

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO  
CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Scutigera immaculata***

**JORGE ARMANDO ACOSTA VANEGAS**

**AMANDA VARELA, Ph. D.  
DIRECTORA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA Y VETERINARIA**

**BOGOTÁ D.C.  
Enero 11 de 2006**

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO  
CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Scutigerella immaculata***

**JORGE ARMANDO ACOSTA VANEGAS**

**AMANDA VARELA, Ph. D.  
DIRECTORA**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de  
MICROBIÓLOGO AGRÍCOLA Y VETERINARIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA Y VETERINARIA**

**BOGOTÁ D.C.  
Enero 11 de 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 porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO  
CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Scutigerella immaculata***

**JORGE ARMANDO ACOSTA VANEGAS**

**APROBADO**

---

**AMANDA VARELA, Ph. D.  
DIRECTORA**

---

**Clemencia De La Rotta  
Ing. Agrónoma M. Sc. fitopatología**

---

**César Matamala  
Ing. Agrónomo**

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO  
CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Scutigerella immaculata***

**JORGE ARMANDO ACOSTA VANEGAS**

**APROBADO**

---

**Angela Umaña Muños M.Phil**  
**Decano Académico**  
**Facultad de Ciencias**

---

**Luis David Gómez MS.c**  
**Director de Carrera**  
**Microbiología Agr. y Vet.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para concluir este trabajo.

A mi familia, por el apoyo brindado en el transcurso de mi vida universitaria para lograr mis objetivos.

A mi directora Amanda Varela, por el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí para realizar este trabajo.

Al profesor Jairo Pérez, por sus múltiples consejos y enseñanzas.

Al laboratorio de ecología de suelos y hongos tropicales por la colaboración logística para el desarrollo del trabajo.

A la Sra. Claudia Salgado y al Sr. Jose Londoño del laboratorio Agrobiológicos L & M Ltda. Por la colaboración y ayuda en la utilización de sus productos e instalaciones.

A los cultivos de flores: Flores La Plazoleta C.I. Ltda. y Finca La Planta por permitirme el ingreso para la realización de los muestreos para la obtención de los sinfílicos en los bloques de las instalaciones de estas empresas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	15
<b>1.1 CONTROL BIOLÓGICO</b> .....	15
<b>1.2 LOS SINFÍLIDOS</b> .....	16
1.2.1 Clasificación .....	16
1.2.2 Descripción .....	17
1.2.3 Ciclo de vida .....	19
1.2.4 Reproducción .....	19
1.2.5 Aspectos biológicos .....	20
1.2.6 Distribución vertical .....	20
1.2.7 Distribución horizontal .....	21
1.2.8 Hábitos alimenticios .....	22
1.2.9 Síntomas y daños .....	22
1.2.10 Aspectos sobre manejo de <i>S. immaculata</i> .....	23
1.2.11 Importancia económica .....	24
<b>1.3. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS</b> .....	24
1.3.1. Historia .....	24
1.3.2. Importancia .....	25
1.3.3. Modo de acción .....	26
1.3.4. Toxinas entomopatógenas .....	27
1.3.5. Especificidad .....	28
1.3.6. Patogenicidad .....	28
1.3.7. Estabilidad y persistencia en el ambiente .....	29
1.3.8. Taxonomía .....	30
1.3.9. <i>Beauveria bassiana</i> .....	31
1.3.10. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	32
1.3.11. <i>Paecilomyces lilacinus</i> .....	33
1.3.12. <i>Lecanicillum lecanii</i> .....	34
<b>2.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>3.1 OBJETIVOS GENERALES</b> .....	36
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	36
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
4.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	37
4.2. CAPTURA DE LOS SINFÍLIDOS .....	37
4.3. CONFINAMIENTO Y CRÍA DE LOS SINFÍLIDOS .....	39

4.4. Obtención de las cepas de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> , <i>L. lecanii</i> y <i>P. lilacinus</i> .	40
4.5. CAPACIDAD CONTROLADORA POR PARTE DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.	41
4.6. CONCENTRACIÓN LETAL 50.....	44
4.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	44
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1. MÉTODOS DE CAPTURA DE SINFÍLIDOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2. CRÍA DE LOS SINFÍLIDOS</b> .....	<b>46</b>
<b>5.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD</b> .....	<b>46</b>
<b>5.4. CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL<sub>50</sub>)</b> .....	<b>58</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>63</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>72</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sinfílido Adulto ( <i>Scutigerella immaculata</i> ).....	18
Figura 2. Trampas cebo compuestas por rodajas de remolacha y círculos de plástico negro usadas para la captura de los sinfílidos. ....	38
Figura 3. Confinamiento y cría de los sinfílidos bajo invernadero en las instalaciones de Agrobiológicos L&M Ltda.....	39
Figura 4. Aislamientos de cepas puras de los hongos <i>L. lecanii</i> (a), <i>P. lilacinus</i> (b), <i>B. bassiana</i> (c) y <i>M. anisopliae</i> (d) en medio PDA, incubados durante 8 días ,a una temperatura de 22-23°C . ....	41
Figura 5. Frasco de compota con los sinfílidos, empleado para los diferentes tratamientos.....	42
Figura 6. Diagrama de la ubicación del muestreo aleatorio para la ubicación de las trampas cebo en las naves y camas de los bloques (invernadero). ...	45
Figura 7. Montaje de los sinfílidos en el medio PDA y crecimiento de los hongos que mostraron patogenicidad sobre estos.....	47
.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 8. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar del ensayo inicial y ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de <i>L. lecanii</i> bajo condiciones de laboratorio. ....	48
Figura 9. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar del ensayo inicial y ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de <i>L. lecanii</i> en invernadero.....	49
.....	50
Figura 10. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo para el hongo <i>L. lecanii</i> .....	50
Figura 11. Comportamiento del porcentaje de mortalidad y desviación estándar de los ensayos iniciales y posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de <i>M. anisopliae</i> bajo condiciones de laboratorio. ...	51
Figura 12. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar de las ensayos iniciales y posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de <i>M. anisopliae</i> en invernadero. ....	52
Figura 13. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo para el hongo <i>M. anisopliae</i> .....	53
Figura 14. Comportamiento del porcentaje de mortalidad y desviación estándar de las ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de la combinación de <i>M. anisopliae</i> y <i>L. lecanii</i> en laboratorio. ....	54
Figura 16. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo de la mezcla <i>M. anisopliae</i> y <i>L. lecanii</i> .....	56
Figura 17. Cajas y bigotes de las medias y desviación estándar de los hongos <i>L. lecanii</i> , <i>M. anisopliae</i> y la combinación de estos en laboratorio. ..	57
Figura 18. Cajas y bigotes de las medias y desviación estándar de los hongos <i>L. lecanii</i> , <i>M. anisopliae</i> y la combinación de éstos en invernadero. ....	58

Figura 19. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) empleando la ecuación  $Y = MX + B$  para el hongo *L. lecanii* en laboratorio e invernadero. ....60

Figura 20. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) empleando la ecuación  $Y = MX + B$  para el hongo *M. anisopliae* en laboratorio e invernadero. ....61

Figura 21. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) empleando la ecuación  $Y = MX + B$  para la combinación *M. anisopliae*+*L. lecanii* en laboratorio e invernadero. ....62

## RESUMEN

El sinfílido *Scutigerella immaculata* es un artrópodo considerado en Colombia como una importante plaga de interés económico en el cultivo de flores y otros cultivos. En el presente trabajo se estableció la captura y cría de *S. immaculata* con el fin de evaluar la actividad patogénica de aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes instares del sinfílido con el objeto de determinar el potencial como controlador biológico de éstos hongos, como una alternativa de manejo de la plaga. Concentraciones de  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml fueron inoculados sobre 10 sinfílicos de diferentes instares, contenidos en suelo previamente esterilizado. Los montajes de los diferentes tratamientos se establecieron tanto a nivel de laboratorio como bajo condiciones de invernadero. A partir de los resultados obtenidos se pudo establecer la capacidad controladora por parte de los hongos entomopatógenos *L. lecanii* y *M. anisopliae* en la concentración  $10^{11}$  conidios/ml. Los otros dos hongos no mostraron patogenicidad contra los sinfílicos. Para *L. lecanii* el mayor porcentaje fue de 37.5% en laboratorio y 15% en invernadero, para *M. anisopliae* fue de 35% en laboratorio y 17.5% en invernadero. Se estableció un mayor porcentaje de mortalidad empleando la combinación de los hongos *L. lecanii* y *M. anisopliae* (55% en laboratorio y 42.5% en invernadero). El agente causal de la letalidad de los sinfílicos se comprobó mediante la siembra de los individuos muertos en el medio de cultivo (Agar Papa Dextrosa), observándose el desarrollo del hongo inoculado en el tratamiento respectivo. La concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) se determinó para *L. lecanii* como de  $7 \times 10^{14}$  conidios/ml, para *M. anisopliae*  $1 \times 10^{15}$  conidios/ml y para la combinación de los hongos en  $8 \times 10^{14}$  conidios/ml. A partir de estos resultados, el uso de estos hongos en aplicaciones frecuentes podrían implementarse dentro de un sistema de manejo integrado de plagas en cultivos de flores y, de este modo establecerse como un método de control más amigable con el medio ambiente.

## ABSTRACT

The symphyla *Scutigera immaculata* is an arthropod considered in Colombia as an important pest of economic interest in the flowers cultivation and other crops. The present work established the capture and breeding of *S. immaculata* with the purpose of evaluating the activity pathogenic of isolations of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Lecanicillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* on different instars of the symphyla in order to determining the potential as biological controller of these fungus, like an alternative of handling of the plague. Concentrations of  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  and  $10^{11}$  spores/ml were inoculated on 10 symphylans of different instars, in previously sterilized soil. Treatments were applied at laboratory level and under greenhouse conditions. It was found a higher percentage of mortality of symphylans with the fungi *L. lecanii* and *M. anisopliae*  $10^{11}$  conidia/ml. *B. bassiana* and *P. lilacinus* were not pathogenic against the symphylans. For *L. lecanii* the biggest percentage of mortality was of 37.5% in laboratory and 15% in greenhouse conditions and, for *M. anisopliae* it was of 35% in laboratory and 17.5% of mortality in greenhouse. A higher percentage of mortality was obtained using the combination of the fungus *L. lecanii* and *M. anisopliae* (55% in laboratory and 42.5% in greenhouse). The dead symphylans were placed on potato dextrose agar (PDA) for checking that the causal agent was the inoculated fungus. The lethal concentration lethal 50 ( $CL_{50}$ ) was established as for *L. lecanii*  $7 \times 10^{14}$  conidia/ml, as for *M. anisopliae*  $1 \times 10^{15}$  conidia/ml and for the combination of the fungus in  $8 \times 10^{14}$  conidia/ml. Based in these results, it is proposed the use of the combination of these fungi in frequent applications inside an integrated pest and disease management to flower's cultures. In this manner symphylans could be controlled in a more friendly way with environment.

## INTRODUCCIÓN

La floricultura colombiana se desarrolla a partir de la década de 1960, estableciéndose desde entonces como una actividad de rápido crecimiento. Se basa en un modelo de agricultura intensiva, lo que significa uso de tecnologías, insumos y optimización en la utilización del espacio. Esto le ha permitido al país ser el mayor exportador de flores de corte del mundo después de Holanda y lograr que dos de cada tres flores que se venden en Estados Unidos sean colombianas (Asocolflores 2002). Por tal motivo la prevención y el control de las plagas y enfermedades son una preocupación importante para los cultivadores de estas plantas ornamentales.

Las plagas causan pérdidas de cosecha directamente a través de la mortalidad y, frecuentemente causan daños estéticos que reducen la calidad y valor de las plantas (Daughtey 2001). Uno de los problemas limitantes en los cultivos de flores son los sinfílicos, debido al daño radicular que causan en la planta. Los problemas ocasionados por los sinfílicos como plagas en los cultivos han sido mencionados desde el siglo pasado, en Europa y América (Filinger 1931). En los últimos años se ha prestado gran atención sobre éstos habitantes del suelo, debido a los daños que ocasionan no sólo a los cultivos de flores sino también a cultivos de caña de azúcar, café y arroz, entre otros (Rincón 1998).

Los sinfílicos en la Sabana de Bogotá, específicamente en los cultivos de flores, han generado grandes pérdidas en la producción de estas plantas ornamentales como lo son la rosa, el pompón y el crisantemo, entre otras (Asocolflores 1992). Por tanto la evaluación de medidas de control de organismos plagas como los sinfílicos, constituye la posibilidad de estructurar adecuados planes de manejo, debido a que se han desarrollado muy pocos

estudios acerca de éstos y la aplicación de químicos no siempre es una alternativa eficaz para el control.

El uso de hongos entomopatógenos es una de las alternativas empleadas en la actualidad para el control de plagas y enfermedades sustituyendo el uso de medios químicos y las medidas impuestas al mercado por residuos agrotóxicos (Roberts 1981). Aunque el conocimiento del uso de los hongos entomopatógenos para el control de plagas no es muy reciente, sólo en los últimos años ha empezado a recibir la atención que se merece (Alves 1986). Ya es ampliamente conocido el uso de varios hongos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces lilacinus* para el control de una gran variedad de insectos plaga de importancia económica (Rodríguez 1990). Sin embargo no se ha probado si éstos pueden ser una alternativa de control de artrópodos como los sinfílidos, organismos habitantes naturales del suelo, de hábitos alimenticios fitófagos y saprófagos, que pueden convertirse en plaga de plantas.

En este estudio se evaluó la eficacia patogénica de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. lecanii* y *P. lilacinus* como posibles controladores biológicos del sinfílido *Scutigerella immaculada* bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Control biológico

Madrigal (2001) plantea que la agricultura orgánica busca fortalecer los factores naturales de mortalidad de plagas, al formar una verdadera barrera de inmunidad y prevención, donde los factores de resistencia del medio ambiente actúen antes de que los organismos potencialmente perjudiciales lo puedan hacer. La meta no es eliminar de la zona de cultivo los organismos potencialmente perjudiciales, sino controlar el crecimiento de sus poblaciones, con el objetivo de evitar la necesidad de tratamientos o actividades de represión directa (Roatta y colaboradores 1989). En este sentido es útil contar con un remanente de organismos potencialmente plaga, para mantener las poblaciones bajo los niveles críticos, ya que ello permite la supervivencia y reproducción de sus biorreguladores naturales (Asocolflores 2002).

Daugtrej (2001) establece que anticiparse a los problemas por medio de medidas culturales preventivas para el control de las enfermedades, podría establecerse como una medida mucho más efectiva que los tratamientos posteriores al desarrollo de los síntomas. Afirma también, que una vez que los síntomas han aparecido es esencial aplicar tecnologías y medidas apropiadas de control de la plaga junto con los avances en el control biológico de las enfermedades. Dichas medidas aplicables en el invernadero ofrecen igualmente una respuesta contra el daño generado por las diferentes plagas y enfermedades.

Uno de éstos métodos es el control biológico el cual es considerado desde un punto de vista ecológico como una fase del control natural, definiéndose como la utilización de cualquier agente biológico de control natural, por lo

cual DeBach (1984) sugiere que el control biológico debería dividirse en control macrobiológico (con parásitos y depredadores) y control microbiano (con patógenos) para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia. Esto significa que después de identificados, aislados y reproducidos son aplicados en forma dirigida en forma de diluciones o liberados sobre las plagas de los cultivos para que lleven a cabo su acción colonizadora, produciendo antagonismo, enfermedades específicas en los agentes que se desea controlar o ejerciendo actividad predatora o parasitoide, con el propósito de reducir el ataque de las plagas a niveles inofensivos (Suquilanda 2001).

