

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA “UNAD”



**Actividad biológica de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) en condiciones del laboratorio
C.I. La Libertad**

**Juan Carlos Campos Pinzón
Heberth Augusto Velásquez Ramírez**

**Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente
Ingeniería Agroforestal**

**Villavicencio
2016**

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA “UNAD”

**Actividad biológica de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) en condiciones del laboratorio
C.I. La Libertad**

**Juan Carlos Campos Pinzón
Heberth Augusto Velásquez Ramírez**

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agroforestal

**Ing. Raúl Vargas
Director**

**Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente
Ingeniería Agroforestal**

**Villavicencio
2016**

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Villavicencio, Diciembre 07 de 2015.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme la libertad de vivir, a mis padres (Q.E.P.D) por inculcarme los valores de la vida y la importancia del estudio, a mi familia por el tiempo que les dejé de brindar mientras cursaba mis estudios. A mis maestros por su arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos. A mi compa Gustavo Quijano por su aliento en los momentos difíciles.

Juan Carlos Campos Pinzón

A Dios y a mi familia por su acompañamiento y comprensión, en estos años de estudio, a Instituciones como el SENA y la UNAD, que por su misión y a sus políticas interinstitucionales, permite que estudiantes con dificultades de tiempo, podamos tener la oportunidad de profesionalizarnos.

Heberth Augusto Velásquez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

Ingeniero Raúl Vargas, por su orientación como director de la tesis.

Doctora Paola Emilia Cuartas, PhD, CORPOICA, por su invaluable colaboración en la orientación y desarrollo de trabajo de tesis.

Doctor Carlos Espinel, líder del Banco de Germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de la nación.

Doctora Liz Alejandra Uribe, por el suministro las cepas de *M. anisopliae* para el desarrollo de esta investigación.

Doctor Óscar Olarte, por su permanente orientación.

Todos los profesores de la UNAD CEAD Acacias por su infinita paciencia para compartir sus conocimientos.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
5. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO	24
5.1 <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.	24
5.1.1 Descripción taxonómica.	24
5.1.2 Distribución.	24
5.1.3 Descripción morfológica.	24
5.1.3.1 Adulto.	24
5.1.3.2 Huevos.	25
5.1.3.3 Larvas.	26
5.1.3.4 Pupas.	26
5.1.4 Daños que causa	28
5.1.5 Alternativas de control.	28

5.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
5.2.1 Taxonomía.	29
5.2.2 Características generales.	29
5.2.3 Etapas del desarrollo de una micosis en insectos por el hongo <i>M. anisopliae</i> .	31
5.2.3.1 Adhesión.	31
5.2.3.2 Germinación	31
5.2.3.3 Penetración.	31
5.2.3.4 Multiplicación del hongo en el hemocele.	31
5.2.3.5 Producción de toxinas	31
5.2.3.6 Muerte del insecto	32
5.2.3.7 Colonización total	32
5.2.3.8 Emergencia del hongo al exterior.	32
5.2.3.9 Esporulación.	32
5.2.3.10 Diseminación	32
5.2.4 Utilización.	32
6. METODOLOGÍA	34
6.1 REACTIVACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	34
6.2 PRODUCCIÓN MASIVA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	34
6.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	35
6.4 PRUEBAS DE VIRULENCIA	38
7. ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS	39
7.1 REACTIVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS	39
7.2 PATOGENICIDAD	40

7.2.1 Mortalidad.	40
7.2.2 Eficacia.	42
7.2.3 Concentración letal.	43
7.3 VIRULENCIA	44
7.3.1 Tiempo medio de mortalidad (TMM).	44
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
9. CONCLUSIONES	48
10. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Mortalidad de las dos cepas de <i>M. anisopliae</i> evaluadas	41
Tabla 2. Concentración Letal Media.....	44
Tabla 3. Tiempo Medio de Mortalidad.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Adulto de <i>R. palmarum</i>	25
Figura 2. Huevos de <i>R. palmarum</i>	25
Figura 3. Larva de <i>R. Palmarum</i>	26
Figura 4. Pupa de <i>R. palmarum</i>	27
Figura 5. Adultos de <i>R. palmarum</i> emergiendo del pupario.....	27
Figura 6. Estructura del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> (conidióforos, fiálide y conidias (A, B, C), conidias (D)).....	30
Figura 7. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) de <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
Figura 8. Etapas del desarrollo de una micosis en insectos por hongo entomopatógeno.	31
Figura 9. Proceso de inmersión x 5min	36
Figura 10. Confinamiento en cajas x 21 días	36
Figura 11. <i>R. palmarum</i> en cámara húmeda	37
Figura 12. Cepas utilizadas para la reactivación del hongo.....	39
Figura 13. Propagación de <i>M. anisopliae</i> en medio sólido (arroz).....	39
Figura 14. <i>R. palmarum</i> infectado por cepa <i>Mt 040</i>	40
Figura 15. <i>R. palmarum</i> infectado por cepa <i>Mt</i>	40

LISTA DE GRÁFICAS

Pág.

Gráfica 1. Comparación de eficacia de cada concentración de las cepas de <i>M. anisopliae</i> evaluadas.....	42
Gráfica 2. Concentración Letal Media.....	43

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Evaluaciòn del ensayo de actividad biologica de la CEPAMt 040 de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Rhynchophorus palmarum</i>	61
Anexo B. Evaluaciòn de actividad biologica de cepa Mt 008 DE <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>R. palmarum</i>	62

RESUMEN

El picudo negro de las palmas *Rhynchophorus palmarum* se considerada como una de las principales plagas de palma africana y de coco en Colombia, ya que es considerado como el único vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* agente causal de la enfermedad Anillo rojo (AR) y estar asociado con la enfermedad de pudrición de cogollo (PC), además del daño que causan las larvas en forma directa al cultivo en todas las zonas productoras de palma de aceite y cocotero.

Este estudio tiene como finalidad evaluar en laboratorio la actividad biológica de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* de CORPOICA, sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum*

La patogenicidad se evaluara en términos de concentración letal 50 y 90 (CL₅₀ y CL₉₀) y se determinará la virulencia en términos de Tiempo Medio de Mortalidad (TMM) de las dos cepas de *M. anisopliae* sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* en condiciones de laboratorio.

Los ensayos consisten en sumergir individuos de *R. palmarum* en una solución de esporas de las cepas *M. anisopliae* a diferentes concentraciones 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , y 1×10^8 conidios/ml, los cuales se confinarán con alimento hasta su muerte; posteriormente se colocarán en cajas de Petri con papel filtro hasta su esporulación, para determinar de esta forma la actividad biológica de cada tratamiento evaluado.

Palabras clave: entomopatígeno, picudo negro de las palmas, palmáceas, *metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

The black weevil palms *Rhynchophorus palmarum* is considered one of the main pests of oil palm and coconut in Colombia, as it is considered the only vector of *Bursaphelenchus cocophilus* causative agent of the disease red ring (AR) and be associated with bud rot disease (PC), plus the damage caused by larvae form directly to the crop in all producing areas of oil palm and coconut.

This study aims to evaluate in the laboratory the biological activity of two strains of *Metarhizium anisopliae* CORPOICA on *Rhynchophorus palmarum* adults.

To evaluate the pathogenicity of two virulence strains is determined by the following parameters: LD90 dose at which 90% individuals die. LT50: time required to kill 50% of insects at a constant dose.

The tests consist of *R. palmarum* individuals dip in a solution of spores of *M. anisopliae* the two strains at different 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , y 1×10^8 conidia/ml, which They are confined to food until his death; subsequently placed in Petri dishes with filter paper until sporulation to determine in this way the biological activity of each evaluated treatment.

Keywords: Entomopathogen, Black weevil palms, Palms, *Metarhizium anisopliae*.

INTRODUCCIÓN

El aumento del área plantada de palma africana a nivel nacional, asociado a un mal manejo de erradicación de las palmas afectadas, por plagas y enfermedades ha traído consigo problemas fitosanitarios como, la pudrición de cogollo, marchitez letal, muerte sorpresiva y anillo rojo, algunas de estas enfermedades están relacionadas con la presencia del picudo americano de las palmas *Rhynchophorus palmarum*.

Rhynchophorus palmarum no había sido considerado como plaga principal en el cultivo de palma africana, hasta que fue asociado como el vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* agente causal de la enfermedad anillo rojo y estar relacionado con el daño mecánico de la pudrición de cogollo.

El uso indiscriminado de productos químicos para el control de plagas y enfermedades, la resistencia a estos compuestos, el deterioro de la salud del personal encargado de estas aplicaciones y del medio ambiente, ha contribuido a buscar nuevas alternativas que garanticen una mayor sostenibilidad en el cultivo y minimicen el impacto sobre el medio ambiente.

Según Pucheta Díaz et al., (2006) los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos (Pucheta Díaz, Flores Macias, Rodriguez Navarro, & De La Torre, 2006).

El uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas es una opción viable y limpia que permite la reducción en el uso de compuestos químicos y puede ser incorporado a programas de manejo integrado de plagas para disminuir el deterioro del medio ambiente. El hongo *Metarhizium anisopliae* ha venido siendo utilizado en muchos países para el control de diferentes plagas como el Mión de los pastos, barrenadores en caña de azúcar, diferentes especies de cicadélidos, y en Colombia está siendo utilizado para el control de chizas.

El presente trabajo evaluó bajo condiciones de laboratorio la mortalidad, porcentajes de eficiencia, se determinó la L50 y L90 y el tiempo medio de mortalidad (TMM) de las dos cepas de *Metarhizium anisopliae*. Los resultados de este trabajo proveen información importante sobre el potencial biocontrolador de estas cepas para que puedan ser integradas a un programa de manejo de *R. palmarum*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El picudo americano de las palmas o picudo negro de las palmas *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) es un insecto de importancia económica en el cultivo de la palma de aceite y el cocotero. Desde 1726 se reportó la infestación de larvas del picudo de las palmas *R. palmarum* en palmas de coco (Griffith & Quoting, 1968-1893) y desde 1921 se postuló como posible vector de la enfermedad Anillo rojo- Hoja corta (AR) (Hagley & Quoting, 1963-1921), (Griffith & Quoting, 1968-1893), y desde entonces se ha constituido en una de las principales plagas en las plantaciones comerciales de coco, *Cocos nucífera* L. y palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. en América Latina y el Caribe (Posada, 1988), (Hagley E. , 1963), (Griffith, 1987) , (Morin, Lucchiani, De Araujo, Ferreira, & Fraga, 1986).

