

Contribución al Estudio de la Biología de la Langosta Llanera *Rhammatocerus schistocercoides* y Desarrollo de un Bioplaguicida Para su Control

M. Gómez, L. Villamizar, C. Espinel, E. Ebratt, A.M. Cotes. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas -MIP- Corpoica, Apartado Aéreo 240142 Las Palmas. Santafé de Bogotá, D. C. Colombia. E-mail: cbiologico@corpoica.org.co

Introducción

La especie *Rhammatocerus schistocercoides* (Rhen 1906) conocida en Colombia como "langosta Llanera", es nativa del continente americano y ha sido registrada como plaga, desde hace algunos años en el Brasil. Por su alta densidad poblacional y comportamiento gregario, se ha convertido en uno de los insectos más importantes de la entomofauna en la altillanura colombiana, ya que afecta extensas áreas de sabana nativa, pastos mejorados y cultivos de importancia económica como son el arroz, el maíz, la caña de azúcar y el sorgo, causando pérdidas en la producción agrícola y ganadera de la región en los departamentos de Vichada, Meta, Casanare y Guaviare.

Debido a los perjuicios ocasionados por muchos insecticidas químicos, el equilibrio ecológico es de difícil restauración. Por ende, para el control racional de la plaga, la alternativa de mayor viabilidad y sostenible desde los puntos de vista económico y ambiental, es el uso de insecticidas biológicos (hongos entomopatógenos). Es así como el International Institute of Biological Control (IIBC) de Inglaterra lidera actualmente los programas de investigación para el control de la langosta peregrina en África, con base en la aplicación del hongo *Metarhizium flavoviridae*.

Sin embargo, las condiciones climáticas de la altillanura colombiana (escasa humedad relativa en verano, altas temperaturas e intensidad lumínica), afectan al biocontrolador cuando éste es aplicado en forma de conidios desnudos, siendo necesario formular al hongo para protegerlo de las condiciones ambientales adversas y así garantizar su viabilidad y su actividad biológica.

Además es importante destacar que la mayoría de las formulaciones hasta el momento desarrolladas con hongos entomopatógenos como *Metarhizium* spp. han presentado deficiencias debido a su poca adherencia y escasa cobertura sobre el follaje y sobre la superficie de los insectos, su reducida dispersión y suspendibilidad en los tanques de aplicación y su poca tolerancia a condiciones medioambientales adversas tales como la radiación ultravioleta del sol.

Es necesario conocer que la generación de un bioplaguicida se considera como una biotecnología de mediano plazo ya que el proceso de investigación y desarrollo requiere entre tres y ocho años de dedicación. Su logro implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, su conservación, la evaluación de su actividad biocontroladora, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, estudios de preformulación y de formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, ensayos de campo, estudios de toxicidad, estudios de impacto ambiental, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento.

Con el presente trabajo se quiso desarrollar para la región de los Llanos Orientales de Colombia alternativas de control biológico de la Langosta *Rhammatocerus schistocercoides* mediante el uso de hongos entomopatógenos que puedan ser compatibles con otras estrategias de manejo del problema. Además, se intentó :- Contribuir al conocimiento de la biología de la plaga y algunos aspectos preliminares sobre su dinámica poblacional. - Verificar la existencia del fenómeno de fases en *Rhammatocerus schistocercoides* bajo condiciones naturales de los Llanos Orientales de Colombia. - Conformar un banco de cepas nativas de *Metarhizium* spp. - Establecer la patogenicidad y dosis letal media de las cepas de entomopatógenos seleccionados. - Realizar estudios para determinar los métodos adecuados de producción masiva, separación y secado de la biomasa fúngica. - Desarrollar un producto utilizando las esporas de las cepa del hongo *Metarhizium* que ofrezca los mejores resultados de control. - Determinar la eficiencia en control del formulados a nivel de invernadero y campo. - Determinar del efecto potencial del bioplaguicida sobre especies benéficas nativas de la región.

Metodología

Contribución al conocimiento de la biología de la plaga y algunos aspectos preliminares sobre su dinámica poblacional.

Con el propósito de generar información básica sobre la biología y algunos aspectos sobre el comportamiento y ecología de las poblaciones del insecto plaga, se llevaron a cabo las siguientes actividades en el C.I Carimagua, ubicado en el departamento del Meta, en límites con el Vichada.

-Determinación del ciclo de vida y comportamiento del insecto. El ciclo de vida de la langosta llanera se determinó a partir de la época de oviposición y transcurridas las etapas de emergencia, estadios ninfales y estado adulto. En cada caso se estudió la morfología y morfometría del insecto; el número de estrías oculares y antenómeros; la longitud de fémur; la relación macho: hembra; y el proceso de desarrollo sexual, cópula y oviposición.