Entre los métodos empleados para el control de insectos plaga está el uso de hongos entomopatógenos, por su papel como biorreguladores naturales de plagas al actuar como parásitos de insectos dañinos (Madrigal 2001). Fargues (1977) establece el uso de los hongos entomopatógenos como una posibilidad de control al constituir una herramienta determinante acorde a los principios naturales en la lucha contra las plagas, ante el problema al que el hombre se enfrenta, provocado en gran medida por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos.

## **1.2 Los sinfílidos**

### **1.2.1 Clasificación**

La clasificación de los sinfílidos ha sido tema de discusión durante muchos años. Para algunos autores *Symphyla* constituye una clase y para otros un orden del Phylum *Arthropoda*. Comstok (1940) los ubica como una clase, con unos pocos géneros conocidos, mientras que Edwards (1990) los considera como un orden, señalando que existen dos familias: *Scutigrellidae* y

Scolopendrellidae. Edwards (1990) señala *también, la amplia riqueza en especies mencionando ocho de la especie *Scutigerella*.*

Según identificación realizada por Evert Linnquist del Laboratorio Biosystematic Research Institute Agriculture Canadá, el sinfílido que ataca los cultivos en Colombia pertenece al género y especie *Scutigerella immaculata*. A esta especie también se le conoce con el nombre de ciempiés de jardín. Su clasificación fue confirmada por el especialista Jhon A. Chemsak, de la Universidad de California, Berkeley, de acuerdo con (Agregado y colaboradores 1993).

Su clasificación taxonómica es la siguiente (Agregado y colaboradores 1993):

Phylum: Artropoda

Clase: Symphyla

Orden: Symphyla

Familia: Scutigerellidae

Subfamilia: Scutigerellinae

Género: *Scutigerella*

Especie: *Scutigerella immaculata*

### **1.2.2 Descripción**

Los sinfílidos son pequeños artrópodos de coloración blanca que miden de 1,2 a 1,5 mm de longitud (Figura 1). **Los individuos adultos son muy delicados y de un color crema suave uniforme, excepto en el área del tracto digestivo (Borror y colaboradores 1989).**



**Figura 1. Sinfilido Adulto (*Scutigera immaculata*).**

La cabeza tiene forma de corazón con partes bucales masticadoras, no poseen ojos, pero sí un órgano postantenal en la base de las antenas. Las antenas son largas y formadas por numerosos anillos con órganos sensitivos en el apéndice y aproximadamente 60 segmentos (Edwards 1990).

Borrer y colaboradores (1989) describen que el cuerpo de los adultos está conformado por 12 segmentos aparentes, uno cefálico y uno anal o telson. Vistos dorsalmente pueden apreciarse entre 15 a 22 segmentos del cuerpo, diferentes formas y patrones según el género. La diferenciación sexual según Edwards (1990) tan sólo puede apreciarse en especímenes montados en alfileres y vistos al estereoscopio. Las patas de los sinfílidos están conformadas por seis segmentos, coxa, trocánter, fémur, tibia, tarso y uñas. Este último segmento es para Snodgrass (1952) el pretarso. De los doce pares de patas, los cuatro primeros se presentan sólo en Scutigerellidae y están reducidos o son vestigiales en otros géneros (Edwards 1990).

### 1.2.3 Ciclo de vida

Los sinfílidos poseen un ciclo de vida similar a la mayoría de miriápodos y son ovíparos. Los huevos son ováricos en vitelio, lo cual permite a la forma embrionaria desarrollarse sin contribución alimentaria de la madre, éstos huevos de color blanco son colocados en masas de 9 a 25 y protegidos por las hembras de depredadores y otros enemigos naturales. *Scutigereilla immaculata* puede ovipositar de 9 a 25 huevos (Edwards 1990).

Agregado y colaboradores (1993) describen las larvas en su primer instar con 10 placas dorsales, 6 pares de patas y tan sólo 6 segmentos antenales. Posteriormente, a los 2 o 3 días se presenta una muda para el segundo instar, que posee 7 pares de patas y 13 segmentos antenales. Después de 10 a 12 días de la muda se llega al quinto instar con 10 pares de patas y 19 segmentos antenales. Luego de 11 a 15 días se produce el sexto instar con 11 pares de patas y 20 a 24 segmentos antenales y el séptimo instar de 13 a 20 días posee conformación definida con 15 placas dorsales, 12 antenales y 24 a 27 segmentos antenales. Duran (1982) sostiene que los adultos mantienen un proceso de muda permanente, las cuales pueden exceder de 50 mudas y las antenas continúan adicionando segmentos durante todo este proceso pudiendo alcanzar 60 segmentos, [pueden vivir durante largos periodos de tiempo, usualmente superando un periodo de longevidad de 4 años \(Vergara 1996\).](#)

### 1.2.4 Reproducción

En cuanto a la reproducción, de acuerdo a Vergara (1996) la especie *S. immaculata* tiene un modo de reproducción complejo. Dallai & Afzelius (2000) describen una estructura conocida como espermatóforo, la cual consiste en una especie de tallo que sale desde la parte anterior de la apertura sexual

del macho; posteriormente esta es adherida al suelo. La hembra toma el esperma de esta estructura y con la ayuda de sus piezas bucales lo deposita a manera de reserva en pequeños depósitos en su boca. Así, cuando va a ovipositar toma el huevo desde su vulva y lo coloca en su boca para fertilizarlo y posteriormente lo coloca en el suelo o en un trozo de planta.

### **1.2.5 Aspectos biológicos**

Conforme a lo propuesto por Ross (1978) los sinfílidos se encuentran en diferentes tipos de hábitats. Es factible hallarlos en suelos con alta humedad, capas profundas de materia orgánica, madera en descomposición, márgenes de estanques o cerca de fuentes de agua. Éstos artrópodos tienen una característica especial y es que la humedad es el principal factor en el proceso de selección y distribución de su hábitat. Algunas especies viven sobre vegetación, en termiteros y nidos de hormigas, así como en cuevas. Pueden abundar en suelos de invernaderos donde las condiciones del medio ambiente son ideales y relativamente estables. *S. immaculata* se encuentra en suelos con estructuras pesadas que favorecen su abundancia. Sus poblaciones son con frecuencia muy numerosas (Walwork 1970).

### **1.2.6 Distribución vertical**

En cuanto a los factores físicos, (Agregado. *et al* 1993) destacan como característica fundamental de los sinfílidos, que éstos requieren de un 100% de humedad para prolongar su supervivencia. Con relación a la temperatura tienen un rango óptimo de 15 °C a 21 °C y pueden soportar temperaturas entre 2° a 28 °C. Debido a la habilidad de penetrar los suelos pueden ser capaces de resistir condiciones adversas por largos periodos de tiempo y luego efectuar la recolonización de las capas superiores de los suelos

cuando las condiciones son más favorables. *S. immaculata* se encuentra hasta 40 cm de profundidad, normalmente ubicándose en los primeros 20 cm, cuando existe una buena cobertura por parte de las malezas y material vegetal que sirve para conservar la humedad y como fuente de alimento. Autores como Michelbacher (1938) los reporta en profundidades de hasta 1,80 m.

### **1.2.7 Distribución horizontal**

Rincón (1998) propone que la especie *S. immaculata* es de amplia distribución y sus poblaciones se encuentran asociadas a dos factores: la distribución del cultivo y las características del suelo que habitan. Peña (1998) establece que la presencia de los sinfílidos se puede asociar a suelos de estructura franca, franco-arcillosa, franco-arenosa, arcillosa, arcillo-limosa y franco arcillo-arenosa. No obstante se considera que los sinfílidos tienen cierta preferencia por los suelos de textura pesada, pero no sometidos a compactación, pues los espacios porosos en aquellos se conservan por mayor tiempo y favorecen el desplazamiento de esta fauna edáfica (Agregado y colaboradores 1993).

Los sinfílidos no cavan galerías en el suelo sino que se desplazan a través de los espacios porosos existentes entre las raíces o por las galerías construidas por otros organismos (Lavelle & Spain 2001); son veloces en sus movimientos gracias a su tamaño y cuerpo blando, huyen rápidamente ante cualquier disturbio como la luz, lo que indicaría un carácter fotofóbico de estos miriápodos (Agregado y Chaparro 1993).

Sus densidades pueden llegar a ser de unos cuantos cientos de individuos hasta  $1,2$  a  $2,4 \times 10^3$  individuos/m<sup>2</sup> (Lavelle & Spain 2001).

### 1.2.8 Hábitos alimenticios

El alimento de los sinfílicos, que son fitófagos y/o saprófagos puede ser a partir de tejidos blandos de la planta, aunque cuando no consiguen este tipo de alimento pueden consumir microorganismos, material vegetal en descomposición y cadáveres de otros invertebrados (Edwards 1990).

*S. immaculata* de acuerdo con Juberthie-Jupeau & Reveillet (1997) son enemigos bien conocidos de muchos cultivos, afectan plantas de interés económico consumiendo hasta 20 veces su propio peso en 24 horas. Entre esta gran variedad de cultivos que describen autores como Agregado y colaboradores (1993) se encuentran: la piña (*Ananas comosus*), la yuca (*Manihota esculenta*), maíz (*Zea maiz*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), guasito (*Guazuma ulmifolia*); entre las plantas arvenses se menciona totorilla (*Cyperus adoratus*), oreganillo (*Turnera ulmifolia*), venturosa (*Lantana armata*), lehecilla (*Euphorbia geniculata*), mastranto (*Hytis sabanarum*) y botoncillo *Biden leavis*.

### 1.2.9 Síntomas y daños

El síntoma de daño en la raíz de los cultivos de flores ocasionado por los sinfílicos se presenta como una reducción del área radical que puede ser leve o severa, en este último caso el sistema radical se pierde ocasionando menor rendimiento de la producción, que puede oscilar entre un 20 y 80% (Abarca & colaboradores 1992).

Según lo descrito por Vergara (1996) *S. immaculata* consume el meristemo subapical radical (tejido meristemático en crecimiento). Como consecuencia del ataque, la planta como mecanismo de supervivencia emite a partir del

periciclo raíces laterales o secundarias, ubicadas en los dos últimos centímetros de la raíz lesionada. Los síntomas se manifiestan porque la planta cesa su desarrollo, presentando por lo tanto enanismo y marchites en las horas de mayor transpiración, ya que hay un desequilibrio hídrico por la reducción y debilitamiento del área radicular (Rincón 1998).

Adicionalmente Duran (1982) sostiene que la presencia de los sinfílicos favorece el ataque de enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp., aunque Abarca & colaboradores (1992) establecen que el ataque, debido al daño generado en la raíz también está asociado a su vez al ataque de fitonematodos y bacterias. También hay una reducción significativa en la duración de la flor después del corte, por producirse un desbalance en el contenido de carbohidratos de la planta.

#### **1.2.10 Aspectos sobre manejo de *S. immaculata*.**

Las prácticas de control de los sinfílicos fueron mencionadas varias décadas atrás. Michelbacher (1938) planteó que la prevención es la mejor alternativa de control, señalando que debe evitarse el traslado natural o artificial de los sinfílicos a zonas libres de la plaga. Umble & Fisher (2003) recomendaron que para evitar el daño de los sinfílicos, una alternativa de control es establecer cultivos susceptibles en suelos libres de la plaga y en caso contrario establecer cultivos pero que no sean susceptibles a la plaga en suelos donde haya presencia de esta. Aunque Rincón (1998) y Agregado y colaboradores (1993) manifiestan que en cuanto al manejo y control de los sinfílicos, este es preponderantemente químico y mencionan entre otros productos comerciales al Benziodixol, Biocardab Gamma BCH, Clorpirifos, Ethoprop, Malathion y carbofuran. Estos productos son aplicados no sólo en

cultivos de flores sino también en semillas y en cultivos de piña y de caña de azúcar.

### **1.2.11 Importancia económica**

El problema generado por *S. immaculata* ha sido de gran preocupación para el sector floricultor. De acuerdo con Duran (1982) la plaga es de gran importancia económica; en el caso de crisantemos y pompones puede afectar la producción en un 30 a 90%. De acuerdo con Peña (1998) por la dinámica poblacional que presenta *S. immaculata* amerita tomar medidas de control con la sola presencia del sinfílido. Esto sumado al creciente interés del mercado mundial por “flores limpias” y a la presión que los grupos ecologistas, particularmente de Europa ejercen para limitar el uso de agroquímicos, especialmente plaguicidas, ha llevado a que muchos floricultores se encuentren empeñados en la búsqueda de tecnologías de producción no contaminantes y en lo posible no químicas, que lleven a establecer una estrategia válida para propiciar la producción florícola de alta calidad y rentabilidad, utilizando tecnologías amigables con el ambiente. Una de estas alternativas es el uso de hongos entomopatógenos, como propone Suquilanda (2001). Peña (1998) recomienda realizar investigaciones sobre posibles enemigos naturales y enuncia a *M. anisopliae* como una posible estrategia de control de los sinfílicos.

## **1.3. Hongos entomopatógenos**

### **1.3.1. Historia**

Desde hace más de un siglo Pasteur ya había pronosticado las ventajas del uso de hongos entomopatógenos, por su papel como biorreguladores de

plagas, al actuar como parásitos de insectos perjudiciales para las plantas (Rosas 1994).

Según Steinhaus (1985) la posibilidad de usar éstos hongos para el control de insectos fue considerada por primera vez en la última parte del siglo XIX. La idea se volvió muy popular durante ese periodo, 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. Baird (1958) indica que algunos de estos intentos tuvieron éxito, estableciendo que las enfermedades fungosas podían ser usadas ventajosamente. Sin embargo, se tuvieron muchas fallas, sin duda debido a que varios investigadores no comprendieron las condiciones necesarias óptimas para la actividad del hongo.

El padre de la patología de insectos Agostino Bassi en 1834 fue quien por primera vez realizó un estudio sobre el agente causal de la enfermedad conocido como muscardina blanca del gusano de seda; [hongo que fue denominado posteriormente como \*B. bassiana\* por Vuillemin en 1912](#) (Steinhaus 1956). Sin embargo, gran parte del mérito por el uso de microorganismos en el control de plagas se atribuye al ruso Metschnikoff, quien en 1878 estudió el control del coleóptero de los granos *Anisopla austriaca* con el hongo *M. anisopliae* (Azevedo & Messias 1985).

### **1.3.2. Importancia**

Alves (1986) resaltó la importancia del estudio de hongos entomopatógenos potencialmente útiles para el control biológico de plagas agrícolas, de jardines [y de vectores de los agentes causantes](#) de enfermedades. Esto debido a la posibilidad de limitar el uso de plaguicidas u otro producto químico con el uso de éstos hongos y así atenuar sus efectos adversos como

contaminantes del ambiente, favoreciendo de esta manera el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas terrestres y la conservación de los recursos naturales.

### **1.3.3. Modo de acción**

La patogénesis se inicia por la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto gracias a interacciones hidrofóbicas entre el conidio y la superficie de la cutícula (Boucias & Pendland 1991). Una infección puede no desarrollarse cuando están ausentes estas interacciones (Hajek & Lejer 1994).

Los conidios son transmitidos por contacto directo. El conidio germina por medio de tubos germinales que penetran directamente el integumento, utilizando presión mecánica y enzimas (proteasas, quitinasas y esterases); la cutícula del insecto es degradada por la acción de estas enzimas (Boucias & Pendland 1988).

La infección se produce a partir de las hifas, las cuales penetran la cutícula y el interior del cuerpo por las cavidades naturales de este, aunque ocasionalmente esta infección puede presentarse por la ingesta de éstos conidios que germinan en el intestino del insecto (Steinhaus 1985).

Los tejidos hipodermales son destruidos y los hongos se multiplican en el hemocele en la forma de filamentos cortos o cuerpos hifales, los cuales son diseminados a todas las partes del insecto destruyendo todos los órganos internos del insecto (Hajek & Lejer 1994).

