelo en Colombia, ha sido utilizado para combatir insectos de importancia económica en la producción agropecuaria, tales como Broca del café *Hypotenemus hampei*, gusano blanco de la papa *Premnotrypex vorax*, Marceños o cuaresmeros *Phyllophaga obsoleta* y varios Lepidopteros en palma africana (Londoño 2001).

El género *Paecilomyces* contiene 14 especies con una amplia distribución geográfica y afecta virtualmente todas las especies de insectos y arácnidos (Hall y Papierok 1982). *Paecilomyces* ha sido encontrado como un entomopatógeno en el control de Lepidoptera (Jiménez 1992). *P. lilacinus* es un hongo típico del suelo y se encuentra comúnmente en los trópicos y subtrópicos; parasita tanto huevos como

larvas de algunos géneros de nematodos. Además su comportamiento saprofítico hace que se pueda aislar de diferentes sustratos y ambientes (Varón 2000). Este hongo no presenta riesgos de intoxicación para los seres humanos y animales de sangre caliente, según pruebas toxicológicas. Las pruebas de patogenicidad e infectividad en conejos, curíes y ratones, inyectados por vía subcutánea, peritoneal e intravenosa, confirman que *P. lilacinus* no es patogénico para esos animales (López 1995).

Los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias y virus entomopatógenos no requieren ser ingeridos para infectar a sus hospederos, ya que su mecanismo de acción es la penetración directa a través del integumento (Ferron 1978). Los conidios pueden adherirse de acuerdo a los pliegues o la rugosidad de la superficie de la cutícula. La interacción entre el conidio y la cutícula depende de las sustancias mucilaginosas que rodean el conidio y las enzimas, además de la conformación morfológica de integumentos, que favorecen la germinación del conidio (Fargues 1984). Este tipo de interacción ocurre dentro de un mínimo de 12 horas siendo necesaria una humedad relativa alta (mayor al 90%) (Bartnick 1984). Luego se producen hifas invasoras que penetran en los tejidos del hospedero, se ramifican, colonizan y llegan hasta la cavidad hemocélica, donde se produce una masa micelial por el crecimiento del hongo y se liberan toxinas que están implicadas en el bloqueo del desarrollo fisiológico del insecto (Delgado 2002, Torres *et al.* 1993).

Diversos estudios ultraestructurales e histoquímicos sugieren que en el proceso infectivo del hongo hacia el insecto existe degradación de la cutícula en la cual se encuentran implicadas varias enzimas como proteasas, lipasas y quitinasas (Delgado 2002, Torres *et al.* 1993). Una vez en la hemolinfa, rica en proteínas y nutrientes, el hongo se alimenta y multiplica, ocurriendo así la ramificación hifal que invade la cavidad del cuerpo. Las hifas se fragmentan originando blastoconidios, clamidoconidios o esporas de reposo y esclerocios. En este proceso el insecto sufre cambios fisiológicos manifestados en síntomas como la pérdida de apetito,

regurgitaciones, diarreas y el insecto se torna visiblemente desorientado. Posteriormente el hongo consume todos los nutrientes de la sangre del insecto y luego produce las toxinas que le causan parálisis y muerte (Torres y López 1997, Rodríguez 1997, Sañudo y Castillo 1994). Cuando las condiciones ambientales son favorables ocurre la esporulación, que normalmente se manifiesta exteriormente en el insecto, por la presencia de los diversos cuerpos fructíferos (Bustillo 1984). Después sucede la dispersión de las unidades infectivas por medio del agua y del viento y así coloniza otro individuo (Fernández 1998).

2.5.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotes distribuidos prácticamente en todos los hábitats terrestres (Tanada and Kaya 1993). Pueden vivir donde la mayor parte de los organismos no pueden hacerlo debido a su diversidad metabólica y suelen ser más numerosas en el suelo que todo el resto de organismos, con la excepción de los virus (Coyne 2000).

La mayor parte de las bacterias del suelo son quimioheterotróficas, jugando un papel en ciclaje de energía y nutrientes. Las bacterias del suelo también difieren considerablemente en su nutrición y en su respuesta a las condiciones del medio. En consecuencia, la clase y la abundancia de las bacterias dependen tanto de los nutrientes disponibles como de las otras condiciones del suelo que tienen que ver con su manejo, temperatura, contenido de humedad, aireación y pH (Burbano 1989). Cuando perciben un medio hostil como la falta de agua o de nutrientes y elevadas concentraciones de oxígeno, tales bacterias dejan de crecer, engendran en su interior una célula que contiene su información genética y que se convierte luego en espora. Una vez maduras, las esporas son muy resistentes al calor, a la radiación y a los agentes antimicrobianos en general y pueden perdurar durante años en un medio ambiente (Volcy 2004).

En el suelo se encuentran diferentes géneros de bacterias. Hay una más alta proporción de bacterias Gram positivas en el suelo en comparación con otros

hábitats como el agua de mar y el agua dulce, pero el número absoluto de las Gram negativas pueden predominar en los suelos (Burbano 1989).

Entre los géneros de bacterias comunes en el suelo y aisladas con mayor frecuencia se incluyen *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. *Arthrobacter* es pleomórfica, de crecimiento lento y crece en diversos sustratos. Las especies de *Bacillus* son formadoras de esporas y sobreviven en un rango de pH de 2 a 8 y a temperaturas entre -5 °C y 75 °C. Algunas especies de *Bacillus* presentan gran habilidad para degradar compuestos químicos orgánicos como los plaguicidas. No obstante, existe una gran diversidad en la forma y las funciones bacterianas en el ambiente y menos de un 10% de las bacterias de un ambiente son realmente cultivables (Coyne 2000).

Las bacterias se reproducen normalmente por fisión binaria con gran profusión, en ambientes aerobios y anaerobios, en condiciones cálidas o frías, lugares oscuros o luminosos, secos o húmedos y pueden ser desde saprófitas hasta obligadamente parásitas (Tanada and Kaya 1993). Existe una gran diversidad de bacterias que ocasionan enfermedades infecciosas en los insectos, lo cual ha ayudado a que cada vez se avance en la investigación de microorganismos como agentes de control biológico (Londoño 2001).

Bacillus thuringiensis (BT) es quizá el agente de control biológico más conocido y ampliamente utilizado en el mundo. La acción insecticida de *B. thuringiensis* se observó por primera vez en 1901 y se vio que era la causa de una enfermedad en el gusano de seda *Bombix mori*. BT además de endosporas, produce en la célula cuerpos parasporales discretos. Esta bacteria produce endotoxinas que son un cuerpo de inclusión paracrystalino, en la mayoría de casos localizado en el exterior de la exospora y en algunas cepas asociado a esta. El cristal paraesporal proteináceo es el factor tóxico (Atlas y Bartha 2002).

La gran mayoría de las bacterias entomopatógenas invaden a sus hospederos al ser ingeridas, causando inicialmente la destrucción parcial del intestino medio (mesenterón) y sobreviniendo una septicemia consecuente. Estas bacterias son patógenas extracelulares (con excepción de las rickettsias) y sus primeros efectos se

reflejan en una pérdida de apetito, diarrea y vómito, para después invadir totalmente al hospedero y causarle la muerte. El cadáver del insecto, se torna oscuro por la oxidación de la hemolinfa y crecen gran cantidad de bacterias saprófitas, provenientes tanto de su propio tracto digestivo (flora intestinal y acompañante del alimento) como del medio que lo rodea. El cadáver adquiere un olor fétido, toma un color entre café oscuro y negro (DeBach 1964). El cuerpo se descompone en forma floculenta, con excepción del integumento (exoesqueleto), para posteriormente secarse y endurecerse (Ibarra 1998). Los insectos infectados cesan de alimentarse, se vuelven perezosos en sus movimientos y mueren en un lapso de 24 a 72 horas (DeBach 1964).

El modo de acción de las toxinas es descrito por Castillo *et al.* (1995), quienes señalan que las toxinas aparentemente se insertan en la membrana del intestino medio, donde aumentan la conductividad de potasio de las membranas apicales de las células columnares; esta acción lleva a la ruptura de los gradientes eléctricos de potasio y a un aumento del pH de la hemolinfa. La mortalidad resulta del desequilibrio del contenido básico hipotónico del intestino medio y la hemolinfa; hay parálisis del cuerpo e intestino y, la muerte ocurre en 2-7 días; no ocurren cambios en la hemolinfa, sólo se observa parálisis del intestino medio. En algunos casos de muerte resulta la septicemia o disentería o ambas, después de la germinación de las esporas en el intestino (DeBach 1964).

La ubicuidad de las bacterias hace que estos sean el tipo más abundante de microorganismos asociados con insectos. Existen bacterias saprofitas, mutualistas y patógenas que pueden estar asociadas externa o internamente con insectos. Se pueden considerar dos grupos de bacterias causantes de enfermedades en los insectos: El primero son los verdaderos patógenos que causan infección siempre que penetran al insecto. El segundo grupo incluye los patógenos potenciales que son omnipresentes pero sólo causan infección cuando el insecto está bajo estrés (Jiménez 1992).

2.5.3. Parasitoides

En el parasitismo el organismo vivo se utiliza como recurso mientras que todavía está vivo. Se define como parásito un consumidor que usualmente no mata al organismo del cual se alimenta. Este se mantiene de uno o más hospederos en el curso de la vida (Begon *et al.* 1986). El organismo parasítico puede vivir en varios hospederos (Stiling 1996), sin destruirlo en el proceso de desarrollo y vive libremente en el estado adulto (Arias 2004). Además puede vivir con el hospedero por prolongados períodos de tiempo.

El término parasitoide hace referencia a un tipo especial de parasitismo que es característico de muchas especies de insectos, en donde este vive por cortos periodos de tiempo hasta que mata a su hospedero (Stiling 1996), a expensas de un sólo hospedero (Davies 1991, Stiling 1996). La mayoría de los insectos que parasitan a otros insectos son parasitoides. Usualmente consumen todo o casi todo el cuerpo de su hospedero y luego pupan, ya sea al interior o al exterior de este. Los parasitoides pueden clasificarse como koinobiontes o idiobiontes, dependiendo del lugar donde estos se desarrollen: dentro de los organismos vivos, muertos o paralizados. El parasitoide adulto emerge de la pupa y se inicia así la próxima generación buscando activamente nuevos hospederos en los cuales depositar sus huevos. La mayoría de los parasitoides adultos requieren de alimento suplementario tales como miel, polen o néctar. Muchos se alimentan de los fluidos del cuerpo de sus hospederos, como ya se mencionó anteriormente. Otros como adultos requieren sólo de agua (DeBach y Rossen, 1991).