-Determinación de los hábitats y las preferencias alimenticias del insecto en sabana nativa. Para la realización de este ensayo se tomaron tres puntos de observación, uno ubicado en la altillanura plana, otro entre la transición de la altillanura plana y la altillanura disectada y el tercero en la altillanura disectada. En estos puntos, se ubicaron focos de ninfas en últimos instares y se realizó un seguimiento periódico cada 48 horas. Sobre estos mismos focos se establecieron aspectos específicos sobre la distribución, desplazamiento, dirección del desplazamiento, hábitats, y preferencias alimenticias. Para el análisis de las preferencias alimenticias se determinaron las especies, y preferencias del insecto, estableciendo una escala de evaluación cualitativa de 0 a 10 puntos, de acuerdo con el daño observado en cada especie.

Verificación de la existencia del fenómeno de fases en *Rhammatocerus schistocercoides* bajo condiciones naturales de los Llanos Orientales de Colombia.

La teoría de las fases establece que los saltamontes solitarios pueden formar enjambres de langostas con altas densidades poblacionales y comportamiento gregario y viceversa. El paso de una fase a la otra está marcada por cambios morfológicos, de color y de comportamiento. Los cambios morfológicos se consideran "índices morfométricos", con base en los cuales se pueden determinar proporciones o "radios" con diferencias significativas, que permiten distinguir la fase gregaria de la solitaria. Estos cambios permiten ubicar una población en la fase a la cual pertenece, teniendo en cuenta una muestra de ambos sexos.

Se ha mencionado la existencia de polimorfismo de fases en esta especie, sin que hasta el momento éste haya sido demostrado, por lo tanto *R. schistocercoides* no es reconocida como una verdadera langosta a pesar de su conducta gregaria. De acuerdo a Chauvin, 1967, se ha podido observar que los insectos reaccionan a la proximidad de sus congéneres, no sólo por un fenómeno de comportamiento, sino también por modificaciones fisiológicas (apetito, celo, etc) denominados "efectos de grupo".

- Determinación del efecto de grupo. Se capturaron en campo individuos solitarios y fueron llevados a jaulas de 0.5 m² de área ubicadas dentro de una casa de malla. Se tuvieron en cuenta 4 tratamientos: jaulas con un individuo, jaulas con tres individuos, jaulas con cuatro individuos y jaulas con 10 individuos. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. La fuente alimenticia fue con base en cespedones de *Axonopus purpussi*, gramínea preferida por la langosta.

Se realizaron observaciones diarias de los individuos, en las cuales se tuvieron en cuenta los cambios de instar y los posibles cambios por el efecto de grupo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del ensayo anterior se procedió a realizar un estudio morfométrico a partir de individuos solitarios aislados y mantenidos a nivel de semicampo.

Conformación de un banco de cepas nativas de *Metarhizium* spp.

El banco de cepas de *Metarhizium* spp. fue conformado colectando cepas nativas y extranjeras, las cuales fueron aisladas, purificadas, identificadas y almacenadas en latencia en ampollitas de vidrio que contenían suelo estéril. Las cepas fueron codificadas e introducidas al Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico, en donde se encuentran debidamente documentadas.

Determinación de la patogenicidad y dosis letal media de las cepas de *Metarhizium anisopliae* seleccionadas.

Para determinar la actividad entomopatógena de *M. anisopliae* se escogieron 3 cepas nativas que habían mostrado actividad sobre las langostas en pruebas preliminares realizadas en condiciones de laboratorio.

El bioensayo para evaluar la actividad insecticida de estas cepas de *M. anisopliae* en laboratorio se llevó a cabo a una temperatura de 27°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), HR 70% ($\pm 10\%$) y fotoperiodo anual de 12 horas luz. Se realizó con ninfas de octavo instar de *R. schistocercoides*, las cuales se encontraban reclusas en jaulas de madera. El diseño experimental fue completamente al azar, con tres réplicas por cepa. Se tomaron dos controles: a) control tratado (individuos asperjados sólo con tween 80 al 0.1%) b) Control absoluto (individuos no asperjados).

Se realizaron cultivos de *M. anisopliae* a partir de cepas previamente reactivadas, y de éstos se realizó una suspensión fúngica que contenía una concentración de 1×10^8 propágulos/ml. La aplicación del hongo sobre los insectos se realizó mediante la aspersión y diariamente se registró la mortalidad de las langostas. Para realizar el bioensayo que permitiría determinar la dosis letal media (DL50) de las cepas contra la langosta llanera, se mantuvieron constantes las condiciones ambientales. El mantenimiento de las langostas, el número de individuos por tratamiento y el diseño experimental fueron iguales a los descritos anteriormente.

