

ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE *Bacillus popilliae* DUTKY SOBRE
Phyllophaga obsoleta BLANCHARD Y DE MEDIOS NUTRITIVOS PARA
SU PRODUCCION

JUAN HUMBERTO GUARIN MOLINA

Tesis de grado presentada
como requisito parcial para optar
al título de Magister en Entomología

Directora: MARTHA EUGENIA LONDOÑO Z., I.A. MSc.

Asesor: OSCAR EFRAIN ORTEGA M., Biólogo MSc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
SEDE MEDELLIN

1.997

DEDICATORIA

A Sara, por su amor, temple y dedicación

A mi hijo Daniel, por su alegría infantil

A ambos, por su paciencia y amor.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus sinceros agradecimientos:

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria , CORPOICA, y en su representación al doctor SEGIO CORREA PELAEZ, Director Regional Antioquia - Choco por la confianza en mi depositada.

A la I. A. M. sc. MARTHA EUGENIA LONDOÑO ZULUAGA, por su asesoría y entusiasmo.

Al Biólogo M.sc. OSCAR EFRAIN ORTEGA MOLINA, por la asesoría.

A la Fundación de Fomento Agropecuario, Buen Pastor.

A MARGARITA MONSALVE A.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

A todas aquellos compañeros de trabajo que en una u otra forma contribuyeron a la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	
1 INTRODUCCION	1
2 REVISION DE LITERATURA	3
3 MATERIALES Y METODOS	33
3.1 LOCALIZACION	33
3.2 METODOLOGIA	34
3.2.1 Obtención del inóculo	34
3.2.2 Obtención de larvas	36
3.2.3 Determinación de la concentración letal media CL ₅₀ de <i>Bacillus popilliae</i> sobre <i>Phyllophaga obsoleta</i>	40
3.2.4 Efecto de la densidad de <i>Ph. obsoleta</i> sobre la patogenicidad de <i>B. popilliae</i>	42

	Pag.
3.2.5 Evaluación de medios de cultivo	44
3.2.6 Temperatura para el almacenamiento de <i>B. popilliae</i>	46
4 RESULTADOS Y DISCUSION	48
4.1 FASES DE LA ENFERMEDAD LECHOSA	48
4.2 CONCENTRACION LETAL MEDIA DE <i>B. popilliae</i> EN EL TERCER INSTAR LARVAL DE <i>Ph. Obsoleta</i>	53
4.3 EFECTO DE LA DENSIDAD DE <i>Ph. obsoleta</i> SOBRE LA PATOGENICIDAD DE <i>B. popilliae</i>	57
4.4 EVALUACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	60
4.5 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE <i>B. popilliae</i>	67
5 CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	72
ANEXOS	81

LISTA DE TABLAS

	Pág
TABLA 1. Razas o variedades de <i>Bacillus popilliae</i> aisladas o evaluadas en diferentes hospederos en el mundo.	21
TABLA 2. Relación de sitios y condiciones del suelo y géneros de "chisas" muestreadas en la búsqueda de <i>B. popilliae</i>	35
TABLA 3. Densidades larvales de <i>Phyllophaga obsoleta</i> inoculadas con <i>B. popilliae</i> .	43
TABLA 4. Porcentaje de mortalidad en diferentes densidades poblacionales de <i>Ph. obsoleta</i> causada por <i>B. Popilliae</i> 82 DDI . (17°C, 78% HR).	58

	Pag.
TABLA 5. Porcentaje de mortalidad corregida, causada por <i>B. popilliae</i> en diferentes densidades Larvales de <i>Ph. obsoleta</i> (17 °C, 78% H. R.)	60
TABLA 6. Diámetro (mm) de las UFC de <i>B. popilliae</i> en diferentes medios de cultivo 18 DDI. (24.8 °C, H. R. 78%, N=4).	61
TABLA 7. Cantidad de esporas de <i>B. popilliae</i> producidas en 13 medios de cultivo 18 DDI (24.8 °C, H. R. 78%, N=4).	65
TABLA 8. Concentración de esporas/ml de <i>B. Popilliae</i> almacenadas a distintas temperaturas (H. R 78%, N=4).	68

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1. Estructuras típicas de <i>B. popilliae</i> .	34
FIGURA 2. Recipiente para confinamiento de larvas de <i>Ph. obsoleta</i> .	37
FIGURA 3. Recipientes para eclosión de larvas de <i>Ph. obsoleta</i> .	37
FIGURA 4. Sustrato para alimentación de larvas de <i>Ph. obsoleta</i>	37
FIGURA 5. Estructuras típicas de <i>B. popilliae</i> provenientes de larvas de <i>Ph. obsoleta</i> .	41
FIGURA 6. Estados de desarrollo de la enfermedad lechosa en larvas de <i>Ph. obsoleta</i> .	48

	Pag.
FIGURA 7. Mortalidad de <i>Ph. obsoleta</i> , expresada en Curvas logarítmicas, causada por <i>B. popilliae</i> .	54
FIGURA 8. Concentración letal media CL ₅₀ de <i>B. popilliae</i> sobre <i>Ph. obsoleta</i> .	55
FIGURA 9. Larvas de <i>Ph. obsoleta</i> en diferentes densidades muertas por <i>B. popilliae</i> .	57
FIGURA 10. Efecto de la densidad de <i>Ph. obsoleta</i> sobre la mortalidad producida por <i>B. popilliae</i>	57
FIGURA 11. Promedio de Unidades Formadoras de Colonia de <i>B. popilliae</i> en diferentes medios de cultivo	63
FIGURA 12. Diámetro promedio de UFC y concentración de esporas producidas por <i>B. popilliae</i> en diferentes medios de cultivo	66

ANEXOS

	Pag.
ANEXO 1. Porcentaje de mortalidad acumulada causada por diferentes concentraciones de <i>B. popilliae</i> sobre larvas de <i>Ph. obsoleta</i> (N=52, 17°C, H.R 78%).	81
ANEXO 2. Porcentaje de mortalidad (acumulada), causada por <i>B. popilliae</i> sobre diferentes densidades larvales de <i>Ph. obsoleta</i> (17 °C, H. R 78%).	81
ANEXO 3. Tablas de contingencia resumidas para el efecto de densidad de <i>Ph.obsoleta</i> sobre la patogenicidad de <i>B. popilliae</i> (17°C, H. R.78%, GL=1).	82
ANEXO 4. Numero de UFC de <i>B. popilliae</i> en diferentes medios de cultivo, 18 DDI (N=4, 24 °C, H. R 78%).	83
ANEXO 5. Análisis de variación de las esporas/ml de <i>B. Popilliae</i> conservadas en diferentes temperaturas de almacenamiento (N=20).	83

RESUMEN

La bacteria entomopatógena *Bacillus popilliae*, agente causal de la enfermedad lechosa en Coleoptera: Scarabaeoidea, también está presente en los integrantes del complejo de "chisas" en el Oriente antioqueño, destacándose *Phyllophaga obsoleta* Blanchard.

Se caracterizó, para el tercer instar larval de *Ph. obsoleta*, la secuencia de desarrollo de la enfermedad lechosa, dividiéndola para fines prácticos en cuatro fases, detallando las características de la apariencia macro y microscópica más conspicuas, como una herramienta a ser considerada en futuras evaluaciones.

En evaluaciones bajo condiciones de casa de malla a 17 °C, 78% humedad relativa, 2120 msnm, se determinó la patogenicidad de diferentes concentraciones de un aislado de la bacteria proveniente de *Ph. obsoleta* en 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 esporas/m², encontrándose, mediante la aplicación de la prueba Probit en el programa SAS, que la CL₅₀ fue de 10^1 esporas/m², el TL₅₀ de *B. popilliae* sobre larvas de tercer instar de *Ph. obsoleta* fue de 75 días.