R. palmarum es considerado como el principal vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, causante del Anillo rojo (Griffith, Red ring disease of coconut palm., 1987), (Rochat, 1987), (Chinchilla, 1988), (Genty, 1988). En Colombia, además de ser el vector de esta enfermedad, este insecto se destaca por ser una plaga directa del cultivo en todas las zonas palmicultoras debido a su relación con la enfermedad conocida como Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite, (Chinchilla, 1988), (Acosta, 1991).

El coleóptero *R. palmarum* utiliza fundamentalmente plantas de la familia Palmae como sitio de ovoposición, reproducción y cría (Bedford, Ocampo, & Reyes, 1978).

El daño directo lo causan las larvas que se alimentan en las bases peciolares (Griffith & Quoting, 1968-1893), en la zona del cogollo de palmas afectadas por Pudrición del cogollo (PC) e incluso ocasionan daño en las inflorescencias andrógenas de híbridos interespecíficos OxG (Aldana, 2005). Las palmas afectadas por la pudrición de cogollo se convierten en sustrato ideal para la alimentación y reproducción de *R. palmarum* (Martínez, y otros, 2008). El daño indirecto es ocasionado al ser el vector principal del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* (Tylenchida: Aphelenchoididae), (Griffith, 1968a), (Griffith, 1968b) causante de la enfermedad anillo rojo - hoja corta (AR), (Hagley, E. 1965b), (Hagley, E. 1965a.), (Sánchez, 1987), (Fedepalma,

1988). (Aldana, 2005), (Gómez, et al., 1990), registrada oficialmente en Colombia desde 1986 (Fedepalma, 1988).

Entre 1964 y 1969, una pudrición de las flechas y el cogollo en la palma de aceite causó la destrucción de la plantación "La Arenosa", en Turbo (Antioquia, Colombia. Años más tarde, otras plantaciones en América Central y del Sur sufrieron un daño semejante (Aldana, 2005), (Gómez, et al, 1990). En 1988, la enfermedad reapareció con características graves en los Llanos Orientales y en menor escala en las Zonas Norte y Sur del país (Gómez, Calvache, & C., 2004). (Gómez, et al. 1990), (Swinburne, 1990). Según las últimas investigaciones, la enfermedad no es de carácter letal (Nieto, 1991), pero su manejo conlleva altos costos y una merma en el rendimiento durante varios años.

En los Llanos Orientales durante los años 90, alrededor de 90.000 palmas fueron erradicadas a causa de la enfermedad AR, las cuales representan unas 500 hectáreas. La incidencia de esta enfermedad se incrementó de 0,5% en 1990 a 8% en 2002 (Gómez, Calvache, & C., 2004). El cálculo de las pérdidas asociadas a costos fijos (tierra, establecimiento y costos administrativos) ocasionados por la enfermedad en esta zona entre 1990 y 2004 fue de aproximadamente ocho millones de dólares (Mosquera, 2005). En esta misma zona se ha calculado que este insecto, como plaga directa, puede ocasionar la pérdida del 35% de las palmas atacadas, incrementando el costo de producción de una tonelada de aceite desde 0,9 hasta 13,5 dólares (Mosquera, 2006).

En 2006 la zona palmera occidental reportó 36.934 Ha sembradas con *Elaeis guineensis* J. (Corredor *et al.*, 2008), cultivo que generó 28.000 empleos directos e indirectos, y se posicionaba como un importante renglón de la economía del municipio de Tumaco (Fedepalma, 2010).

Pese a los desarrollos productivos y agroindustriales implementados en la zona occidental por más de dos décadas, desde 2006 a 2009 se presentaron incrementos dramáticos en la incidencia de la pudrición del cogollo (PC), enfermedad que avanzó de manera letal afectando el 90% del área sembrada y ocasionó una grave emergencia social y económica en la zona (Martínez y Silva, 2009), situación que generó un incremento alarmante de las poblaciones de

este insecto, llegándose a considerar plaga directa del cultivo de palma de aceite (Aldana *et al.*, 2010). Las pérdidas generales para la economía se estiman en \$5,5 billones, y las específicas de los inversionistas ascienden a \$ 2 billones. 70.000 hectáreas han sido devastadas y aproximadamente 15.000 empleos han desaparecido (Ministerio De Agricultura – Colombia, Ica y Fedepalma , s.f.).

El cultivo del cocotero en Colombia representa el 0.23 de la producción mundial y ocupa el vigésimo cuarto lugar (24) entre los países productores de Coco en el mundo, cuenta con una de las más altas productividades: 8.62 toneladas por hectárea al año, por encima del promedio mundial de 5 toneladas por hectárea al año. Para el año 2010 el área plantada era de 16.091 ha. El departamento de Nariño ocupa el primer puesto en la producción nacional con el 50.2%, representadas en 8.118 hectáreas cultivadas en las cuales 5.900 familias derivan su sustento de este producto; le sigue Cauca con el 22% representado en 2.297 hectáreas y en tercer lugar Córdoba con 1.896.

Durante las tres últimas décadas, los cultivos de coco en el pacífico colombiano, especialmente en Tumaco, se han visto seriamente afectados por el complejo Anillo rojo- *R. palmarum* que ha llegado a destruir hasta el 80% de las palmas existentes, mermando la producción y afectando considerablemente los ingresos de los productores.

En el año 2014 más de 15.000 palmas de coco improductivas por problemas fitosanitarios ocasionados por *R. palmarum* y Anillo Rojo fueron erradicadas en el departamento de Cauca, municipio de Guapi, así como 7.100 palmas en el municipio de Tumaco, departamento de Nariño.

Dentro de los programas de MIP para este picudo, una de las prácticas más utilizadas en el control de las enfermedades PC y AR es la captura con trampas de *Rhynchophorus palmarum*, este método a pesar de ser una buena alternativa presenta algunas deficiencias ya que un alto número de picudos logran escapar de la trampa, para evitar que esto suceda una práctica común en las plantaciones es adicionar algún tipo de insecticida, lo que trae consigo problemas en la salud humana, contaminación del medio ambiente; además puede generarse resistencia en las

poblaciones del insecto(Fedepalma,2013).

Debido a los problemas que conlleva el uso de insecticidas, *M. anisopliae* constituye como una estrategia viable y efectiva que puede ser usada como complemento al manejo integrado de plagas para el control de *R. palmarum*.

3. JUSTIFICACIÓN

La palma de aceite (*E. guineensis* Jacq.); se encuentra distribuida en Colombia en cuatro zonas productivas; norte, centro, oriente y sur occidente con características agroecológicas diferentes (DANGON, 2014); 130.000 familias, de 116 municipios, en 18 departamentos dependen socioeconómicamente de este cultivo, ya que genera 128.000 empleos directos y 200.000 empleos indirectos (Croplife, Latín América, 2013). En el año 2013, de esta especie se reporta un área total establecida de 477.000 hectáreas y una producción de 1.040.000 toneladas. Según información del DANE (2011), el desarrollo poblacional del país al año 2022, será de 52 millones de personas, por tanto la producción de aceite de palma para satisfacer las necesidades de comestibles, concentrados y biodiesel es de 2.121.000 toneladas (DANGOND L, 2014); de acuerdo a esta proyección, se debe crecer en área y producción por hectárea en palma africana en el país. Otra especie de importancia socioeconómica en el Litoral Pacífico, es la palma de coco; hay establecidas 5530 hectáreas de palma de coco, de las cuales derivan su sustento 1800 familias, en los municipios de Tumaco (Nariño) y Guapi (Cauca) (Croplife, Latín América, 2013). Un factor que limita la productividad de los cultivos de palma aceitera y palma de coco, son las enfermedades anillo rojo, generada por el vector *Rhynchophorus palmarum* y el patógeno *Bursaphelenchus cocophilus*, y pudrición de cogollo enfermedad que la produce el mismo insecto asociado con el hongo *Phytophthora palmivora* Bult (Sarria, 2008).

La asociación *R. palmarum*- PC es el complejo fitosanitario que más ha afectado la palma de aceite en Colombia; Esta enfermedad es considerada letal y epidémica, por la pérdida de 70.000 hectáreas, en zonas productoras de palma de aceite, como Tumaco (Nariño); Puerto Wilches (Santander); Cantagallo (Sur de Bolívar), entre los años 2006 a 2009 (ICA, 2013). Generando pérdidas económicas a la nación. En estas regiones esta enfermedad es el mayor problema fitosanitario para el cultivo del cocotero, alcanzando niveles del 100% de incidencia (CORPOICA, 1999). Según la Corporación Autónoma Regional de Valle del cauca (CVC), en Tumaco (Nariño), en el año 1988, esta enfermedad provocó la muerte del 90% de las palmas, afectando a 2000 familias de la zona. En el año 2014, el ICA, erradicó 15.000 palmas de Cocotero, en el municipio de Guapi (Cauca) y 7.100 palmas de coco en el municipio de Tumaco

(Nariño). En la zona oriental (Meta-Casanare), en los años noventa, se erradicaron cerca de 90.000 palmas de aceite por AR. (Gómez et al, 2004).

Una de las prácticas del manejo integrado de estas enfermedades AR y PC es la disminución de la población del *R. palmarum* a través de trampeo con recipientes plásticos, con insecticida. El uso de insecticidas no es sostenible por el daño a la salud humana, a la fauna y flora, el no uso de insecticidas, no es tan eficaz en el control, porque los insectos se fugan de las trampas en un porcentaje de 50%, según evaluaciones desarrolladas por (Bernhard Lohr y Pedro Pablo Parra, 2010).

Una alternativa para mejorar el control de *R. palmarum*, sin causar daño al ecosistema y a los trabajadores, es la inoculación de hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* con alto porcentaje de patogenicidad y virulencia, el hongo pueden ser aplicado a los cebos alimenticios de las trampas de recipiente plástico.