Para la preparación del inóculo microbial se obtuvo una suspensión inicial de cada una de las cepas del hongo que contenía una concentración de 1×10^8 propágulos/ml. A partir de

ésta, mediante diluciones seriadas se obtuvieron 5 diluciones que contenían (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 propágulos/ml). De cada dilución se extrajo un volumen y se aplicó tópicamente a nivel del pronoto y primer tergo del insecto. Los individuos tratados fueron depositados en la jaula correspondiente. La forma de evaluación, el registro acumulado de mortalidad diaria y el montaje de insectos en cámara húmeda, se llevó a cabo del mismo modo descrito para el ensayo anterior.

Realización de estudios para determinar los métodos adecuados de producción, separación y secado de la biomasa fúngica. -Producción masiva de *Metarhizium* spp.

Para la determinación del método de producción masiva de *Metarhizium* spp. se probaron dos métodos, uno de ellos basado en la utilización de dos fases de cultivo (Jenkins y Lomer, 1994) y el otro en una sola fase. El método basado en dos fases de cultivo comprendió la utilización de un medio líquido con base en levadura y sacarosa, inoculado con una suspensión de conidias del hongo e incubados a 25°C por 48 horas a 150rpm.

La biomasa obtenida fue utilizada para inocular el medio sólido, el cual consistió en arroz humedecido estéril contenido en bolsas de polietileno de alta densidad. Las bolsas fueron incubadas a 25°C por un periodo de 13 días. Para la evaluación de la producción masiva mediante la utilización de una sola fase se obvió la utilización del precultivo líquido y las bolsas que contenían el arroz se inocularon con una suspensión de esporas, las condiciones de temperatura y tiempo de incubación fueron las mismas descritas anteriormente. Para el análisis de resultados se utilizó la técnica de conteo en placa, la cual permitió determinar el número de unidades formadoras de colonia producidas por un gramo de arroz esporulado.

-Separación y secado de la biomasa fúngica. Las esporas de *Metarhizium anisopliae* se separaron del arroz mediante un lavado con una solución de Tween 80 y posterior centrifugación. La biomasa obtenida se secó en un secador de lecho fluido. Para evaluar la pérdida de viabilidad por el secado se realizó una cinética durante el proceso de secado, tomando muestras de biomasa a diferentes tiempos y determinando en ellas los porcentajes de viabilidad y de humedad.

Desarrollo de un producto utilizando las esporas de la cepa del hongo *Metarhizium* sp. previamente seleccionada por su actividad biocontroladora.

Según el ciclo de vida de la langosta y la forma de infección del hongo, *Metarhizium anisopliae* puede ser aplicado sobre la superficie de la plaga, o sobre el follaje en forma de un polvo fino para suspender por tal razón, se eligió como forma de presentación del producto, un polvo para reconstituir en una emulsión aceite en agua, constituida por un aceite vegetal y una mezcla de tensioactivos que permiten emulsionar esta suspensión en el volumen de agua necesario para su aplicación en campo. En este proceso, las esporas se recubren con un protector solar adherido a la superficie mediante un agente gelificante (Gómez *et al.*, 1997).

Inicialmente se hicieron estudios de preformulación en los que se realizó una caracterización física y microbiológica del principio activo (*Metarhizium anisopliae*), posteriormente se hizo un estudio de almacenamiento de los diferentes excipientes en mezcla con el biocontrolador durante 3 meses a 8°C para determinar el efecto de estas sustancias sobre la viabilidad del hongo. Una vez seleccionados los excipientes inocuos para el hongo, se realizaron diferentes ensayos para determinar las concentraciones y los tiempos de mezclado y secado, en el proceso de recubrimiento de las esporas con el protector solar.

El producto desarrollado fue sometido a un riguroso control de calidad, realizado tanto durante el proceso como al producto terminado. El control de calidad del producto terminado incluía análisis físicos (tamaño de partícula, velocidad de sedimentación, fluidez y voluminosidad), y análisis microbiológicos como determinación de la concentración, porcentaje de germinación y porcentaje de protección a la radiación U.V.

Este último ensayo fue realizado exponiendo el producto y un control compuesto por esporas desnudas, durante 30, 60 y 90 minutos, bajo una lámpara germicida G30T8 que emite una longitud de onda de 253,7 nm (UVC). Las muestras obtenidas después de la exposición a dicha lámpara se sometieron a una evaluación de concentración mediante la técnica de recuento en placa. Posteriormente, este ensayo fue realizado utilizando la misma metodología, pero exponiendo las muestras directamente a la luz solar en Puerto López, (Meta).

Determinación de la eficiencia biocontroladora del formulado a nivel de campo.