Los parasitoides constituyen el grupo más importante de reguladores naturales y controladores biológicos de plagas en gran diversidad de cultivos y ecosistemas forestales. Características como su especificidad, adaptación biológica y fisiológica al hospedero, plasticidad ecológica, capacidad de búsqueda y sincronía con sus hospederos hacen de estos un grupo más deseable que los predadores para programas de control biológico (Madrigal 2003).

Los parasitoides de huevos son insectos benéficos o avispas diminutas, pertenecientes al orden Hymenoptera, principalmente de las familias *Trichogrammatidae*, *Scelionidae*, *Braconidae* y *Nymaridae*. En la naturaleza se encuentra una gran diversidad de especies de parasitoides de huevos y los géneros *Trichogramma* y *Telenomus* son los que incluyen el mayor número de especies que actúan principalmente contra plagas del orden Lepidoptera. En los huevos parasitados se detiene el desarrollo de las larvas de la especie plaga y este proceso es remplazado por la formación de nuevos adultos de los benéficos, los cuales al multiplicarse en el campo, incrementan los porcentajes de parasitismo natural (García *et al.* 2004).

Colombia es país líder en la producción y uso de *Trichogramma* y existen laboratorios que la crían masivamente. Desde la década de los años setenta se realizan liberaciones de este parasitoide en el Valle del Cauca y otras regiones colombianas para el control biológico de plagas del orden Lepidoptera en cultivos de algodón, soya, caña de azúcar, yuca, tomate, frijol y girasol (García *et al.* 2004).

Los Ordenes Hymenoptera y Diptera incluyen las principales especies de insectos parasitoides de larvas dañinas en cultivos. Estos benéficos hacen parte de una gran diversidad de avispas y moscas de una gran ocurrencia sobre las plantas, que buscan las larvas de las plagas que les sirven de hospederas. Los adultos de estos parasitoides se alimentan de secreciones y del néctar de las plantas como también de los exudados de sus hospederos (García *et al.* 2004).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1. Formulación del problema

En la actualidad los cultivos de guanábana están siendo afectados por plagas en donde una de las más limitantes es *B. maculicollis* (perforador del fruto) ya que este insecto origina heridas o perforaciones que permiten la penetración e invasión de hongos, los cuales deterioran la fruta ocasionando así elevadas pérdidas económicas en los cultivos de esta fruta. Esta plaga se ha venido controlando por medio del embolsamiento del fruto (bolsas de polietileno), y la utilización de plaguicidas. Sin embargo al ser utilizados inadecuadamente estos afectan el suelo, la flora y la fauna y asimismo a los microorganismos nativos del medio. Por otra parte al no ser biodegradables las bolsas de polietileno se convierten en un factor adverso que conlleva a proponer otros procedimientos y así obtener una opción más económica y ecológica para el beneficio del ambiente.

Prácticamente no hay estudios que indiquen la acción controladora de microorganismos sobre *B. maculicollis* en Colombia, por lo cual es necesario como un primer paso para el control biológico de esta plaga, la búsqueda e identificación de controladores naturales.

3.2. Justificación

La guanábana es un producto apetecido por su jugosidad y aroma, su precio en el mercado es relativamente alto si se compara con otras frutas. En Colombia el guanábano se ha convertido en una opción atractiva como cultivo comercial por la demanda nacional e internacional que posee, en departamentos como Antioquia, Bolívar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Risaralda, Santander, Valle y, Tolima con 17.180 Ton, siendo el mayor productor de anonáceas del país.

Este cultivo se ha visto afectado por plagas en donde una de las más limitante es *B. maculicollis* (perforador del fruto), que ataca el fruto desde muy joven ocasionándole graves daños y generando pérdidas económicas. Los altos costos del control químico y el impacto ambiental de las aplicaciones de insecticidas químicos de diferentes categorías toxicológicas que se realizan en este cultivo hacen necesario identificar agentes de control biológico: parasitoides y entomopatógenos para esta plaga de los cultivos de guanábana y demás Anonáceas. Entonces ya que en la

bibliografía consultada no se encuentran reportes de enemigos naturales con potencial de control biológico, es indispensable investigar posibles agentes de control para la avispa perforador del fruto que están en las mismas áreas de las plantaciones del cultivo, con el fin de establecer la potencialidad de los microorganismos nativos que están adaptados a las condiciones ambientales en que también se encuentra la avispa.

Además vale la pena resaltar que este es el primer registro sobre la búsqueda de microorganismos para el control de esta plaga.

3.3 Pregunta de Investigación

¿Hay microorganismos en los cultivos de guanábana ubicados en los municipios de Carmen de Apicalá y Mesitas del colegio que sean patógenos para *B. maculicollis*?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Buscar agentes potenciales de control microbiológico de *B. maculicollis* en fincas productoras de guanábana ubicadas en los departamentos de Tolima y Cundinamarca y, probar en invernadero la capacidad de control de algunos de los potenciales microorganismos controladores encontrados.

4.2. Objetivos específicos

Realizar muestreos en la zona objetivo para establecer los posibles controladores de la avispa *B. maculicollis* que ataca frutos de *A. muricata*.

Aislar, identificar y conservar cepas de microorganismos potenciales controladores de *B. maculicollis*, presentes en semillas de frutos de guanábana, suelo y material vegetal no descompuesto y con bajo grado de descomposición.

Aislar, identificar y seleccionar cepas de hongos con potencial entomopatógeno para *B. maculicollis* presentes sobre insectos muertos, material vegetal o suelo.

Realizar ensayos utilizando la metodología de casa malla para determinar el grado de patogenicidad del(los) microorganismos patógenos seleccionados sobre *B. maculicollis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación

5.1.1 Área de estudio: Este trabajo se realizó en dos fincas escogidas, una localizada en el municipio de Carmen de Apicalá, ubicado a 200 m.s.n.m con una temperatura anual promedio de 28 a 30°C, precipitaciones de 1500-2000 mm anuales (hacienda Curazao, vereda la Antigua) y otra ubicada en el departamento de Cundinamarca, en el municipio de Mesitas del Colegio, ubicada a una altura de 650 m.s.n.m aproximadamente, precipitaciones entre 1500 a 1800 mm anuales, temperatura entre 12 y 24°C (las Golondrinas) (Novoa 1996). La selección de las fincas se realizó con base en el conocimiento previo que se tenía de los dueños, la producción de guanábana y a la incidencia de la avispa *B. maculicollis* en el cultivo. Adicionalmente se realizó una presentación del proyecto a los propietarios de las fincas, los cuales aceptaron la realización del estudio en sus cultivos.

Este trabajo se realizó en dos fases: una de campo y otra de laboratorio.

5.2. FASE DE CAMPO

5.2.1. Recolección de muestras: Se recolectaron muestras de suelo, hojarasca e insectos teniendo en cuenta que el cultivo no hubiera tenido aplicación de compuestos químicos como insecticidas o fungicidas en un tiempo prolongado (4 meses o más) y en sitios donde hubiera una alta humedad relativa e incidencia de la avispa.

Para obtener microorganismos potenciales controladores se escogieron muestras de suelo, hojarasca y guanábanas del árbol en diferentes estados de desarrollo, aparentemente sanas y con perforaciones. Se guardaron en bolsas plásticas con cuidado para no maltratarlas y se llevaron al laboratorio para su procesamiento.

En el muestreo de suelo se siguió el siguiente procedimiento: En cada finca se seleccionó un área de una fanegada (6.400 m²), en la cual se recolectaron cinco muestras compuestas a una profundidad de 10-15 cm. De cada muestra compuesta se escogió una submuestra de quinientos 500 g aproximadamente.

Se recolectaron 10 muestras de hojarasca no descompuesta y con bajo grado de descomposición en lugares con vegetación diversa aledaños al cultivo (áreas remanentes de bosque), dentro del cultivo y en los sitios donde se recolectaron las muestras de suelo.

Las muestras de suelo y material vegetal fueron guardadas en bolsas plásticas con cierre hermético y se rotularon con la fecha, clase de sustrato y número de lote o finca donde se recogieron. Se conservaron a una temperatura de 4°C para su transporte al laboratorio, y se mantuvieron a esta temperatura hasta su procesamiento.

Adicionalmente se buscó en suelo, bajo la hojarasca, en el envés de las hojas, flores, frutos, troncos y ramas de árboles, insectos muertos con o sin crecimiento micelial, los cuales fueron recogidos y se colocaron en recipientes ventilados, según la metodología establecida por Keller (1987). Se guardaron a 4°C, hasta su procesamiento.

5.3. FASE DE LABORATORIO

5.3.1. Procesamiento de muestras

10 g de cada submuestra de suelo fueron depositadas en frascos de dilución con 90 ml de solución salina (NaCl 0,85%) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Este procedimiento se repitió con las muestras de material vegetal. A partir de esta se hicieron diluciones seriadas 1:10 y se sembró en profundidad las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} transfiriéndose por duplicado 1 ml a cajas de Petri con los medios Extracto de Malta y Rosa de Bengala para hongos, adicionándoles cloranfenicol (1 g/l) para evitar el crecimiento de bacterias. También se sembraron en Agar Nutritivo y Agar Trypticase Soya para bacterias, adicionándoles nistatina (0,01 g/l) para inhibir el crecimiento de hongos. Después de distribuir uniformemente las muestras con su respectivo medio de cultivo, las cajas de Petri fueron llevadas a la incubadora a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por 5 a 7 días para hongos y de 24 a 48 horas para bacterias.

Algunas guanábanas se abrieron, se observaron las semillas y se escogieron aquellas que fueran de color café claro, blandas o con perforaciones. Se abrieron las semillas y se observó con lupa su interior buscando la presencia de pupas, larvas, adultos muertos o crecimiento micelial de hongos.