Al ser esta enfermedad progresiva, el número de células del hemocele disminuye cuando el hongo muestra un incremento. Se producen cambios en la composición del hemocele, pasando de pH ácido a cercano a la

neutralidad; se presenta mayor viscosidad y los aminoácidos desaparecen, especialmente después de la muerte (Fargues & colaboradores 1976).

También suelen aparecer pigmentos rojos (oosporeína) y una gran variedad de toxinas. La muerte del insecto puede ser causada por las toxinas o por el incremento en la viscosidad del hemocele. Después de la muerte las hifas del hongo emergen al exterior (24 a 48 horas), donde bajo condiciones húmedas se produce el conidio (Rodríguez 1984).

#### **1.3.4. Toxinas entomopatógenas**

Roberts y colaboradores (1981) establece que algunos hongos pueden matar a sus hospederos mediante acción tóxica, más que por la invasión del mismo (acción mecánica). Los hongos sintetizan toxinas dentro del hemocele del insecto y también cuando se multiplican en medios líquidos. Según (Pais *et al.* 1981) hasta el momento se conocen tres métodos para probar las toxinas fúngicas sobre los insectos: por ingestión, por contacto a través de la cutícula y por inyección directa al hemocele. Actualmente son varios los metabolitos que se han identificado a partir de filtrados de cultivos de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *Aspergillus sp.*, *L. lecanii*, *Paecilomyces*, *Coryceps* y *Entomophthora* (Hamill & colaboradores 1969). El efecto de las toxinas en la hemolinfa de los insectos es la reducción del movimiento de los componentes de la hemolinfa, lo que impide la rápida formación de los granulocitos permitiendo la multiplicación del hongo dentro de este (Roberts 1981).

### **1.3.5. Especificidad**

El conocimiento de la especificidad de un hongo entomopatógeno es un aspecto esencial que se debe determinar entre los mecanismos de selección de un hongo candidato para usarse como bioplaguicida. De acuerdo con Fargues & Remaudiere (1977) existen factores tanto intrínsecos como extrínsecos que determinan o tienen influencia sobre la especificidad de un hongo. Uno de ellos es la coincidencia espacio-temporal entre el hospedero y el patógeno; otro es la existencia de patotipos de una especie de hongo, que aunque presenten morfología similar, tienen diferente rango de hospederos.

Otros factores que pueden influenciar la infección del insecto por un hongo son el estado fisiológico y la edad de los insectos. (Rosas y colaboradores 1994) indican que algunos hongos pueden infectar un estado biológico del insecto, ya sea el de huevo, larva, pupa o adulto; aunque pueden parasitar más de dos estadios. Sin embargo, las dosis letales de un hongo son diferentes en las distintas edades de un insecto. Lo anterior indica la presencia de cierta resistencia de los insectos ligada a la edad. De igual manera Rosas y colaboradores (1994) señalaron también, que las plantas poseen metabolitos que protegen al insecto de infecciones fúngicas, por lo que la dietas de los insectos influyen en la susceptibilidad de estas infecciones.

### **1.3.6. Patogenicidad**

Lezama en 1994 reservó el término de patogenicidad para su sentido cualitativo, dejando los términos de virulencia y agresividad para el aspecto cuantitativo. En este sentido, patogenicidad se refiere a la capacidad de causar enfermedad o daño, mientras que virulencia es el grado de

patogenicidad de las cepas hacia el hospedero específico, expresado en relación inversa a la dosis del patógeno requerida para causar daño determinado, y agresividad es una función inversa del tiempo requerido por un patógeno para causar un daño, es decir, cuanto menor es el tiempo requerido por un patógeno para causar un daño, mayor es su agresividad. El efecto se mide en términos de mortalidad, como si fuera un insecticida. De acuerdo con (Rosas y colaboradores 1994) el efecto de los hongos sobre los insectos sólo podrá ser medido mediante bioensayo. Por razones estadísticas, el principal objetivo de este es determinar el estímulo necesario para obtener una respuesta de 50% de los organismos de prueba ( $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ ,  $TL_{50}$ , etc.) que refleja dentro de ciertos niveles de probabilidad, el nivel de virulencia y agresividad de la preparación fúngica.

### **1.3.7. Estabilidad y persistencia en el ambiente**

Wilding (1970) determinó que se debe tener en cuenta que la acción de los hongos entomopatógenos está íntimamente ligada a las condiciones ambientales. La temperatura y la humedad son los factores que mayor influencia tienen en la acción de los hongos entomopatógenos. En general la germinación y el crecimiento pueden ocurrir entre 5 a 35° C, pero la temperatura óptima se encuentra entre 20 y 30° C. La alta humedad es esencial para la germinación de los conidios y para que la mayoría de hongos entomopatógenos causen la enfermedad (Roberts & Yendol 1971).  
**INCLUIR ALGO DE SI LA HUMEDAD ES IMPORTANTE EN LA SUPERVIVENCIA DEL HONGO EN EL CAMPO, NO SOLAMENTE DURANTE LA GERMINACION DE LOS CONIDIOS Y PARA CAUSAR LA ENFERMEDAD. ADEMÁS CITAR UN REF.**

La luz del sol (rayos UV) afecta negativamente los hongos entomopatógenos causando la muerte de conidios. Además de las condiciones ya mencionadas, la acción de éstos depende de la densidad de la población del hospedero, condiciones de estrés, su actividad antagonista y sinergismo con otros patógenos y de la constitución genética del patógeno y hospedero (Revelles 1984).

### **1.3.8. Taxonomía**

La forma de clasificar a los hongos se realiza principalmente con base en sus características anatómicas o morfológicas macro y microscópicas (forma de micelio, forma y tamaño de esporas, etc.). En la actualidad se recurren a otros aspectos tales como: el tipo de hospedero, el lugar, las condiciones de temperatura y humedad, la fecha del aislamiento y medio de cultivo donde se desarrolla, entre otros. Pero también se realizan estudios infraestructurales (microscopia electrónica) y análisis bioquímicos, genéticos y biológicos (Lezama 1994). El conjunto de estos estudios permite diferenciar las especies de hongos e inclusive la presencia de cepas, aislamientos o patotipos dentro de una especie de hongo (Roberts 1981).

Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados así (Alexopoulos 1996):

**Phyllum:** Ascomycota

**División:** Deuteromycota

**Clase:** Hyphomycetes

**Orden:** Moniliales

**Género:** *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* y *Lecanicillium*.

### 1.3.9. *Beauveria bassiana*

Este género se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticiliados, algunas veces hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio, el cual presenta forma de zig-zag después de que varios conidios se producen; los conidios son hialinos, redondeados a ovoides con un tamaño de 3-6  $\mu\text{m}$  de largo a 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de ancho; unicelulares y naciendo en pequeños esterigmas (Domsch & Gams 1980). Las colonias crecen de 0,6-2,3 cm en 8 días a 20°C, de color blanco al principio y luego se tornan de amarillo a rosado con una apariencia polvosa con abundantes conidios (Domsch & Gams 1980).

La germinación de los conidios requieren de una temperatura óptima de 25-30°C (mínimo de 10°C y máximo 30°C), el pH óptimo para su crecimiento es de 5,7-5,9 y para la formación de conidios de 7-9 (Domsch & Gams 1980).

Producen la enfermedad de la muscardina blanca. Este término fue empleado por los biólogos franceses para describir un número de enfermedades fúngicas que transforman algunos insectos en momias blancas con un aspecto similar al algodón; el hongo responsable de causar dicha enfermedad es *B. bassiana* (Steinhaus 1985).

Para este género se han reportado especies como *B. brongniartii*, *B. Globulifera*, *B. densa* y *B. tenella* (Domsch & Gams 1980).

Los reportes en Colombia de *B. bassiana* se ha observado este hongo atacando a los insectos de las especies de familias de *Leptinotarsa* (Chrysomelidae), *Glena bisulca* (Geometridae), *Monalonium* sp. (Miridae), *Diatrea* sp. (Pyrilidae), *Panoquina* sp. (Hesperiidae) (Bustillo 1994).

También se han realizado estudios de este hongo para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Álvarez *et al.* 1998, Rivera 1993;

Benavides y Bustillo 2002) y la langosta llanera (*Rhammatocerus shistocercoides*) (Rivera1993).

#### **1.3.10. *Metarhizium anisopliae***

El género *Metarhizium* se caracteriza por presentar conidioforos que forman una capa de esporas: las fialides pueden ser solas, en pares o en manojos; los conidios se producen en cadenas de basipetalos compactados en columnas, son ovoides o cilindricos, unicelulares. Los conidios pueden ser hialinos o ligeramente pigmentados de verde oliva con un tamaño de 7-9  $\mu\text{m}$  de largo y 4,5-5  $\mu\text{m}$  de ancho (Domsch & Gams 1980). Las colonias crecen lentamente alcanzando hasta 2 cm en 10 días a 20°C sobre medio de cultivo sintético.

*M. anisopliae* tiene un óptimo crecimiento a una temperatura de 25° C y puede crecer in Vitro en un rango de pH de 3,3-8,5; se requiere de una alta humedad para que se desarrolle los conidios. La alta presencia de CO<sub>2</sub> y la deficiencia favorece la supervivencia de los aislamientos (Domsch & Gams 1980).

La utilización de *M. anisopliae* ha sido efectiva en la reducción de poblaciones de las plagas de miones de los pastos y miones de caña de azúcar en Brasil. Para el control de insectos se emplea una preparación que contiene conidios de este hongo en las prácticas agrícolas (Moore & Landecker 1996).

En el género *Metarhizium* se han reportado siete especies: *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin; *M. flavoviride* Gams y Rozypal; *M. album* (Petch); *M. pingshaeme* Chem y Giro; *M. guizhousense* Chem y Giro, y *M. taii* Liang y Liu (Liang *et al* 1995). De las especies conocidas *M. anisopliae*, *M. flavoviride*

y *M. album* son las que presentan una mayor gama de hospederos y amplia distribución geográfica (Fegan & colaboradores 1993). *M. anisopliae* es un patógeno facultativo que ataca más de 200 especies de insectos (Fargues 1976). La especie ha sido clasificada en dos variedades sobre la base del tamaño de los conidios: *M. anisopliae* var. *anisopliae* (conidios más pequeños 3,5-9  $\mu$  de largo) y *M. anisopliae* var. *majus* (conidios más largos, en un rango de 9-18  $\mu$ ) (Tulloch 1976, Samson *et al.* 1988). Respecto a los hospederos la var. *anisopliae* muestra un amplio rango de hospederos, y la var. *majus* un rango menor y restringido principalmente al coleóptero *Oryctes rhinoceros* (Gillespie & Claydon 1989). También es distintivo que ambos tipos de *M. anisopliae*, compuéstos llamados destruxinas durante el proceso de patogenicidad (Roberts 1981).

El modo de acción de *M. anisopliae* puede variar tanto en relación con el patógeno como con el hospedero (Ferron 1978). Se encuentran reportes de este hongo en Colombia atacando insectos pertenecientes a las especies de familias de *Glena bisulca* (Geometridae), *Caligo* sp. (Brasolidae), *Aenoelamia varia* (Cercopidae), *Ancognatha* sp. (Scarabidae) y *Clavipalpus* sp. (Melolonthinae) (Rodríguez 1982), *Premnotrypes vorax* (Curculionidae) (Torres 1999).

En otros estudios se encontró al hongo infectando a la langosta llanera *Rhamatocerus shistocecooides* (Álvarez y colaboradores 1997).

### **1.3.11. *Paecilomyces lilacinus***

Los conidióforos del género *Paecilomyces* son ramificados, agrupados o irregulares. Los conidios se encuentran agrupados en forma de cadena. Presenta un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos

de ramificaciones laterales, cada una de las cuales presenta de 2 a 4 divisiones ovaladas antes de los conidios. Estos últimos tienen una longitud de 2,5-3,0  $\mu\text{m}$  y de 2,0-2,2  $\mu\text{m}$  de ancho y presentan coloración lila (Samson 1975). Las colonias crecen de 5-7 cm en 14 días a 25°C presentando un color lila. El crecimiento óptimo para el desarrollo del microorganismo ocurre en un rango de 26-30°C, con un pH de 2-10 (Domsch & Gams 1980).

Entre este género se encuentran las especies *P. marquandii* y *P. fumosoroseum* (Domsch & Gams 1980).

En Colombia se encuentran reportes de este hongo atacando a larvas de *Heliothis* sp. Perteneciente a plagas de la familia Noctuidae, larvas de *Glena bisulca* de la familia Geometridae, *Antiteuchus tripterus* (ninfas y adultos) de la familia Pentatomidae y afectando algunos nematodos de la familia Meloydogine (Bustillo 1984).

La facultad que posee para infectar huevos de nematodos, también se expresa algunas veces sobre nematodos en estados libres o móviles, o sobre hembras sedentarias, pero es más agresivo sobre los huevos (Cabanillas y colaboradores 1989).

### **1.3.12. *Lecanicillum lecanii***

Se caracteriza por presentar conidioforos alargados, ramificados, como mínimo alguna de las ramas verticiladas, conidios hialinos, con un tamaño de 2,3-10  $\mu\text{m}$  de largo y 1-2,6 de ancho. Las colonias crecen de de 1,8-2,2 cm en 10 días a una temperatura de 20°C; presentan blanco a amarillo pálido de aspecto algodonoso (Domsch & Gams 1980).

Este entomopatógeno sólo produce epizootias en climas tropicales o en ambientes de invernadero que se aproximan a condiciones tropicales. Para que el hongo pueda causar infección y esporular se requiere de una alta humedad. Se recomienda el uso de este hongo en programas de control integrado de plagas en cultivos bajo invernadero en los cuales se le puede proporcionar las condiciones ambientales necesarias para ser efectivo (Domsch & Gams 1980).

Se encuentra entre uno de los géneros de hongos entomopatógenos más estudiados; sus infecciones fúngicas son muy comunes en insectos y fáciles de detectar debido a que su cuerpo está cubierto de micelio o cuerpos fructíferos del hongo (Yendol y Roberts 1971).

Entre este género se encuentran las especies *L. nigrescens*, *L. dahliae*, *L. nuvilum*, *L. albo atrum* y *L. tricorpus* (Domsch & Gams 1980).

En Colombia se ha reportado esta especie en cultivos de café atacados por *Coccus viridae*, controlando completamente la población de escama, en las zonas templadas, al igual que se observa un alto porcentaje de control en *Myzus persicae*, *Aphis gossipy*, *Bophylus microplus*, *A. fabae* y mosca blanca (Bustillo 1984). La esporulación de los insectos facilita la dispersión del inóculo en el medio, favorecida por la alta humedad de los invernaderos durante la noche (Hall 1984). Muchas de estas especies producen conidios en mucílago, cadenas de conidios o conidios solitarios, estas suelen encontrarse sobre la superficie de los insectos (Alexopoulos 1996).

## 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe actividad patogénica de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces lilacinus* sobre el sinfílido *S. inmaculata* bajo condiciones controladas?