CENIPALMA es una de las instituciones que ha desarrollado investigaciones en laboratorio, infectando *R. palmarum* con *M. anisopliae*, el cual ha demostrado patogenicidad y virulencia en porcentajes hasta del 87% en adultos y en menor porcentaje en larvas; En otras investigaciones (Esteves E, 2008), evaluó cepas de *M. anisopliae* las cuales mostraron una alta patogenicidad y virulencia sobre adultos de *R. palmarum*, logrando mortalidades de 90 y 100%; Osorio y Lezama (1991), Citado por García J, (2013) reportan que cepas de *M. anisopliae*, a la concentración de 1×10^9 conidios/mL causa una mortalidad del 90% en *R. palmarum*, en un tiempo letal 50% (TL50) de 36 días en adultos. Revisando la patogenicidad y virulencia de estos hongos entomopatógenos sobre el *R. palmarum* en las pruebas en laboratorio se observa que es una alternativa viable y eficaz para el control de *R. palmarum*, sin riesgo para la salud humana y sostenible para el medio ambiente. El presente trabajo desarrolló pruebas de patogenicidad, en laboratorio de dos cepas de *M. anisopliae* obtenidas del banco de cepas de Corpoica, para que puedan ser integradas a programas de MIP en palma africana.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad biológica de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hypomycetes) sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: curculionidae) en condiciones de laboratorio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la patogenicidad en términos de concentración letal 50 y 90 (CL₅₀ y CL₉₀) de dos cepas de *M. anisopliae* sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* en condiciones de laboratorio.

Determinar la virulencia en términos de Tiempo Medio de Mortalidad (TMM) de dos cepas de *M. anisopliae* sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* en condiciones de laboratorio.

Seleccionar la cepa *M. anisopliae* con mayor potencial para el control biológico de adultos de *R. palmarum* bajo condiciones de laboratorio.

5. MARCO CONCEPTUAL Y TEÓRICO

Los insectos *R. palmarum*, *S. aloeus* y las enfermedades Marchitez letal (ML), Anillo Rojo (AR) y Pudrición de Cogollo, son consideradas de control oficial por parte ICA, ya que están generando un gran impacto económico en la producción de palma africana y alto riesgo de dispersión en nuestro país (ICA, 2015).

5.1 RHYNCHOPHORUS PALMARUM L.

5.1.1 Descripción taxonómica. Este insecto pertenece al orden Coleóptera, familia Curculionidae, tribu Rhynchophorini. Este género está constituido por diez especies de las cuales sólo tres están presentes en el neotrópico: *R. cruentatus*, *R. richeri*, y *R. palmarum* (Wattanapongsiri, 1966). Se conoce como picudo americano de las palmas, gualpa, casanga o gusano de los cogollos.

5.1.2 Distribución. *R. Palmarum* es una especie de distribución neotropical, con un amplio rango geográfico que se extiende desde el sureste de California y Texas hasta Argentina, Paraguay, Uruguay y Bolivia (Wattanapongsiri, 1966; Citado por Aldana R, 2011))

En Colombia se presenta en todas las zonas cultivadas de palma de aceite. Además se encuentra en zonas selváticas. El rango altitudinal también es extenso, encontrándose desde el nivel del mar hasta los 1.200 msnm (Jaffé y Sánchez, 1992).

5.1.3 Descripción morfológica.

5.1.3.1 Adulto. Son picudos de color negro, con el cuerpo en forma de bote. Miden entre 4 y 5 cm de longitud aproximadamente y 1,4 cm de ancho. La cabeza es pequeña y redondeada con un característico y largo rostrum curvado ventralmente (pico) (Mexzon et al., 1994; Sánchez *et al.*, 1993).

Figura 1. Adulto de *R. palmarum*



Fuente. Campos, J. C. 2015.

Presentan dimorfismo sexual; los machos tienen un notable penacho de pelos en la parte dorsal hacia el centro del rostrum o pico. Las hembras tienen el rostrum curvo y liso. Los adultos tardan 30 a 45 días para emerger de la pupa (Sánchez et al., 1993), permanecen dentro del capullo entre 7 y 11 días antes de salir (Hagley, 1965a).

5.1.3.2 Huevos. Son de color blanco crema, ovoides y de un tamaño promedio de 2,5 x 1 mm. Son colocados en posición vertical, a una profundidad de 1 a 2 mm y protegidos con un tapón de una sustancia cerosa de color amarillo cremoso. Tienen un periodo de incubación de 2 a 4 días (Hagley, 1965a; Sánchez et al., 1993).

Figura 2. Huevos de *R. palmarum*



Fuente. Campos, J. C. 2015.

Las hembras apareadas en el laboratorio y mantenidas en pareja presentan un periodo de ovoposición hasta de 43 días (Sánchez et al., 1993). Una hembra puede ovopositar 12 huevos inmediatamente después de la primera cópula y hasta 63 huevos en un día (González y Camino, 1974). Pueden colocar entre 697 (Sánchez et al., 1993) y 924 huevos por hembra en todo su ciclo (González y Camino, 1974).

5.1.3.3 Larvas. Son apodas, es decir que no tiene patas. Cuando emergen del huevo pueden medir 3,4 mm de longitud. El cuerpo es ligeramente curvado ventralmente.

Figura 3. Larva de *R. Palmarum*



Fuente. Campos, J. (2015)

Su color es blanco cremoso (Mexzon et al., 1994; Sánchez et al., 1993; González y Camino, 1974). Las larvas pasan por nueve a diez instares que tienen una duración de 42 a 62 días (Hagley, 1965a). En sus últimos instares pueden alcanzar una longitud de 5 a 6 cm. Durante este período es frecuente el encuentro entre larvas con el subsecuente canibalismo. En el último instar larval, que puede durar entre 4 y 17 días, toman una coloración amarillo más oscuro, y antes de empupar migran a la periferia del estípite o bases peciolares para tejer un capullo con fibras vegetales, el cual tapa los extremos con los tejidos fibrosos (Sánchez et al., 1993).

5.1.3.4 Pupas. El estado de pupa tiene una duración entre 16 días y 30 días. (Coto y Saunders, 2004).

Figura 4. Pupa de *R. palmarum*



Fuente. Campos, J. (2015)

Figura 5. Adultos de *R. palmarum* emergiendo del pupario



Fuente. . Campos, J. (2015)

Una vez formado el capullo que protege la pupa inicia la metamorfosis, es decir el cambio de estado de larva a pupa y de pupa a adulto dentro del capullo (Hagley, 1965a; Sánchez et al., 1993) El capullo mide aproximadamente 7 a 9 cm de longitud y 3 a 4 cm de diámetro. La pupa es de color café. Cuando es perturbada hace movimientos ondulatorios continuos con el

abdomen.

5.1.4 Daños que causa. *R. palmarum* se alimentan de los tejidos de la palma y se reproducen en ellas cuando han quedado abandonadas por estar afectadas por PC o cuando se encuentran en proceso de descomposición por cualquier otro motivo. Las hembras depositan sus huevos en los sitios donde se han producido heridas o cuando se presenta la pudrición de las flechas más jóvenes en las palmas afectadas por PC y cuando las larvas emergen, y durante su desarrollo, se alimentan del tejido blando del cogollo y las bases peciolares, lo que impide que la palma pueda producir nuevos tejidos sanos, nuevas emisiones de hojas y por consiguiente, su recuperación (Griffith, 1987; Chichilla, 1988; Acosta, 1991; Sánchez, 1987).

Este picudo se presenta como importante vector de nematodos causantes del AR, principalmente en las zonas Norte y Oriental. Esta enfermedad tiene gran variedad de síntomas según la edad del cultivo y la severidad o el tiempo de infección que tenga la palma enferma.

En Colombia las malas prácticas de erradicación de palmas con PC, han generado mayor disponibilidad de tejido para la alimentación y reproducción del *R. palmarum* (Bustillo A, 2014).

5.1.5 Alternativas de control. Dentro de las alternativas de control para este picudo: Una actividad es la erradicación de palmas con síntomas de AR, reducción de la población adulta de *R. palmarum*, mediante el uso de trampas (Morínet *al*, 1986; Chinchilla, Oehlschlaher 1992). Otra alternativa para el control de esta plaga, es mediante el uso de entomopatógenos, el cual debe hacerse mediante la “inoculación” de estos organismos, a través de liberaciones y aspersiones dirigidas a los focos de las plagas en el cultivo, los cuales se determinan a través de monitoreos. Estos microorganismos se establecen, diseminan y parasitan las plagas, regulando su población en el cultivo. Estas prácticas generan menos riesgo ambiental y mayor sostenibilidad, para el cultivo y el ecosistema (Bustillo, 2013).

Los entomopatógenos son un grupo de microorganismos (Bacterias, Virus, Nematodos, Hongos) con la capacidad de ejercer control sobre diferentes tipos de artrópodos (Insectos y ácaros), generalmente causando la muerte directa del artrópodo o actuando como antagonista,

inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos, mediante sustancias que excretan (Rodríguez y Arredondo, 2007). Los hongos entomopatógenos están representados en más de 700 especies reunidas en 100 géneros, son parásitos de diferentes tipos de artrópodos.

El primer entomopatógeno ilustrado fue el hongo *Cordiceps sinensis* realizado por Réaumur en 1726. Agostino Bassi realizó en 1835, los primeros trabajos en patología de insectos demostrando que *Beauveria bassiana* (Bals) era el agente causal de la enfermedad *Bombyx mori* L., en el gusano de seda.

En 1879 Metschnikoff estudió la muscardina verde enfermedad de las larvas de *Anisoplia austriaca* y la identificó como *Entomophthora anisopliae* (actualmente *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff). Sugirió el uso de larvas enfermas, esporas del hongo o suelo aledaño a larvas enfermas, para el control de larvas sanas.