Las semillas y los insectos que presentaron algún tipo de crecimiento micelial se colocaron en una cámara húmeda, constituida por una caja de Petri de 5 cm de diámetro que tenía en la base un papel filtro humedecido con agua destilada estéril. Las cajas de Petri se colocaron en la incubadora a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 días aproximadamente o hasta que se observara crecimiento. Posteriormente se tomó una muestra del hongo y se realizó un pase a Agar Extracto de Malta y a Agar Papa Dextrosa (con cloranfenicol 1g/l), las cajas se llevaron a la incubadora durante 5 a 7 días y se observaron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias.

Para la recolección de parasitoides y de avispas de *B. maculicollis* se tomaron guanábanas que se encontraban alrededor de la fase 6 de crecimiento y próximas a madurar, ya que en esta etapa de la formación del fruto hay más posibilidad de encontrar individuos de estos insectos. Se colocaron dentro de cajas de cartón con una perforación lateral donde se introdujo un frasco de vidrio para permitir la entrada de luz y atrapar los organismos que salieron (cámaras de emergencia) (Figura 4).



Foto tomada por Amanda Varela

Figura 4. Cámaras de emergencia utilizadas para la captura de los insectos

Para aislar bacterias de las avispas (*B. maculicollis*) que no presentaron crecimiento micelial encontradas dentro de las semillas, estas se maceraron y se sembraron por el método de dilución en placa (Wollum 1982). Se realizaron diluciones hasta 10^{-3} en solución salina al 0,85% y se inoculó 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , en profundidad, en Agar Nutritivo adicionando nistatina (0,01 g/l). Luego fueron llevadas a la incubadora a 22 ± 2 °C por 24 horas.

De las muestras tomadas en campo de los insectos muertos en los diferentes estados de desarrollo se realizó primero una observación y se separaron si presentaban crecimiento micelial.

Los cadáveres de insectos con crecimiento micelial externo se sembraron directamente sobre los medios de cultivo Agar Sabouraud Rosa de Bengala, Agar Papa Dextrosa y Agar Extracto de Malta, con antibiótico (con cloranfenicol 1g/l). Después de sembrados los hongos en las cajas de Petri fueron llevados a la incubadora a 22 ± 2 °C por un tiempo de 5 a 7 días. Durante este período se hicieron observaciones respecto a la aparición de crecimiento cada 24 horas como sugiere Mayen *et al.* (1982).

5.3.2. Identificación de los aislamientos

Al completar el tiempo de incubación de las cajas de Petri, se observaron las colonias crecidas en los medios de cultivo y se les realizó una descripción macroscópica y microscópica para determinar las características de los microorganismos posiblemente controladores. Se descartaron los contaminantes naturales para así limitar la búsqueda.

Para los hongos se tomó en cuenta tanto el color del reverso como del anverso de la colonia, el aspecto (aterciopelado, pulverulento o algodonoso), la forma, tamaño y color de las colonias. También se hizo un montaje con azul de lactofenol y se observaron las características microscópicas importantes para su identificación como: morfología del conidióforo, forma como se originan los conidios, tamaño y forma de los conidios, tamaño y terminación de fiálides, presencia o ausencia de clamidosporas, entre otras. Se utilizaron para la identificación claves como Barnett y Hunter (1972), Domsch *et al.* (1980), Gilman (1963), Nelson *et al.* (1983), Tom y Raper (1945), Watanabe (2002). De esta forma se seleccionaron los que por literatura son conocidos y utilizados como biocontroladores.

Cuando no se observaron inicialmente estructuras reproductivas se realizó microcultivo, que se incubó a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3-4 días y se observó directamente en el microscopio viéndose las estructuras para su identificación.

Los aislamientos obtenidos de los hongos con características de posibles controladores se purificaron por pases sucesivos en el medio en el que se encontraban, observando en el intervalo de cada pase, características propias de cada microorganismo.

Para las bacterias se realizó coloración de Gram y se escogieron los bacilos Grampositivos y Gramnegativos esporulados. Se hizo un pase o más haciendo siembra selectiva en el medio en el que se encontraban (Agar Trypticase Soya o Agar Nutritivo) para obtener colonias aisladas y se confirmó su morfología y pureza realizando coloración de Gram.

5.3.3. Conservación

Para conservar los aislamientos de los hongos ya identificados se usó el método de conservación en agua destilada estéril, en frascos de vidrio herméticamente cerrados, utilizando las cepas crecidas previamente en Agar Extracto de Malta o Agar Papa Dextrosa, con 7-10 días de incubación a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Se cortaron discos de aproximadamente 4 mm de diámetro y se suspendieron en 5 ml de agua destilada estéril, conservándose los frascos a 4°C .

Para la conservación de las bacterias se realizó siembra masiva en el mismo medio en el que se encontraban. Después de 24-48 horas de incubación a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ se realizó un raspado de todo el crecimiento de la bacteria y se sumergió en viales que contenían leche descremada y se mantuvieron a 4°C .

5.3.4. Activación de las enzimas del hongo

Para tener una mejor acción del hongo frente a la avispa, se realizó un pase del hongo a agar quitina al 1.5% y se llevó a incubar a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y luego se sembró en agar salvado de trigo para tener una mejor esporulación.

5.3.5. Pruebas de patogenicidad de los microorganismos potenciales controladores sobre la avispa.

5.3.5.1. Obtención de adultos de *B. maculicollis*. Se recolectaron guanábanas en lugares que tuvieran alta incidencia de la avispa, se seleccionaron frutos con perforaciones y sin perforaciones próximos a madurar y se colocaron en cámaras de emergencia hasta que salieran los adultos, de acuerdo a Cardona (1971).

5.3.5.2. Establecimiento de insectos adultos en casa malla. Se colocaron los adultos en materas plásticas que contenían suelo, material vegetal y como alimento se colocó gotas de miel de abeja pura o diluida en agua destilada, frutos jóvenes y pequeños para mantenerlas vivas y determinar el mejor tipo de alimento para su sobrevivencia en cautiverio.

Cada casa malla se roció dos veces al día con ayuda de un aspersor para mantener una adecuada humedad (alrededor de 60 %).

5.3.5.3. Bioensayo

Este ensayo se llevó a cabo en el municipio de Carmen de Apicalá para mantener las condiciones ambientales similares a las de las áreas de cultivo y así asegurar la supervivencia de la avispa.

Para la realización de los ensayos biológicos con la suspensión del hongo entomopatógeno *Paecilomyces lilacinus* se colocó en un recipiente plástico que contenía en el fondo una capa de suelo, flores, alimento y 6 avispas adultas de *B. maculicollis*, provenientes de las cámaras de emergencia. Este ensayo tuvo un diseño experimental completamente al azar de 3x3. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental de 6 individuos por casamalla (Figura 5). Se tuvo en cuenta un control que consistió en individuos asperjados sólo con tween 80 estéril al 0,1%. Se utilizaron 2 tratamientos del hongo entomopatógeno: Tratamiento 1: concentración $3,3 \times 10^{-7}$ conidios/ml y tratamiento 2: concentración $6,4 \times 10^{-7}$ conidios/ml. Se realizaron tres réplicas del bioensayo, todas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.



Foto tomada por Denys Murcia

Figura 5. Casamalla para el cautiverio de *B. maculicollis* en el ensayo experimental.

El aislamiento de *Paecilomyces lilacinus* conservado en agua destilada estéril se multiplicó colocando uno de los discos de Agar en medio de cultivo Papa Dextrosa (Merck) con antibiótico (cloranfenicol 1g/l). Luego se realizó un pase a medio quitina al 1,5% para activar las enzimas quitinolíticas del hongo. A partir de este crecimiento se hicieron pases en el medio de cultivo salvado de trigo quitina para obtener una mayor esporulación del hongo. Después de 10 días de incubación a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ se realizó un raspado de los conidios con un rastrillo y se agregó a una solución de tween 80 al 0,1%. La suspensión se homogenizó agitando por 3 minutos. Este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad.

Posteriormente se ajustaron las concentraciones teniendo en cuenta el tubo número 8 y 10 del patrón de McFarland para tener una guía de comparación. Estas correspondieron a una concentración de 24×10^8 y 30×10^8 cél/ml, las cuales se verificaron por conteo en cámara de NeuBauer en el laboratorio de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, dando como resultado $3,3 \times 10^7$ conidios/ml y $6,4 \times 10^7$ conidios/ml, respectivamente.

Para la aspersión los 6 ± 0.5 ml/casamalla de la suspensión con el hongo se utilizó un atomizador para que esta fuera más homogénea. La aspersión se efectuó por la mañana ya que la radiación solar era baja y la humedad relativa más alta, favoreciendo la acción del hongo en los primeros instantes de su proceso de infección (Milner y Yandprior 1994). Se tuvo en cuenta que la aplicación fuera lo más homogénea posible, abarcando toda la casa malla.

5.3.5.4. Toma de datos. Al día siguiente de la aplicación se comenzó a hacer el registro diario de mortalidad. Para esto se realizaron dos recolecciones diarias (mañana y tarde). Se colectaron los individuos muertos y se guardaron en bolsas de papel de 4,5 x 8 cm marcadas con el tratamiento respectivo para ser llevados al laboratorio. Una vez allí, cada insecto fue lavado en hipoclorito al 0,5% durante 40 seg y alcohol por 30 seg, para eliminar cualquier contaminante epicuticular y posteriormente se realizó un lavado con agua destilada estéril 3 veces durante 1 minuto cada uno. Una vez seco se llevó a cámara húmeda y se incubó a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta observar la esporulación del patógeno, con el fin de comprobar que la muerte

fue producida por la acción del hongo (Figura 6). A los que presentaron crecimiento en cámara húmeda se les realizó pase a medio Agar Papa dextrosa y luego se hizo un montaje con azul de lactofenol para observar la morfología microscópica del hongo y así confirmar que era *P. lilacinus*.



Foto tomada por Denys Murcia

Figura 6. Cámara húmeda para verificar la acción del hongo sobre la avispa por su crecimiento.