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos generales

Establecer si los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. lecanii* y *P. lilacinus* pueden ser utilizados como agentes de control biológico del sinfílido *S. inmaculata*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar un método eficiente para la captura de estadios adultos de *S. inmaculata* con el fin de establecer la cría.
- Implementar un método que permita la cría de *S. inmaculata* en diferentes estadios para su uso como hospedero de los hongos entomopatógenos.
- Comprobar si existe algún efecto de control por parte de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. lecanii* y *P. lilacinus* sobre el sinfílido.
- Determinar cuál de los hongos entomopatógenos posee una mayor actividad controladora sobre el sinfílido.
- Establecer la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) por parte de los hongos que ejerzan un control sobre el sinfílido.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Área de estudio**

El estudio se realizó en la finca La Planta, productora de plantas y flores ornamentales, ubicada en el municipio de Machetá, departamento de Cundinamarca, a 2094 m.s.n.m., con una temperatura promedio 17° C y en Flores La Plazoleta C. I., empresa productora y comercializadora de flores ornamentales para exportación, ubicada en la Sabana de Bogotá, departamento de Cundinamarca, a 2614 m.s.n.m., con un temperatura promedio diaria de 13° C. Los muestreos para la obtención de los sinfílicos se llevaron a cabo en los bloques de los invernaderos en donde se presentó con mayor frecuencia la plaga.

La parte experimental en la que se llevó a cabo la cría y el confinamiento de los sinfílicos se realizó en el invernadero de la empresa Agrobiológicos L&M Ltda. y las pruebas de patogenicidad y virulencia de los hongos frente a los sinfílicos se llevaron a cabo a nivel de laboratorio y bajo condiciones de invernadero en las instalaciones de esta empresa y en el laboratorio de Ecología de Suelos y Hongos Tropicales de la Pontificia Universidad Javeriana.

### **4.2. Captura de los sinfílicos**

Para la captura de sinfílicos se emplearon dos métodos: recolección en focos ubicados por los agrónomos de la finca (Muestreo por conveniencia) y trampas cebo para atraer a los sinfílicos en los cultivos de flores tropicales y crisantemo. Estas trampas estaban conformadas por círculos de remolacha

no mayores a 2,5 cm de diámetro colocados en medio de discos de plástico oscuro de 20 cm de diámetro con el fin de evitar la entrada de luz (Figura 2).



**Figura 2. Trampas cebo compuestas por rodajas de remolacha y círculos de plástico negro usadas para la captura de los sinfílidos.**

Estas trampas cebo se ubicaron a 7 cm de profundidad. Se realizó un muestreo aleatorio simple para determinar la ubicación de las trampas en las diferentes naves y camas de los bloques.

El sitio seleccionado para la ubicación de la trampa se demarcó con una cinta de color amarillo para la posterior búsqueda y obtención de los sinfílidos. Se realizó un monitoreo para observar y capturar los sinfílidos en las trampas cada 48 horas durante dos semanas, tiempo en el cual se estimó que se capturarían los sinfílidos necesarios para realizar la cría bajo condiciones controladas.

### 4.3. Confinamiento y cría de los sinfílidos

Después de obtener los sinfílidos a partir de las trampas ubicadas en los bloques, se confinaron en un contenedor oscuro (para evitar la entrada de luz) con un diámetro de 100 x 30 x 30 cm de profundidad. Éstos contenían suelo que se mantuvo húmedo durante el estudio y con un rango de temperatura entre 4°C (temperatura mínima) y 21°C (temperatura máxima) bajo condiciones de invernadero. En este contenedor se sembraron 20 plantas de rosa de las variedades Vogue, Almers gold, y Charlotte, variedades que pueden ser susceptibles al ataque de los sinfílidos, y de esta manera sus raíces fueran usadas como alimento por los sinfílidos, simulando las condiciones en las que el sinfílido se establece en los cultivos de flores para reproducirse (Figura 3).



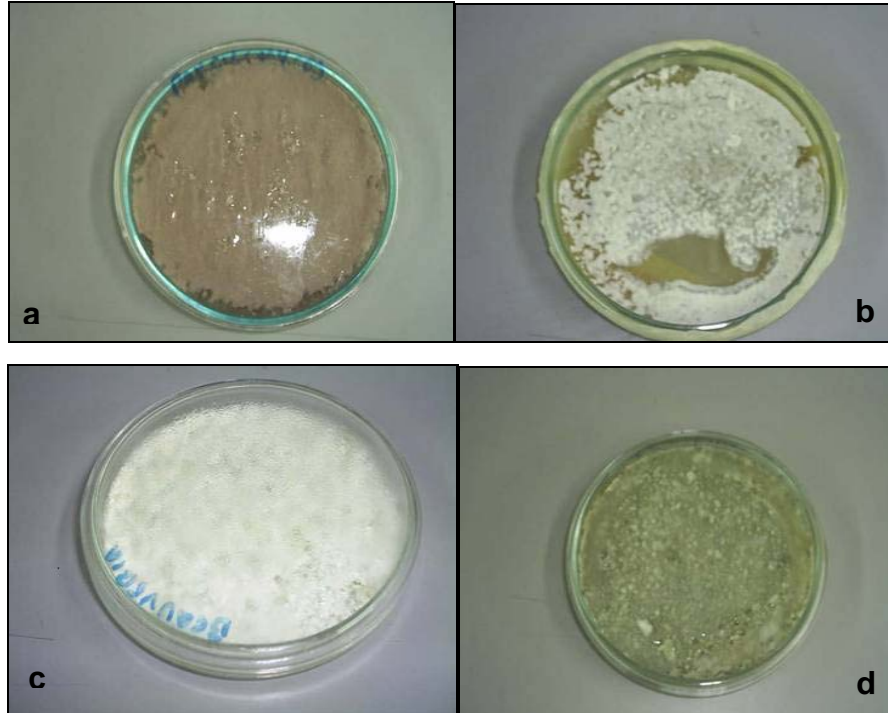
**Figura 3. Confinamiento y cría de los sinfílidos bajo invernadero en las instalaciones de Agrobiológicos L&M Ltda.**

Este procedimiento se llevó a cabo durante 4 meses, tiempo en el cual se obtuvieron sinfílidos en el instar 1 al 7 o adultos. Durante este tiempo se

evaluó el crecimiento y número de retoños de las plantas, al igual que se determinó la temperatura mínima y máxima diaria.

#### **4.4. Obtención de las cepas de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. lecanii* y *P. lilacinus*.**

Se obtuvieron cepas de cada uno de los hongos entomopatógenos (*M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. lecanii* y *P. lilacinus*), a partir de productos biológicos comerciales suministrados por la empresa Agrobiológicos L&M Ltda. Para esto se realizaron siembras de los productos en agar papa dextrosa (PDA) a partir de las diluciones  $10^3$ ,  $10^5$  y  $10^7$  durante 8 días en incubadora a una temperatura de 22-27°C. Luego se observaron las colonias que se presumían pertenecían a los géneros para el estudio de los hongos antes mencionados. Posteriormente se realizó un montaje de éstos hongos en láminas, usando azul de lactofenol y se observaron bajo microscopio. Al determinar el hongo, se inoculó este en el medio (PDA) realizando repiques en el mismo medio de cultivo a una temperatura de 22-27°C durante 8 días y así obtener el microorganismo puro (Figura 4).



**Figura 4. Aislamientos de cepas puras de los hongos *L. lecanii* (a), *P. lilacinus* (b), *B. bassiana* (c) y *M. anisopliae* (d) en medio PDA, incubados durante 8 días ,a una temperatura de 22-23°C .**

Finalmente los hongos fueron conservados en agua estéril para tener un inóculo a partir del cual se pudieran obtener las cepas nuevamente para las diferentes pruebas (Ibarra & Varela 2002).

#### **4.5. Capacidad controladora por parte de los hongos entomopatógenos**

Para llevar a cabo las pruebas de patogenicidad se utilizaron las cepas obtenidas a partir de la metodología anterior, con 8 días de crecimiento y realizando montajes en lámina de cada uno de los hongos en azul de lactofenol, con el fin de ser observadas bajo microscopio para determinar que estuvieran libres de contaminación.

Para los ensayos de patogenicidad se realizó un ensayo inicial (réplica 1) y 2 ensayos posteriores (réplicas 2 y 3), cada uno de estos tanto a nivel de laboratorio como a nivel de invernadero.

El ensayo inicial constó de 4 tratamientos y 4 repeticiones evaluados al nivel de laboratorio y bajo condiciones de invernadero. Los tratamientos utilizados fueron las concentraciones  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  conidios/ml y un control absoluto, teniendo en cuenta que  $10^9$  es la concentración establecida por las formulaciones de los productos de agentes biológicos. Las diferentes concentraciones se obtuvieron realizando diluciones seriadas y realizando recuento de conidios en cámara de Neubauer por duplicado para cada hongo.

Para estas pruebas se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorio (DBCA). La unidad experimental constó de 10 sinfílicos introducidos en frascos de compota con 50 g de suelo esterilizado 4 veces (Figura 5), para cada uno de los tratamientos.



**Figura 5. Frasco de compota con los sinfílicos, empleado para los diferentes tratamientos.**

Posteriormente se adicionó 4,9 ml de cada una de las concentraciones conidiales fúngicas, teniendo en cuenta las dosificaciones establecidas por

los fabricantes de los productos biológicos ( $20 \times 10^9$  conidios/ml) y su aplicación en el suelo (250 g/hectárea). Considerando el área de superficie de suelo adicionado a los frascos de compota (2,5 cm de diámetro). Se adicionó 2 ml de agua destilada estéril cada 2 días para mantener la humedad del suelo dentro de los frascos.

Posteriormente se realizaron 2 réplicas idénticas, cada una de cuales se realizó en diferentes periodos de tiempo. Al igual que el ensayo inicial se evaluaron al nivel de laboratorio y bajo condiciones de invernadero empleando el mismo número de tratamientos y repeticiones y, aplicando la misma metodología mencionada en el ensayo inicial. Los tratamientos empleados en este caso fueron las concentraciones  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  y  $10^{12}$  conidios/ml y un control absoluto, con base en los resultados del ensayo inicial.

Se determinó el porcentaje de mortalidad realizando conteo directo de estos individuos durante los días 8, 9, 10 y 11 a partir del montaje de la prueba. Los individuos encontrados muertos fueron colocados en cámara húmeda durante 8 días a temperatura ambiente ( $18^\circ\text{C}$ ). Posteriormente fueron lavados con hipoclorito al 5,25% por 2 minutos y luego por agua destilada durante el mismo tiempo. Finalmente, fueron secados con toallas de papel estéril, se colocaron en medio PDA generando presión sobre los sinfilidos en el medio para liberar el contenido del interior del individuo y así determinar si el hongo era el verdadero causal de la enfermedad. Se incubaron durante 8 días a una temperatura de  $22-23^\circ\text{C}$ . La presencia del hongo se determinó realizando montajes en láminas con azul de lactofenol y observaciones al microscopio.

#### **4.6. Concentración letal 50**

La determinación de la CL<sub>50</sub> se realizó a partir del seguimiento durante los días 8, 9, 10 y 11 de los diferentes tratamientos con las concentraciones de conidios 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup> y control.

#### **4.7. Diseño experimental y análisis estadístico.**

Se empleó un diseño bloques completamente aleatorizado (DBCA) con dos réplicas, 4 repeticiones por cada tratamiento y un testigo absoluto para cada uno de éstos, es decir, un arreglo factorial 4x5x2, en el que:

5= Número de tratamientos

4= Número de repeticiones

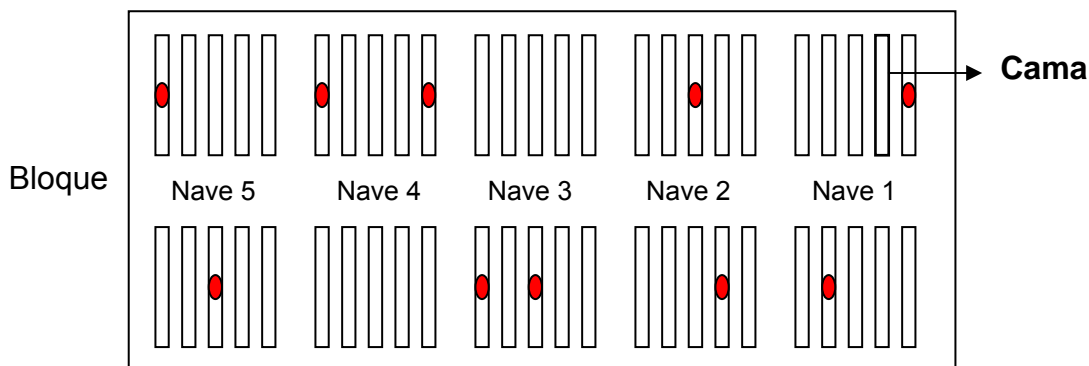
2= Número de réplicas

Para los ensayos de patogenicidad se empleó el diseño de bloques completamente aleatorizado (Steel & Torrie 1988). Posteriormente se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y un análisis de varianza para determinar si hubo diferencias significativas entre tratamientos (Sokal & Rohlf 2001). Finalmente se realizó la prueba comparación múltiple *a posteriori*, para saber cuál tratamiento era el diferente, separando las medias de los tratamientos evaluados, realizando las comparaciones múltiples posibles con el número de tratamientos incluidos en el estudio. Se usó un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas (Zar 1999). La concentración letal 50 se estimó a partir de regresiones lineales a un  $\alpha=0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Métodos de captura de sinfílicos

A partir de los dos métodos de captura de sinfílicos empleados en el estudio, tanto el método directo dirigido por los agrónomos de las fincas, como el muestreo aleatorio simple con el uso de trampas cebo, se pudo recolectar diferentes estadios del sinfílido. Se obtuvo una cantidad total de aproximadamente 540 sinfílicos a partir de los dos muestreos. El muestreo aleatorio simple permitió establecer la ubicación de trampas cebo ubicando dos trampas por cada nave en diferentes camas a los largo de los bloques que presentaban la presencia del sinfílido (Figura 6).



**Figura 6. Diagrama de la ubicación del muestreo aleatorio para la ubicación de las trampas cebo en las naves y camas de los bloques (invernadero).**

Con este método también se pudo determinar la presencia del sinfílido como una manera de monitoreo para éstos, gracias a que las trampas se ubicaron de una manera aleatoria y permitiendo seleccionar una parte representativa de las camas del bloque (invernadero).

## 5.2. Cría de los sinfílicos

La captura de diferentes estadios de los sinfílicos permitió que se desarrollara la cría de sinfílicos de diferentes estadios, bajo condiciones de invernadero y simulando el medio en el cual los sinfílicos se establecen, como fue el uso de plántulas de rosa en suelo propio de invernaderos de producción de rosa de la Sabana de Bogotá. Estos fueron empleados para las diferentes pruebas de patogenicidad. A partir de 540 sinfílicos el número total de estos aumentó a alrededor de 1920 individuos, los cuales fueron empleados en las diferentes réplicas. La temperatura bajo condiciones de invernadero fue medida durante el estudio para determinar si esta temperatura era similar a la temperatura en que se desarrollan los sinfílicos en los invernaderos de la sabana de Bogotá, esta fluctuó entre 5,2 y 36° C. El número de retoños de las plantas de rosa también fue medido con el fin de observar que efectivamente las plantas se establecieron y desarrollaron a lo largo del estudio y de esta manera hubiera un aporte de alimento por parte de estas para permitir el desarrollo de los sinfílicos. Al inicio del estudio, estas plantas presentaban de 2 a 4 retoños y al final del estudio alcanzaron a tener de 14 a 17 retoños, lo cual es un indicativo de su establecimiento.

## 5.3. Pruebas de patogenicidad

A partir de las pruebas iniciales de patogenicidad se pudo establecer el comportamiento de la capacidad patogénica por parte de los diferentes hongos a lo largo del estudio.