5.2 METARHIZIUM ANISOPLIAE

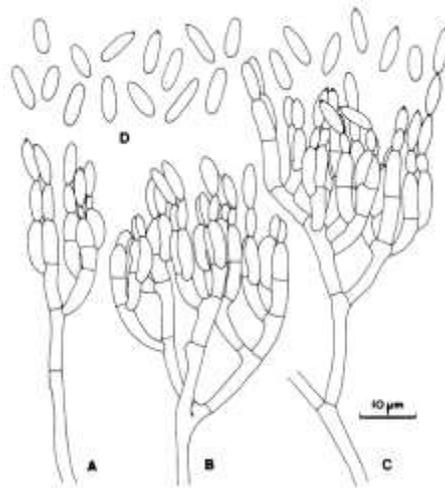
5.2.1 Taxonomía. *Metarhizium anisopliae* según Alex Opoulos y Mims, (1979) ha sido clasificado como:

Reino:	Mycetae
División:	Amastigomicota
Subdivisión:	Deutermycetes
Subclase:	Hyphomycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Moniliaceae
Géneros:	Metarhizium
Especie:	anisopliae y flavoviridae

5.2.2 Características generales. Se reproduce de forma asexual, a través de conidios o esporas asexuales. Produce conidióforo ramificado, las esporas son alargadas y se forman en cadenas. La conidia más joven es la de la base del conidióforo. En cada conidióforo se forma una

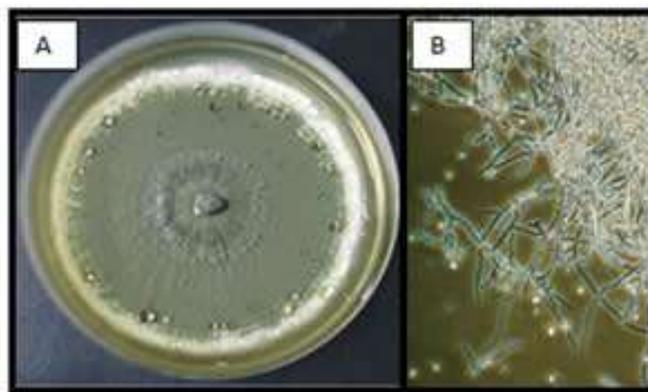
cadena de conidias biseptada, las cuales crecen densas y adheridas, son esporas alargadas. Las conidias cuando jóvenes son blancas y de color verde oscuro conforme van madurando.

Figura 6. Estructura del hongo *Metarhizium anisopliae* (conidióforos, fiálide y conidias (A, B, C), conidias (D))



Fuente: Tzean, SS et al.(1997).Estructura del hongo *Metarhizium anisopliae*[Figura]
http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802250009

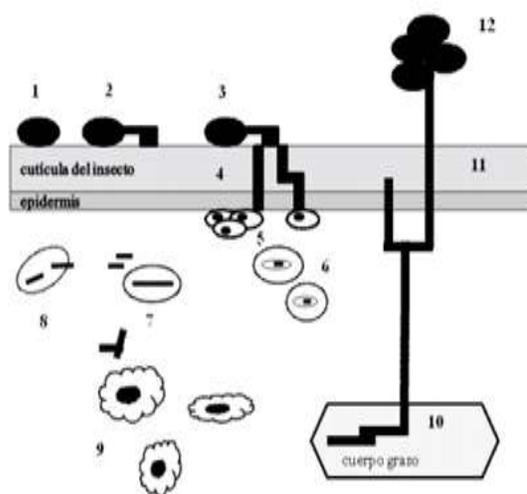
Figura 7. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) de *Metarhizium anisopliae*



Fuente: Pik-Kheng y col., (2009). Morfología macroscópica y microscópica de *Metarhizium anisopliae*. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM8/5.pdf>

5.2.3 Etapas del desarrollo de una micosis en insectos por el hongo *M. anisopliae*.

Figura 8. Etapas del desarrollo de una micosis en insectos por hongo entomopatógeno.



1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto,
2. Germnación y formación del apresario,
3. Penetración de la cutícula,
4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis,
5. Agregación de los hematocitos en el lugar de penetración fúngica,
6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto,
7. Transformación a cuerpos levaduriformes,
8. Evasión del sistema inmune,
9. Propagación en el hemocele,
10. Transformación a cuerpo grado

Fuente. Modificado de Vilcinskis & Gütz, 1990.

5.2.3.1 Adhesión. Fijación de los propágulos al tegumento.

5.2.3.2 Germinación. Luego de la hidratación del conidio o espora, germina emitiendo el tubo germinativo, para penetrar el insecto.

5.2.3.3 Penetración. Acción combinada de procesos físicos y enzimáticos formados por lipasas, proteasas y quitinasas (Gabriel, 1968; Leopold y Samsinakova, 1970).

5.2.3.4 Multiplicación del hongo en el hemocele. En el interior del insecto el hongo se multiplica por germinación, con formas de micelios libres y unicelulares, llamadas blastosporas.

5.2.3.5 Producción de toxinas. No todos los hongos producen toxinas en el hemocele. Estas toxinas producen la muerte en el insecto por sus actividades insecticidas (Vey y Götzt, 1986).

5.2.3.6 Muerte del insecto. Ocurre antes de que el hongo colonice todo el interior del hemocele. Esta es originada en parte por las toxinas.

5.2.3.7 Colonización total. Luego de la muerte o final de la fase parasítica, el micelio invade todos órganos y tejidos (Pekrul y Grula, 1979).

5.2.3.8 Emergencia del hongo al exterior. El hongo emerge del interior del insecto cuando se aumenta la humedad relativa, atravesando el tegumento nuevamente, generalmente por membranas intersegmentales o los espiráculos.

5.2.3.9 Esporulación. Las hifas que atraviesan el tegumento están en etapa vegetativa y pasan a etapa reproductiva entre 24 a 48 horas, conformando conidios o esporas. El insecto cambia de color. Blanco en el caso de *Beauveria Bassiana*, y verde oliva en el caso de *M. anisopliae*.

5.2.3.10 Diseminación. Los conidios o esporas que están sobre el insecto se dispersan por acción del viento, agua, por acción del hombre o de otros organismos.

5.2.4 Utilización. El hongo *Metarhizium anisopliae* ha venido siendo utilizado en muchos países para el control de diferentes plagas como: *Mahanarva posticata*, *Deois sp*, *Zulia sp* barrenadores en caña de azúcar y algunas especies de isóptera.

En Brasil la experiencia en la utilización de hongos entomopatógenos ha sido reconocida mundialmente con la utilización de *M. anisopliae* para el control de *Mahanarva posticata*, en caña de azúcar con más de 100.000 ha/año tratadas con este hongo. En Argentina han realizado estudios para la utilización de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi* encaminados a controlar plagas como *Diatrea saccharalis*, *Anticarsia gemmentalis*, *Rachiplusia nu* y *Spodoptera frugiperda*. Finalmente, en Colombia está siendo utilizado para el control de chizas, *Aeneolamia varia*, *A reducta*, *Spodoptera frugiperda*, *Tagosodes oryzicola*, *Euetheola sp*, *Sogata sp*, *Tibraca sp* y *Euschistus*.

CENIPALMA, ha venido investigando el uso de entomopatogenos, bajo condiciones de

laboratorio y luego de evaluar 24 cepas de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* que provenían de adultos de *R. palmarum*, como las más patogénicas y que causaron mortalidades de 80 y 87% en adultos y de 27 y 45% en larvas de *R. palmarum* (Alvarado *et al.*, 2013).

Esteves E, (2008), evaluó durante un periodo de 21 días, en condiciones de laboratorio las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, estas mostraron patogenicidad y virulencia sobre adultos de *R. palmarum*; logrando mortalidad en los insectos de 90% y 100%. La cepa de *B. bassiana* y la cepa de *M. anisopliae*, fueron las más virulentas, porque infectaron al 100% de los insectos *R. palmarum*, entre 6 días a 8 días.

Osorio y Lezama (1991), Citado por García J, (2013) reportan que cepas de *M. anisopliae*, a la concentración de 1×10^9 conidios/mL causa una mortalidad del 90% en *R. palmarum*, en un tiempo letal 50% (TL50) de 36 días en adultos.

6. METODOLOGÍA

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de entomología del Centro Investigación (C.I.) La libertad de Corpoica, situado en la vereda la reforma, Villavicencio (Meta), a una latitud de 4° 03' N; longitud 73° 29' W y una altitud de 336 msnm, la temperatura media anual es de 26°C y la humedad relativa (HR) de 75%.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* codificadas como Mt 040 y Mt 008 procedentes del banco de germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de la nación, el cual es administrado por el laboratorio de control biológico de Corpoica en el C.I. Tibaitatá. La cepa Mt 040 fue aislada a partir de insectos de *Ancognatha scarabaeoide* (Coleóptera: Nelolonthidae) (Erichson, 1847) recolectados en el municipio de Rio Negro, Antioquia; para la cepa Mt 008 no se conoce el hospedero del cual se aisló, pero se sabe que procede de muestras tomadas en el C.I. La Libertad, departamento del Meta.

6.1 REACTIVACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

La reactivación de las dos cepas de *M. anisopliae* se realizó utilizando adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Coleóptera: Curculionidae) (Linnaeus, 1758) recolectados en campo y mediante el método de inmersión. Para tal fin se prepararon suspensiones de cada uno de los hongos a una concentración ajustada de 3×10^8 conidios/ml (Gutiérrez y Saldarriaga 2004) y se seleccionaron 10 individuos por cada una de las cepas, los cuales fueron sumergidos en dicha suspensión durante 5 minutos. Los individuos inoculados se colocaron luego en recipientes plásticos cuadrados de 1.6 L con dieta natural y se mantuvieron en condiciones de laboratorio con una temperatura promedio de 27°C y 75% de HR. Los insectos se revisaron diariamente durante 21 días y los individuos muertos se colocaron en una cámara húmeda en condiciones de laboratorio para favorecer la esporulación del hongo; a partir de los insectos esporulados se recuperaron los hongos en medio de cultivo YM.

6.2 PRODUCCIÓN MASIVA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Una vez se contaba con las cepas de *M. anisopliae* reactivadas se procedió a realizar su producción masiva. Para tal fin, se utilizó un medio de cultivo sólido, el cual consistió en 50 g de arroz comercial contenido en botellas de vidrio planas de 375 cc, con 80 ml de agua destilada, siguiendo la metodología descrita por Antia et al. (1992). Luego de su esterilización, por 15 minutos a 121°C y 15 p.s.i, cada botella se inoculó con 1 ml de suspensión de conidios de *M. anisopliae* obtenidos de la reactivación del hongo. Estos medios se incubaron a 25°C \pm 2°C, HR de 70% \pm 5% por 30 días.