El ensayo duró 12 días. Teniendo en cuenta estos resultados fueron registrados en una tabla diariamente. Para los datos del número de insectos vivos y muertos se calculó el porcentaje de eficacia mediante la corrección de Abbott (Borrór 1970).

$$E = \left(\frac{A - B}{A} \right) 100$$

Donde

E = porcentaje de eficacia

A = Número de insectos vivos en el control

B = Número de insectos vivos en el tratamiento

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Muestras analizadas

En el ambiente existe gran diversidad de bacterias que interactúan entre sí, formando asociaciones que pueden ayudar a mantener un equilibrio entre los insectos plaga y el medio ambiente. Aunque existen muchas especies de bacterias asociadas con insectos son pocas las que presentan características de patogenicidad para su utilización en el control biológico de estos (Sañudo y Castillo 1994).

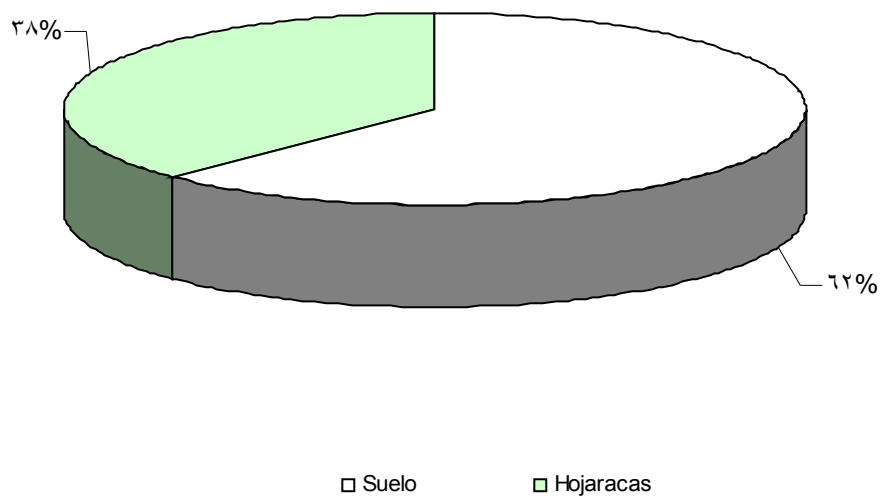


Figura 7. Distribución en porcentaje de bacterias analizadas de las muestras de suelo y hojarasca en Agar Tripticasa de soya y Agar nutritivo.

Dentro de las bacterias analizadas de suelo se determinó que el 71% fueron bacilos lo cual concuerda con lo citado por Coyne (2000) que comenta que las especies *Bacillus* representan entre el 7 y el 67% de los grupos aislados del suelo (Figura 7).

De las muestras analizadas se encontró solamente un 2% de bacilos esporulados (Figura 8), que era lo que se buscaba, ya que según Coyne (2000) las especies de *Bacillus* formadoras de esporas, sobreviven en un rango de pH de 2 a 8 y a temperaturas entre -5°C y 75°C. Asimismo la acción patogénica es atribuida al cristal parasporal que se forma dentro del esporangio y en otros géneros se le atribuye a la espora (Tanada y Kaya 1993). Además actualmente hay varios patógenos bacterianos de insectos que se están utilizando como insecticidas (Atlas y Bartha 2002), entre ellos encontramos a *Bacillus popilliae* y *Bacillus thuringiensis* (BT). *Bacillus popilliae* es utilizado para el control de Coleoptera de la familia *Melolonthidae* y BT es utilizado en el control de Lepidoptera, Coleoptera y Diptera (Jiménez 1992).

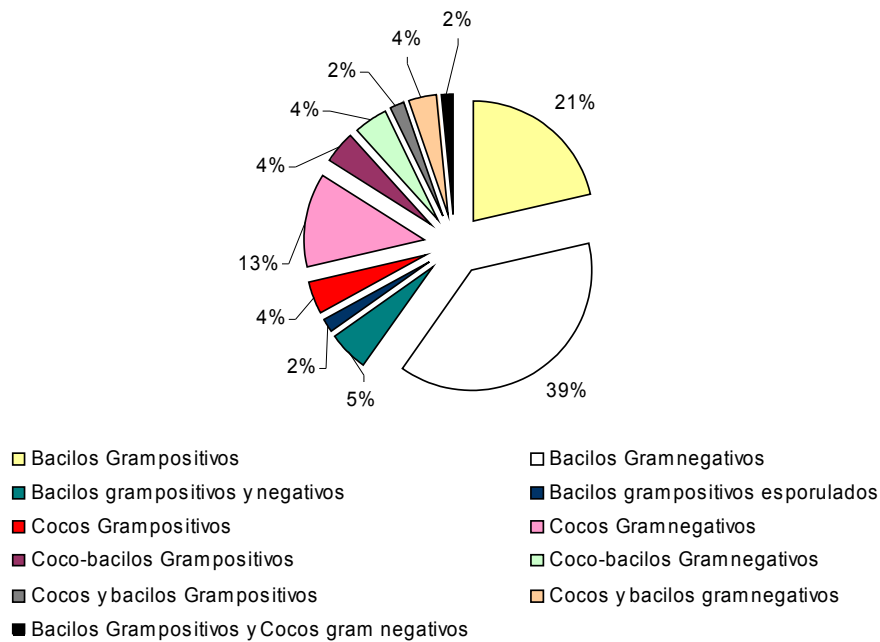


Figura 8. Porcentaje de los grupos bacterianos obtenidos de las muestras de suelo y hojarasca en las fincas muestreadas.

No se utilizaron bacterias en el bioensayo porque lo ideal para controlar a *B. maculicollis* es impedir que este penetre el fruto, ya que en su ciclo de vida la hembra coloca los huevos bajo la corteza de los frutos y la larva recién eclosionada hace galerías en la pulpa en busca de las semillas que prefieren como alimento (Nuñez y Dela Cruz 1982, Escobar y Sánchez 2000). Al utilizar bacterias no se podría evitar que este insecto ovipositará el fruto ya que la gran mayoría de las bacterias entomopatógenas invaden a sus hospederos al ser ingeridas (Ibarra 1998).

Igualmente no se utilizaron bacterias no esporuladas porque cuentan con pocos representantes entomopatógenos, su uso práctico en el control de plagas se dificulta por su sensibilidad a factores desfavorables de clima y suelo; además algunas especies pueden ser patógenas de vertebrados (Sañudo y Castillo 1994).

De las muestras analizadas en el laboratorio se diferenciaron 67 tipos de colonias distintas de hongos de los cuales la mayor proporción se encontró en el suelo (Figura 9).

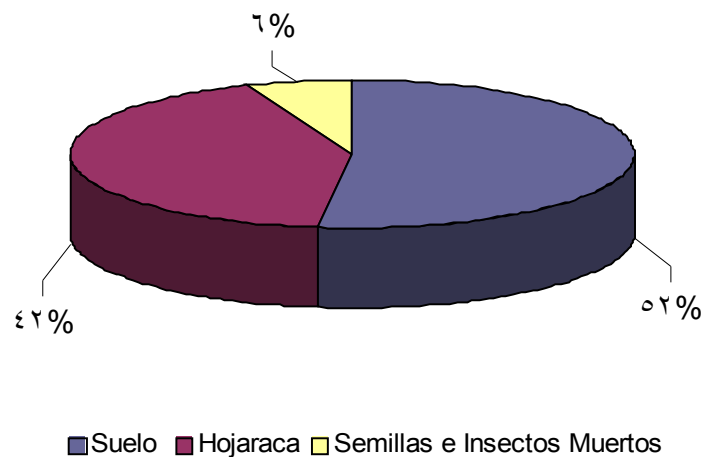


Figura 9. Distribución en porcentaje de hongos analizados de las muestras de suelo, hojarasca e insectos muertos, en Agar Extracto de malta y Agar papa dextrosa.

Del 64% del total de las muestras analizadas se determinaron 10 géneros diferentes de hongos como no entomopatógenos, de los cuales los más comunes fueron: *Penicillium* 19%, *Trichoderma* 16%, *Aspergillus* 10% y *Fusarium* 7%. Se determinó una especie de hongo con reconocido potencial entomopatógeno, aislado a partir de muestras de suelo del cultivo de guanábana en el municipio de Carmen de Apicalá, representando el 1% de los aislamientos, denominado *Paecilomyces lilacinus* (Figura 10). Existe otro estudio en donde la recuperación de entomopatógenos fue muy baja y solamente se encontró a *Beauveria bassiana* como hongo entomopatógeno (Ibarra y Varela 2002). Esto concuerda con estudios realizados por Doberski y Tribe (1980) que mencionan la escasa obtención de entomopatógenos a partir de muestras de suelo lo cual podría explicarse porque en este ocurren procesos de fungistasis, estando por lo tanto, la mayoría del inóculo de los hongos entomopatógenos restringida a cadáveres de insectos hospederos, donde la esporulación puede ser abundante.