Los hongos *B. bassiana* y *P. lilacinus* tanto en los ensayos iniciales (réplica1) como en los posteriores (réplicas 2 y 3) no se observó capacidad patogénica en ninguno de los tratamientos (concentración  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$

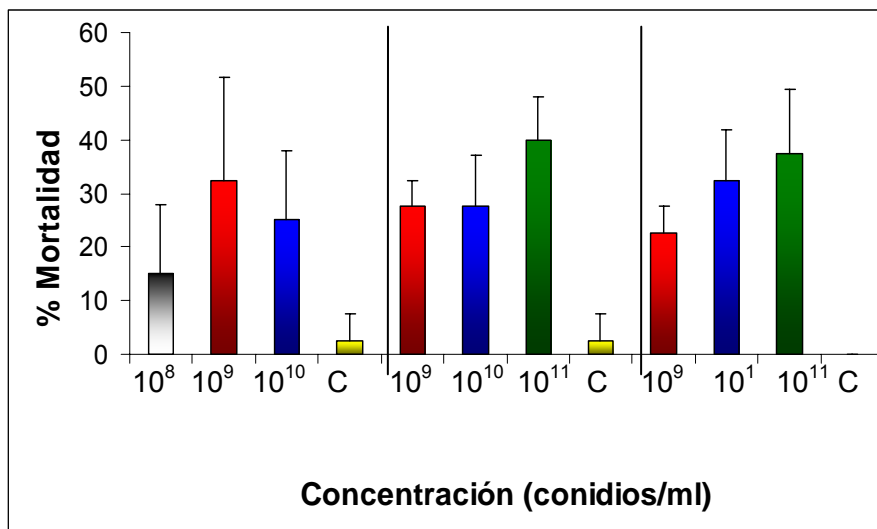
conidios/ml). En el caso de *B. bassiana* no se encontró diferencia alguna con respecto al control debido a que no se presentó mortalidad en los ensayos iniciales ni en los posteriores (réplicas 2 y 3), llevados a cabo tanto en laboratorio como en invernadero. Para el caso de *P. lilacinus* se presentó una mortalidad de 5 individuos muertos (0,78%), en total considerando todos los ensayos.

Para el caso de los hongos *L. lecanii* y *M. anisopliae* se presentó mortalidad de individuos tanto en los ensayos iniciales como en los ensayos posteriores. Esto se evidenció mediante la siembra de los individuos infectados en el medio de cultivo PDA, donde se presentó el crecimiento de los hongos y se realizó la posterior observación sobre éstos montados en láminas con azul de lactofenol y observados al microscopio (Figura 7).



**Figura 7. Montaje de los sinfílidos en el medio PDA y crecimiento de los hongos que mostraron patogenicidad sobre estos.**

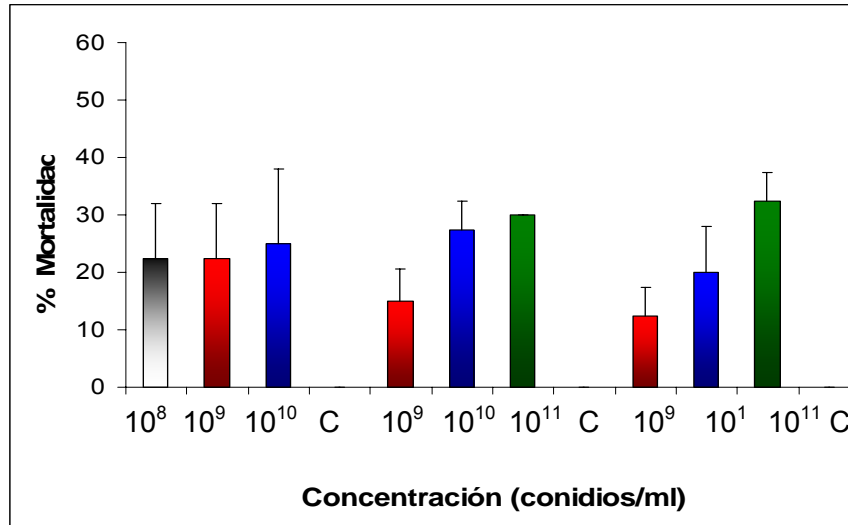
Para el hongo *L. lecanii* se evidenció que a mayor concentración fue mayor el porcentaje de mortalidad. De igual manera se encontró que el mayor porcentaje de mortalidad lo presentó la concentración  $10^{11}$  conidios/ml, con un porcentaje de mortalidad del 27,5 % en la réplica 2 y 37,5% en la réplica 3 (Figura 8).



**Figura 8. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar del ensayo inicial y ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de *L. lecanii* bajo condiciones de laboratorio.**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones evaluadas de *L. lecanii* ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml) en laboratorio ( $H=7,5$ ,  $P 0,02$ ). Al realizar a prueba de comparación múltiple *a posteriori* se encontró que solamente la concentración  $10^{11}$  fue diferente de las otras dos concentraciones ( $P<0,05$ ), la cual generó la mayor mortalidad.

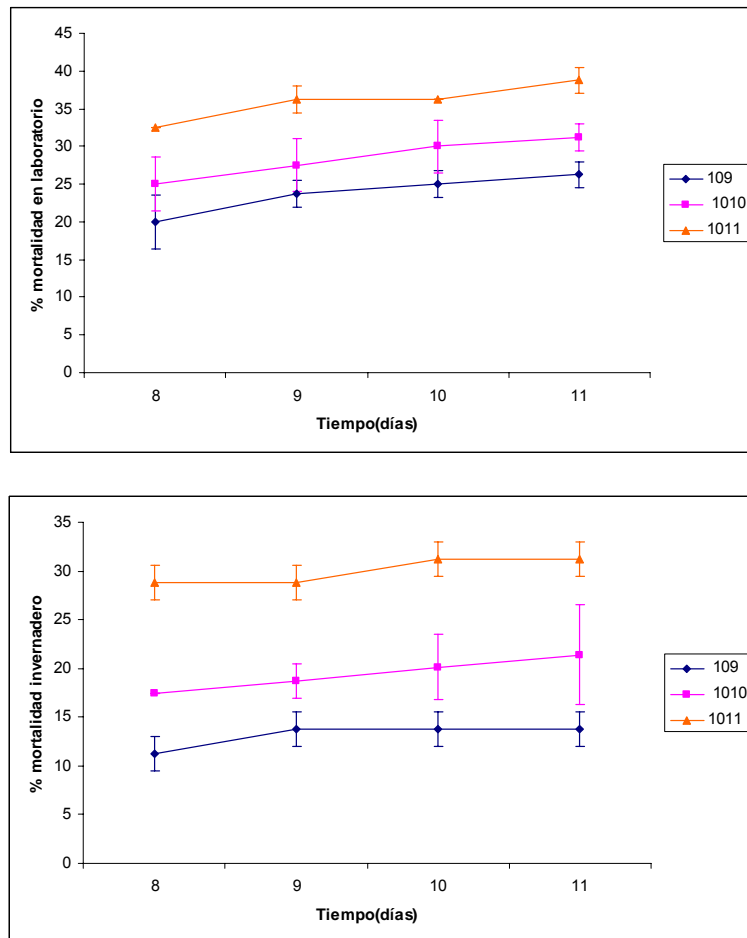
En invernadero en las pruebas con *L. lecanii*, se encontró que en los ensayos posteriores (réplica 2 y 3) el mayor porcentaje de mortalidad se presentó en la concentración  $10^{11}$  conidios/ml: 15% en la réplica 2 y 12,5% en la réplica 3 (Figura 9). Estos porcentajes fueron inferiores a los presentados en las pruebas de laboratorio.



**Figura 9. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar del ensayo inicial y ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de *L. lecanii* en invernadero.**

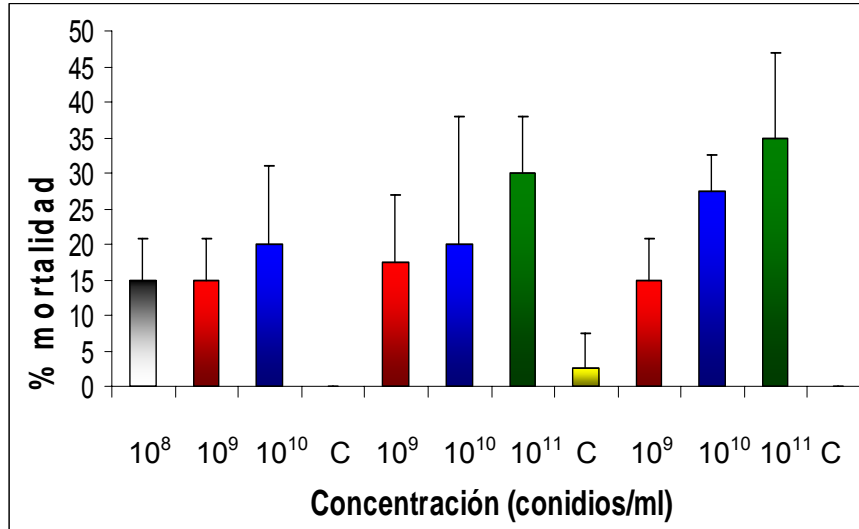
Con respecto al comportamiento del hongo en invernadero, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comprar los 3 tratamientos ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml) ( $H=15,5$ ,  $P 0,0004$ ). La concentración  $10^{11}$  conidios/ml fue la diferente ( $P<0.05$ ), siendo la que presentó mayor porcentaje de mortalidad.

El mayor porcentaje de mortalidad con respecto al tiempo en los diferentes tratamientos de los ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) se observó en el día 8. En los siguientes tres días, el porcentaje de mortalidad no mostró un incremento notorio (Figura 10).



**Figura 10. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo para el hongo *L. lecanii*.**

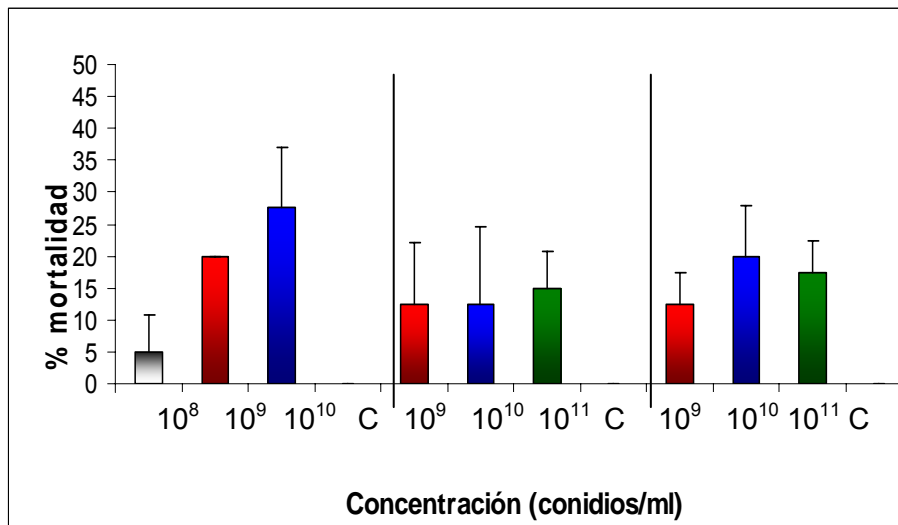
El hongo *M. anisopliae* en laboratorio mostró un mayor porcentaje de mortalidad en la concentración mas alta ( $10^{11}$  conidios/ml), con porcentajes de 30% en la réplica 2 y 35% en la réplica 3 con respecto a las otras dos concentraciones ( $10^9$  y  $10^{10}$  conidios/ml), tal como lo muestra la Figura 11.



**Figura 11. Comportamiento del porcentaje de mortalidad y desviación estándar de los ensayos iniciales y posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio.**

Para los tratamientos con el hongo *Metarhizium anisopliae* ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml) en laboratorio no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre éstos tratamientos ( $H=4$ ,  $P=0,03$ ). En la prueba de comparación múltiple la concentración  $10^9$  conidios/ml fue la concentración diferente ( $P<0,05$ ), siendo esta la que presentó menor porcentaje de mortalidad.

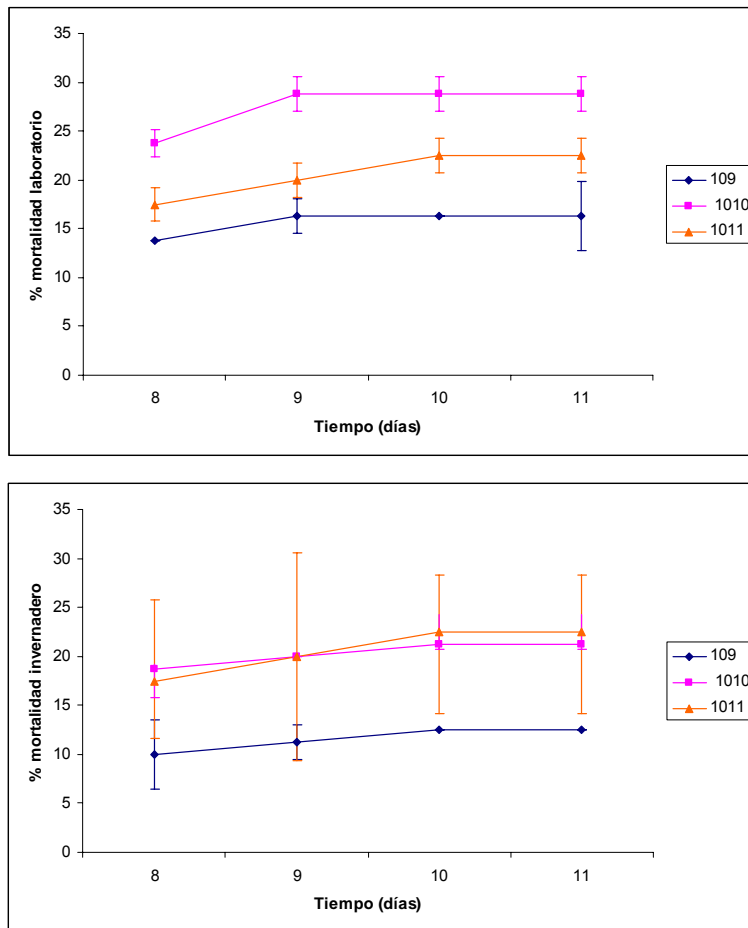
*M. anisopliae* en invernadero a diferencia de las condiciones de laboratorio, presentó un porcentaje menor de mortalidad. La concentración intermedia ( $10^{10}$ ) mostró un porcentaje de mortalidad del 15% para la réplica 2 y un 17,5% para la réplica 3 (Figura 12).



**Figura 12. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar de las ensayos iniciales y posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de *M. anisopliae* en invernadero.**

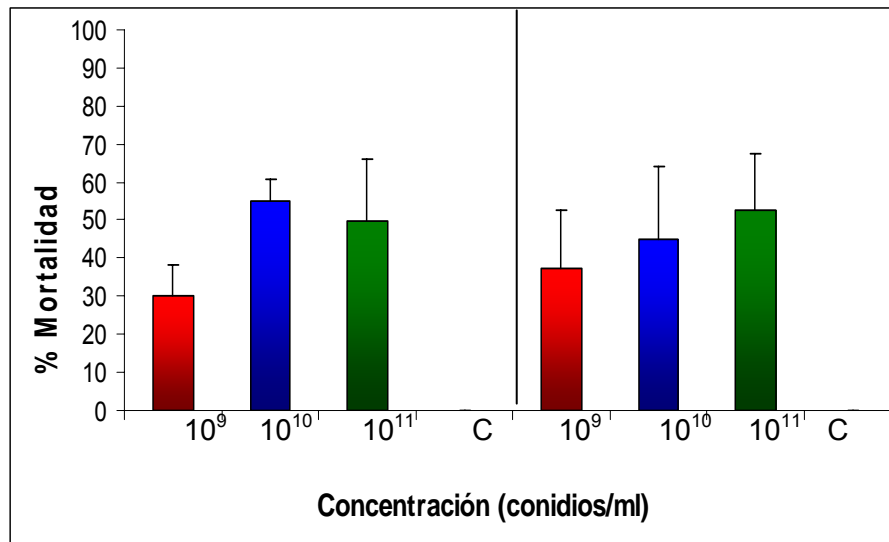
En cuanto las pruebas en invernadero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $H=3.8$ ,  $P 0.14$ ) entre los tratamientos ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml).