6.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

A partir de los conidios de *M. anisopliae* reactivados y producidos en medio de cultivo sólido durante 30 días, se realizó una separación en húmedo de los mismos mediante lavado con Tween® 80 al 0,1% y agitación manual. El sustrato de producción fue lavado completamente hasta observar el desprendimiento de las esporas de los granos de arroz y la suspensión obtenida fue luego filtrada mediante muselina estéril y filtro con tamaño de poro de 106 μ m.

Con las suspensiones obtenidas para cada cepa y mediante recuento en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico a 40X, se prepararon cinco concentraciones ajustadas en 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 con/ml para cada cepa. Los bioensayos se realizaron con adultos de *R. palmarum* obtenidos en una plantación de palma africana, que fueron previamente confinados en condiciones de cuarentena para descartar los insectos enfermos.

Los tratamientos a evaluar consistieron en las cinco concentraciones ajustadas para cada cepa y un testigo absoluto donde no se realizó ninguna aplicación, utilizando un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Para tal fin, se utilizaron 50 ml de cada una de las suspensiones con los cuales se inocularon 30 individuos por tratamiento, mediante el método de inmersión por un tiempo de cinco minutos. Los insectos inoculados se confinaron en cajas plásticas cuadradas de 1.6 L de capacidad, se alimentaron con dieta natural correspondiente a cañas de azúcar y se mantuvieron en condiciones de laboratorio con una temperatura promedio de 27°C y 75% de HR.

Figura 9. Proceso de inmersión x 5min



Fuente. Velásquez, H. (2015)

Figura 10. Confinamiento en cajas x 21 días



Fuente. Velásquez, H. (2015)

La mortalidad de los insectos se registró diariamente y durante 21 días postinoculación. Los insectos muertos se colocaron en cámaras húmedas de manera individual, para favorecer la esporulación del hongo y evidenciar el desarrollo de la enfermedad.

Figura 11. *R. palmarum* en cámara húmeda

Fuente. Velásquez, H. (2015)

A partir de los datos de mortalidad se calcularon los porcentajes de eficacia para cada uno de los tratamientos evaluados utilizando la fórmula de Schneider- Orelli (Zar, 1999).

$$\% \text{ Eficacia} = \left[\frac{(A - B)}{(100 - B)} \right] \times 100$$

En donde A es igual a la mortalidad en el tratamiento y B corresponde a la mortalidad en el testigo absoluto. Para estos resultados se determinó la homocedasticidad y normalidad de los datos mediante pruebas de Bartlett y Shapiro-Wilk (95%) respectivamente, y se realizó una prueba ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) mediante el programa Statistix 8.0.

Posteriormente, los datos de mortalidad de los tratamientos fueron corregidos con respecto al testigo y se utilizó un modelo Probit (Finney, 1952) mediante el programa POLO-PLUS 1.0 (LeOra Software, 2010) para determinar la concentración letal media (CL₅₀) y noventa (CL₉₀) de las dos cepas evaluadas. Para comparar los valores de CL₅₀ obtenidos, se calcularon las líneas de paralelismo y se probó la hipótesis de igualdad mediante el programa POLO-PLUS 1.0 (LeOra Software, 2010).

6.4 PRUEBAS DE VIRULENCIA

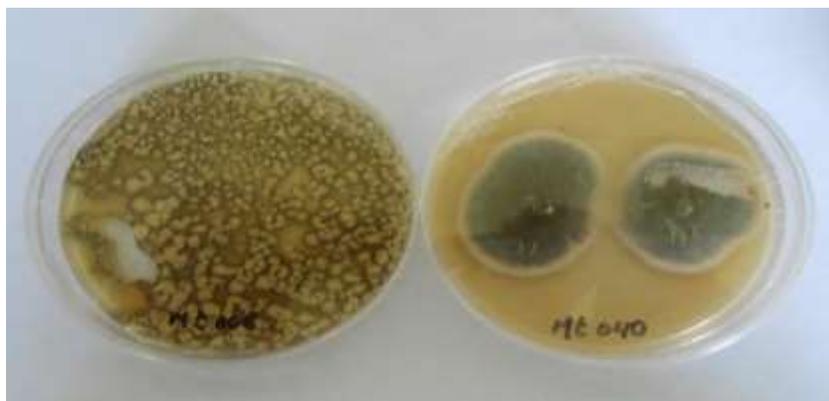
Adicionalmente utilizando los datos de mortalidad diaria obtenida en las pruebas de patogenicidad para el tratamiento correspondiente a 1×10^8 con/ml, se calculó el tiempo medio de mortalidad (TMM) para cada una de las cepas. Los datos fueron sometidos a un análisis de supervivencia mediante el programa POLO-PLUS 1.0 (LeOra Software, 2010). Para comparar los valores de TMM obtenidos para cada cepa, se calcularon las líneas de paralelismo y se probó la hipótesis de igualdad utilizando el mismo programa.

7. ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS

7.1 REACTIVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS

La reactivación de las dos cepas de *Metarhizium* se realizó según la metodología descrita.

Figura 12. Cepas utilizadas para la reactivación del hongo



Fuente. Campos, J. (2015)

Para las dos cepas en medio YM, se obtuvieron colonias redondeadas con una coloración inicial amarilla y posteriormente se observó la esporulación de los hongos con esporas de color verde oscuro. A partir de estas esporas se realizó la producción masiva en botellas con sustrato sólido correspondiente a arroz, como se mencionó en la metodología.

Figura 13. Propagación de *M. anisopliae* en medio sólido (arroz)



Fuente. Campos, J. (2015)

Se observó una colonización completa del sustrato sólido cubierto por esporas después de 21 días de incubación para las dos cepas evaluadas. A partir de las esporas obtenidas se realizaron todos los bioensayos.

7.2 PATOGENICIDAD

7.2.1 Mortalidad. En todos los tratamientos inoculados con el hongo se observaron insectos con síntomas típicos de infección por hongos, como presencia de hifas o etapa vegetativa del hongo con una coloración blanca inicial, que posteriormente se tornó a una coloración verde oscura con la esporulación del hongo (Figuras 14 y 15). Las dos cepas evaluadas presentaron síntomas similares.

Figura 14. *R. palmarum* infectado por cepa *Mt 040*



Fuente. Campos, J. (2015)

Figura 15. *R. palmarum* infectado por cepa *Mt*



Fuente. Velásquez, H. (2015)

Con las diferentes concentraciones evaluadas del hongo, se observó que para las dos cepas a medida que aumentaba la concentración del hongo, aumentó la mortalidad de los adultos de *R. palmarum* (Tabla 1).

Tabla 1. Mortalidad de las dos cepas de *M. anisopliae* evaluadas

Tratamiento	Mortalidad (%)	
	Mt040	Mt008
Testigo absoluto	10,0 d	10,0 c
1×10^4 con/ml	23,3 cd	26,6 bc
1×10^5 con/ml	43,3 bc	50,0 b
1×10^6 con/ml	53,3 b	50,0 b
1×10^7 con/ml	83,3 a	46,7 b
1×10^8 con/ml	90,0 a	100 a

Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)

El análisis estadístico se realizó para cada cepa de manera independiente, los resultados presentaron homogeneidad de varianzas y normalidad por lo cual se realizó un análisis de varianza paramétrico (ANAVA) comparando las diferentes concentraciones evaluadas; la comparación de medias se realizó con un test de Tukey al 95%.

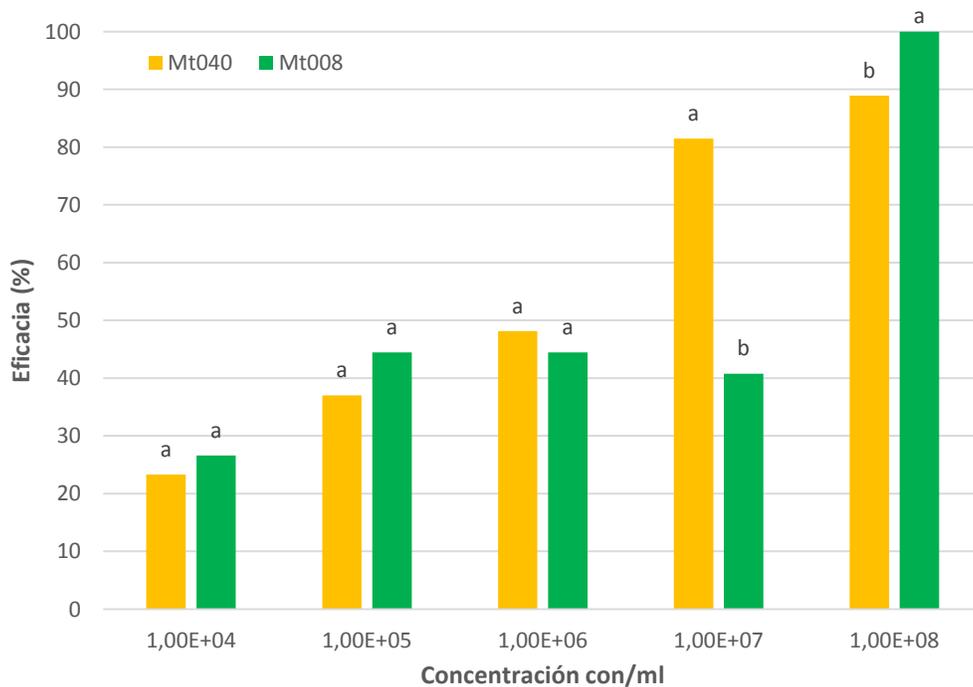
Para la cepa Mt040 se observó una mortalidad que osciló entre el 23,3% y el 90% con las diferentes concentraciones evaluadas (Tabla 1). A excepción de la concentración 1×10^4 con/ml, con todas las concentraciones se obtuvo una mayor mortalidad con respecto a testigo presentando diferencias significativas ($P= 0,0000$; $F= 42,2$; $gl= 17$). Las concentraciones intermedias de 1×10^5 y 1×10^6 con/ml no presentaron diferencias estadísticas al igual que las mayores concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 con/ml.