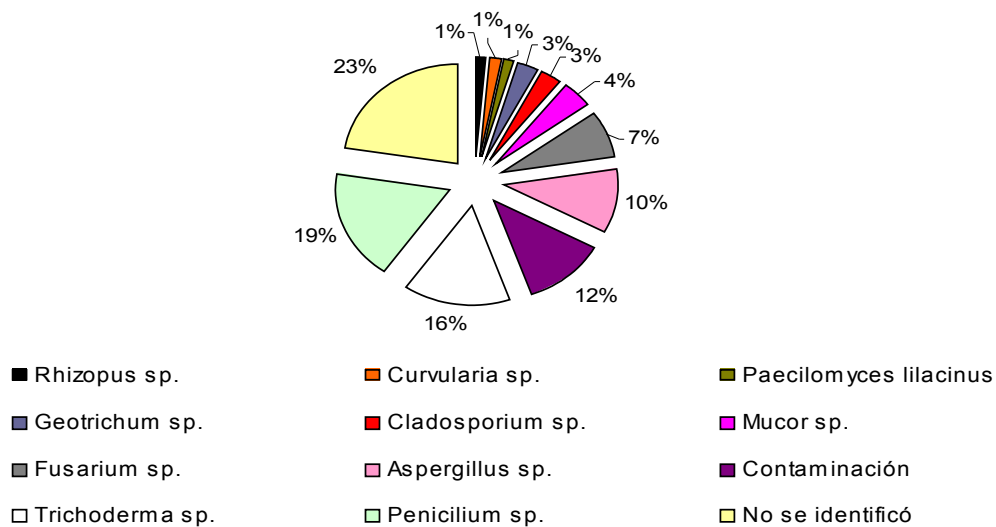


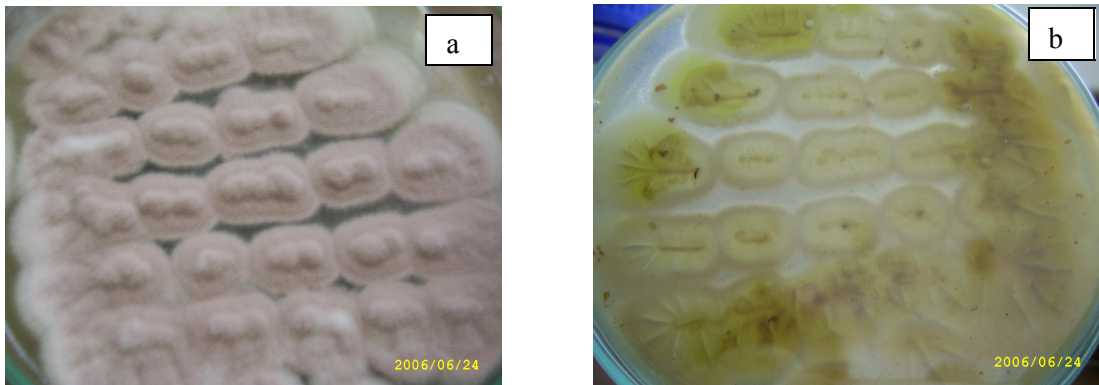
Figura 10. Proporción de los géneros de hongos obtenidos de las muestras de suelo y hojarasca en cultivos de guanábana de los municipios Carmen de Apicalá y Mesitas del Colegio.

Otra razón por la que se encontró solamente a *P. lilacinus* como agente biocontrolador pudo ser por la aplicación de químicos en el suelo que haya disminuido la presencia de hongos entomopatógenos, lo que concuerda con Ibarra y Varela (2002) que mencionan en su estudio que algunos insecticidas presentan actividad negativa contra los hongos, reduciendo su tasa de crecimiento.

6.2. Caracterización morfológica de la cepa *Paecilomyces lilacinus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, dentro de todas las muestras de suelo, hojarasca e insectos analizadas se encontró al hongo *Paecilomyces lilacinus*, el cual se encuentra principalmente en la zona tropical como un hongo del suelo y patógeno de insectos (Domsch *et al.* 1980).

La colonia de *Paecilomyces lilacinus* creció en el medio PDA como una colonia blanca, de textura algodonosa y luego al esporular presentó color lila por el anverso (Figura 11a) y por el reverso se observó de textura rugosa de color amarillo oscuro (Figura 11b). El crecimiento óptimo de este hongo fue a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ entre 5-7 días.



Fotos tomada por Denys Murcia

Figura 11. Morfología de *P. lilacinus* a. morfología macroscópica del anverso de *Paecilomyces lilacinus*. b. Morfología macroscópica del reverso de *Paecilomyces lilacinus* en medio salvado de trigo quitina, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días.

Observaciones realizadas al microscopio con el aumento de 40x permitieron diferenciar las estructuras microscópicas de *Paecilomyces lilacinus* que presentó conidióforos ramificados, hifas septadas, sin métula, fiálides largas hialinas y conidios agrupados en forma de cadena (Figura 12).

Las características de las colonias aisladas en medios de cultivo y la morfología microscópica de las estructuras del hongo corresponden a las descritas por Barnett and Hunter (1972), Domsch *et al.* (1980), por lo cual se ratifica la clasificación de la especie.

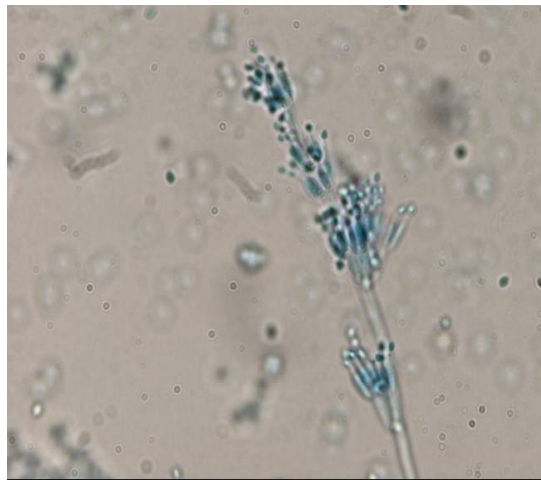


Foto tomada por Mónica Salamanca y Mónica Aguilera

Figura 12. Morfología microscópica de *Paecilomyces lilacinus* con azul de lactofenol con un aumento de 40X.

En este estudio se evaluó la eficacia biológica del hongo *P. lilacinus* sobre las avispas porque los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias no requieren ser ingeridos para infectar a sus hospederos, ya que según Ferron (1978) su mecanismo de acción es la penetración directa a través del integumento, en donde los conidios del hongo se adhieren a los pliegues de la cutícula. Además los hongos entomopatógenos de manera general, son capaces de producir estados sumamente resistentes para asegurar su sobrevivencia durante períodos de condiciones desfavorables en el medio ambiente y son capaces de diseminarse

rápidamente en una población de insectos debido a liberaciones naturales de masas de esporas que son acarreadas por el viento (DeBach 1964).

Aunque no se conocen reportes de *P. lilacinus* parasitando Hymenoptera, sí se han encontrado estudios donde *Paecilomyces* sp. ha sido encontrado como un entomopatógeno en el control de Lepidoptera (Jiménez 1992). Este hongo posee grandes capacidades quitinolíticas como lo describen Dávila *et al.* (1999) en donde identificaron dos especies de *Paecilomyces* (*P. lilacinus* y *P. marquandii*) con capacidad quitinolítica y los clasificaron como posibles controladores biológicos del nematodo nodulador *Meloidogyne incognita*.

Durante el tiempo de estudio se evaluó la capacidad del hongo *P. lilacinus* de generar infección sobre los adultos de *B. maculicollis*. En el bioensayo realizado se encontró que la concentración $6,4 \times 10^7$ conidios/ml causó una mortalidad del 100% de 4 días, mientras que con la concentración de $3,3 \times 10^7$ conidios/ml se obtuvo una mortalidad del 83% en 6 días como se observa en la (Figura 13). Se encontró que la infección y posterior muerte de los adultos tratados, aumentó de acuerdo a la cantidad de conidios/ml infectivos del inóculo aplicado, el cual dio una mayor posibilidad para que la avispa se infectara. Además se evidenció que aunque se trabajó con concentraciones similares se mostró una diferencia notable en el tiempo en que se generó el 100% de mortalidad de las avispas. En caso de utilización de alguna de estas dosis, posiblemente se escogería la menor concentración, ya que representaría menos costos de producción y sólo dos días de diferencia en causar la mortalidad de las avispas. En todo caso antes de tomar la decisión es necesario hacer la evaluación respectiva de ambas dosis.

Si se comparan estos resultados con los de los autores como García y Carballo (1995) quienes determinaron que las cepas de *Metarhizium anisopliae* (M-37, M-32, M-30) y de *Beauveria bassiana* (RL-9 y 447) causaron el 100% de mortalidad y un TL_{50} de cerca de 2 días para *M. anisopliae* y cerca de 5 días para *B. bassiana*. Esto se asemeja a los resultados encontrados en este bioensayo.

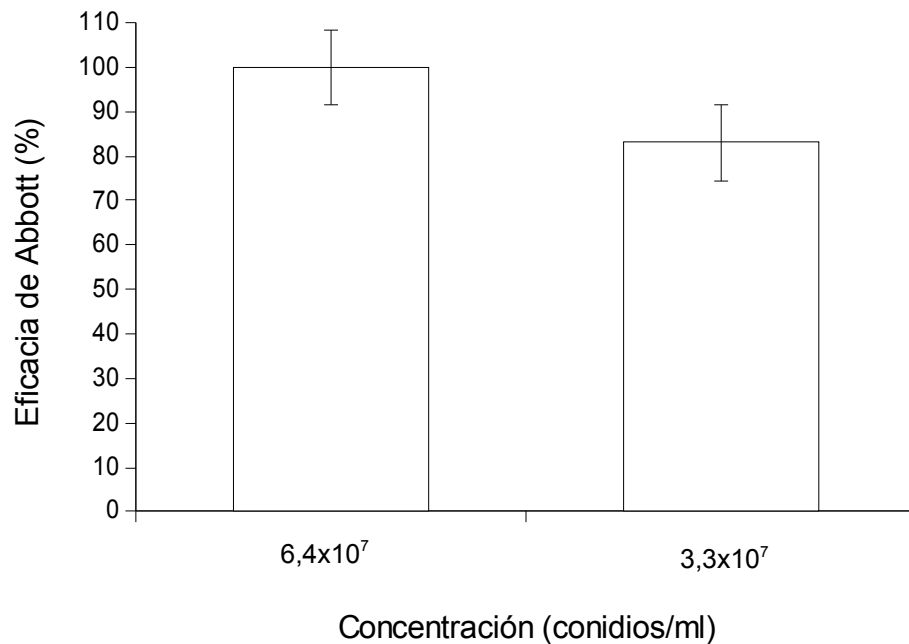


Figura 13. Efecto biocontrolador en condiciones confinadas en campo sobre adultos de *B. maculicollis* de la cepa *P. lilacinus*, con base en el porcentaje de mortalidad corregida Abbot a los 6 días, a 25-28°C.

Durante el desarrollo de este estudio las concentraciones del hongo fueron evaluadas bajo las mismas condiciones ambientales de temperatura (25-28°C) y humedad relativa (60-80%) del lugar de donde era originaria la cepa. Debido a que se manejaron condiciones similares, los resultados de este bioensayo permiten suponer que una evaluación en campo con este hongo arrojaría porcentajes de control similares.