Para las mismas condiciones de evaluación, estadísticamente se determinó la no existencia de diferencias en la mortalidad acumulada causada por *B. popilliae* a través tiempo en los diferentes tratamientos con diferentes densidades poblacionales de *Ph. obsoleta* a saber 30, 100, 200 y 300 larvas/m² ($\alpha = 0.005$), determinándose que las diferencias que se dieron fueron atribuibles al azar y no al tratamiento respectivo. La concentración evaluada en esta prueba fue de 10⁶ esporas/m².

Se evaluó el potencial de 13 medios de cultivo, para la producción de *B. popilliae* proveniente de *Ph. obsoleta*, siguiendo un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones; los medios evaluados fueron: Younsten, Younsten - Urea, Younsten - Agua de coco, Younsten - Hemolinfa, Agar J, Agar J - urea, Agar J - Agua de coco, Agar J-Hemolinfa, Agar - Agar, Agar - Agar - Urea, Agar - Agar - Agua de Coco, Agar - Agar - Hemolinfa y Agua de Coco, determinándose, mediante la prueba de rangos de Friedman que las distintas combinaciones del medio **Younsten**, presentaron las mejores características para producción de unidades formadoras de colonia (UFC) y la producción de esporas.

Con apoyo en la prueba de comparación de medias de Duncan ($\alpha = 0.05$) se determinó que el tratamiento de preservación de esporas en glicerol al 20% en puerta de nevera a 4 °C fue el mejor, más práctico y económico,

comparado con almacenamiento en nitrógeno líquido (-176°C), almacenamiento en congelador (-15°C), almacenamiento a temperatura ambiente (17°C), los anteriores en glicerol al 20% y almacenamiento a temperatura ambiente (17°C) en agua destilada estéril.

INTRODUCCION

La enfermedad lechosa en "chisas", "mojojeyes" o "morrongos", causada por *Bacillus popilliae* Dutky y *Bacillus lentimorbus* Dutky ha sido registrada en varios países del mundo en diversos cultivos y condiciones, causando mortalidad en diferentes instares larvales de varias especies de la superfamilia Scarabaeoidea del orden Coleoptera.

Popillia japonica Newman, el escarabajo japonés, fue el primer insecto al que se diagnosticó la enfermedad lechosa y el uso de la bacteria contra éste insecto ha sido considerado como un ejemplo clásico en el control biológico (Tanada y Kaya, 1993).

La especificidad en la patogenicidad en los distintos aislados de *B. popilliae* hace importante la búsqueda de alternativas para el manejo del complejo de "chisas" que afectan diferentes cultivos en el Oriente antioqueño. *Ph. obsoleta*, es la "chisa" de mayor abundancia dentro del complejo.

La evaluación en nuestro medio de la patogenicidad de la bacteria, caracterización de la infección en larvas de *Ph. obsoleta* , así como, el efecto de la densidad del insecto sobre la patogenicidad de *B. popilliae* , la evaluación de medios de cultivo para su producción y determinación de condiciones apropiadas de almacenamiento, son los objetivos planteados en esta investigación; con este trabajo se pretende contribuir con herramientas en el manejo integrado de cultivos, acordes con técnicas de agricultura moderna, teniendo en cuenta criterios de sostenibilidad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Desde hace más de 60 años, *B. popilliae* ha sido utilizada tradicionalmente en Estados Unidos, bien como agente de inoculación al suelo para establecimiento o para aumento del patógeno en el campo, con el propósito de lograr un control a largo plazo de *Popillia japonica* Newman (Coleoptera:Scarabaeidae:Rutelinae)(Redmond y Potter, 1.995; Tanada y Kaya, 1.993; Klein, 1.993; Stahly y Klein, 1992).

En los trabajos iniciales con *B. popilliae*, agente causal de la enfermedad lechosa, White y Dutky (1940), registraron que las larvas de *P. japonica*, padecían en más del 90% de ésta enfermedad. La enfermedad lechosa no solo es producida por *B. popilliae*, también lo es por *B. lentimorbus*, un par de bacterias formadoras de esporas, las cuales crecen y esporulan en la hemolinfa de larvas vivas. Regularmente en la literatura se relaciona a este par de bacterias con la denominación Tipo B y Tipo A, respectivamente (White y Dutky, 1940; White, 1940).

B. popilliae es portadora de cristal o cuerpo parasporal, la hemolinfa infectada en exposición al aire no se pardea, la larva enferma no muda, a

diferencia de *B. lentimorbus* que carece de cuerpo parasporal, la hemolinfa contaminada por la bacteria se pardea y la larva infectada puede continuar el proceso de muda (Tanada y Kaya, 1993).

Se considera que los hospederos de *B. popilliae* están en la familia Melolonthidae, el rango de hospederos de *B. popilliae* no incluye a los escarabajos estercoleros (Klein y Jackson, 1992).

Bulla *et al.* (1978) asignan diferentes grados en la calificación de la enfermedad lechosa en *P. japonica*, grados que varían de I a IV dependiendo del tipo y abundancia relativa de estructuras vegetativas y reproductivas en la hemolinfa. Para la fase I se da la inoculación inicial del patógeno, en la fase II corresponde a la proliferación de células vegetativas, en la fase III hay del 15 al 30% de células esporuladas y fase IV, llamada de esporulación, se da la muerte de la larva que contiene 5×10^6 esporas.

Se considera que ciertas bacterias imparten al cadáver de la larva un color característico, una coloración roja brillante sugiere la presencia de *Serratia marcescens*, *Bacillus alvei* confiere a la larva enferma un patrón de coloración desde amarillo a gris, en tanto que las abejas infectadas con *B. larvae* adquieren un color café oscuro. La porción posterior de una "chisa"

con *B. popilliae* se torna blanca; la mayoría de otras infecciones confieren **a la** larva un color café oscuro, color que se asocia con la descomposición **bacterial** (Poinar y Thomas, 1984).

La infección por enfermedad lechosa se puede determinar visualmente por **turbidez** de la hemolinfa (Ladd y MacCabe, 1967; Warren y Potter, 1983; **White** y Dutky, 1940) que le confiere al abdomen de la larva el aspecto de **leche** coagulada, como consecuencia de millones de esporangios de *B. popilliae*; el aspecto de turbidez de la hemolinfa para larvas afectadas o inoculadas también depende de la especie de *Bacillus* responsable; se estima que *B. popilliae* requiere de 60 millones de esporas, en tanto que *B. lentimorbus* requiere de 100 millones esporas para dar esa tonalidad (Tanada y Kaya 1993).

B. popilliae es el agente causal de la enfermedad lechosa en larvas del escarabajo japoses *P. japonica*. Después de su uso en programas de control biológico, por entidades oficiales de los Estados Unidos, ha sido patentado y producido comercialmente bajo nombres como DOOM, JAPIDEMIC, MILKY SPORES, GRUB ATTACK Y RINGER, por Fair fax Biological Laboratories, inc.,

respectivamente (Stahly y Klein, 1.992; Jackson y O'Callaghan, 1.995; Klein, 1.981).

Regularmente se considera la patogenicidad como la habilidad determinada genéticamente para producir enfermedad. Para el caso de *Bacillus thuringiensis*, es patogénico a especies de lepidópteros pero su virulencia depende de condiciones tales como métodos de cultivo, almacenamiento, formulación y factores ambientales (Tanada y Kaya, 1993). Con frecuencia se estima la virulencia a través de la concentración letal media (CL₅₀) o del tiempo letal medio (TL₅₀).

Se ha considerado como un factor de importancia la facilidad con que los organismos responsables de la enfermedad lechosa, infecten a sus hospederos, particularmente para el control de *P. japonica* (White y Dutky, 1940) y también de otra serie de "chisas" en distintas latitudes (White y Dutky, 1940; Tanada y Kaya, 1993; Thurston *et al.*, 1993; Tashiro y White, 1957; Stahly *et al.*, 1992); se considera que un entomopatógeno virulento no sería deseable en programas de manejo integrado de plagas, pues se reduce drásticamente el hospedero sobre el cual debe reproducirse y mientras transcurre ese tiempo, es el suficiente para que el insecto en la condición de plaga ocupe de nuevo su posición (Tanada y Kaya, 1993).