El mayor porcentaje de mortalidad en el tiempo en los diferentes tratamientos de las réplicas 2 y 3 al igual que *L. lecanii* se observó en el día 8, en los siguientes tres días, el porcentaje de mortalidad no tuvo un incremento importante (Figura 13).



**Figura 13. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo para el hongo *M. anisopliae*.**

La combinación de los hongos *M. anisopliae* y *L. lecanii* mostró porcentajes más altos de mortalidad con respecto a la aplicación de estos hongos de manera individual. A mayor concentración fue mayor el porcentaje de mortalidad. El porcentaje más alto en laboratorio lo presentó la concentración media ( $10^9$  conidios/ml) con un porcentaje de 55% en la réplica 2 y 52,5% en la réplica 3, como se observa en la Figura 14.

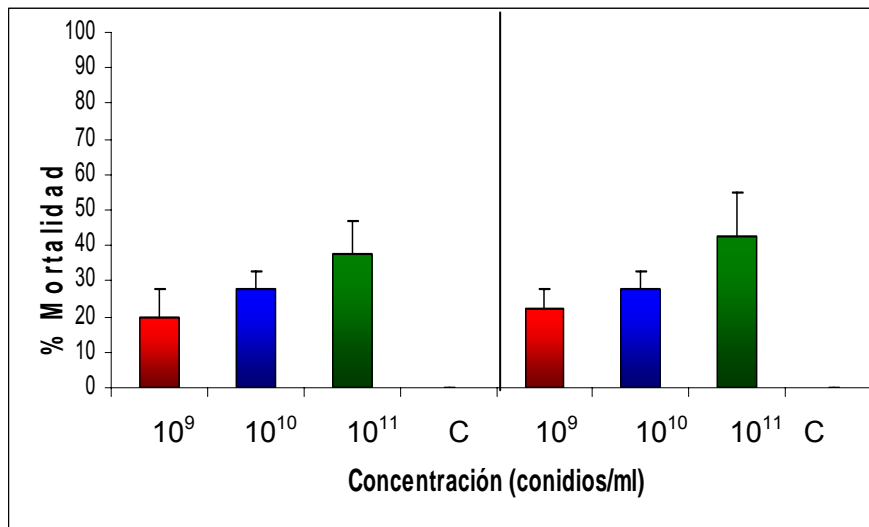


**Figura 14. Comportamiento del porcentaje de mortalidad y desviación estándar de las ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de la combinación de *M. anisopliae* y *L. lecanii* en laboratorio.**

Se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml) de la combinación de los hongos *L. lecanii* y *M. anisopliae* en laboratorio ( $H=6,4$ ,  $P 0,03$ ). En la prueba de comparación múltiple *a posteriori* se observó que las concentraciones  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml fueron las concentraciones diferentes ( $P<0,05$ ) siendo estas las que presentaron mayor porcentaje de mortalidad.

En el comportamiento de la combinación *M. anisopliae* y *L. lecanii* en invernadero se observa que a mayor concentración mayor porcentaje de mortalidad (Figura 15). En la concentración mayor ( $10^{11}$  conidios/ml) se encontró el mayor porcentaje de mortalidad (37,5% réplica 2 y 42,5% réplica

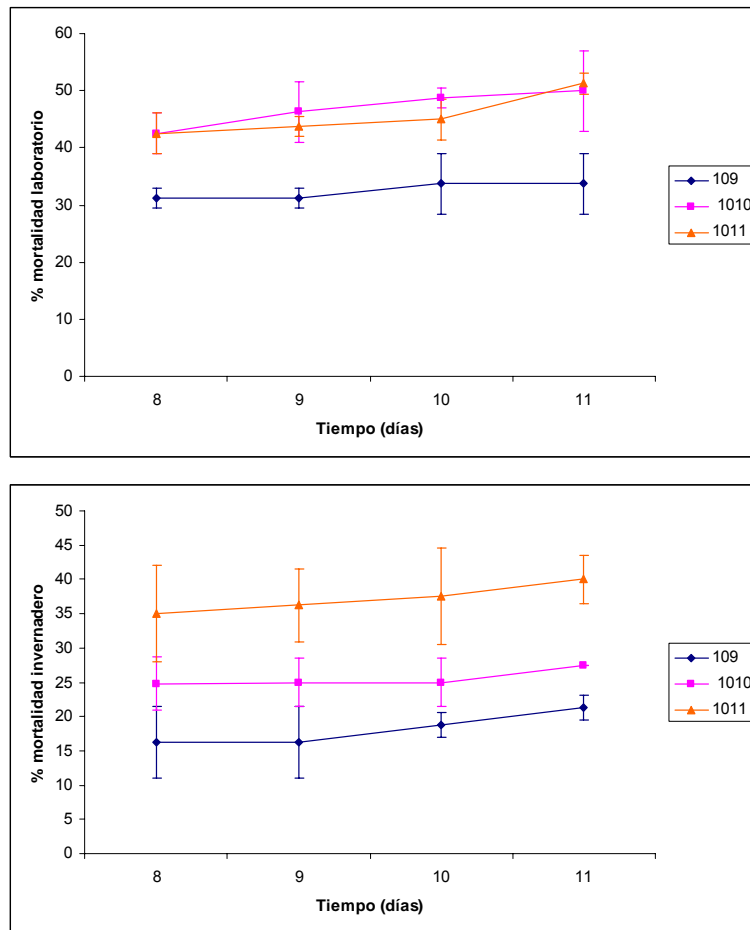
3). Sin embargo esta mortalidad fue inferior a la de las pruebas de laboratorio.



**Figura 15. Comportamiento del porcentaje de mortalidad y desviación estándar de los ensayos posteriores (réplicas 2 y 3) de los diferentes tratamientos de la combinación de *M.anisopliae* y *L. jecanii* en invernadero.**

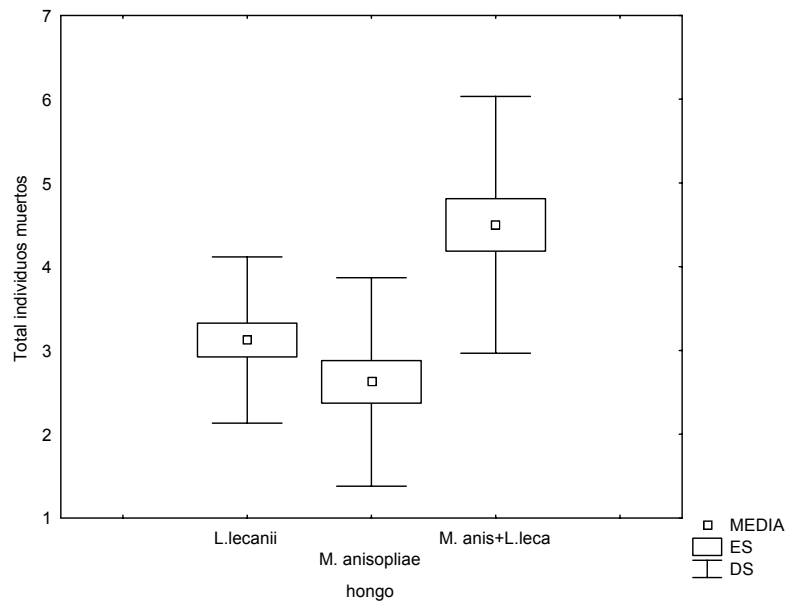
En invernadero, en la combinación de los hongos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $H=13,8$ ,  $P 0,001$ ) entre los tratamientos ( $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$  conidios/ml). En la prueba de comparación múltiple se encontró que el tratamiento  $10^{11}$  conidios/ml fue el que presentó el mayor porcentaje de mortalidad ( $P<0,05$ ).

El comportamiento en el tiempo de los diferentes tratamientos de las réplicas 2 y 3 fue similar al de los hongos individualmente, con sólo un ligero incremento después del día 8, como se ve en la Figura 16.



**Figura 16. Porcentaje de mortalidad promedio y desviación estándar en el tiempo de la mezcla *M. anisopliae* y *L. lecanii*.**

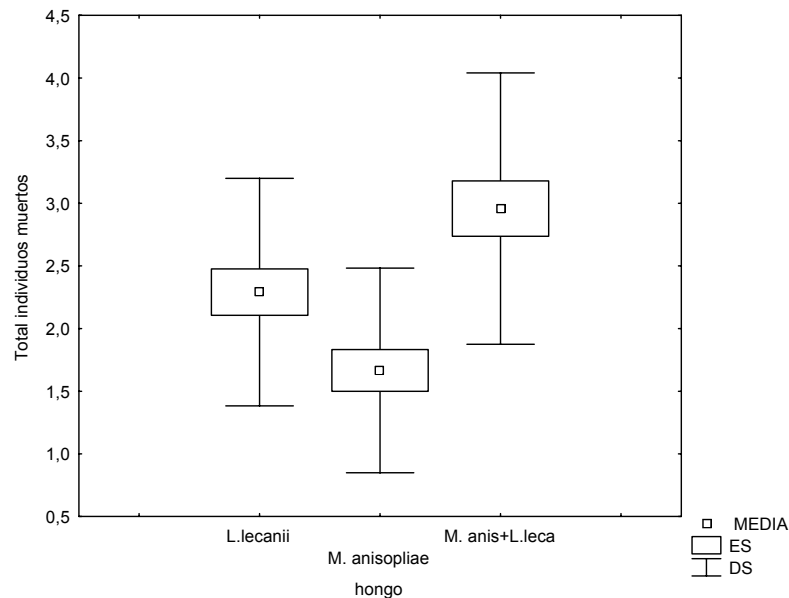
También, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los hongos *L. lecanii*, *M. anisopliae* y la combinación de estos, en condiciones de laboratorio ( $H=18,9$ ,  $P 0,0001$ ). La gráfica muestra la diferencia de la media del total de individuos muertos y de la combinación de los hongos con respecto a estos de manera individual (Figura 17).



**Figura 17. Cajas y bigotes de las medias y desviación estándar de los hongos *L. lecanii*, *M. anisopliae* y la combinación de estos en laboratorio.**

La prueba de comparación múltiple demostró que la combinación de los dos hongos fue la mejor en cuanto al porcentaje de mortalidad ( $P < 0,05$ ).

En condiciones de invernadero se encontraron de igual forma diferencias estadísticamente significativas entre los hongos aplicados individualmente y la combinación de los mismos ( $H=18,3$ ,  $P 0,0001$ ). La Figura 18 muestra la diferencia entre las medias de individuos muertos de los hongos y la combinación de estos.



**Figura 18. Cajas y bigotes de las medias y desviación estándar de los hongos *L. lecanii*, *M. anisopliae* y la combinación de éstos en invernadero.**

De nuevo la combinación de los dos hongos en los ensayos en invernadero fue la mejor ( $P < 0,05$ ).

#### 5.4. Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>).

La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) a partir de la regresión lineal. La ecuación usada para el cálculo de esta fue:

$$y = mx + b$$

Donde:

$y$ = valor de predicción

$m$ = pendiente

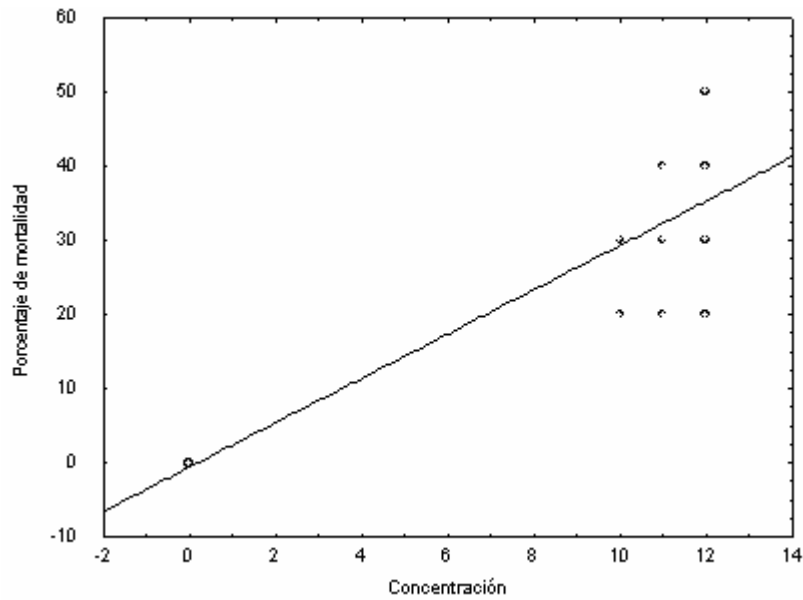
$x$ = valor asignado

$b$ = intercepto

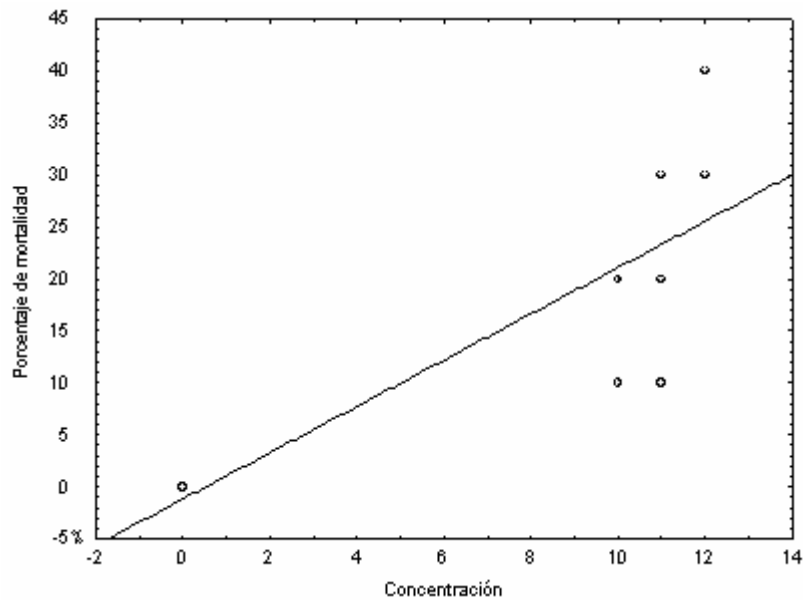
Con base en lo anterior la ecuación de la recta para determinar la concentración letal 50 del hongo *L. lecanii* posee un valor para  $m = 0.005$  y  $b =$

1724 obteniéndose que se requiere una concentración de  $17 \times 10^{14}$  conidios/ml del hongo *L. lecanii* en laboratorio para producir la muerte del 50% de la población de sinfílidos y para este hongo en invernadero una concentración de  $25 \times 10^{14}$  conidios/ml donde el valor de  $m= 0.011$  y  $b=2500$  (Figura 19); la concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) para *M. anisopliae* se estableció en  $50 \times 10^{12}$  conidios/ml en laboratorio, donde  $m= 0.01$  y  $b= 50$  y  $20 \times 10^{14}$  conidios/ml en invernadero, donde  $m= 0.0006$  y  $b= 2000$  (Figura 20); en la combinación de los hongos se encontró que se requiere de  $50 \times 10^{12}$  conidios/ml para producir la muerte del 50% de la población de los sinfílidos en laboratorio, donde  $m= 0.008$  y  $b= 50$  y  $17 \times 10^{14}$  conidios/ml en invernadero donde,  $m= 0.001$  y  $b= 1785$  (Figura 21).

Las concentraciones letales medias establecidas sugieren que se requieren de mayores concentraciones a las evaluadas para generar la muerte del 50% de los individuos; esto coincide a los resultados obtenidos en los que en ninguna de las medias de los tratamientos se obtuvo una mortalidad superior al 50%.