- **Evaluaciones en condiciones controladas de campo.** En el bioensayo realizado en condiciones controladas de campo (temperatura 36°C y HR 56% promedio) en el C.I Carimagua; fueron evaluadas las cepas M11, M5 y M3 sobre adultos de la langosta. El hongo se evaluó en dos presentaciones, una como conidios desnudos (tratamiento testigo) y la otra como conidios formulados con el protector solar CBUVO1.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completamente al azar. Se evaluaron doce tratamientos en total y 60 individuos por tratamiento, cada cepa se evaluó en dos concentraciones (1x10⁷ y 1x10⁸ propágulos/ml), así como en sus dos presentaciones: conidios formulados (f) y conidios desnudos (cd) es decir, sin recubrimiento.

Los tratamientos se aplicaron en horas de la tarde por medio de la aspersion de 20 ml de la suspensión por cada jaula, mediante la utilización de una bomba de ultra bajo volumen MICRON-ULVA, utilizando una boquilla que proveía un tamaño de gota de 50 micras.

El registro de mortalidad se hizo diariamente por medio de dos recolecciones (mañana y tarde). Los individuos muertos o con signo de infección fueron colocadas en cámaras húmedas para verificar la causa de la muerte.

- **Evaluaciones en condiciones de campo abierto sobre focos de la plaga.** Esta evaluación fue realizada con el formulado basado en la cepa M11, seleccionada por su alta actividad biocontroladora en condiciones controladas de campo. Este producto fue reconstituido y llevado a una concentración de 1x10⁸ propágulos/ml de *M. anisopliae* y a una dosis de 5 x 10¹¹ propágulos/ha.

La aplicación se hizo utilizando dos tipos de bomba, una bomba de Ultra Bajo Volumen (ULV) la cual posee una capacidad de 10 litros por hectárea y una bomba convencional, que posee una capacidad de 200 litros por hectárea. También se evaluaron dos formas de acceso al foco para aplicar el bioinsecticida, una forma **A**, perturbando el foco de saltones y una forma **B** en la que no se perturbó el foco; en ésta se aprovechó la conducta natural gregaria del insecto y la deriva producida por el viento.

Después de las aplicaciones sobre los focos de la plaga, se tomaron muestras de material insectil de cada foco y se recluyeron en jaulas para poder determinar la mortalidad ocasionada por los tratamientos evaluados, esta determinación se realizó siguiendo la metodología previamente establecida en las evaluaciones realizadas en condiciones controladas de campo.

Determinación del efecto potencial del bioplaguicida sobre especies benéficas nativas de la región.

Con el propósito de determinar los posibles efectos que tanto en laboratorio como en condiciones controladas de campo pueden tener las aplicaciones del bioplaguicida con base en *M. anisopliae*, sobre organismos no blanco, fueron escogidas tres especies bioindicadoras: La hormiga arriera *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), la hormiga depredadora- cazadora de langosta *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae), y la avispa parasitoide *Prionyx thomae* (Hymenoptera: Sphecidae) seleccionadas por su amplia distribución geográfica, alta densidad poblacional y adaptación a la zona.

Las hormigas *A. laevigata* se instalaron en condiciones controladas de campo y se les suministró el material vegetal de mayor preferencia (*Tabebuia chysantha*); *E. ruidum* se mantuvo en sus bioterios para su adaptación, suministrándole diariamente como alimento langostas *R. schistocercoides*. *P. thomae*, fue mantenida en invernadero en jaulas de madera con piso de arena, se le suministró lasgostas adultas como hospedero, debido a que la avispa es parasitoide específica de la langosta. La aplicación del bioplaguicida se hizo directamente sobre las especies bioindicadoras y sobre el alimento consumido por ellas. Se determinó la mortalidad diaria y la repelencia al alimento tratado, producida en los insectos por el hongo.

Resultados

Contribución al conocimiento de la biología de la plaga y algunos aspectos preliminares sobre su dinámica poblacional.

- Determinación del ciclo de vida y comportamiento del insecto.

Los estudios realizados en el C. I Carimagua y en áreas del departamento del Vichada, permitieron concluir que el insecto presenta un ciclo de vida univoltino, que incluye un estado de huevo, nueve estados ninfales y un estado adulto. Los estados de desarrollo presentaron una estrecha sincronización con el régimen de precipitación unimodal o estacional. En el estado adulto, la langosta madura sexualmente e inicia sus oviposiciones durante la estación seca, construyendo ootecas en suelos con textura arenosa, las cuales eclosionan 25 a 30 días después con las primeras lluvias de abril. El comportamiento de *Rhammatocerus schistocercoides* mostró ser evidentemente gregario, desde el primer instar ninfal hasta el estado adulto, formando focos en media luna, con altas densidades poblacionales por m² (Ebratt, 1998).