Siendo *B. popilliae* un patógeno obligado (Klein y Jackson, 1992 ; Tanada y Kaya, 1993), se considera de baja virulencia y además restringido para Scarabaeoidea (Ibarra, 1994; Tanada y Kaya, 1993; Klein y Jackson, 1992; Hanula y Andreadis, 1988), tiene la capacidad de enfermar y, dependiendo de la especie de insecto de la cual fue aislada la bacteria es bien específica, por lo tanto no puede pretenderse una infección cruzada entre familias, subfamilias y ni siquiera de géneros (Klein y Kaya, 1995).

La virulencia de una cepa o de un aislado de *B. popilliae* se modifica por diferentes factores, uno de ellos es el empleo de medios de cultivos para producción de *B. popilliae in vitro*; lo exigente en nutrientes restringe el uso de esta bacteria (Warren y Potter, 1983).

El método de inoculación empleado es determinante en la expresión de la virulencia de una determinada cepa de *B. popilliae* sobre un hospedero de género distinto a aquel del que fue aislada (Warren y Potter, 1983); una cepa de *B. popilliae* "Tipo A, raza De Bryne" proveniente de *P. japonica*, tanto por inyección como por ingestión resultó mas virulenta a *A. majalis* que la de *B. lentimorbus*, en iguales condiciones de inoculación (Tashiro, 1957).

Aunque la causa de la muerte por *B. popilliae* aún no ha sido desentrañada (Klein y Kaya, 1995), se sabe que las esporas de *B. popilliae* ingeridas, con el alimento, por las larvas germinan en el tracto digestivo y por fagocitosis los bastones penetran en las células del intestino medio (Tanada y Kaya, 1993; Poinar y Thomas, 1984), también que las primeras células bacteriales producidas por una espora en germinación tienen forma de lanza al extremo de la emergencia (Tanada y Kaya, 1993); esta estructura podría tener la función de penetración de la célula bacterial al hemocelo, inicialmente la multiplicación bacterial se da sobre el costado luminal de la membrana de basamento en las áreas regenerativas del intestino medio, para después sucederse de nuevo la multiplicación, durante la cual se presenta la invasión del hemocelo (Tanada y Kaya, 1993).

Durante la multiplicación bacterial la hemolinfa infectada adquiere un aspecto opaco a diferencia del translúcido que le caracteriza (Ibarra, 1994; Redmond y Potter, 1995; Tanada y Kaya, 1993), esto por la proliferación y al final formación de millones de nuevos esporangios antes de la muerte del hospedero (Warren y Potter, 1983; Bulla *et. al.*, 1978). Durante la esporulación los bacilos se concentran en el tejido conectivo o se asocian

estrechamente a los hemocitos, los bastones se multiplican y esporulan **gradualmente** (Tanada y Kaya, 1993).

En las diferentes especies de "chisas", los signos producidos por la enfermedad lechosa, son macroscópicamente similares, (Klein y Kaya, 1995; Bulla *et al.*, 1978).

Puede pensarse en *B. popilliae*, donde lo hay establecido, como un indicador de la densidad larval del insecto rizofago y al contrario la densidad larval como un punto en el estado de desarrollo de *B. popilliae* (White, 1940).

Una de las características deseables del entomopatógeno es que la incidencia de *B. popilliae*, aun así sea baja, pueda fortalecerse; en 1937, White, con solo una larva de *P. japonica* afectada de enfermedad lechosa alcanzó a realizar un fortalecimiento de la presencia de la enfermedad en un grupo de larvas compuesto el 90% de tercer instar y 10% por larvas de segundo instar (White, 1940).

En 1934, en áreas con baja densidad de larvas, recién infestadas por *P. japonica*, no se encontró incidencia de la enfermedad lechosa; pero cuando la infestación por larvas creció la incidencia de la enfermedad fué baja, para luego aumentar rápidamente a medida que el hospedero se sostenía en una alta densidad (White y Dutky, 1940).

White (1940) indica que para mantener las larvas de *P. japonica* por debajo del nivel de daño económico (NDE), debió aplicar dosis del entomopatógeno en el rango de 2.3×10^6 a 1.4×10^7 en una o varias estaciones, dependiendo de la distancia de los puntos de aplicación. La incidencia de la enfermedad lechosa dependería de la capacidad de diseminación por otros factores como aves e insectos (White, 1940). Fue probado experimentalmente que la incidencia de la enfermedad lechosa dependía de la capacidad de diseminación por medios como aves de corral que trasladaban excretas con residuos de "chisas" con *B. popilliae* pasadas intactas por el tracto digestivo y se potenciaron como inóculo en las nuevas áreas (White y Dutky, 1940; White, 1940).

Tashiro y White (1954) evaluaron diferentes razas de los organismos agentes causales de enfermedad lechosa, *B. popilliae* y *B. lentimorbus*, los resultados indicaron un bajo grado de virulencia de la raza "Tipo B regular" y

alto grado de virulencia de la raza "Tipo B Amphimallon", y ambas razas del "Tipo A", en cada caso, en dosis de 10^4 o más esporas inyectadas por individuo de *Amphimallon majalis*. El desarrollo de la enfermedad fue más rápido con "Tipo B Amphimallon" y la raza "Tipo A Stanton" que con las razas "Tipo A regular"; la concentración de la incidencia de la enfermedad se dio durante la segunda semana después de la incubación, para luego decrecer gradualmente (Tashiro y White, 1954).

Tashiro y White (1954), suministraron alimento inoculado con 2.0×10^8 esporas/kg de suelo a larvas de *A. Majalis* y la enfermedad se manifestó a la segunda semana; emplearon varias cepas de la bacteria, la raza "Tipo B Amphimallon" y "Tipo A regular", así como la raza "anxia". A la tercera semana la incidencia de la enfermedad, estuvo entre el 79 y 85%. Con base en los resultados preliminares se condujeron pruebas en las que no se encontró que hubiera correlación entre dosis de esporas y la incidencia de larvas enfermas para ninguna de las razas de la bacteria (Tashiro y White, 1954).

En condiciones de laboratorio, en evaluaciones efectuadas por Tashiro y White (1954) de tres razas de *B. popilliae* y 2 de *B. lentimorbus*,

encontraron que la raza "Amphimallon" de *B. lentimorbus* infectó del 95 al 100% de las larvas de *A. majalis* dos semanas después de inyectadas, con 10 de esporas cada una. La cantidad de infección siempre estuvo relacionada con la temperatura de incubación, de manera que a 15.5°C se obtuvo infección en seis semanas, a 21.1 °C en dos semanas y a 26.6 °C se obtuvo infección en solo una semana (Tashiro y White, 1954).

En 1940, White efectuó observaciones de hormigas que transportaron hasta 3 metros gusanos blancos afectados por la enfermedad lechosa; esto es un indicador del papel que juegan los insectos, zorrillos, topes, etc. en la diseminación local de la enfermedad y de aves de largo vuelo en su dispersión a grandes distancias (White y Dutky, 1940).

Una de las grandes ventajas de los productos con *B. popilliae* obtenidos *in vivo* es su alta residualidad, ya que pueden mantenerse activos hasta por mas de 21 años, pero es de considerar lo inestable de su expresión patogénica, siendo patógeno obligado con alta patogenicidad pero de baja virulencia (Tanada y Kaya , 1993).