Para la cepa Mt008 la mortalidad osciló entre el 26,6% y el 100% con las diferentes concentraciones evaluadas (Tabla 1). Al igual que la anterior cepa a excepción del tratamiento 1×10^4 con/ml con todas las concentraciones se obtuvo una mayor mortalidad con respecto a

testigo presentando diferencias significativas ($P= 0,0000$; $F= 35,6$; $gl= 17$). Entre las concentraciones de 1×10^4 y 1×10^7 con/ml no se observaron diferencias significativas entre sí, pero para la concentración de 1×10^8 con/ml se obtuvo la mayor mortalidad con un 100%, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos.

7.2.2 Eficacia. A partir de la mortalidad obtenida en cada uno de los tratamientos y mediante una corrección con la mortalidad obtenida en el testigo absoluto mediante la fórmula de Schneider Orelli se determinó la eficacia de cada una de las cepas del hongo. El análisis estadístico se realizó para cada concentración evaluada comparando las dos cepas, los resultados presentaron homogeneidad de varianzas y normalidad por lo cual se realizó un análisis de varianza paramétrico (ANAVA) y una comparación de medias con un test de Tukey al 95%:

Gráfica 1. Comparación de eficacia de cada concentración de las cepas de *M. anisopliae* evaluadas

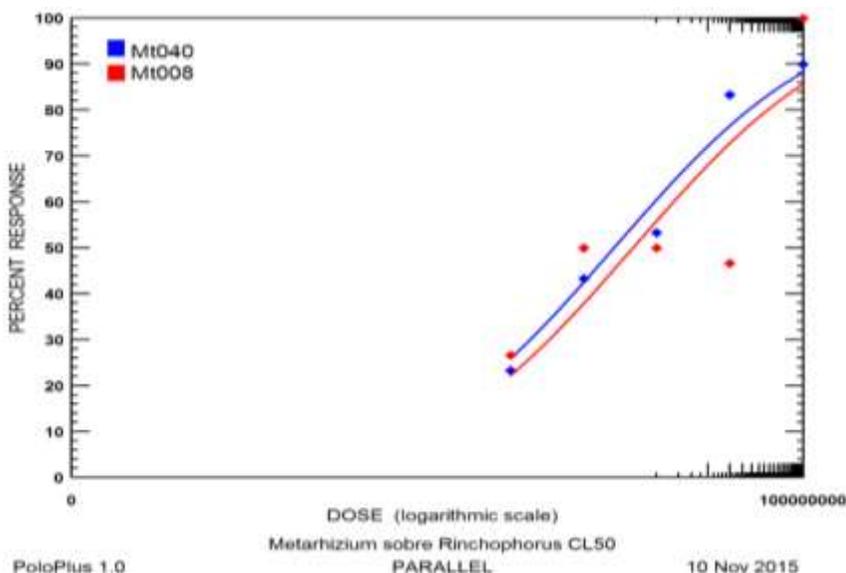


Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)

Para las concentraciones entre 1×10^4 y 1×10^6 con/ml no se presentaron diferencias significativas para la eficacia de las dos cepas, lo que sugiere que a estas concentraciones las dos cepas presentan una actividad biológica similar. Sin embargo, para la concentración de 1×10^7 con/ml la cepa Mt040 presentó una mayor eficacia (81,5%) en comparación con la eficacia obtenida con la cepa Mt008 (40,7%). Por el contrario, para el tratamiento correspondiente a 1×10^8 con/ml, la cepa Mt008 presentó una mayor eficacia con un 100% en comparación con la cepa Mt040 con una eficacia del 88,9% (Gráfica 1) [1×10^4 con/ml: (P= 0,5185; F= 0,50; gl= 5), 1×10^5 con/ml: (P= 0,5616; F= 0,40; gl= 5), 1×10^6 con/ml: (P= 0,6435; F= 0,25; gl= 5), 1×10^7 con/ml: (P= 0,0177; F= 15,1; gl= 5), 1×10^8 con/ml: (P= 0,0001; F= 206; gl= 5)].

7.2.3 Concentración letal. Con los datos de mortalidad obtenidos se realizó una corrección con respecto al testigo y se utilizó un modelo Probit para calcular la relación dosis-mortalidad de las cepas Mt040 y Mt008 sobre adultos de *R. palmarum*. Los valores de P obtenidos fueron superiores a 0,05 (Tabla 2), lo que permitió aceptar la hipótesis de que existe una correlación lineal entre la dosis y la mortalidad de los insectos; además los bajos valores de Chi-cuadrado (χ^2) sugirieron homogeneidad entre los datos, lo que además indicó que la distribución experimental se ajustó a la teórica (Zar, 1999) (Gráfica 2).

Gráfica 2. Concentración Letal Media.



Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)

Bajo las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo, la mortalidad de los insectos se vio afectada por la concentración del hongo utilizada, obteniéndose valores de concentración letal media (CL₅₀) de 2,8 x 10⁵ con/ml para la cepa Mt040 y de 4,3 x 10⁵ con/ml para la cepa Mt008 y valores de CL₉₀ de 8,8 x 10⁷ con/ml y 6,5 x 10⁸ con/ml para las cepas Mt040 y Mt008, respectivamente (Tabla 2). La comparación entre los límites fiduciales (95%) de la CL₅₀ indicó que no existen diferencias entre la patogenicidad de las dos cepas, lo que fue confirmado con el programa POLO-PLUS 1.0 (LeOra Software, 2010) cuyo análisis permitió aceptar las hipótesis de igualdad (P= 0,353) y paralelismo (P= 0,379) entre los resultados obtenidos para las dos cepas de *M. anisopliae* evaluados.

Tabla 2. Concentración Letal Media

Cepa	CL ₅₀ (con/ml)	Límites de confianza de la CL ₅₀ 95%		CL ₉₀ (con/ml)	Pendiente ± error estándar	Nive l de p	Heterogeneida d	
		Inferior	Superio r				χ ²	GI
Mt040	2,8x10 ⁵	8,6x10 ⁴	7,7x10 ⁵	8,8x10 ⁷	0,514±0,08	0,41 2	1,237	3
Mt008	4,3x10 ⁵	3,9x10 ³	4,8x10 ⁷	6,5x10 ⁸	0,404±0,18	0,22 0	4,413	3

Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)

7.3 VIRULENCIA

7.3.1 Tiempo medio de mortalidad (TMM). El tiempo medio de mortalidad (TMM) fue estimado con la concentración que resultó en aproximadamente el 90% de la mortalidad de los insectos, que para las dos cepas fue 1 x 10⁸ con/mL. La gráfica obtenida, evidencia una relación directa entre el tiempo y la mortalidad de los insectos. Para la cepa Mt040 se obtuvo un TMM de 8,8 días y para la cepa Mt008 de 13,1 días (Tabla 3, Gráfica 2), valores que presentaron diferencias significativas sugiriendo que las dos cepas difieren en su virulencia determinada como tiempo de acción, en donde la cepa Mt040 actúa en un menor tiempo.

Tabla 3. Tiempo Medio de Mortalidad

Cepa	TMM (días)	Límites fiduciales (95%) (días)		Hipótesis de Igualdad	Hipótesis de paralelismo
		Inferior	Superior		
Mt040	8,8	7,8	9,7	P= 0,000	P= 0,870
Mt008	13,1	11,9	14,4	Rechazada	Aceptada

Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* es un hongo cosmopolita que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes, los cuales son cubiertos por micelio, que inicialmente es de color blanco, pero que se torna verde una vez que el hongo esporula (Sandino, 2003. Citado por Franco G, 2014), como se observó en este trabajo. Posee un amplio espectro de acción ya que puede infectar a una gran cantidad de insectos, además de tener la facilidad para crear epizootias, lo cual favorece su diseminación. Se produce principalmente sobre productos y desechos agrícolas como cascarilla de arroz y arroz (Esteves & Cedeño, 2008). Asimismo, se ha descrito que puede ocasionar un control efectivo sobre una de las plagas de alta importancia en palma para el país como *R. palmarum* (Osorio y Lezama, 1991; Lezama-Gutiérrez et al., 2006).

A nivel mundial se ha evaluado la actividad biológica que puedan tener diferentes cepas de este hongo sobre adultos de la plaga. En México (Armería, Colima) se encontró que con una aplicación mensual de *M. anisopliae* se ha logrado una reducción en el número de adultos de *R. palmarum* en un 48.2%, con una aspersion foliar del hongo a la concentración de 1×10^8 esporas/ml en condiciones de campo (Mora & Ceballos, 2007).

En diferentes trabajos, en condiciones de laboratorio se ha reportado que con diferentes cepas de *M. anisopliae* evaluadas a una concentración de 1×10^9 con/ml se obtienen mortalidades entre el 87,5% y el 90% y un TMM de 36 días sobre adultos de *R. palmarum* (Almeida et al., 2010; Osorio y Lezama, 1991). En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo en donde con una concentración de menor de solamente 1×10^7 con/ml se obtiene una mortalidad similar con un valor del 83,3% y un TMM del 8,7 días, lo que sugiere que las cepas evaluadas en este estudio presenta una mayor actividad biológica para el control de adultos de esta plaga.

Las diferencias en actividad entre diferentes cepas del mismo hongo, pueden deberse al mecanismo de acción y a los factores de virulencia de cada una. En el mecanismo descrito para este hongo, este ingresa a través del tegumento usando hifas filamentosas de penetración y por efecto de proteínas de degradación, Posteriormente, dentro del hemocele estas hifas de penetración se transforman en cuerpos de hifas como de levadura o protoplastos que proliferan

en nuevos crecimientos. Después el hongo nuevamente cambia a fase filamentosa e invade tejidos y órganos. El hongo posteriormente sale a través de la cutícula y micelios externos cubren al huésped. En cada paso de este ciclo de infección se producen diferentes proteínas o toxinas de degradación cuyo nivel de producción y efectividad depende de las características genéticas de cada cepa, de las condiciones ambientales y del grado de adaptación al hospedero (Castrillo 2005)

Adicionalmente, en condiciones ambientales que no son favorables en términos de humedad y temperatura según las características de cada cepa, este hongo puede formar estructuras de descanso dentro del insecto y no continuar con su ciclo de infección (Castrillo, 2005). Estos hongos, también producen metabolitos secundarios, derivados de varios pasos en la formación de los metabolitos primarios, de los cuales algunos poseen propiedades insecticidas. Los hongos que los poseen producen la muerte más rápidamente que los que no (Fernández-Larrea, 2002).