El comportamiento de los diferentes estados de desarrollo de *Rhammatocerus schistocercoides* estuvo estrechamente sincronizado con la fenología de los ecosistemas de la sabana, en lo que respeta a la disponibilidad de aguas, fluctuaciones anuales de temperatura, y disponibilidad de alimento. Los focos de adultos jóvenes nómadas colonizan la altillanura plana y de transición sobre sabana nativa lignificada, luego migran hacia áreas recién quemadas en la altillanura disectada, sobre las cuales se posan y consumen el pasto de rebrote.

- Determinación de los hábitats y preferencias alimenticias del insecto en sabana nativa.

La langosta *Rhammatocerus schistocercoides*, durante las primeras 8 semanas de post-quema en la sabana nativa no mostró ninguna preferencia alimenticia, sin embargo, a medida que la sabana envejeció, los insectos se hicieron más selectivos y en orden de preferen-

cia consumieron los géneros *Mesosetum*, *Axonopus*, *Paspalum*, *Trachypogon*, *Schyzachyrium*, *Andropogon*, *Trasya* y *Panicum rudgei*. Estos géneros representan especies con altos contenidos de proteína durante todo su periodo vegetativo. Además, son las especies de mayor consumo por el ganado vacuno de la región. Esta situación muestra el riesgo potencial que representa la plaga para el sector ganadero.

Verificación de la existencia del fenómeno de fases en *Rhammatocerus schistocercoides* bajo condiciones naturales de los Llanos Orientales de Colombia.

-Determinación del efecto de grupo en *Rhammatocerus schistocercoides*.

Los individuos solitarios mantenidos en grupos de 3 a 10 por jaula, presentaron transformaciones cromáticas después de cada muda, estas transformaciones coinciden con las características descritas para los individuos gregarios. Dicha coloración se inicia a partir de la región inferior del dorso del cuerpo hasta abarcar toda su área. La cara interna de los fémures posteriores presentaron un cambio de color del verde esmeralda hacia el azul característico de los individuos gregarios.

Los ejemplares solitarios que se mantuvieron aislados individualmente en cada jaula, no presentaron cambio alguno en su coloración, es decir, conservaron su color verde esmeralda. A partir de este ensayo se pudieron diferenciar morfológicamente los individuos solitarios y gregarios

*** Descripción morfológica de Individuos solitarios (noveno instar):**

Estos presentaron una coloración verde esmeralda en todo el cuerpo, la cara inferior de los fémures posteriores presentó color verde, la cara interna presentó coloración verde y tres manchas de color marrón, la cara superior de los fémures posteriores fueron de color verde esmeralda y las tibias posteriores tuvieron color rojo carmin con el tercio apical azul claro. Las espinas de las tibias posteriores poseen una base de color blanco y ápice negro.

*** Descripción morfológica de Individuos gregarios (noveno instar):**

Los individuos gregarios mostraron coloración corporal amarillo-naranja con una tonalidad oscura en el área dorsal, la cara inferior de los fémures posteriores presentaron un color azul oscuro, y en la cara interna una coloración azul claro, con presencia de tres manchas negras. Las tibias posteriores presentaron un color anaranjado con el tercio apical azul oscuro y las espinas de las tibias posteriores mostraron una base azul clara y negro en su ápice.

Al evidenciarse los cambios cromáticos, de los individuos solitarios que se mantuvieron agrupados hasta que presentaran características de individuos gregarios, se constató que existe el efecto de grupo en esta especie. Este hecho podría evidenciar la presencia de un fenómeno de polimorfismo de fases en *Rhammatocerus schistocercoides* para el caso de los Llanos Orientales de Colombia, ya que el efecto de grupo se considera como un paso obligado en la ocurrencia del fenómeno de langostas verdaderas en los acrididos.

-Determinación del polimorfismo de fases en Imagos de *Rhammatocerus schistocercoides*.

Los imagos solitarios emergidos que se mantuvieron individualizados en cautiverio son insectos de tamaño pequeño, con una longitud de élitro inferior a 33 mm en los machos. La

coloración general del cuerpo es verde pálido, la cara inferior de los fémures posteriores presenta color azul claro, con la cara interna de coloración verde pálido con tres manchas de color marrón. Las tibias posteriores son de color amarillo con el tercio apical azul claro, las espinas de la región apical de las tibias posteriores presentan su base de color blanco y el ápice de color negro.