El empleo de los diferentes métodos de inoculación de *B. popilliae* dependerá del objetivo que se tenga al hacerlo, si es para establecer

pruebas en el campo o si es para hacerlo en laboratorio. Igualmente al **hacer** una aplicación en el campo dependerá de la presencia previa de *B. popilliae*; en el caso de no haberse presentado registros, se recomienda una **evaluación** previa de la presencia de larvas con la enfermedad lechosa, lo **mismo** que de la composición del complejo de "chisas" y la densidad en que **hacen** presencia en el área a considerar. En inoculaciones en el laboratorio **se** emplean varios métodos como la inyección de larvas bien sea entre el **cuarto** y quinto (Dunbar *et. al.*, 1975; Tashiro, 1957) o entre el sexto y **séptimo** segmento (Tashiro y White, 1954; Warren y Potter, 1983; Shinde y **Sharma**, 1971) en la posición dorso lateral del abdomen (Tashiro y White, 1954), también se emplea la inoculación del alimento o del suelo en el que **habitan** las larvas

La metodología de inoculación empleada por Dutky (1940) ha sido validada por los demás investigadores. En evaluación de dos cepas inoculadas sobre *Amphimallon majalis*, Tashiro y White (1954) inyectaron a cada larva con 2.5×10^6 esporas por larva; en inoculaciones al suelo emplearon de $2 - 12 \times 10^6$ esporas/Kg de suelo. En inoculaciones a lotes de mayor tamaño ellos aplicaron homogenizadas en talco, 10^6 de esporas por gramo de formulación, para a su vez descargar dos gramos a intervalos de 1.5 m^2 (Tashiro y

White, 1954), que es el tratamiento estándar para aplicaciones contra el escarabajo japonés (White y Dutky, 1940; Warren y Potter, 1983). Cuando se emplea el método de inoculación vía inyección se descarga con microinyector, aproximadamente 0.0035 ml, dirigidos al hemocelo (Tashiro y White, 1954; Polivka, 1956). En las formulaciones de *B. popilliae* en polvo, se procura que haya un total de 100 millones de esporas por gramo de preparado (White y Dutky, 1940; Polivka, 1956; Tashiro y White, 1954; Ladd y MacCabe, 1967; Warren y Potter, 1983).

Para *P. japonica* las inoculaciones de campo con *B. popilliae*, tendientes a fortalecer la presencia del entomopatógeno, se considera que la densidad de las larvas está relacionada con su presencia y que la probabilidad de encontrar larvas enfermas se ve favorecida con la mayor densidad de larvas en el campo (Polivka, 1956; Warren y Potter, 1983). Una manera práctica de inoculación de la bacteria fue tomar larvas enfermas del campo y distribuir las homogéneamente en el campo a tratar (White, 1940).

En Estados Unidos, en 1958, se había registrado la presencia de *B. popilliae* en 14 estados en terrenos afectados por "chisas" en los cuales se había tratado aproximadamente 60000 hectáreas con *B. popilliae* formulado en talco, (Ladd y MacCabe, 1967).

No solo se han realizado pruebas tendientes a inocular *B. popilliae* sobre la superfamilia Scarabeoidea, también se han hecho sobre crisomelidos adultos. El método de inoculación empleado para *Diabrotica virgifera* (LeConte) y *D. longicornis* (Say.) fue aplicar *B. popilliae* en formulación comercial (Doom) sobre los pelos de mazorca de maíz. Los resultados al día 13 después de la inoculación indicaron que ni la presencia de esporas ni de otros componentes de la bacteria retardaron o modificaron el desarrollo larval; esto a pesar de que los productos fueron aplicados en dosis superiores a las empleadas para otros insectos susceptibles; esto permite decir que la posibilidad de su uso como método de control debe ser descartado (Sutter, 1969).

Las esporas producidas en adultos son de importancia para aquellos casos en que la disponibilidad de larvas se ve restringida en una época del año (Klein, 1981). La inoculación de adultos de *P. japonica* realizada por Langford y otros en 1942, fue registrada por Klein (1981); en ella obtuvieron 5.0×10^8 esporas de cada adulto inoculado, aproximadamente la cantidad requerida para formular 5 gramos de *B. popilliae* en polvo. En inoculación de adultos de *P. japonica*, Klein (1981), logró del 53 al 95 % de infección

dos semanas después del establecimiento de la prueba. La carencia de métodos efectivos para producción de esporas infectivas sobre medio artificial ha sido la principal limitante para la multiplicación de *B. popilliae* (Klein, 1981, Warren y Potter, 1983).

Para efectuar evaluaciones de productos comerciales con *B. popilliae* como ingrediente activo, Redmond y Potter (1995) inocularon suelo y alimento para probar el desarrollo de la enfermedad sobre *P. japonica*; se evaluaron las concentraciones 1×10^9 , 2×10^9 , 5.0×10^8 , 2.5×10^8 y 1.25×10^8 obtenidas de los productos comerciales Doom y Grub Attack siendo siempre baja la mortalidad causada por ambos productos, aunque siempre mas alta la producida por Doom, formulado con base en macerado de larvas vivas enfermas por *B. popilliae* (Redmond y Potter, 1995).

En Estados Unidos la introducción de *B. popilliae* en áreas infestadas de *P. japonica* ha sido una práctica recurrente desde 1937. Mediante la adición, en un principio, de larvas con enfermedad lechosa, se logró el establecimiento de la enfermedad en lugares en los que no se hallaba aun y permitió también estar reforzando la presencia del agente causal, mediante la aplicación posterior bien fuera de larvas enfermas, maceradas en caolín o

incluso en formulados comerciales que incluían tanto bacterias producidas *in vivo* como *in vitro* (White y Dutky, 1940; White, 1940); aunque la propagación de *B. popilliae* *in vitro* conduce a la pérdida total de la virulencia en las células producidas (Redmond y Potter, 1995; Klein y Jackson, 1992).

En diferentes estudios (Hanula y Andreadis, 1988; White y Dutky, 1940; White, 1940; Hall *et al.*, 1968; Boucias *et al.*, 1986; Tashiro y White, 1954), se ha observado la regulación que ejercen *B. popilliae* o *B. lentimorbus* sobre sus hospederos, hecho que lleva al insecto a densidades bajas; pero a su vez, se ha observado en el entomopatógeno la capacidad que tiene de persistir aun sin la presencia del hospedero (Klein y Jackson, 1992; Glare *et al.*, 1992), esto conduce a que quede un espacio que debe ser llenado por otros organismos antagonistas.

El que la presencia de *B. popilliae* se haya caracterizado, desde que se detectó, como reguladora de poblaciones de *P. japonica*, como permanente en unos casos, esporádica , en otros, puede llevar a pensar en el antagonismo que tenga con otros organismos. Por el contrario, la capacidad reguladora de poblaciones de "chisas", ejerciendo una virulencia

alta, lleva a que se den estructuras de resistencia de la bacteria como puede ser mediante los esporangios para mantener su persistencia (Klein y Kaya, 1995).

Ha sido clásico el uso de *B. popilliae* inoculado en campo, para aumentar el inóculo ya existente (Klein y Kaya, 1995; Tanada y Kaya, 1993). Si se considera que cada larva de *P. japonica* de tercer instar contiene entre $1 - 20 \times 10^{11}$ esporas, es de esperarse que las larvas sobrevivientes queden expuestas a altas concentraciones de inóculo (Ladd y MacCabe, 1967), pero a su vez pone en evidencia la presión de selección que puede ejercer el entomopatógeno hacia la resistencia del microorganismo, o a la combinación de factores como es la resistencia de la pared del intestino medio a ser penetrado por la acción de la bacteria al ser modificado el mecanismo de acción a causa de químicos residuales (Ladd y MacCabe, 1967).

Los registros de ocurrencia de *B. popilliae* en el escarabajo japonés, bien en laboratorio, en epizootias de campo, o en evaluaciones de campo, se han repetido hasta nuestros días y por varios autores (Klein, 1981; White, 1940; White y Dutky, 1940). Se destaca la proliferación de información con la introducción accidental de *P. japonica* en New Jersey en 1916, la búsqueda

de agentes de control natural, así como la evaluación de formulados de producción *in vivo* y otros de producción *in vitro* para su control (Klein, 1981; Klein y Jackson, 1992). El éxito de *B. popilliae* ha sido tal, que le ha permitido ser presentado como uno de los ejemplos clásicos de control biológico en el mundo (White y Dutky, 1940; White, 1940; Tanada y Kaya, 1993; Bulla *et al.*, 1978; Klein y Jackson, 1992 ; Klein y Kaya, 1995; Ibarra, 1994; Hanula y Andreadis, 1988; Ladd y MacCabe, 1967).