Mortalidades del 100% y 88,9% a concentración de 1×10^8 de las cepas Mt008 y Mt040 respectivamente y TMM entre 8,7 y 13,4 días, son características de gran importancia si tenemos en cuenta que *R. palmarum* pueden vivir entre 40 y 90 días. La selección de cepas entomopatógenas con menores concentraciones letales y menor tiempo de mortalidad permitiría que los adultos no cumplan con su función reproductiva y el daño indirecto que ocasiona.

9. CONCLUSIONES

Las cepas Mt040 y Mt008 presentaron la misma patogenicidad en términos de CL_{50} con valores de, 8×10^5 y $4,3 \times 10^5$ respectivamente. Sin embargo, se observaron algunas diferencias a nivel de eficacia con las dos mayores concentraciones evaluadas, en donde una mortalidad óptima en condiciones de laboratorio (cerca al 80%) se obtiene con la cepa Mt040 a la concentración de 1×10^7 con/ml, lo que sugiere que esta cepa sería óptima para ser incorporada en un MIP.

La cepa Mt040 presentó una mayor virulencia con un menor valor de TMM, en comparación con la cepa Mt008 con valores de 8,8 y 13,1 días, respectivamente; lo que sugiere que la cepa Mt040 sería la mejor para implementar un manejo de control biológico de esta plaga al presentar un tiempo de acción menor.

En este trabajo se seleccionó la cepa de *M. anisopliae* Mt040 por su mayor potencial para el control biológico de adultos de *R. palmarum* bajo condiciones de laboratorio; ya que aunque no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones letales de las dos cepas, en el tiempo medio de mortalidad esta cepa actúa más rápido.

10. RECOMENDACIONES

Las cepas de *M anisopliae* utilizadas en este estudio demostraron poseer buena patogenicidad y virulencia para el control de *R. palmarum* en condiciones de laboratorio, por lo que sería conveniente realizar evaluaciones en campo para determinar si pueden ser incorporado a programas de manejo integrado de *R palmarum* en cultivos de palma africana y coco.

Sería importante realizar estudios con otras especies de hongos entomopatogenos como *Beauveria bassiana*, otras cepas de *M. anisopliae*, para el control biológico de *R. palmarum*.

BIBLIOGRAFÍA

- A.M.B. de Almeida et al., 2010. Susceptibilidad de *Rhynchophorus palmarum* ácao de *Metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. En: Almeida, pdf. Instituto de Biología. Vol.77. N 4. P 662. [Citado 2010]. Disponible en:
- Acosta, G. A. 1991. Pudrición del cogollo en palma de aceite: observaciones y manejo. *Palmas (Colombia)*, 12 (2): 49 - 54
- Aldana, R. C. (2005). Medidas para prevenir el Ataque de *Rhynchophorus palmarum* L. palmas afectadas por Pudrición del cogollo. Hoja divulgativa, 1-2. Bogotá: Sena – Cenipalma.
- Aldana, R. C; Aldana, J. A; Moya, O. M. 2011. Cartilla- rpalmarum-ICA. final (1) pdf. Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). Instituto Colombiano Agropecuario. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx).
- Alejandro, T, María, C, Yuridia, M, y Alí, A, T. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Universidad Politécnica de Pachuca, Sonora, México. Pag.1. [Agosto, 2015]. Disponible en:<http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2010/06/7.-TR-141.pdf>
- Bedford, G., Ocampo, M., & Reyes, F. 1. (1978). México red-ring disease and *Rhynchophorus palmarum* on coconut palms. *FAO Plant Protection Bulletin*, 1(26), 26-29.
- Bedford, G.O., M.M. Ocampo and F. Reyes. 1978. México red-ring disease and *Rhynchophorus palmarum* on coconut palms. *FAO Plant Protection Bulletin* 26(1):29.

Bernhard L, Parra p. Manual de Trampeo del Picudo Negro de las Palmas *Rhynchophorus palmarum* L. Velásquez digital S.A.S., Cali, Colombia, 2014, p 6.

Bustillo Alex P. Manejo de Insectos plaga de la palma de Aceite con énfasis en Control biológico y su relación con el cambio climático.pdf. [En línea]. Revista palmas, Vol.35. 2014 [Citado Octubre 2015]. Disponible en Internet: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/11035>.

Castrillo, LA. Roberts, DW. y Vandenberg, JD. 2005. The fungal past, present, and future: germination, ramification and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 89, p. 46 - 56.

Chang, Ll; Delgado, H. 2011. Trampa con atrayentes: feromona y frutas para capturas de adultos de (*Rhynchophorus palmarum* L.) y “picudos” (*Metamasius sericeus*) en cocotero. Exposición. Foro Regional Andino para El Dialogo y La Integración de la Educación Agropecuaria y Rural. Venezuela. Oct. 2011.

Chinchilla, C. M. (1988). El síndrome del Anillo rojo-Hoja pequeña en palma aceitera y cocotero. *Oil Palm Operations*, 2(4), 125.

Chinchilla, C. M. 1988. El síndrome del Anillo rojo-Hoja pequeña en palma aceitera y cocotero. *Bol. Tec. (2):4. Oil Palm Operations (Costa Rica)*. 125p.

Coto y Saunders, 2004. Citado por: Espinoza H, Fundación Hondureña de Investigación Agrícola.pdf. Efectividad del Trampeo Intensivo Para el Control del Picudo *Rhynchophorus palmarum* L en el cultivo del Coco. . [En línea]. 2012. Hoja Técnica, N (3). [Octubre2015]. Disponible en Internet: http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/hoja_tecnica_proteccion_vegetal13.pdf

Dane, (2011). Proyecciones de Población-DANE. [En línea]. Disponible en internet:

Dangon L, Palma de aceite: compromiso con el progreso y al convivencia. En: Revista palmas. Vol. 35 (3), (Julio Septiembre, 2014) [Septiembre, 2015] Disponible en: file:///C:/Users/heberth/Downloads/10998-11532-1-SM.pdf

Dangon. (2014). de aceite. Palmas (Colombia) v. 11 , no. 3, p.32-63

Esteves, E. F; Cedeño, R. j. Susceptibilidad de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleóptera: Curculionidae) a Cepas de Hongos Entomopatógenos. Universidad Earth. 2008.

Fedepalma. 1988. Anillo rojo en palma de aceite. Boletín técnico 4. Bogotá

Fernández – Larrea, O. 2002. Introducción al tema: control microbiológico de plagas agrícolas. In producción y uso de agentes microbianos para el control de plagas en agricultura ecológica. Turrialba (CR): CATIE. P. 2-8.

Gallegos Morales, G., Cepeda Siller, M., & Olayo Paredes, R. P. (2003). Entomopatógenos. México, D.F., Trillas, S. A, p, 59 - 73

Genty, P. (1988). Manejo y control de plagas en palma africana. VI Seminario sobre problemas fitopatológicos de la palma africana. iica, bid, Prociandino. GENTY, P. 1988. Manejo y control de plagas en palma africana. VI Seminario sobre problemas fitopatológicos de la palma africana. iica, bid, Prociandino (Colombia) 101-112, Colombia.

Gómez, P. L., Calvache, H., & C., A. R. (2004). Stem and root borers: Two important pests of the oil palm crop in South America. International conference on pest and diseases of importance to the oil palm industry, 1-19.

Gomez, P.L.; Owen, E.; Calvache, H.; Nieto, L.E.; Alvarez, G.; Mondragon. V. 1 990. Diagnóstico Tecnológico del cultivo de la palma de aceite. Palmas (Colombia) v. 11 , no. 3, p.32-63

Griffith, 1987; Chichilla, 1988; Acosta, 1991; Sánchez, 1987. Citado por: ALDANA R.C, 2011). Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). [En línea]. Cartilla- rpalmarum -ICA. final (1) pdf. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en Internet: [http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eefcfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eefcfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx)

Griffith, R. (1968a). The mechanism of transmission of the red ring nematode. *J. Agric. Soc.*, 149 - 159.

Griffith, R. (1968b). The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. *J. Agric. Soc.* , 3(5), 342-356.

Griffith, R. (1987). Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis.*, 2(71), 193-196.

Griffith, R. 1968 b. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. *J. Agric. Soc. Trinidad and Tobago* 68(3): 342-356.

Griffith, R. 1968A. Quoting BLANDFORD, 1893. In The mechanism of transmission of the red ring nematode. *J. Agric. Soc. Trinidad and Tobago*, 3: 149 - 159.

Griffith, R. 1987. Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis.* 71(2): 193-196.

Griffith, R., & Quoting, B. J. (1968-1893). In The mechanism of transmission of the red ring nematode. *J. Agric. Soc.*, 3, 149 - 159.

Hagley E. 1963. Quoting Ashby, 1921 in The role of the palm weevil as a vector of red ring disease of coconuts. *Journal of Economic Entomology* 56, 375–380.

Hagley, 1965a; Sánchez et al., (1993). Citado por: ALDANA R.C, 2011). Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). [En línea]. Cartilla- rpalmarum -ICA. final (1) pdf. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en Internet:

[http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx)

Hagley, E. 1965b. Tests of attractants for the palm weevil. *J. Chem. Ecol.* 58(5): 1002-1003.

Hagley, E., & Quoting, A. (1963-1921). The role of the palm weevil as a vector of red ring disease of coconuts. *Journal of Economic Entomology*(56), 375-380.

<http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=162>.

http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/conciliacenso/7_Proyecciones_poblacion.pdf.

L, D. (2004).

Lecuona, R. E. *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. Buenos Aires, Argentina: Talleres Gráficos Mariano Mas.1996, p, 35 – 42.