De otra parte, los individuos gregarios capturados en campo abierto que formaban enjambres presentaron las siguientes características morfológicas: Son insectos de tamaño grande, con una longitud de élitro que sobrepasa 35.15 mm. en los machos. La coloración general del cuerpo es castaño claro. Los espiráculos abdominales son de color azul. La cara inferior de los fémures posteriores de color azul oscuro, con igual coloración en su cara interna. Las tibias posteriores son de color anaranjado con el tercio apical azul oscuro. Las espinas de la región apical de las tibias posteriores presentan su base de color azul claro y negro en su ápice, y las espinas de la región superior, son de color anaranjado.

Conformación de un banco de cepas nativas de *Metarhizium* spp.

Durante todo el desarrollo del proyecto fueron coleccionadas 11 cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes departamentos de Colombia y de diferentes hospederos. También se obtuvo una cepa foránea de *M. anisopliae* proveniente de Venezuela.

Igualmente, se obtuvo la cepa IMI08023 de *Metarhizium flavoviridae* del Instituto Internacional de Control Biológico de Inglaterra, la cual es utilizada para el control de la langosta peregrina del desierto en África. Estas cepas fueron almacenadas en latencia utilizando la técnica de conservación en suelo estéril y fueron introducidas al banco de germoplasma del laboratorio de control biológico.

Determinación de la patogenicidad y dosis letal media de las cepas de *Metarhizium anisopliae* seleccionadas

Al determinar la patogenicidad bajo condiciones de laboratorio de las cepas nativas M5, M11 y M3 de *M. anisopliae*, se encontró que éstas produjeron al onceavo día un 100% de mortalidad en langostas de octavo instar.

Dado que en el ensayo anterior no se presentaron diferencias significativas en la mortalidad ocasionada por las tres cepas evaluadas, con éstas se determinó la dosis letal media (DL50). Los resultados se analizaron por medio del programa estadístico Probit con un coeficiente de significancia de 0.05. La dosis letal 50 obtenida para la cepa M5 fue de 5 conidias/insecto, mientras que para las cepas M3 y M11 ésta fue de 7 conidias/insecto.

La pequeña cantidad de inóculo necesaria para producir mortalidad en *R. schistocercoides*, indicó que las cepas nativas de *M. anisopliae* evaluadas en laboratorio, poseen una alta actividad biocontroladora, la cual es promisoría si se tiene en cuenta que las DL50 requeridas con las cepas nativas son menores que las reportadas internacionalmente. Esto podría ser debido a la adaptación del hongo a las condiciones particulares del insecto, tales como una afinidad química a su epicutícula, la capacidad que pueda tener cada conidio del hongo para penetrar e infectar rápidamente al insecto o la adaptación del hongo a las condiciones climáticas del trópico.

Determinación de los métodos adecuados para la producción masiva, separación y secado de la biomasa fúngica.

Producción masiva

Mediante el método de inoculación directa de *Metarhizium anisopliae* en arroz húmedo contenido en bolsas de polietileno de alta densidad, se obtuvo una producción de 30 x 10⁸ u.f.c. por gramo, mientras que mediante la técnica de producción del hongo en dos fases se obtuvo una producción de 43 x 10⁷ u.f.c.

La inoculación directa del sustrato con el hongo, fue elegida como el método más adecuado de multiplicación, ya que se obtuvieron los mayores niveles de esporulación. Además, el otro procedimiento requiere de un precultivo líquido de 48 horas que aumenta el tiempo total de incubación del cultivo. Para el caso de la inoculación directa, éste fue de 13 días mientras que para la técnica de producción en dos fases fue en total de 15 días. Este precultivo además de aumentar el tiempo total de la incubación, representa riesgos de contaminación que podrían hacer la técnica poco rentable.

Separación y secado de las esporas

La técnica de separación de la biomasa a partir del sustrato fue estandarizada en el presente trabajo. Esta que consiste en un lavado con tween 80 y posterior centrifugación en flujo continuo, mostró rendimientos de aproximadamente 6,7 gramos de conidias húmedas por cada 100 g de arroz esporulado de *M. anisopliae*.

El secado de *M. anisopliae* en lecho fluidizado no afectó la viabilidad del hongo, ya que éste tan solo disminuyó en un 5 % después de dos horas de secado a 50°C. La biomasa obtenida después del secado presentó una humedad del 7%, la cual es aceptable para poder mantener el hongo en un estado de latencia y así garantizar el almacenamiento del principio activo del bioplaguicida por un periodo de tiempo prolongado.

Desarrollo de un bioplaguicida utilizando los conidios de las cepas de *Metarhizium anisopliae*, previamente seleccionada por su alta actividad biocontroladora.