Regularmente las especies como *Lachnosterna consanguinea*, *Maladera castanea* (Polivka, 1956), *Anomala orientalis* (Hanula y Andreadis, 1988), *A. majalis* (Tashiro y White, 1954), *Phyllophaga (Holotrichia) serrata*, *Cyclocephala immaculata* (Warren y Potter, 1983), *Phyllophaga fusca*, *Ph. hortícola*, *Ph. anxia* (Warren y Potter, 1983), *Dermolepida alborhitum* (Warren y Potter, 1983), *Sericesthis germinata*, *Anaplognathus porosus* (Klein y Jackson, 1992), *Rhopaea verreauxi* (Klein y Jackson, 1992), *Heteronychus santahelenae*, *Melolontha melolonthae*, *Antitrogus morbillosus*, *Costelytra zeilandica* (Tanada y Kaya, 1993), *Heteronychus arator*, *Amphimallon solstitialis* (Glare *et al.*, 1993), *Holotrichia oblita*, *Anomala corpulenta* y *Lygirus subtropicus* (Boucias *et al.*, 1986) entre otras, han sido evaluadas en su susceptibilidad a aislamientos del agente causal de

enfermedad lechosa provenientes de *P. japonica*, con resultados positivos en condiciones de laboratorio pero erráticos cuando son llevados al campo, lo que indica dependencia de esas cepas de los factores ambientales. A continuación se presenta una relación de razas o variedades de *Bacillus* agentes causales de la enfermedad lechosa en diferentes hospederos en el mundo (Tabla 1).

Regularmente, para la producción de *B. popilliae* se emplean larvas enfermas de tercer instar (Ladd y MacCabe, 1967). Fleming (1968), citado por Ladd y MacCabe (1967), inoculó larvas de *P. japonica* con suelo que contenía de 10^6 - 10^8 de esporas por kg de suelo encontrando que entre el 50 y el 90% de las infecciones por enfermedad lechosa ocurrieron en el primero y segundo instar.

Las esporas de *B. popilliae* producidas *in vivo* son de gran valor; en zonas templadas escasean las larvas de tercer instar, por lo que en la estación de invierno, debido a las heladas, la obtención de esporas a partir de adultos inoculados es de gran importancia. Cada adulto inoculado y con la enfermedad puede contener 5×10^8 esporas (Klein, 1981). Sin embargo, en la naturaleza no se ha registrado la ocurrencia de *B. popilliae* en adultos

TABLA 1. RAZAS O VARIEDADES DE *Bacillus popilliae* EN DIFERENTES HOSPEDEROS EN EL MUNDO

Raza o variedad	Hospedero	Cultivo	Lugar	Autor	Año
Tipo A, tipo B	<i>P. japonica</i> Newman	observaciones	USA	Dutky	1940
Tipo A Larvas vivas enfermas	<i>P. japonica</i>	campo	USA	White y Dutky	1940
Campo	<i>C. larvae</i>	campo	USA	White	1940
Tipo A	<i>P. japonica</i>	campo-nieve	USA	White y Dutky	1940
Tipo A	<i>P. japonica</i>	suelo contaminado con b. p.	USA	Dutky	1940
<i>B. popilliae</i>	<i>P. japonica</i>	Césped	USA	Beard	1945
<i>B. popilliae</i> poivo	<i>P. japonica</i>	campo	USA	Hall, et al.	1948
Tipo A <i>anxia</i>	<i>A. majalis</i>	laboratorio, inyección, ingestión	USA	Hall, et al.	1948
<i>B. lentimorbus</i>	<i>A. majalis</i>	laboratorio, inyección, ingestión	USA	Hall, et al.	1948
?	<i>C. borealis</i>	césped	USA	Tashiro y White	1954
Tipo A	<i>A. majalis</i>	ingestión-inyección	---	Tashiro y White	1954
Milky disease	<i>Phyllophaga</i> sp.	campo	USA	Tashiro y White	1954
<i>popilliae</i>	<i>C. borealis</i> Arrow	pastos	USA	Tashiro y White	1954
			USA	Tashiro y White	1954
Tipo B <i>Amphimallon</i>	<i>A. majalis</i> , <i>P. japonica</i>	ingestión, inyección	USA	Tashiro y White	1954
<i>Melolonthae</i>	<i>P. anxia</i>	hemocitos, laboratorio	USA	Tashiro	1957
Tipo A. Debryne	<i>A. majalis</i> , <i>P. japonica</i>	ingestión, inyección	USA	Tashiro	1957
Tipo A	<i>A. majalis</i> , <i>P. japonica</i>	ingestión, inyección	USA	Tashiro	1957
Inoculación 1940	<i>P. japonica</i>	césped	USA	Ladd y McCabe	1963
<i>Popilliae</i>	<i>P. japonica</i>	campo	USA	Ladd y McCabe	1967
<i>B. euloomarahae</i>	<i>H. erator</i>	laboratorio	USA	Steinkraus y Tashiro	1967
NZ-1	<i>C. zelandica</i>	campo	N. Zelanda	Steinkraus, Tashiro	1967
Doom	<i>D. virgifera</i> Leconte	maíz, estigmas (adultos)	USA	Sutter	1969
Doom	<i>D. longicornis</i> (Say.)	maíz, estigmas (adultos)	USA	Sutter	1969
Tipo A	<i>L. consanguinea</i>	laboratorio, placas	India	Shinde	1971
	<i>H. consanguinea</i>	laboratorio	India	Shinde	1971
<i>Popilliae</i>	<i>P. japonica</i>	laboratorio	USA	Milner	1974

TABLA 1. RAZAS O VARIETADES DE *Bacillus popilliae* EN DIFERENTES HOSPEDEROS EN EL MUNDO

Raza o variedad	Hospedero	Cultivo	Lugar	Autor	Año
<i>Melolonthae</i>	<i>M. melolonthae</i>	laboratorio	USA	Milner	1974
Doom, <i>B. popilliae</i>	<i>P. japonica</i>	laboratorio, ingestión, iyección	USA	Dunbar y Beard	1975
<i>B. popilliae</i> , Doom	<i>A. orientalis</i>	laboratorio, ingestión, iyección	USA	Dunbar y Beard	1975
NZ- Tipo II	<i>C. zeilandica</i>	laboratorio	USA	Milner	1976
?	<i>A. spretulus</i>	laboratorio	USA	Spittstoesser	1977
NRRL B-2309	<i>P. japonica</i>	laboratorio	USA	Bulla et al.	1978
RM-9	<i>A. morbillosus</i>	laboratorio	USA	Milner	1978
<i>Popilliae</i>	<i>Cyclocephala borealis</i> Arrow	laboratorio	USA	Klein	1981
<i>C. borealis</i>	<i>P. japonica</i>	laboratorio	USA	Klein	1981
<i>C. hirta</i>	<i>C. borealis</i>	laboratorio		Milner	1981
<i>B. p. rhopaea</i>	<i>R. morbillosa</i>	laboratorio	Australia	Milner	1981
	<i>Sericesthis nigrolineata</i>	laboratorio	Australia	Milner	1981
	<i>Othnonius batesi</i>	laboratorio	Australia	Milner	1981
	<i>R. verreauxi</i>	laboratorio	Australia	Milner	1981
	<i>P. (Holotrichia) serrata</i>	Laboratorio	India	Milner	1981
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Popilliae quadriguttata</i>	laboratorio- iyección	China	Milner	1981
<i>B. popilliae</i>	<i>Holotrichia serrata</i> F	abono organico	USA	Milner	1981
RM 17	<i>Aphodius tasmaniae</i>	campo	USA	Milner	1981
Rhopaea	<i>S. germinata</i>	laboratorio	USA	Milner	1981
RM-12	<i>Anaplognathus porosus</i> (Dalman)	campo	N. Zelanda	Milner	1981
Tipo A <i>Cyclocephala</i>	<i>C. immaculata</i>	césped, grama	USA	Warren y Potter	1983
Tipo A comercial	<i>C. immaculata</i>	laboratorio, trebol holandes, ryegrass	USA	Warren y Potter	1983
<i>fusca</i>	<i>P. fusca</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
<i>majalis</i>	<i>R. majalis</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
<i>hirticula</i>	<i>P. hirticula</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
<i>orientalis</i>	<i>A. orientalis</i>	laboratolo	USA	Warren y Potter	1983
<i>popilliae</i> tipo A	<i>P. japonica</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983