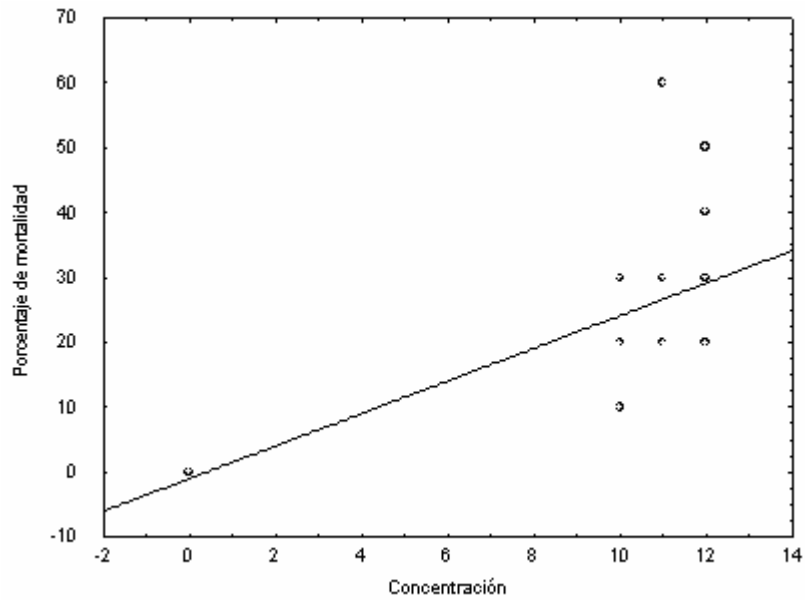


a. Regresión lineal *L. lecanii* en laboratorio para establecer CL<sub>50</sub>

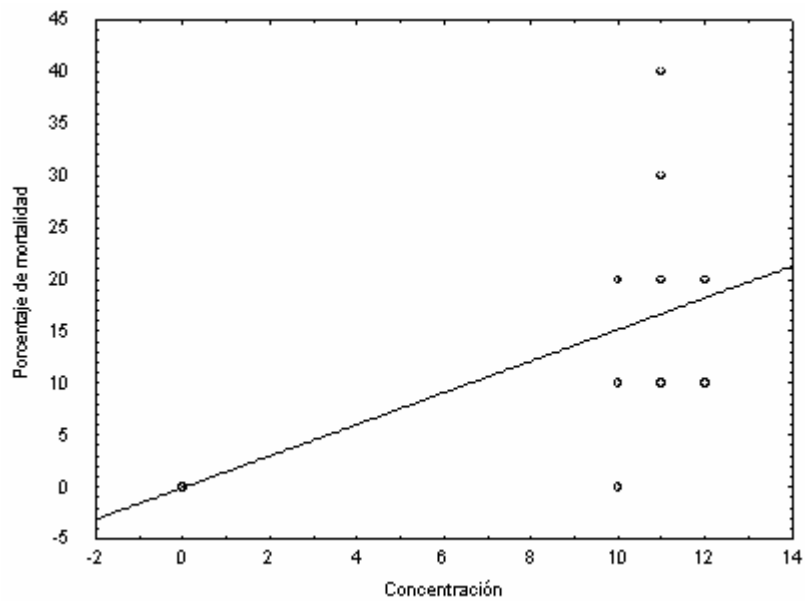


b. Regresión lineal *L. lecanii* invernadero para establecer CL<sub>50</sub>

**Figura 19. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para el hongo *L. lecanii* en (a) laboratorio e (b) invernadero.**

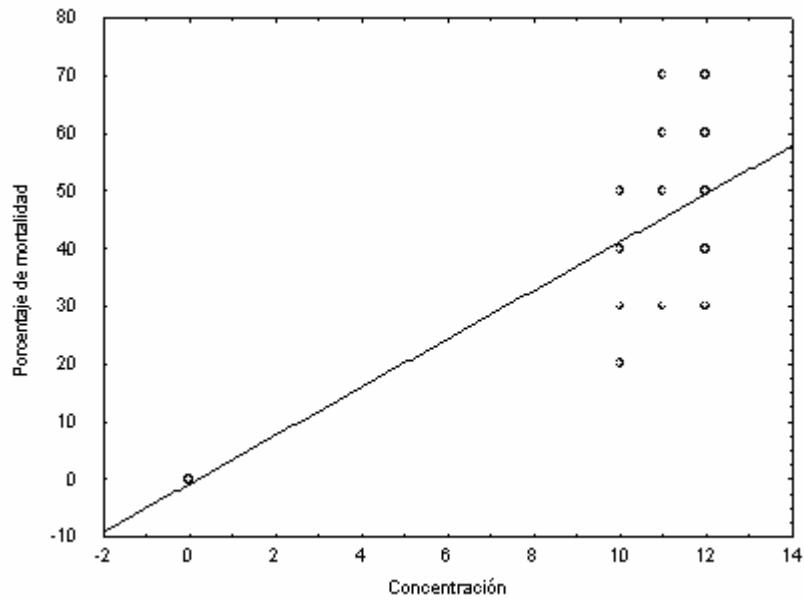


a. Regresión lineal *M. anisopliae* en laboratorio para establecer CL<sub>50</sub>

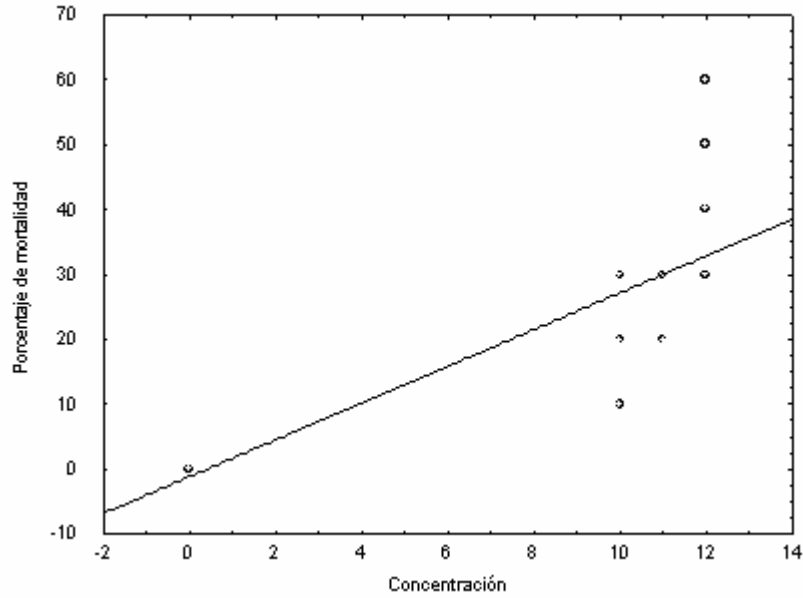


b. Regresión lineal *M. anisopliae* invernadero para establecer CL<sub>50</sub>

**Figura 20. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para el hongo *M. anisopliae* en (a) laboratorio e (b) invernadero.**



a. Regresión lineal para la combinación *M. anisopliae*+*L. lecanii* laboratorio para establecer  $CL_{50}$



b. Regresión lineal para la combinación *M. anisopliae*+*L. lecanii* invernadero para establecer  $CL_{50}$

**Figura 21. Regresión lineal que representa la concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) para la combinación *M. anisopliae*+*L. lecanii* en (a) laboratorio e (b) invernadero.**

## 6. DISCUSIÓN

La metodología aplicada para la captura de los sinfílidos permitió obtener cantidades suficientes de sinfílidos para establecer la cría de estos, tanto por el método directo dirigido por los agrónomos como por el método de captura por trampas. Con el método dirigido por los agrónomos se logró obtener sinfílidos de diferentes instares gracias a que en este método los muestreos fueron realizados por conveniencia y en los lugares donde por medio de un monitoreo previo se determinó la presencia de la plaga. El método de muestreo aleatorio simple por medio de trampas al igual que el método anterior permitió la captura de sinfílidos en diferentes naves y camas de los bloques en estudio; además es un método que podría emplearse como método de monitoreo puesto que selecciona una parte representativa y permite establecer la presencia del sinfílido dentro del invernadero.

A partir de la captura de los sinfílidos se estableció de manera satisfactoria la cría de estos gracias a que las condiciones brindadas bajo invernadero fueron muy similares durante el estudio a las que se presentan en suelos de cultivos de flores bajo invernadero. La temperatura durante el estudio fluctuó entre 5 y 36° C y la humedad se mantuvo adicionando agua a los tratamientos para mantener esta cerca al 100%, cumpliendo con las condiciones de humedad relativa del 100% y un rango de temperatura óptimo de 2° a 28 °C propuestas por (Agregado *et al.* 1993) como óptimas para prolongar la supervivencia de los sinfílidos. El adicionar suelo proveniente de estos cultivos y evidenciar el desarrollo de las plantas de rosa permitió establecer de algún modo que estas condiciones semejabán a las presentadas en los cultivos de la Sabana de Bogotá. Dichas condiciones favorecieron el desarrollo de diferentes instares del sinfílido y de esta manera

el obtenerse una cría representada por más de 1900 individuos, conseguidos a partir de una población inicial de 560 sinfílidos.

A partir de las pruebas de patogenicidad con los diferentes tratamientos y llevadas a cabo tanto en laboratorio como bajo condiciones de invernadero se encontró que los hongos *B. bassiana* y *P. lilacinus* no presentaron patogenicidad frente al sinfílido. Los resultados sugieren que no existe capacidad patogénica de estos hongos hacia el sinfílido, ya que no se encontró mortalidad alguna al aplicar los diferentes tratamientos. Esto podría indicar que la actividad de estos de algún modo depende de características intrínsecas de cada aislamiento como origen geográfico, tipo de hospedero, grado de esporulación, capacidad y tiempo de germinación, actividad de las enzimas asociadas al proceso de infección y la viabilidad de los conidios como lo propusieron Daoust y Roberts (1982) en estudios realizados con *B. bassiana* en el que emplearon mosquitos larva no blanco para este hongo con resultados negativos. Por tal motivo estos autores sugieren que el mayor potencial controlador de hongos entomopatógenos debe provenir de aislamientos obtenidos del insecto blanco o de especies estrechamente relacionadas. Sin embargo otros autores han propuesto que son precisamente los aislamientos provenientes de órdenes distintos los que pueden tener mayor virulencia (Varela & Morales 1996).

Otro limitante en la utilización de estos hongos en el estudio es el efecto nocivo de algunos compuestos que producen los artrópodos como mecanismo de respuesta inmune. Aunque se conocen pocos factores de los insectos con actividad dirigida hacia hongos, en estudios realizados en *Sarcophaga peregrina* y *Drosophyla melanogaster* se encontraron proteínas que poseen péptidos capaces de inhibir el desarrollo de hongos. Péptidos que no sólo se desarrollan en el cuerpo graso del individuo sino también en

tejidos epiteliales que se encuentran en contacto con el ambiente (Uribe 1997). Gonzáles (1997) establece de igual modo que las enzimas de muchos patógenos son determinantes de la virulencia, puesto que ellas le permiten al patógeno coexistir con los procesos cambiantes asociados con la enfermedad. Los resultados en este estudio sugieren que algo en ese sentido pudo haber ocurrido.

Otra posibilidad sugiere que debido a la actividad y movimiento de los sinfílidos, en la cual ellos tienden a profundizar en el suelo (Duran 1982) es posible que al aplicar la suspensión de conidios, estos se queden más bien en la superficie del suelo y no puedan entrar en contacto con los sinfílidos. También es posible que el resultado encontrado se pueda explicar a través de una combinación de todas las condiciones anteriormente descritas, las cuales pudieron ocurrir conjuntamente para impedir la infección por parte de estos hongos sobre los sinfílidos.

En contraste con estos hongos, *M. anisopliae*, *L. lecanii* y la combinación de estos dos hongos presentaron patogenicidad frente a los sinfílidos con respecto a *P. lilacinus* y *B. bassiana*. En algunos estudios se demostró que las propiedades químicas de la cutícula facilitan la adhesión conidial y la orientación del tubo germinal, encontrando que algunos hongos entomopatógenos tienen preferencia por la región del cuerpo insecto y la superficie de la cutícula que contiene espinas cuticulares (Boucias & Pendland 1988), presentes también en los sinfílidos. Al desarrollarse los tubos germinales se producen las células apresorias que secretan exoenzimas que ayudan a la penetración del hongo a través de la cutícula del insecto (Zacharuk 1970).

En los resultados de las réplicas 2 y 3 tanto para *M. anisopliae*, *L. lecanii* y la combinación de estos se observó que la mayor concentración presentó los mayores porcentajes de mortalidad, lo que demuestra la diferencia existente al aplicar una concentración alta comparada con una baja, ya que la primera posee una mayor cantidad de conidios, lo que aumenta la probabilidad de que puedan infectar al hospedero. También se encontraron diferencias en los resultados de los tratamientos aplicados en laboratorio frente a los llevados a cabo bajo invernadero. Para el hongo *L. lecanii*, en los ensayos realizados en laboratorio se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 5% más alto comparado al obtenido en invernadero. Con *M. anisopliae* se obtuvo un porcentaje de mortalidad 8% más alto en el laboratorio en comparación al encontrado en invernadero. Algo similar ocurrió con los resultados de los hongos en combinación, sólo que la diferencia fu mayor, en donde se obtuvo un porcentaje de aproximadamente 13% mayor en laboratorio. Resultados que se pueden conferir al hecho que una limitante en la utilización de hongos como agentes de control es el efecto nocivo que sobre estos tienen factores ambientales tales como humedades relativas bajas, temperaturas altas hacia el mediodía y, radiación UV del sol (Revelles 1990), características que se presentan en las condiciones bajo invernadero.

En este estudio los resultados obtenidos demostraron que la actividad biocontroladora de las cepas de *M. anisopliae* y *L. lecanii* puede ser potencializada mediante la utilización de manera combinada presentándose cierta sinergia o interacción entre ellos. Dicha interacción podría producirse mediante mutualismo o sintrofia. En el primer caso, los hongos podrían haber superado de alguna manera cualquier factor limitante en el medio, haciendo más fácil su desarrollo y produciendo la mayor mortalidad de los sinfilidos en parte por la acción combinada de las toxinas de los dos hongos. En el caso de ocurrir sintrofia los dos organismos involucrados podrían haber

compartido el mismo microambiente, debido a que el producto del metabolismo de uno de ellos le sería fácilmente accesible al segundo (Campbell 1987).

Las diferencias encontradas en el comportamiento biocontrolador de las cepas evaluadas podrían estar relacionadas con sus características genéticas y fisiológicas, ya que existen diferentes razas de una especie de un hongo que pueden presentar diferencias en su patogenicidad hacia un insecto hospedero determinado. Esto ha sido demostrado en cepas de *B. bassiana*, las cuales han presentado diferencias en la virulencia en la broca del café en las que al evaluar 46 aislamientos de este hongo provenientes de diferentes insectos hospederos y diferentes sitios de origen se encontró que sólo 5 de ellos presentaban niveles de infección del 80% (Jiménez 1992).

Se estableció que la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) estaba por fuera del rango de las concentraciones de conidios evaluadas en el estudio, lo que plantea la necesidad de obtener cantidades más altas del hongo para ocasionar esta mortalidad. Algunos autores como Tovar y colaboradores (1988) en estudios realizados en la broca del café demostraron que el uso de productos comerciales como tratamiento presentó los porcentajes de mortalidad más bajos frente a otros tratamientos. Razón por la cual pudo haberse presentado estos resultados en este estudio puesto que los aislamientos de los hongos fueron realizados a partir de productos comerciales. Esto implicaría el uso de estos productos de una manera más frecuente en campo para lograr mortalidades más altas, que compensen la baja concentración que traen los productos biológicos comerciales para el control de esta plaga. Otra opción sería la reactivación del hongo sobre el sinfílido para incrementar el porcentaje de mortalidad de sinfílicos.