Leora Software. (2010). Polo Plus. Probit and logit analysis.

Lezama-Gutiérrez, R., Reyes-Martínez, J. G., Barba-Reynoso, M., Angel-Sahagún, C. A., Galindo-Velasco, E., López-Lavín, M. y Molina- Ochoa, J. 2006. Uso del *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) para el control de *Rhynchophorus palmarum* (Coleóptera: Curculionidae) en campo. *Entomol. Mex.* 5:586-600.

Madrigal. A. (2001) *Fundamentos de control biológico de plagas*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de Ciencias, p, 168-171

Martínez Luis L. *Revista ICA*, 2013. [Octubre 2015]. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-\(1\)/Lanzamiento-programa-fitosanitario-para-combatir-l.aspx](http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-(1)/Lanzamiento-programa-fitosanitario-para-combatir-l.aspx).

Martínez, G., Arias, N., Sarria, G., Torres, G., Aldana, R. C., Martínez, L. C., y otros. (2008). *Prácticas de manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite*. Prácticas de

manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite., 1-12.

Martínez, G.; Arias, N.; Sarria, G.; Torres, G.; Aldana, R. C.; Martínez, L. C.; Moya, O.; Burgos, C. 2008. Prácticas de manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. Folleto. 12p.

Mexzon et al., 1994; Sánchez et al., 1993. Citado por: Aldana R.C, 2011). Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). [En línea]. Cartilla- *rpalmarum* -ICA. final (1) pdf. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en Internet: [http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx)

Ministerio De Agricultura – Colombia, Ica y Fedepalma . (s.f.). Campaña contra la pudrición. Obtenido de . <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Ministerio-de-Agricultura,-ICA-y-FEDEPALMA,-lancan-campa%C3%B1a-contrala-Pudrici%C3%B3n-del-cogollo.aspx>

Mondragon. V. 1 990 . Diagnóstico Tecnológico del cultivo de la palma

Mora, C.A. 2007. Efecto de la aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) y peremetrina sobre la densidad de adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Coleóptera: Curculionidae) y palmas atacadas por *Bursaphelenchus Cocophilus* (Tylenchidae) en campo. Tesis (Lic), FCBA Universidad de Colima. p, 137.

Morin J.; Lucchiani F.; De Araujo, J.; Ferreira, J.; Fraga, L. 1986. Control de *Rhynchophorus palmarum* mediante trampas construidas por pedazos de palma. *Oleagineux* (Francia) 41(2): 6163.

Oehlschlager, A.C, Chinchilla y Gonzáles L.M. Gonzales L.M. Manejo del Picudo de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) y la enfermedad de anillo rojo mediante un sistema de trapeo basado en la feromona de agregación.pdf [En línea] ASD. Oil Palm Papers. N5,

24-31.1992. [Citado Octubre 2015]. Disponible en Internet: <http://aitesahn.com/DOCUMENTOS/nuevos/Manejo%20del%20picudo%20de%20la%20palma.pdf>.

Osorio, B. G. J. y Lezama, G. R. 1991. Actividad patogénica de *Metarhizium anisopliae* en adultos de mayate prieto del cocotero *Rhynchophorus palmarum* L. en laboratorio. XIV Congreso Nacional de Control Biológico. Buenavista, Saladillo, Coahuila. Pp.254.260.

Peña, E. A; Reyes, R. 1994. Dinámica poblacional del insecto *Rhynchophorus palmarum* L., en la Zona de Tumaco. PALMAS. V 18, N. 4. 1997.

Pik-Kheng Hoe, Choon-Fah J. Bong, Kadir Jugah, Amartalingam Rajan. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) Isolates and their Effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 4 (4): 289-297.

Posada, F. 1988. Manejo de vectores insectiles del anillo rojo en palma africana. VI Seminario sobre problemas fitosanitarios de la palma africana.

Pucheta Diaz, M., Flores Macias, A., Rodriguez Navarro, S., & De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Inci, 31(12).

Ramírez F. 1998. Reconocimiento de enemigos naturales y estudio de la fluctuación poblacional de *Rhynchophorus palmarum* y *Metamasius hemipterus* (Coleóptera: Curculionidae) Acacias (Meta). Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Bogotá.

Ramírez M, Benítez E, Pudrición de cogollo PC (*Phytophthora palmivora*) . En: CropLife Latín América. 2013. [Octubre 2015]. Disponible en:

Rangel, J. L. Dinámica de captura de adultos de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera:

Curculionidae) en la red de monitoreo de la Zona Occidental. Ponencia de la IX Reunión Técnica Nacional en Palma de Aceite. Cenipalma. sept. 2010.

Restrepo, I. G.; Rivera, F.; Raigosa, J. 1982. Ciclo de vida, hábitos y morfometría de *Metamasius hemipterus* Oliver. Y *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.). *Acta Agron.* 32 (1/4): 33-44.

Rochat, D. (1987). Etude de la communication chimique chez un Coleoptere: Curculionidae. Disertación de maestría, 1-30. Paris: Universite Paris VI. Institut National Agronomique.

Sánchez et al., 1993. Citado por: Aldana R.C, 2011). Cartilla- *rpalmarum*-ICA. final (1) pdf. Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). Instituto Colombiano Agropecuario. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx).

Sánchez, A. 1987. El anillo rojo del cocotero y la palma aceitera en Colombia. Biología, hábitos, hospedantes, alternativas y vectores de su agente causal *Rhadinaphelenchus cocophilus*. En: Foro sobre Anillo rojo. Santa Marta, Fedepalma. 33p

Sánchez, P., Jaffé, K.; Hernández, J. V.; Cerda, H. 1993. Biología y Comportamiento del Picudo del Cocotero *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). Venezuela. P 83-93.

Sandino, & Citado por Franco G, G. (1 de diciembre de 2003). <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3896/63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>. Recuperado el 19 de Diciembre de 2015, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3896/63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3896/63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>

NCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1

Sandino, 2., & Citado por Franco, G. (1 de Diciembre de 2014). repositorio.uaaan.mx:8080/.../63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERA.. Recuperado el 19 de Diciembre de 2015, de repositorio.uaaan.mx:8080/.../63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERA..: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3896/63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>

Sandino, 2003. Citado por Franco G, 2014, Estudio de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en el Quiste de Nematodo Dorado de la papa *Globodera rostochiensis* (Bechrens, 1975), bajo condiciones de laboratorio. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro División de Agronomía Departamento de Parasitología. Saltillo México. p 7.[Noviembre 2015] Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3896/63127%20FRANCO%20MARIN,%20GERARDO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>

Sarria, G., Martínez, Gerardo., TORRES, Francia. *Phytophthora palmivora* es el agente causal de la pudrición de cogollo de la palma de aceite. En: Revista Palmas, Vol, 31, N0 Especial, Tomo 1, 2010. 336p. [Citado 2010]. Disponible en <file:///C:/Users/heberth/Downloads/1538-1538-1-PB.pdf>.

Swinburne, T.R, 1990. El complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite. Informa de visita a Brasil, Ecuador y Colombia. FEDEPALMA, Bogotá. 38p. (Mimeografiado).

Tzean S.S., Hsieh L.S. & Wu W.J., 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan: Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, Republic of China, 215 p. ISBN 957-97217-6-9. Pour commander, s'adresser au Dr S.S. Tzean, Dept. of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 10617, Republic of China

Wattanapongsiri, 1966. Citado por: Aldana R.C, 2011). Manejo del picudo *Rhynchophorus*

palmarum L. (Coleóptera: Curculionidae). [En línea]. Cartilla- rpalmarum -ICA. final (1) pdf.. 2007. [Octubre 2015]. Disponible en Internet: [http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--\(Cole.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/19e016c0-0d14-4412-af12-03eecfe398f2/Manejo-del-picudo--Rhynchophorus-palmarum-L--(Cole.aspx)

Wattanapongsiri, 1966; Citado por ALDANA R, 2011).

Zar, J.(1999). Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall.

ANEXOS

Anexo B. Evaluación del ensayo de actividad biológica de la CEPA Mt 008 de *Metarhizium anisopliae* sobre *Rhynchophorus palmarum*

		Anexo 2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CEPA Mt 008 DE <i>Metarhizium anisopliae</i> SOBRE <i>R. palmarum</i>																																													
		DIAS DESPUES DE APLICADO																																													
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21					
Tto	Repetición	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M						
1x10 ⁵	1	10	0	10	0	10	0	10	0	8	2	8	0	8	0	7	1	6	1	6	0	6	0	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0				
1x10 ⁵	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	0	7	2	7	0	7	0	7	0	6	1	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0		
1x10 ⁵	3	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	8	1	6	2	6	0	6	0	6	0	6	0	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	4	1	4	0	4	0		
1x10 ⁶	1	10	0	10	0	9	1	8	1	8	0	8	0	8	0	7	1	6	1	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	5	1	4	1	4	0	4	0	4	0		
1x10 ⁶	2	10	0	9	1	9	0	9	0	9	0	8	1	8	0	8	0	7	1	7	0	6	1	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0		
1x10 ⁶	3	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	0	9	0	9	0	8	1	8	0	8	0	7	1	6	1	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0		
1x10 ⁷	1	10	0	9	1	8	1	8	0	8	0	8	0	7	1	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	6	1	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0		
1x10 ⁷	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	0	8	1	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	7	1	7	0	6	1	6	0	6	0	6	0		
1x10 ⁷	3	8	2	7	1	6	1	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	4	1	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0		
1x10 ⁸	1	9	1	9	0	8	1	8	0	7	1	7	0	7	0	7	0	7	0	6	1	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	4	2	2	2	1	1	0	1	0	0	0	
1x10 ⁸	2	9	1	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	8	1	8	0	7	1	7	0	6	1	6	0	6	0	5	1	5	0	2	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1x10 ⁸	3	10	0	9	1	8	1	8	0	7	1	7	0	7	0	5	2	5	0	5	0	4	1	2	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Testigo	1	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0		
Testigo	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
Testigo	3	9	1	8	1	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0

V= Vivos M= Muertos

Fuente. Campos, J. & Velásquez, H. (2015)