TABLA 1. RAZAS O VARIETADES DE *Bacillus popilliae* EN DIFERENTES HOSPEDEROS EN EL MUNDO

Raza o variedad	Hospedero	Cultivo	Lugar	Autor	Año
<i>anxia</i>	<i>P. anxia</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
RM 10-25	<i>D. alborhitum</i>	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
RM-11	<i>Sericesthis geminata</i> Boisderval	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
RM-12	<i>Anoplognathus porosus</i> Delman	laboratorio	USA	Warren y Potter	1983
RM-8	<i>R. verreauxi</i>	campo-inyección	USA	Warren y Potter	1983
RM-6	<i>R. morbillosa</i> Newman	césped-inyección	USA	Warren y Potter	1983
<i>B. euloomarahee</i>	<i>Heteronychus santahelense</i> Blanchard	césped-inyección	USA	Warren y Potter	1983
A. 1036-13	<i>Holotrichia</i> spp.	cesped-inyección	USA	Warren y Potter	1983
<i>B. lentimorbus</i> (Maryland)	<i>P. japonica</i>	ceped-inyección	USA	Warren y Potter	1983
A. 1026-D	<i>R. mangnicornis</i> Blackburn	cesped-inyección	USA	Warren y Potter	1983
Tipo A	<i>C. paralella</i> Casey	caña de azúcar	USA	Boucias	1988
Tipo B	<i>Lygirus subtropicus</i> Blatchey	caña de azúcar	USA	Boucias	1988
Popilliae, <i>B. lentimorbus</i>	<i>P. japonica</i>	campo	USA	Hanula y Andreadis	1988
Popilliae, <i>B. lentimorbus</i>	<i>M. castanea</i> (Arrow)	campo	USA	Hanula y Andreadis	1988
Popilliae, <i>B. lentimorbus</i>	<i>A. orientalis</i> Waterhouse	campo	USA	Hanula y Andreadis	1988
Popilliae	<i>P. japonica</i>	campo-aves	USA	Hanula y Andreadis	1988
Aislado local y Doom	<i>A. majalis</i>	laboratorio	USA	Steinkraus	1990
	<i>B. popilliae</i>	campo	Colombia	Londoño	1992
<i>rhopaea</i>	<i>R. verreauxi</i>	campo	Australia	Steinkraus y Klein	1992
<i>B. lentimorbus</i>	<i>P. japonica</i>	césped-inyección	USA	Steinkraus y Klein	1992
<i>Holotrichia obliterata</i>	<i>P. crinita</i>	zanahoria negativa	USA	Klein y Kaya	1992
	<i>R. majalis</i>	zanahoria negativa	USA	Klein y Kaya	1992
<i>B. popilliae</i>	<i>C. hirta</i>	laboratorio	USA	Klein y Kaya	1992
Grub Attack	<i>P. japonica</i>	ingestión, inyección	USA	Stahly y Klein	1992
Cepas nativas	<i>M. melolonthae</i>		USA	Tanada y Kaya	1993
<i>B. popilliae</i> variedad <i>melolonthae</i>	<i>M. melolonthae</i>		USA	Tanada y Kaya	1993
<i>B. fribourgensis</i> var. <i>melolonthae</i>	<i>A. solstitialis</i>	campo	ALEMANIA	Glare et al.	1993

TABLA 1. RAZAS O VARIEDADES DE *Bacillus popilliae* EN DIFERENTES HOSPEDEROS EN EL MUNDO

Raza o variedad	Hospedero	Cultivo	Lugar	Autor	Año
<i>B. popilliae</i>	<i>C. hirta</i>	laboratorio	USA	Tanada y Kaya	1993
<i>B. popilliae</i>	<i>C. hirta</i>	laboratorios <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	USA	Thurston et al.	1993
<i>Cyclocephala</i>	<i>Ph. obsoleta</i>	Hortalizas	Colombia	Londoño	1994
<i>B. popilliae</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. lentimorbus</i>	<i>P. japonica</i>	laboratorio-trebol	USA	Redmond y Potter	1995
Doom	<i>P. japonica</i>	campo de golf	USA	Redmond y Potter	1995
Grub Attack	<i>P. japonica</i>	laboratorio	Australia	Klein y Kaya	1995
<i>P. japonica</i>	<i>Costelytra zealandica</i>		USA	Klein y Kaya	1995
?	<i>Clavipalpus</i> pos. <i>ursinus</i>	pastos	Colombia	Rodríguez	1996
Cepa nativa	<i>Ancognatha scarabaeoides</i>	pastos	Colombia	Rodríguez	1996
	<i>A. ustulata</i>	pastos	Colombia	Rodríguez	1996
	<i>Leucothyreus</i> sp	Papa, Pastos	Colombia	Guarín	1996a
<i>B. popilliae</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. lentimorbus</i>	<i>Anomala</i> sp.	Pastos	Colombia	Guarín	1996b
<i>B. popilliae</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. lentimorbus</i>	<i>Ph. obsoleta</i>	Hortalizas	Colombia	Guarín	1996b
<i>B. popilliae</i> , <i>B. sphaericus</i>	<i>Clavipalpus</i> sp.	Flores	Colombia	Guarín	1996b
<i>B. popilliae</i> , <i>B. lentimorbus</i>	<i>Ancognatha scarabaeoides</i>	Pastos	Colombia	Guarín	1996b
<i>B. popilliae</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. lentimorbus</i>	<i>Symmela</i> sp.	<i>Symmela</i> sp.	Colombia	Guarín	1996b

en condiciones de campo; se pone en duda el potencial que los adultos puedan tener en la diseminación de la enfermedad lechosa (Villani *et al.*, 1992).

La masificación de la producción a gran escala de *B. popilliae* se ha visto obstaculizada por los exigentes requerimientos en medios de cultivo artificiales para la esporulación y la pérdida de virulencia de las células resultantes, cuando éstas se dan (Klein y Jackson, 1992; Steinkraus, 1957; Glare *et al.*, 1992; Nuñez, 1993; Stahly y Klein, 1992; Travers y Faust, 1982).

La gran diversidad de escarabajos adultos y sus larvas, de importancia económica en el mundo, como *Phyllophaga crinita* Burm. y otras especies de este género, *Cotinis nitida* y varias especies de *Cyclocephala*, que atacan áreas de pastos y césped en USA, *Chlorochiton convexa* Given, *C. zeilandica* (White) en Nueva Zelandia alimentándose de raíces y trozando tallos en pastos, varias especies de Melolonthidae y *Phyllophaga horticola* (L) en praderas en Europa, *Aphodius tasmaniae* Hope y *Adoryphorus couloni* (Burm.) en pastos de Australia, varias especies de *Oryctes* atacando palmas en Asia y Africa, varias especies de *Holotrichia* que atacan maní y otras cultivos en la India (Jackson, 1992), varias especies de *Phyllophaga* y

otros géneros como *Anomala*, *Cyclocephala* y *Bothynus* reportados como "chisas" de importancia económica en América Central están representadas por (King, 1984), ponen de manifiesto la necesidad de conocer las diferentes alternativas de regulación de poblaciones, que pasan necesariamente por conocer la composición de los complejos de "chisas".