Raymond *et al.* (2004) plantearon el uso de varios componentes de la cutícula del insecto en el medio de cultivo de los hongos entomopatógenos, ya que esto produce un aumento significativo en la virulencia de dichos hongos. Este efecto es posiblemente debido a la activación de sistemas enzimáticos en los hongos, los cuales son determinantes en su acción controladora sobre el insecto. Esto fue confirmado por Valdez y Vélez en 1998 en estudios con *B. bassiana*, en los cuales al comparar aislamientos activados y no activados sobre insectos, demostraron que la reactivación mejora la respuesta enzimática. Finalmente, aunque ninguno de los hongos que presentó patogenicidad (individualmente o combinados) demostró tener una efectividad superior al 50% de mortalidad sobre el sinfílido, estos resultados podrían sugerir el uso de estos hongos como agentes de control en un programa de manejo integrado de plagas, ya que estas prácticas al combinarse tienen un efecto final más contundente sobre la disminución de la población de una plaga. En este sentido se podría combinar el uso de estos hongos junto con el uso de insecticidas, como sugiere Astudillo (1993) en estudios realizados con *B. bassiana* en combinación con formulaciones comerciales con fungicidas e insecticidas. Atehortúa y Londoño (1994) también evaluaron el efecto del uso de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación. En este estudio se encontró que concentraciones altas (250 ppm) de productos comerciales como Benomil y Malation inhiben el crecimiento de estos hongos. En la concentración más baja empleada (25 ppm) 10 veces menor a la más alta, se observó que el porcentaje de inhibición del crecimiento no fue mayor, lo que indica que a mayores concentraciones de estos productos, de igual manera será la respuesta inhibitoria de crecimiento de los hongos.

Los resultados presentados en este estudio permiten abrir un nuevo campo en la investigación sobre el control biológico de los sinfílicos, plaga que a

pesar de tener gran importancia económica en nuestro país, no ha sido estudiada profundamente en cuanto a un control natural, hecho que además de reducir costos en productos químicos permitiría mantener un equilibrio natural de los agroecosistemas.

Finalmente, el uso de los hongos empleados en este estudio en aplicaciones frecuentes o dentro de un programa de manejo integrado de plagas podría llegar a establecerse como una alternativa para el control de esta plaga.

## CONCLUSIONES

- A partir de las dos metodologías empleadas en este estudio se logró capturar poblaciones de individuos suficientes para establecer la cría de sinfílidos.
- El método de muestreo aleatorio simple con el uso de trampas cebo no solo permitió la captura, sino a su vez permitió establecer la presencia del sinfílido en varios lugares del invernadero.
- A partir de los sinfílidos capturados en campo se logró establecer bajo condiciones controladas bajo invernadero la cría de diferentes instares del sinfílidos.
- Se encontró capacidad patogénica por parte de los hongos *L. lecanii* y *M. anisopliae* y ninguna por parte de *B. bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*.
- De acuerdo con los resultados encontrados se determinó que el uso de estos dos hongos combinados posee un mayor efecto patogénico, que su uso de manera individual.
- Al establecer la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) se encontró que se requieren concentraciones más altas a las estudiadas para lograr una mortalidad superior al 50% de los individuos.

## RECOMENDACIONES

- Se debe considerar el muestreo aleatorio simple con trampas cebo como un método alternativo posible de monitoreo, puesto que en algunos cultivos de flores el monitoreo sobre el suelo no es muy frecuente. De esta manera se podría detectar en qué momento está aumentando la población de sinfílidos con el fin de ejercer acciones correctivas.
- Se hace necesario buscar otros aislamientos de *L. lecanii* y *M. anisopliae* para evaluar su virulencia y el uso de cepas reactivadas en sinfílidos, buscando mejorar el grado de control.
- Evaluar la patogenicidad de otros hongos entomopatógenos, así como de insectos predadores que podrían establecerse como otra alternativa de control de sinfílidos.
- Buscar la manera de desarrollar un sistema de manejo integrado de plagas en cultivos de flores con estos hongos, para tener un método de control más amigable con el ambiente y eficaz para esta plaga.

## 9. REFERENCIAS

- Abarca, G., Vargas, y Mata, P. 1992. Alternativas de combate del complejo de larvas de Jobotos (*Phyllophaga* sp., *Anomala* sp. y *Cyclocephala* sp.) (Col: Scarabaeidae) en fresa (*Fragaria ananassa*). *Agronomía Costarricense* 16(1): 45-54 pp.
- Agregado, C., Zuluaga, J. y Chaparro, E. 1993. Importancia, identificación, características y daños de sinfílidos en piña, *Ananas comosus*, en el departamento del Valle. *Acta Agronómica* 38(2): 1-11 pp.
- Alexopoulos, C.J and Blakwell, M. 1996. *Introductory mycology*. John Willey and Sons. New York, U.S.A. 869 p.
- Álvarez, I.; Rivero, F.; Cotes, A. 1997. Patogenicidad de *M. anisopliae* en la langosta llanera migratoria *Rhammatocerus schisticercoides* en Colombia. Producción masiva y preformulación de *Metarhizium* spp. para el control biológico de langosta llanera. *Revista Colombiana de Entomología* 23(3-4): 119-124 pp.
- Alves, S. B. 1986. *Controle microbiano de insectos*. Editorial Mande, Sao Paulo, Brazil. 407 p.
- ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE EXPORTADORES DE FLORES. Florverde. 1998. *Manual de mejores prácticas, autorregulación ambiental y social, versión 2.0*. Bogotá, D.C., Colombia.
- ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE EXPORTADORES DE FLORES. Florverde. 2002. *Guía ambiental para el subsector agricultor. Versión 1.0*- Bogotá, D.C., Colombia.
- Astudillo, M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* con formulaciones comerciales con fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de entomología*. 19 (4): 255-260 pp.

- Atehortua, M.; Londoño, M. 1994. Efecto de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae*. Revista Colombiana de entomología. 4 (2): 255-260 pp.
- Azevedo, J. L. y Messias, C. L. 1985. Aspectos genéticos do controle genético de insectos por fungos. FEALQ. 114 p.
- Baird, A. B. 1958. Biological control of insects in Canada. Proc. 10<sup>TH</sup> International Congress Entomology 4:483-485 pp.
- Benavides, P.; Bustillo, E. 2002. Participación del control cultural, químico y biológico en el manejo de la broca del café. Revista Colombiana de entomología. 28(28): 161-165 pp.
- Borror, D., Charles, A., Triplehorn, J., Norman, F. & Johnson, F. 1989. Introduction to the Study of Insects. 6th edition. Harcourt College Publishers. New Jersey. U.S.A. 875 p.
- Boucias, D.; Pendland, J. 1988. Non specific factors involved in the attachment of entomopathogenic. Deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and Environmental Microbiology 54(7): 1795-1805 pp.
- Bustillo, A.E. 1984. Microorganismos patogénicos de insectos: caracterización y modos de acción. Seminario sobre patología de insectos. Medellín, Colombia. 58 p.
- Cabanillas, Enrique; Barker, K. R. & Daykin, M. E. (1988): Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Nematology 20 (3): 362-365 pp.
- Campbell, R. 1987. Ecología microbiana. Editorial Limusa S. A. México D.F. México. 268 p.

- Comstok, H. 1940. An introduction to entomology. Comstok Publisher Collection. New York, U.S.A. 147-178 pp.
- Dallai, R. and Afzelius, B. 2000. Spermatozoa of the 'primitive type' in *Scutigereilla* (Myriapoda, Symphyla). Applied Soil Ecology (32):1-8 pp.
- Daughtrey, M. 2001. Plagas y enfermedades de las plantas. Mundiprensa. Madrid, España. 90 p.
- DeBach, P. 1984. Control biológico de los insectos y malas hierbas. Editorial Continental. Mexico D.F., Mexico. 494 p.
- Domsh, H.; Gams, W. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press Ltd. New York, U. S. A. 859 p.
- Doust, R. & Roberts, D. 1982. Virulence of natural and insect passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology 40: 107-117 pp.
- Duran, D. 1982. Manejo de insectos y otros artrópodos relacionados con el cultivo de flores. Seminario de plagas en cultivo de flores. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, Colombia. 84-87 pp.
- Edwards, C. A. 1990. Symphyla. En: Daniel Dindal (ed.). Soil biology guide. John Willey and Sons. New York, U.S.A. 1349 p.
- Fargues, J. 1976. Etude des conditions d'infection des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say, Par *Beauveria bassiana* (Bals) Vuele (Fungi Imperfecti). Entomophaga 17:319-337 pp.
- Fargues, J. and Remaudiere, G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathology. 62:31-37 pp.
- Fegan, M., J.M. Manners, D.J. Maclean, J. Irwin, K. Samuels, D.Z. Holsom. D. II. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus

*Metarhizium anisopliae*. Journal of General Microbiology 129:2075-2081 pp.

- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. Annual Review Entomology 23:409-442 pp.
- Filingier, G. A. 1931. The garden symphylid. Bulletin Ohio Agricultural Experiments Station (486): 33 p.
- Gillespie, A.T. y N. Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. Journal of Pest Science 27: 203-215 pp.
- Gonzáles, J. 1997. Evaluación de cepas nativas de *Lecanicillium lecanii* en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. Revista Colombiana de Entomología. 23(1-2): 25-30 pp.
- Hajek, A. And R. J. St Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review Entomology. 39:293-322 pp.
- Hamill, R., Higgins, C., Boaz, E. and Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Letters. 49: 4225-4231 pp.
- 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 pp.
- Jiménez, J. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cenicafé (Colombia). 43(3): 84-92 pp.
- Juberthie-Jupeau, L. & Réveillet, P. 1997. un nouveau Symphyle (Myriapoda) de Colombie et considérations sur les appendices régénérés.

Laboratoire de zoologie (artropodes). Muséum Nationale d'histoire Naturelle 19(4): 613-622 pp.

- Lezama, G.R. 1994. Primer seminario sobre patogenicidad de organismos parásitos de insectos. Tacoma, Colombia. 116 p.
- Liang, Z., A. Liu y J. Liu. 1995. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium anamorph*. *Acta Mycologica* 10:257-262 pp.
- Madrigal, S. B. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. Medellín, Colombia. 453 p.
- Michelbacher, A. E. 1938. Biology of the garden centipede, *Scutigereilla immaculata*. *Hilgardia* 11:228-229 pp.
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall, Inc. New Jersey, U.S.A. 575 p.
- Pais, M., Das, B and Ferron, P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 20:715-719 pp.
- Peña, C. 1998. evaluación de daños de *Scutigereilla immaculta* newport en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de clavel, rosa y pompón y su relación con el tipo de suelo. *Trabajo Pregrado*. Universidad Nacional. Facultad de agronomía. Bogotá, Colombia. 140 p.
- Raymond, K.; Rojas, F.; Benavides, E.; Cotes, A.; Ronderos, V.; García, p. 2004. Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata *Bophilus Microplus* (Acari: ixodidae): uso de activadores de patogenicidad. *Revista Colombiana de Entomología* 30(1): 1-6 pp.
- Revelles, P. 1990. Fungos entomopatógenicos. En: *Ingeniería agropecuaria* (167) 5-20 pp.
- Rincón, J. 1998. efecto de cuatro tipos de cobertura para el manejo de *Scutigereilla immaculata* en un cultivo comercial de Solidaster (variedad

Yellow submarine) bajo invernadero. *Trabajo Pregrado*. Universidad Nacional. Facultad de agronomía. Bogotá, Colombia. 75 pp.

- Rivera, M. 1993. Estudio sobre la compatibilidad de *Beauveria bassiana* en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). *Revista Colombiana de Entomología* 20(40):209-214 pp.
- Roberts, D. 1981. Toxins entomopathogenic fungi. En: Burges, H. *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980*. Academic Press. London, England. 441-464 pp.
- Roberts, D. and Yendol, W.G. 1971. Use of fungi for microbial control of insects en: Burges, H.D. and Husey, N. W. *Microbial control of insects and mites*. London, England. 449 p.
- Roberts, D.W. and Huber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. In: Cole, G.T. *Biology of conidial fungi*. Academic Press. New York, U.S.A. 229 p.
- Roberts, D.W., Fuxa, J.R. Gaugler, r., Jaques, R., and Maddox, J. 1991. Use of pathogens in insects control. In: Pimentel, D. *Handbook of pests management in agricultura*. 2nd. Edition. 15-42 pp.
- Rodríguez, D. A. Estudios iniciales sobre *Metarhizium anisopliae* (Mitch) Sorokin y pruebas de sensibilidad en *Ancognatha* sp en: Congreso Sociedad Colombiana De Entomología (9: 1982: Cali) Resúmenes IX Congreso Nacional Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, Colombia. Socolen. 1982. 31 p.
- Rodriguez, D. A. 1984. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 10:57-64 pp.
- Rosas, A. 1994. XXIX Congreso nacional de entomología y asamblea anual de la Southwestern Branco. E. S. A. Oaxaca, México. 163 p.

- Ross, H. H. 1978. Introducción a la entomología general y aplicada. Editorial Omega. Barcelona, España. 229 p.
- Samson, R. A. 1975. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. 6: 1-119 pp.
- Snodgrass, R. 1952. A textbook of arthropod anatomy. Comstock Publisher Collection. New York, U.S.A. 270 p.
- Sokal, R and Rohlf, F. 2001. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company. Third edition. New York, U.S.A. 887 p.
- Steel, R y Torrie, J. 1998. Bioestadística: principios y procedimientos. MacGraw Hill. México D.F, México. 622 p.
- Suquilanda, B. 2001. Alternativas orgánicas en floricultura. Cultivos controlados. Vol. 3:6.
- Steinhaus, E. A. 1985. Microbial disease of insects. Annual Review of Microbiology 11: 165-182 pp.
- Torres, L.; Cotes, A.; Estrada, I. 1999. Actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: curculionidae) mediante su utilidad industrial y combinada. Revista Colombiana de Entomología. 25(3-4): 121-129 pp.
- Tovar, P.; Vélez, E.; Montoya, C. 1988. Evaluación en campo de un aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* seleccionado por aislamientos a la luz ultravioleta. Revista Colombiana de Entomología 24(3-4):157-163 pp.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society 66:407-411 pp.

- Umble, J. & Fisher, J. 2003. Suitability of selected crops and soil for garden symphylan populations (Symphyla, Scutigereidae: *Scutigereida inmaculata* Newport). *Applied Soil Ecology* (24): 151-163 pp.
- Uribe, S. 1997. Mecanismos de la respuesta inmune de insectos. *Revista Colombiana de Entomología* 23(3-4): 177-185 pp.
- Valdéz, B.; Vélez, P. 1998. características bioquímicas y cualitativas de aislamientos de *Beauveria bassiana* de una colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé. *Revista Colombiana de Entomología* 24(1-2): 61-66 pp.
- Vergara, R. A. 1996. Aspectos bioecológicos y de manejo sobre colémbolos y sinfílidos. Resumen de la conferencia dictada en el seminario de plagas del suelo en la floricultura. Bogotá, Colombia. Mayo 15. 112 pp.
- Walkwork, J. A. 1970. *Ecology of soils animals*. McGraw Hill. New York, U.S.A. 330 p.
- Wilding, N. 1970. *Entomophthora* in the air spora. *Journal Genetic Microbiology*. 62:149-153 pp.
- Zacharuk, R. 1970. Fine structure of the fungus *Metrahizium anisopliae* infecting three species of larval Elatiridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 7: 414-422 pp.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Fourth edition. New Jersey, U.S.A. 663 p.