EL desarrollo de la formulación basada en el hongo *Metarhizium anisopliae* se realizó teniendo en cuenta los excipientes que mostraron un efecto no significativo sobre la viabilidad del biocontrolador. El producto consistió en un polvo para reconstituir en una emulsión aceite en agua (O/W). En éste, las esporas del hongo se encuentran recubiertas con el protector de luz ultravioleta CBUV01, adherido a su superficie, mediante un agente gelificante cuyo tamaño de partícula es inferior al de las conidias para que éstas se comporten como un núcleo de recubrimiento. Este polvo fue diseñado para ser suspendido en una emulsión cuya fase oleosa está constituida por un aceite vegetal con una mezcla de tensioactivos en la concentración requerida para alcanzar el balance hidrófilo-lipófilo necesario para incorporar el aceite en la emulsión.

Este producto presentó un tamaño de partícula de 45mm, una concentración de 109 conidios por gramo, una velocidad de sedimentación de 0.6 ml/min permitiendo formar una suspensión estable, libre de problemas tales como sedimentación, floculación y cremado. El bioplaguicida desarrollado resultó ser de fácil resuspendibilidad y debido a todas sus características fue posible su aplicación con bombas de ultra bajo volumen (ULV).

En las evaluaciones hechas en condiciones de laboratorio y campo para determinar la protección del bioplaguicida frente a los rayos ultravioleta, se observó que cuando las conidias fueron recubiertas con el filtro solar CBUV01, no se registraron pérdidas significativas de viabilidad a lo largo del período de exposición.

Determinación de la eficiencia biocontroladora del bioplaguicida a nivel de campo.

- Evaluaciones en condiciones controladas de campo

Al ser evaluadas las cepas formuladas y no formuladas de *M. anisopliae* en condiciones controladas en el C.I Carimagua, los mayores porcentajes de mortalidad corregida se obtuvieron con las cepas formuladas (f) y aplicadas a una concentración de 1×10^8 propágulos/ml al décimo séptimo día de aplicación; siendo los porcentajes de mortalidad producidos en la langosta de un 67.8% cuando se aplicó la cepa M5, cuando se aplicó la M11 ésta fue de 64.1% y cuando se aplicó la cepa M3 la mortalidad fue de 56.5%. Estos resultados presentaron diferencias significativas con respecto a los producidos al aplicar las conidias desnudas (ed.), resultando una mortalidad de 9.5% cuando se aplicó la cepa M5, 28.2% cuando se aplicó la cepa M3 y 26.4% cuando se aplicó la cepa M11.

En cuanto a los resultados obtenidos cuando se aplicó una concentración de 1×10^7 propágulos/ml, tanto de las cepas formuladas como no formuladas, se observó que al décimo séptimo día el porcentaje de mortalidad corregida producida por la cepa M5 fue de 54.7%, el producido por la cepa M11 fue de 52.8% y el producido por la cepa M3 fue de 49.1%; no presentando diferencias significativas entre ellas. Mientras que cuando se aplicaron las conidias desnudas (de.) se observaron porcentajes de mortalidad de 7.6% cuando se aplicó la cepa M5, de 13.2% cuando se aplicó la cepa M11 y de 16.9% cuando se aplicó la cepa M11, no presentando diferencias significativas entre ellas. Sin embargo se observaron diferencias significativas entre el resultado obtenido al aplicar las cepas formuladas y las cepas no formuladas (conidias desnudas).

- Evaluaciones en condiciones de campo abierto sobre focos de la plaga

Al evaluar en condiciones de campo abierto la mortalidad ocasionada por el bioplaguicida aplicado utilizando dos formas de acceso al foco (perturbándolo y sin perturbarlo), y utilizando dos bombas diferentes (bomba U.L.V y bomba convencional), los resultados mostraron diferencias significativas entre la actividad biocontroladora del bioplaguicida evaluado y la observada en el testigo absoluto, que mostró una mortalidad inferior al 10% para los diferentes sistemas de aplicación. De otra parte, se encontraron diferencias significativas cuando el bioinsecticida fue aplicado utilizando las dos formas de aproximación al foco. El porcentaje de mortalidad acumulada causado por el bioplaguicida aplicado con bomba de U.L.V y sin perturbar el foco alcanzó el 63.2%, mientras cuando éste fue aplicado con la bomba convencional y sin perturbar el foco de saltones el porcentaje de mortalidad fue de 51.2%.

Cuando la forma de aproximación al foco fue perturbándolo, se obtuvieron mortalidades de 31.6% al aplicar el bioplaguicida con bomba U.L.V. y de 21% al aplicarlo con bomba convencional. Los resultados obtenidos permiten concluir que la aplicación del bioinsecticida sin perturbar el foco de langostas, fue la más adecuada para lograr un efecto biocontrolador eficiente del hongo *M. anisopliae*, utilizando cualquiera de las dos bombas .

Determinación del efecto potencial del bioplaguicida sobre especies benéficas nativas de la región.