En Colombia, la atención a las "chisas" de significado económico, se ha concentrado en *Ancognatha scarabaeoides* Burmeister, registrada como plaga en el cultivo de la papa y hortalizas al sur del país (Posada, *et al.*, 1976).

En el Oriente antioqueño los insectos que hacen parte del complejo de "chisas" se les encuentra alimentándose de raíces y tubérculos en papa, en raíces de maíz y frijol en cultivos solos o asociados, en raíces de hortalizas, en raíces de pastos y prados en áreas de recreo, en raíces de frutales y forestales (Londoño, 1995; Nanclares y Ramirez, 1992)

Los registros de "chisas" de importancia económica en Colombia no han tenido mayor consistencia, concentrándose los existentes en el Oriente del departamento de Antioquia, caracterizado por un complejo en el que

predomina *Ph. obsoleta* Blanchard, y de acuerdo a las localidades, alternan *Cyclocephala sexpunctata*, *C. lucida*, *Plectris sp.*, *P. aeruginosa*, *Ancognatha scarabaeoides*, *C. gregaria* e *Isonychus sp.* (Londoño, 1992; Vallejo, 1995; Nanclares y Ramirez, 1992). Según el comportamiento de captura de adultos con trampas de luz (BLB) en el Oriente antioqueño (Londoño, 1992; Vallejo, 1995; Londoño, 1995), se conserva el predominio global, para el área muestreada, de *Ph. obsoleta* hasta mayo de 1996 (Guarín, 1996b).

El panorama de distribución e importancia de las distintas "chisas" en el mundo tanto en cultivos, como en áreas de recreo, también ha llamado la atención y permitido la búsqueda de formas de vida antagonistas que contribuyan al manejo de esas poblaciones (Klein, 1981; Klein y Jackson, 1992; Boucias *et al.*, 1986).

Se han desarrollado y comercializado productos para control de especies de "chisa" como son Doom, Japademic, Grub Attack, Milky Spore, Ringer, conteniendo *B. popilliae* como ingrediente activo, han sido usados contra *P. japonica* en Estados Unidos (Hanula y Andreadis, 1988; Stahly y Klein, 1992), pero su disponibilidad en mercado hoy es nula (Jackson y O'Callaghan, 1995). Igualmente ha sido desarrollado otro producto con la

bacteria *Serratia entomophila* como ingrediente activo bajo la marca registrada INVADE, el cual es recomendado para ser aplicado contra larvas de *Costelytra zeilandica* en praderas de Nueva Zelandia (Jackson y O'Callaghan, 1995; Klein y Kaya, 1995). Eso sin considerar la cantidad de trabajos que se han adelantado con *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*, con cepas aisladas de "chisas" en diferentes partes del mundo (Tanada y Kaya, 1993; Klein y Jackson, 1992; Jackson y O'Callaghan, 1995).

En Colombia la evaluación de enemigos naturales de "chisas" no ha tenido mayor continuidad, es común encontrar datos e información aislada al respecto. En 1987, se evaluó, bajo condiciones de laboratorio, la susceptibilidad de los diferentes instares larvales del gusano ejército del maíz, *Spodoptera frugiperda*, a dos cepas de *M. anisopliae*, una de ellas aislada de *Ancognatha scarabeoides* (Guarín y Meza, 1987). En un reconocimiento de los enemigos naturales de las "chisas" en el Oriente antioqueño, se encontró que el 44% de las larvas colectadas en 1992 y el 77 % en 1994, eran controladas naturalmente; entre los agentes de control estaban *B. popilliae*, los nemátodos de las familia Rhabditidae y Mermithidae, lo mismo que los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* y en

menor proporción dos ectoparásitos (Hymenoptera : Tiphiidae y Scoliidae) y un endoparásito (Diptera : Tachinidae) (Londoño, 1995); Guarín (1996a) registró la ocurrencia de *B. popilliae* y *Bacillus sphaericus* en diferentes géneros, como *Leucothyreus*, *Anomala*, *Clavipalpus* y *Symmela*, integrantes del complejo de "chisas" predominante en el Oriente antioqueño.

En la Sabana de Bogotá ha sido aislada *B. popilliae* de *Ancognatha scarabaeoides*, *A. ustulata*, *Clavipalpus* pos. *ursinus* y *Heteroghomphus dilaticollis* (Rodríguez, 1996). Esta información es alentadora en el sentido de adelantar trabajos que tiendan a modificar condiciones de manejo de cultivos, hacia un mayor equilibrio de los factores naturales que contribuyan a mantener las poblaciones de "chisas" a niveles competitivos.

White (1940), a inicios de 1935, encontró lugares con *P. japonica* con densidades desde 630 larvas/m² sin aparición de *B. popilliae*; después de la inoculación de la enfermedad lechosa la densidad se redujo a 135 larvas/m²; en junio de 1939 en los lotes evaluados, se recuperaron 54 larvas/m² sanas. En los alrededores del área tratada con *B. popilliae*, en un radio de 70 m, se encontraron menos de 90 larvas/m² y se registró una incidencia con mas del 30% de la enfermedad lechosa (White y Dutky, 1940). Al parecer tiene

consistencia que a medida que se aleja del área tratada aumenta la densidad de larvas y se reduce la incidencia de la enfermedad lechosa según las evaluaciones de los autores; en mayo de 1939 se encontró que a un radio de 200 metros del área tratada hubo 324 larvas/m² causando daños en un campo de golf; aproximadamente a los 400 metros de radio, el promedio pasó a ser 554.4 larvas/m²; esto llevó a la destrucción del campo (White, 1940). Solo en Junio de 1939 se recuperaron larvas afectadas por enfermedad lechosa en 70 m. alrededor del área inicialmente inoculada.

Es posible fortalecer la acción del patógeno ya presente, mediante la dispersión del inóculo ya encontrado en el campo. La capacidad de diseminación de la bacteria es bastante reducida pero se ve incrementada por otros mecanismos como aves, roedores e insectos (White y Dutky, 1940; White, 1940).

Otro ejemplo que permite verificar la dependencia de la presencia de la enfermedad con la densidad de "chisas" se dio en New Jersey, donde en 1937 en el mes de mayo la incidencia de la bacteria solo fue de 0.2%, ya en junio de ese año la incidencia fue del 28% y las densidades larvales de *P. japonica* habían pasado de 360 a 50 larvas/m² (Klein y Jackson, 1992).

La disminución de las densidades de larvas de *P. japonica* hizo caer también la disponibilidad de presentaciones comerciales de insecticidas biológicos a base de *B. popilliae* obtenido *in vivo* de larvas enfermas del escarabajo japonés (Jackson y O'Callaghan, 1995). Esto acompañado de la pérdida de virulencia de los medios artificiales para la producción *in vitro* de la bacteria responsable de la etiología de la enfermedad lechosa llevó a que se desenchajara un programa que había funcionado adecuadamente para el manejo de poblaciones de escarabajos y de sus larvas fundamentalmente; es por esto que de nuevo se reclama la implementación de programas estatales que restablezcan el equilibrio perdido (Jackson y O'Callaghan, 1995).

La presencia de razas y cepas nativas de *B. popilliae* bien sea en otras latitudes o en nuestro entorno son una realidad; la tarea radica en detectarlas y valerse de ellas, como poderosas herramientas, que contribuyan al manejo racional de los insectos que puedan causar daño a cultivos y actividades humanas.

Redmond y Potter, (1995) consideran que las condiciones favorables para la expresión de la enfermedad lechosa están a temperatura del suelo superior

a 21 °C por varios meses; también que la densidad sea mayor o igual a 300 larvas/m² y para que una aplicación provea control en 1 - 3 años, afirman que es necesario aplicar 3,1 lbs de formulado con *B. popilliae*/Ha. (Redmond y Potter, 1995; Tashiro y White, 1954).