Se utilizaron dos concentraciones dentro del mismo orden de magnitud debido a que por las condiciones del estudio en campo se manejó el patrón de McFarland el cual presenta una estandarización dentro un mismo rango de magnitud. Los resultados mostraron que no se necesitó de una concentración más alta, puesto que se ha determinado que *Paecilomyces* sp. a una concentración de 10^7 conidios/ml controla más del 50% de la población del nematodo *Meloidogyne javanica* después de las 72 horas de incubación (Dávila *et al.* 2002). Aunque este resultado es para un

nematodo que tiene componentes de cutícula diferentes, proporciona una guía para determinar la concentración y tiempo de acción del hongo en estudio.

En otros reportes en que se evaluó la patogenicidad de *Fusarium* sp. sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, se encontró una mortalidad del $62,5 \pm 9,57\%$ en un tiempo promedio de $5,5 \pm 3,03$ días. Este tiempo concuerda con el de evaluación de este estudio con *P. lilacinus*, de tal manera el control de la plaga será eficiente, al causar una muerte relativamente rápida de los insectos plaga (Diaz *et al.* 2003).

Asimismo existen reportes de control biológico de insectos plaga en donde las concentraciones entre 10^7 y 10^8 conidios/ml son efectivas para controlar más del 50% de cada una de las poblaciones evaluadas (Espinel *et al.* 1998, Alean 2003). En este experimento se utilizó una concentración dentro del orden de magnitud de 10^7 conidios/ml, la cual se presenta como una alternativa adecuada para la reducción de costos de producción, debido a que un formulado con mayores concentraciones incrementa los costos. Además la concentración de 10^7 conidios/ml se encuentra entre los rangos de los formulados comerciales que varía entre 10^7 - 10^{10} conidios/ml. Un producto formulado con base en este hongo tendría aún una mayor eficacia, ya que las esporas estarían protegidas.

La mortalidad del control fue de 44% al día 6, tiempo en el cual finalizó la evaluación del tratamiento 1 con el 83% de la mortalidad y en el tratamiento 2 la mortalidad del control fue de 17% al cuarto día, en el que finalizó la evaluación al alcanzarse un 100% de mortalidad; esto indicó que fue un buen control ya que no superó el 20% de mortalidad de la población en los dos tratamientos. Adicionalmente se tuvieron observaciones diarias del comportamiento de *B. maculicollis*, observándose notorios cambios en su comportamiento como desorientación, menor movimiento, antenas agachadas y pérdida de equilibrio, lo cual se reafirma con lo reportado por Ebratt y Madero (1995) que plantea que algunos de los síntomas iniciales de la enfermedad pueden aparecer cuando el insecto cesa de alimentarse y se nota visiblemente desorientado.

Se evaluó la mortalidad diariamente, tomándose como individuo muerto por hongo al insecto adulto que presentó crecimiento típico del microorganismo aplicado al colocarse en cámara húmeda después de la muerte. De este crecimiento se tomó una muestra y se hizo una siembra en medio PDA a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ entre 5-7 días y se observó en el microscopio las características típicas del hongo aplicado.

El resultado de la colonización de la cepa *P. lilacinus* en adultos de *B. maculicollis* se evidenció con la aparición del micelio a partir del quinto día de la muerte del insecto, al ser colocado en condiciones de cámara húmeda a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. La cepa de *P. lilacinus* esporuló a los 8 días sobre los cadáveres de *B. maculicollis* adquiriendo un aspecto pulverulento (Figura 14).



Foto tomada por Mónica Salamanca

Figura 14. *B. maculicollis* colonizada por el hongo *P. lilacinus* en cámara húmeda a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 8 días.

En los aislamientos de cámara húmeda se identificó en algunos casos el crecimiento de hongos contaminantes como *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp. en el cadáver de algunos de los insectos que son hongos que están presentes en el suelo y el ambiente (Carlile *et al.* 2001).

Lo anterior pudo ser debido a que *P. lilacinus* causó infección a *B. maculicollis* y luego hongos oportunistas del ambiente pudieron colonizar el cadáver, ya que

frecuentemente se encuentran hongos saprófitos en insectos que han muerto por otra causa (DeBach 1964).

Además se conoce que este hongo tiene un amplio rango de hospederos y parasita sobre diversas plagas como chinches y nematodos, lo que lo convierte en un biocontrolador importante dentro del manejo integrado de cultivos (Sánchez y Prager 2001). Esto es muy importante en este estudio ya que puede ser un hongo efectivo para Hymenoptera plaga. También algo importante para destacar es que este estudio se realizó con un aislamiento nativo de *P. lilacinus*, cuyo impacto sobre la microbiota del suelo y sobre la entomofauna sería mucho menor, que en el caso de usar un aislamiento introducido.

Con el hallazgo del hongo entomopatógeno *P. lilacinus* se propone una alternativa para nuevos estudios que amplíen los ensayos a nivel de campo que determinen realmente la concentración que se debe usar para la formulación de un nuevo producto que disminuya el impacto ambiental que está generando *B. maculicollis*.

6.3. Parasitoides encontrados en el estudio

En la búsqueda de adultos de *B. maculicollis* se observaron diariamente las cámaras de emergencia para ver la salida de los mismos. Adicionalmente por este método se encontraron parasitoides que fueron retirados y colocados en frascos de vidrio con alcohol al 70%.

La identificación de estos parasitoides se realizó en el Laboratorio de Entomología de la Pontificia Universidad Javeriana. Estos fueron identificados hasta familia siguiendo la clave taxonómica de Goulet y Huber (1993).

De los frutos de guanábana se obtuvieron cinco familias diferentes de parasitoides pertenecientes al orden Hymenoptera. Los datos parciales presentados aquí, revelan la presencia de una interesante diversidad de parasitoides nativos asociados con la especie plaga (*B. maculicollis*). Sin embargo, se requiere de un estudio más detallado para la confirmación de la identidad de los siguientes organismos:

Suborden: Apocrita, Superfamilia: Evanioidea, Familia: Evaniidae. Esta familia está representada por un número relativamente pequeño de géneros y especies dentro del orden Hymenoptera (Campos y Zambrano 2004), esta familia comprende cerca de 500 especies descritas, actualmente clasificadas en 17 géneros. Este grupo es más o menos de distribución cosmopolita, aunque vale la pena resaltar el poco conocimiento acerca de los hospederos de la gran mayoría de especies tropicales (Madrigal 2001).

En Colombia se estima que existen 6 géneros, *Evania*, *Evaniella*, *Semaemyia*, *Evaniscus*, *Hyptia* y *Decevania*, pero se desconoce el número real de especies. Parasitan ootecas de cucarachas (Campos y Zambrano 2004, Fernández y Sharkey 2006) (Figura 15).



Foto tomada por Iowa State University entomology

Figura 15. Familia: Evaniidae, Suborden Apocrita encontrados en cámaras de emergencia.

Suborden: Apocrita, Superfamilia: Evanioidea, Familia: Aulacidae. Son endoparasitoides de insectos que viven ocultos en ramas o troncos, sus hospederos incluyen varias familias de perforadores de madera, especialmente Coleoptera (Cerambycidae y Buprestidae) e Hymenoptera (Madrigal 2001, Smith 2001).

Superfamilia: Proctotrupeoidea, Familia: Proctotrupidae. Son parásitos solitarios o gregarios de larvas de Coleoptera y Diptera (Borror *et al.* 1989). La mayoría de las

especies son endoparasitoides solitarios de larvas de Coleoptera y Díptera que viven en el suelo, hojarasca o madera en descomposición. Algunas especies parasitan larvas de Mycetophilidae (Madrigal 2001, Fernández y Sharkey 2006) (Figura 16).



Foto tomada por Denys Murcia y Mónica Salamanca

Figura 16. Familia: Proctotrupidae Superfamilia Proctotrupoidea encontrados en cámaras de emergencia.

Superfamilia: Ichneumonoidea, Familia: Braconidae. Los braconidos son cosmopolitas y constituye una de las familias de mayor tamaño dentro de los insectos (Campos y Zambrano 2004) y es considerada la segunda familia más grande de los Himenoptera. Más de 10.000 especies de braconidos han sido determinados y se estima que puede haber de 40.000 a 50.000 especies. En Colombia se han identificado alrededor de 3000 especímenes en las colecciones más representativas del país, reportando 180 géneros distribuidos en 28 subfamilias (Campos 2004).

La gran mayoría son parasitoides primarios de otros insectos (Madrigal 2001) sin embargo algunas especie son parasitoides de ninfas de áfidos (Campos y Zambrano 2004), pero la mayoría de sus hospederos son de los Ordenes Coleoptera, Lepidoptera, Díptera y en menor cantidad Hemiptera, Homoptera y raramente Hymenoptera. Muchos braconidos son ectoparasitoides de hospederos ocultos y otros son endoparasitoides, pero al terminar su período larval o un poco

antes se colocan en la parte externa del hospedero. Algunos son parasitoides solitarios y otros gregarios (Madrigal 2001) (Figura 17).



Foto tomada por Denys Murcia y Mónica Salamanca

Figura 17. Familia: Braconidae Superfamilia Ichneumonoidea encontrados en cámaras de emergencia.

Vale la pena resaltar que los resultados de este estudio son novedosos en la medida que se registra por primera vez de un microorganismo entomopatógeno nativo que genera una mortalidad importante de *B. maculicollis*. En este sentido se da un primer paso para implementar un programa integrado de plagas en el cual se incorpore a *P. lilacinus* como agente de control biológico. De esta manera se reducirían los costos para los agricultores y el impacto negativo en el ambiente por el uso de productos químicos que se viene realizando actualmente para el control de esta plaga. Además sería muy valioso continuar los estudios con este aislamiento de *P. lilacinus* para desarrollar un producto comercial formulado, con el fin de utilizarlo dentro de un programa de manejo integrado de plagas para el control de *B. maculicollis*.

7. CONCLUSIONES

Se encontró un aislamiento de *P. lilacinus* aislado de una muestra de suelo, el cual fue probado por medio de un bioensayo, destacando que se trata de una cepa nativa y se pudo determinar que provoca la muerte de los adultos de la plaga.