En las especies bioindicadoras, no se observó efecto de repelencia ni del material vegetal tratado con el bioplaguicida, ni de las langostas tratadas, dado que el consumo del alimento fue normal para las especies.

En condiciones de laboratorio y en condiciones controladas de campo, los resultados mostraron que las aplicaciones en forma directa sobre las hormigas y sobre el alimento consumido por éstas, no ocasionaron efectos significativos sobre la hormiga *E. ruidum*, ya que en condiciones de laboratorio se obtuvieron porcentajes de mortalidad acumulado de 10.88% y de 8.56% cuando se aplicaron esporas desnudas y esporas formuladas respectivamente.

El mismo comportamiento se observó cuando se aplicó el hongo sobre las langostas que consumió *E. ruidum*, ya que el porcentaje promedio de mortalidad obtenido al aplicar esporas desnudas fue de 9.76% y el obtenido al aplicar esporas formuladas fue de 7.48%.

Al aplicar el hongo sobre la hormiga *E. ruidum* en condiciones controladas de campo, se presentaron porcentajes de mortalidad de 14.18% cuando se aplicaron las esporas formuladas y de 9.41% cuando se aplicaron las esporas desnudas, sin presentarse diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En la aplicación sobre las langostas consumidas por las hormigas, no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, ya que el porcentaje promedio de mortalidad cuando éstas se asperjaron con esporas formuladas fue de 14.18% y cuando se asperjaron con esporas desnudas fue de 9.41%.

En condiciones controladas de campo, se hizo la aplicación directa sobre la hormiga *A. laevigata* y sobre el material vegetal que ella consume, sin ocasionar un impacto significativo sobre esta especie, ya que cuando se hizo la aplicación directamente sobre la hormiga, el porcentaje promedio de mortalidad fue de 8.37% para la aspersión con esporas formuladas y de 6.77% para la aspersión con esporas desnudas; sin presentarse diferencias significativas entre tratamientos. Cuando se hizo la aplicación sobre el alimento consumido por ellas, se presentaron porcentajes de mortalidad de 9.22% para las esporas desnudas y 8.29% para las esporas formuladas, obteniéndose diferencias altamente significativas entre los tratamientos biológicos aplicados y el control tratado.

A pesar de que el porcentaje de mortalidad en *Prionyx thomae* fue cercano al 40%, se considera que el impacto del bioplaguicida fue moderado. Esto debido a que el entomopatógeno no afectó la actividad parasitoide de la avispa durante la duración del ensayo (10 días). *P. thomae*, mantuvo la misma tasa de captura de la langosta, siendo de 3 a 4 langostas diarias por avispa. Además, para el cuarto día, en que comenzó a evidenciarse la mortalidad de las avispas, cada una parasitó potencialmente 12 langostas en promedio. Es decir, que por cada avispa muerta por la acción del bioplaguicida, habrían potencialmente 12 avispas nuevas al final del ensayo.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que las aplicaciones de *M. anisopliae* hechas, tanto a los individuos bioindicadores como al alimento, no afectaron negativamente sus poblaciones.

Conclusiones

- Se estableció el ciclo de vida de *R. schistocercoides* en la región de Carimagua Meta, y se contribuyó al estudio de la biología y comportamiento de la plaga.
- Se contribuyó al estudio de los enemigos naturales de la plaga.

- Se desarrolló un bioplaguicida de aplicación foliar a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, respaldado por una amplia investigación que comprendió estudios del comportamiento y biología de la plaga; estudios tecnológicos de producción masiva y formulación, al igual que evaluaciones hechas tanto en laboratorio como en condiciones de campo para demostrar la efectividad y eficiencia del bioplaguicida.
- El bioplaguicida desarrollado mostró ser estable en condiciones de almacenamiento, de fácil aplicación, resistente a la luz ultravioleta del sol, persistente en el follaje y cutícula de los insectos y de bajo impacto ambiental. Este producto demostró su eficiencia biocontroladora equivalente a 70% de control de la langosta llanera en campo.

Bibliografía

- Chauvin, R. 1967. El mundo de los insectos. Ed. Guadarrama, Madrid. 251 p.
- Ebratt, E.; Espinel, C.; Cotes, A. 1999. Contribución al estudio de la teoría de fases en la especie *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera :acridiade) en los Llanos Orientales de Colombia. Revista Colombiana de Entomología. V 24 N°3-4, p .1-7. Santafé de Bogotá.
- Gómez, M.; Villamizar, L. 1997 Estudio tecnológico para la producción masiva y preformulación de *Metarhizium* spp. para el control biológico de la langosta de los Llanos Orientales de Colombia. Revista Colombiana de Entomología. V 23 N°3-4. Santafé de Bogotá.