Se resalta el hecho que este sería un primer registro de esta especie que podría ser usada como agente de control microbiológico de *B. maculicollis*.

Se encontró que una concentración de $6,4 \times 10^7$ conidios/ml causa una mortalidad del 100% de *B. maculicollis*, en casamalla, en 4 días en promedio, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Dentro de los microorganismos aislados se encontraron bacterias de tipo bacilo, esporulados, en suelo y hojarasca encontrándose en un porcentaje del 2%. Sin embargo estos microorganismos no son adecuados para el control de la avispa porque la gran mayoría invaden a sus hospederos al ser ingeridos.

Se encontraron insectos pertenecientes a las familias: Aulacidae, Proctotrupidae, y Braconidae como posibles parasitoides controladores de *B. maculicollis*, los cuales pueden ser potencialmente utilizados como controladores biológicos de esta plaga.

8. RECOMENDACIONES

Para la protección de los frutos contra los daños de pudrición seca o antracnosis también se debe empezar por controlar las perforaciones del fruto *Bephratelloides*, ya que este insecto origina heridas o perforaciones que permiten la penetración de hongos oportunistas.

Debido a que en el país no se cuenta con un producto registrado con base en hongos entomopatógenos para el control de *B. maculicollis* y dado que *P. lilacinus* es un microorganismo que se encontró en campo, se propone el estudio para la formulación de este hongo probando las dosis de $3,3 \times 10^7$ conidios/ml y $6,4 \times 10^7$ conidios/ml.

Se deben realizar nuevas investigaciones que determinen cuál es la concentración mínima inhibitoria del hongo *P. lilacinus* que pueda infectar a las avispas adultas de *B. maculicollis*.

En la realización del bioensayo es aconsejable utilizar tierra limpia para evitar la presencia de gusanos, arañas y hormigas que se alimentan del insecto muerto no permitiendo la colección del insecto para el ensayo.

Hacer producción masiva del hongo probando diferentes sustratos con el fin de evaluar cual es el óptimo para la esporulación del hongo y realizar ensayos en campo para determinar su eficacia.

Evaluar el impacto colateral comparativo de *P. lilacinus* sobre otras especies y géneros de Hymenoptera benéficos del cultivo.

Debido a la importancia económica que presenta el control de insectos plaga se sugiere seguir realizando estudios para determinar si los parasitoides

encontrados en el bioensayo pueden llegar a ser usados como controladores biológicos de *B. maculicollis*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATORRE, R. 1994. Desarrollo del control biológico. V Curso de Control Biológico. Programa de entomología. Instituto de Fitosanidad, México, D.F., México. 186 p.

ALEAN, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia Básicas. Departamento de Microbiología agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia. 107 p.

ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C. 1996. Introductory Mycology. Fourth Edition. New York, U.S.A. 869 p.

AMAYA, J.; ROLDÁN, H. 1992. Eficiencia de la protección físico-mecánico a los frutos de guanábano (*Annona muricata L.*) como método de control al ataque de dos insectos plaga en Colombia. Tesis pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 126 p.

ARIAS, M. 2004. Guía de insumos biológicos para el manejo integrado de plagas. Corporación para el desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Harmonia. Cali, Colombia. 111 p.

ATLAS, R.; BARTHA R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 677 p.

ARBELÁEZ, J. 2002. Relación entre la fenología del fruto de guanábano *Annona muricata L.* y el período de oviposición del perforador de fruto *Bephratelloides macullicolis* Cam. (Hymenoptera: Eurytomidae). Tesis pregrado. Universidad Nacional. Facultad de Agronomía. Bogotá, D.C., Colombia. 130 p.

BARNETT, H.; HUNTER, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. California, U.S.A. 241 p.

BARTNICKI, G. 1984. Spore germination in fungi: Basic concepts. In: Roberts, D., Aist, J. (eds.) Infection processes of fungi. A Bellagio Conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. U.S.A. 210 p.

BEGON, M.; HARPER, J.; TOWNSEND, C.; 1986. Ecology individuals, populations, and communities. Blackwell Scientific publications. Sunderland, Massachusetts. 876 pp.

BORROR, J.; WHITE, R. 1970. A field guide to the insects of America North of Mexico. Houghton Mifflin Company Boston. Ohio State University, U.S.A. 404 p.

BORROR, D.; TRIPLEHORN, A.; JHONSON, N. 1989. Study of insects. Sixth Edition. Philadelphia, U.S.A. 875 p.

BURBANO, H. 1989. El suelo: Una visión sobre sus componentes bioorgánicos. Universidad de Nariño. Primera edición. Pasto, Colombia. 447 p.

BUSTAMANTE, E. 1999. Control Biológico de patógenos de plantas. En: Bases tecnológicas del MIP. ICA. Boletín de Sanidad Vegetal 25. Bogotá, Colombia. 68 p.

BUSTILLO, A. 1984. Microorganismos patogénicos a insectos: características y modos de acción. Seminario sobre patología de insectos. Medellín, Colombia. 164 p.

CAMPOS, D. 2004. Avispas parasitoides de la familia Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) de Colombia. En: Insectos de Colombia. FERNANDEZ, F.; ANDRADE, M.; AMAT, G.; Universidad Nacional de Colombia. Vol 3. Bogotá, Colombia. 600 p.

CAMPOS, D.; ZAMBRANO, G. 2004. Estado de conocimiento de las familias *Braconidae* y *Evaniidae* en Colombia. En: Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN. Memorias XXXI Congreso. Bogotá, Colombia. 215 p.

CANTILLO, A.; RUEDA, O. 1986. Reconocimiento e identificación de entomofauna en el cultivo de la guanábana *Annona muricata* en zonas de Lebrija y Florida blanca (Santander). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia. 110 p.

CARDONA, C. 1971. The biology and physical ecology of *Apanteles subandinus* Blanchard (Hymenoptera: Braconidae), With notes on the temperature reponses of *Apanteles scutellaris* Muesebeck and they host, the potato tuberworm. Dissertations (Ph. D. Entomology). University of California. Riverside, U.S.A. 150 p.

CARLILE, M.; WATKINSON, S.; GOODAY, G. 2001. The fungi. Elsevier Academic Press. California, U.S.A. 420 p.

CASTILLO, P.; ACOSTA, N.; CILIEZAR, A. 1995. Control microbiológico de plagas artrópodos. En: Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. DPV-EAP No. 622. Zamorano, Honduras. 105 p.

COTES, A. M. 1994. Selección, producción masiva y formulación de microorganismos biocontroladores de insectos plaga. V Curso de Control Biológico. Bogotá, Colombia. 40 p.

CORPORACIÓN COLOMBIANA INTERNACIONAL. 1999. Guanábana. Ficha Tecnológica. SIESA. Bogotá, Colombia. 20 p.

COYNE, M. 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Capitulo 10. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 416 p.

DÁVILA, M.; ACOSTA, N.; BETANCOURT, C.; NEGRÓN, J. 1999. Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infectados con el nematodo nodulador (*Meloidogyne spp*) en Puerto rico. Journal Agriculture University 83 (3-4): 189-199.

DÁVILA, P.; MARTINEZ, M.; FRANCO, M.; HIO, J. 2002. Evaluación del establecimiento de los hongos *Arthobotryx sp.* *Paecilomyces sp.* En compost vegetal para el control del nematodo *Meloidogyne javanica* en el cultivo de crisantemo (*Drenganthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 126 p.

DAVIES, R. 1991. Introducción a la entomología. Ediciones Mundiprensa. London, England. 449 p.

DIAZ, P.; GOMEZ, Y.; ZENNER, I.; VARGAS, A. 2003. Evaluación de una cepa nativa de *Fusarium sp.* para el manejo de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Revista Colombiana de Entomología 29 (1): 71-76.

DeBACH, P. 1964. Biological control of insect pests and weeds. Chapman and Hall. London, England. 949 p.

DeBACH, P.; ROSEN, D. 1991. Biological control by natural enemies. Second edition. Cambridge, U.S.A. 440 p.

DELGADO, F. 2002. Mecanismos de infección y cuantificación de la actividad de la fenoloxidasa, N-acetilglucosaminidasa, quitinas, y de la toxina Beauvericina de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patogénicos a *Hypothenemus hampei*. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 121p.

DOBERSKI, J; TRIBE, H. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with referent to ecology of *Bauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. British Mycological Society transactions 74(1): 96-100.

DOMSCH, K.; GAMS, W.; ANDERSON, T. 1980. Compendium of soil fungi. Volumen 1. Academic Press. New York, U.S.A. 859 p.

EBRATT, E.; MADERO, C. 1995. Evaluación de hongos entomopatógenos para el control del gusano blanco de la papa *Pemnomotrypes vorax* (Hustache) en el municipio de Motavita Boyacá.. Tesis de pregrado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de ciencias Agropecuarias. Tunja, Colombia. 82 p.

ESCANDÓN, A.; LAMUS, B.; CALDERON, C. 1982. Incidencia de *Bephrata macullicolis camerum*, perforador del fruto del guanábano. Métodos preliminares de control y rentabilidad de la práctica en dos zonas del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ingeniero Agrónomo. Palmira, Colombia. 210 p.

ESCOBAR, W. 1992. Fruticultura Colombiana "Guanábana". Manual de Asistencia Técnica. Número 57. ICA. Bogotá, D.C., Colombia. 100 p.

ESCOBAR, W.; SÁNCHEZ, L. 2000. Control de plagas y enfermedades de guanábano. ICA. Edición Produmedios. Tibaitatá, Colombia. 100 p.

ESPINEL, C.; EBRATT, E.; COTES, A. 1998. Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: *Acrididae*) Revista Colombiana de Entomología 24(1-2):1-5.

FARGUES, J. 1984. Adhesion of de fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity-. In: Roberts, D; Aist J (eds) infection proceses of fungi. A

Bellagio conference, March 21-25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. U.S.A. 110 p.

FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M. 2006. Introducción a los Hymenoptera de la región Neotropical: Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C, Colombia. 893 p.

FERNÁNDEZ, O. 1998. La reproducción de los hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Habana, Cuba. 10 p.

FERRON, P.; ROBERT, P.; DEOTTE, A. 1975. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 25: 335-356.

FERRON, P. 1978. Biological Control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review Entomology* 23: 409-442.

FLORES, A. 1995. Manejo post-Cosecha de Guanábana. Memorias en manuscrito. SENA Regional Tolima, abril 3 al 12 de 1995. Espinal, Colombia. 83 p.

FOURQUE, A. 1992. Famille des anonacees, genre *Annona*. En: *Especies frutierees D"Amerique Tropical fruits* 27 (1): 62-72.

GARCÍA, F. 1992. Estado actual y perspectivas de control biológico de algunos cultivos del Valle del Cauca, Colombia. En: *Sociedad Colombiana de Entomología. II Simposio Nacional sobre Control Biológico*. Palmira, Colombia. 39 p.

GARCÍA, F.; AMAYA, M.; JIMÉNEZ, J. 2004. Parasitoides. En: *Guía de insumos biológicos para el manejo integrado de plagas*. ARIAS, M. Editorial Harmonia. Cali, Colombia. 111 p.

GARCÍA, G.; CARBALLO, M. 1995. Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de *Hyalymenus tarsatus* (Hemiptera: Alydidae) en Macadamia. Manejo integrado de plagas. 36: 7-11.

GILMAN, J. 1963. Manual de los hongos del suelo. Segunda edición. Compañía Editorial Continental, S.A. México, D.F., México. 572 p.

GONZALEZ, M.; POSADA, F.; BUSTILLO, A. 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.

GOULET, H.; HUBER, J. 1993. Hymenoptera of the World: and Identification Guide to Families. Centre for Land and Biological. Resources Research. Ottawa, Canada. 668 p.

GUZMÁN, F. 1988. La guanábana. Federación Nacional de cafeteros de Colombia. Fruticultura tropical. Segunda edición. Palmira, Colombia. 260 p.

GUZMÁN, F. 1997. La deliciosa guanábana. Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Agronómica. Departamento de Producción y Sanidad Vegetal. Ibagué, Colombia. 177 p.

HALL, A.; PAPIEROK, B. 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultura and medical important. Parasitology 84. Institut Pasteur, Paris. 240 p.

HANSON, P.; HILJE, L. 1993. Control Biológico de Insectos. Colección temas de fitoprotección para extensionistas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATLE. Turrialba, Costa Rica. 37 p.

IBARRA, R. 1998. Bacterias entomopatógenas. En: IX Curso Nacional de Control Biológico (Memorias). Sociedad Mexicana de Control Biológico. Río Bravo, Tamaulipas, México. 210 p.

IBARRA, A.; VARELA, A. 2002. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas. Revista Colombiana de Entomología 28 (2): 129-137.

JIMÉNEZ, J. 1992. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plagas. En: Control Microbiano de insectos. Centro de Investigación en Palma de Aceite-CENIPALMA. Editorial Kimpres Ltda. Bogotá, Colombia. 115 p.

KELLER, S. 1987. Arthropod-photogenic Entomophthorals of Switzerland. Conibolus, entomophaga and entomophthora. Sydowia 40: 122-167.

KUNO, G.1982. Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. Universidad del Valle. Departamento de Biología. Cali, Colombia. 178 p.

LONDOÑO, M. 2001. Producción y uso de microorganismos para el control biológico de plagas. En: Uso de microorganismos en la agricultura, materia orgánica: Mito o realidad. Memorias del X congreso de la sociedad Colombiana de la ciencia del suelo. Medellín, Colombia. 189 p.

LÓPEZ, M. 1995. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: Caracterización, Reproducción y Obtención de un biopreparado con efecto nematocida. Tesis de Doctor en Ciencias Agrícola, INISAV, La Habana, Cuba. 80 p.

LÓPEZ, A. 2000. Control Biológico. I Curso Taller Internacional. CORPOICA. Bogotá, Colombia. 125 p.

MADRIGAL, A. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. Requisito para optar a la categoría de profesor titular. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. 459 p.

MADRIGAL, A. 2003. Insectos forestales en Colombia. Biología, hábitos, ecología y manejo. Primera edición. Editorial Mann Vieco Ltda. Medellín, Colombia. 848 p.

MAYEN, S.; NOVO, A.; SORDO, A.; ALVAREZ, V. 1982. Introducción a la Microbiología del suelo. Editorial Pueblo y educación. La Habana Cuba. 150 p.

MILNER, R.; YANDPRIOR, C. 1994. Biological Control. Susceptibility of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* and the wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the fungi *Metharhizium* sp. 165 p.

MIRANDA, I. 1995. Manejo agronómico del cultivo de la Guanábana. Curso sobre frutales de clima medio. CORPOICA. Espinal, Tolima. 19 p.

MIRANDA, D.; ARCE, C.; GOMEZ, L.; BASTO, D.; GUZMÁN, J.; MUÑOZ, A. 1996. Caracterización de cultivos de guanábana (*Annona muricata* L), en la zona Valle del alto Magdalena. CORPOICA. Tibaitatá, Colombia. 189 p.

MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas 63: 95-103.

NADEL, H.; PEÑA, J. 1991. Seasonal oviposition and emergence activity of *Bephratelloides cubensis* (Hymenoptera, Eurytomidae), a pest of *Annona* species in Florida. Environmental Entomology 20(4): 1053-1057.

NELSON, P.E. ; TOUSSOUN, T. ; MARASAS, W. 1983. *Fusarium* species. The Pennsylvania State University. Washington, U.S.A. 193 p.

NOVOA, D. 1996. Memoria Técnica: Informe Estatuto de zonificación de usos del suelo. Planeación Municipal. Alcaldía del Colegio-Cundinamarca. Colombia. 52 p.

NUÑEZ, V. 1980. Reconocimiento y descripción de los principales insectos observados en cultivos de guanábano *Annona muricata L* en algunas zonas del departamento del Valle del Cauca. Tesis Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ingeniero Agrónomo. Palmira, Colombia. 134 p.

NUÑEZ, R.; DELACRUZ, J. 1982. Reconocimiento y descripción de los principales insectos observados en cultivos de Guanábano (*Annona muricata L.*) Acta Agronómica 32: 1-4.

PEDIGO, L. 1996. Entomology and Pest Management. Prentice Hall Inc. Second edition. New Jersey, U.S.A. 679 p.

POSADA, L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Boletín Técnico No.43. ICA. Bogotá, Colombia. 662 p.

RAMÍREZ, F.; LÓPEZ, M. ; GUTIERREZ, A. 1998. Manejo post cosecha y comercialización de guanábano (*Annona muricata L*). SENA. Bogotá, Colombia. 95 p.

REYES, A. 1967. Algunas recomendaciones para el control del perforador de las semillas de anonáceas (*Bephrata* sp. Orden Hymenoptera). Revista. Agricultura Tropical 5: 325-326.

RODRÍGUEZ, S. 1982. Curso de patología de insectos. Conferencias de la Escuela de Postgrado-ICA (proceso de publicación). Bogotá, Colombia. 50 p.

RODRÍGUEZ, D. 1984. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 10 (1-2): 57-64.

RODRÍGUEZ, L. 1994. V Curso de Control Biológico. Memorias. Ed. IMIFAP-SARH. Rio Bravo, México. 103 p.

RODRÍGUEZ, D. 1997. Biología y manejo de chisa. Instituto Colombiano agropecuario, ICA. División de sanidad vegetal. Produmedios. Santa fé de Bogotá, Colombia. 31 p.

SANCHEZ, M., PRAGER, M. 2001. Nociones fundamentales para el manejo ecológico de problemas fitosanitarios. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 43 p.

SANTOCOLOMA, B. 1999. Control de Plagas una alternativa ecológica. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Facultad de Ciencias Agrarias. Editorial UNAD. Primera Edición. Santafé de Bogotá, D.C, Colombia. 196 p.

SAÑUDO, S.; CASTILLO, G. 1994. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias agrícolas. San Juan de Pasto, Colombia. 68 p.

SMITH, D. 2001. World catalog of the family *Aulacidae* (Hymenoptera). Contributions on Entomology, International 4: 263–319.

STILING, P. 1996. Ecology Theories and applications. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 539 pp.

TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 666 p.

THOM, C.; RAPER, K. 1945. A Manual of the *Aspergilli*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, U.S.A. 285 p.

TORRES, H.; ORTEGA, A.; ALCÁZAR, J.; AMES, T.; PALOMINO, L. 1993. Control biológico del gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp) con *Beauveria*

brongniartii. Guía de investigación CIP 8. Centro internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 43 p.

TORRES, R.; LÓPEZ, A. 1997. Estudios básicos para 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

VARGAS, M. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zéller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Tesis pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológica. Lima, Perú. 127 p.

VARÓN, A. 2000. Algunas consideraciones sobre el control biológico de nematodos. En: Taller Internacional de Control Biológico. Corpoica (I curso: Memorias). Santafé de Bogotá, Colombia. 86 p.

VELOZA, J. 1991. Correlación entre el ciclo de vida de *Bephratelloides maculicolis* cam y el fruto de la guanábana *Annona muricata* L. Facultad de Agronomía. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia., Bogotá. 183 p.

VERGARA, R. 1991. Manejo de problemas entomológicos en huertos de guanábana. En: I curso Nacional de guanábana. Asia fruit. Ibagué, Colombia. 173 p.

VOLCY, C. 2004. Lo malo y lo feo de los microbios. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia. 345 p.

WATANABE, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Second Edition. CRC Press. Boca Ratón, U.S.A. 486 p.

WOLLUM, A. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. En: PAGE, A., MILLER, R., and KEENY, D. (eds). Methods for soil analysis. Part 2. Chemical

and microbiological properties. Second edition. American Society of Agronomy. Madison Wisconsin, U.S.A. 1159 p.

ZÁRATE, R. 1981. Principales problemas fitosanitarios del guanábano (*Annona muricata* L) y medidas preliminares de control. En: producción de frutales en el Valle del Cauca. Trabajo de promoción profesoral. Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. Colombia. 98 p.

ZÁRATE, R. 1987. Principales problemas fitosanitarios del guanábano *Annona muricata* L. y medidas preliminares de control. Universidad Nacional, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia. 105 p.