En una evaluación efectuada por Hanula y Andreadis (1988), en Connecticut durante 1986, para determinar la presencia de microorganismos asociados con la presencia de *P. japonica* y otras "chisas" asociadas, no se encontró que hubiera relación entre la presencia de *B. popilliae* y la densidad de larvas como *P. japonica*, *Maladera castanea* y *Anomala orientalis*; solo se encontró a *Rickettsiella popilliae* como entomopatógeno de *Phyllophaga* spp.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 LOCALIZACION

El trabajo se realizó en dos centros de Investigación (C. I.) de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, .

La parte correspondiente a pruebas de patogenicidad fue conducida en el C. I. "La Selva", ubicado en la vereda Llano Grande, del municipio de Rionegro a 2120 msnm, con una temperatura promedio de 17 °C, una humedad relativa del 78% y una precipitación promedio anual 2.100 mm. De acuerdo con la clasificación de zona de vida de Holdridge, ésta corresponde a un Bosque húmedo Montano bajo (bh-MB).

Las evaluaciones de medios de cultivo para el crecimiento de *B. popilliae* , se llevaron a cabo en el C. I. "Tulio Ospina", localizado en el municipio de Bello a 1438 msnm, con una temperatura promedio de 24.6 °C, H. R. de 78.4% y una precipitación promedio anual de 1400 mm, para el periodo comprendido entre octubre - noviembre de 1996; la zona de vida en esta localidad corresponde al Bosque húmedo Premontano (bh-PM).

3.2. METODOLOGIA

3.2.1 Obtención del inóculo

Para la obtención del inóculo, se realizó una búsqueda en diferentes localidades y cultivos, no solo sobre *Ph. obsoleta*, sino también para otros géneros integrantes del complejo de "chisas" del Oriente antioqueño. En la Tabla 2 se muestra la relación de sitios y las especies de "chisas" en los que se realizó la búsqueda, sin que necesariamente el hallazgo de *B. popilliae* haya sido exitoso.

La fuente de *B. popilliae* para el inóculo inicial fue obtenida de larvas de *Ph. obsoleta* provenientes del municipio de Marinilla (Antioquia), con sintomatología típica de la enfermedad, como la sedimentación blanca opaca de la hemolinfa, y la existencia de masas blancas de distintos aspectos en la región caudal. Para determinar la presencia de *B. popilliae*, se examinaron individualmente larvas con alguna sintomatología.

Mediante la tinción de esporas, utilizando verde de malaquita y safranina, se verificó la morfología típica de la bacteria. (Figura 1).

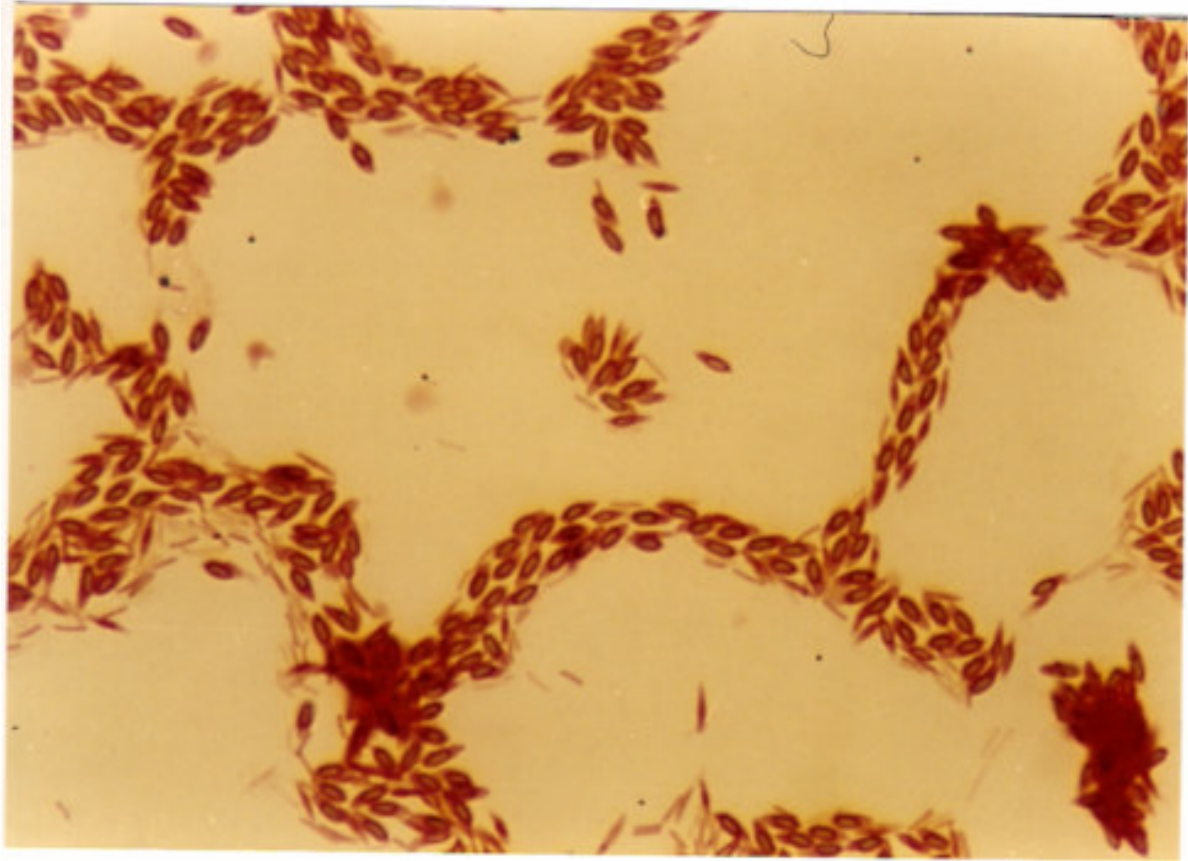


FIGURA 1. Morfología típica de *B. popilliae*; nótese la deformación de la célula bacteriana a causa de a espora. Espora : de color verde; cristal: de color rosado.

TABLA 2. Relación de sitios, condiciones de suelo y géneros de "chisas" muestreadas en la búsqueda de *B. popilliae*, en el oriente Antioqueño 1996

MUNICIPIO	VEREDA	pH SUELO	CULTIVO	ESPECIES
Rionegro	Tablazo	5.78	Gramas Prado	<i>Symmela sp.</i> , <i>Ph. obsoleta</i> , <i>Plectris sp.</i> , <i>Ancogntha sp.</i> , <i>Cyclocephala sp.</i>
El Santuario	Platanillo	5.88	Papa	<i>Ph. obsoleta</i> <i>Cyclocephala sp.</i>
El Retiro	Villa Elena	6.10	Pasto	<i>Ph. obsoleta</i>
Medellín	Sta. Elena (El Rosario)	5.4	Papa	<i>Cyclocephala sp.</i> <i>Ancognatha sp.</i>
El Carmen	Samaria	5.57	Frijol	<i>Ph. obsoleta</i> <i>Cyclocephala sp.</i>
Marinilla	La esperanza	6.30	Frijol	<i>Ph. obsoleta</i>
Rionegro	Llano Grande (LaSelva)	5.52	Frijol	<i>Ph. obsoleta</i> , <i>Symmela sp.</i>
Sonson	Tasajo	5.24	Papa	<i>Ph. obsoleta</i> <i>Ancognatha sp.</i>

Tanto las larvas sanas, como aquellas sospechosas de estar afectadas por un entomopatógeno, se rotularon individualmente y se registró el sitio, especie cultivada.

Realizadas las pruebas que permitieron confirmar la identidad del inóculo *B. popilliae* se preparó una solución madre a la que se le determinó la concentración de estructuras infectivas mediante el empleo del hemocitómetro; a modo de rutina, esas soluciones fueron preservadas en condiciones de refrigeración en glicerol al 20%.

3.2.2 Obtención de larvas

Durante el período comprendido entre febrero y mayo de 1996, en diferentes localidades del Oriente antioqueño, con antecedentes de la presencia de "marceños", se realizaron capturas de adultos y larvas en diferentes estadios de desarrollo.

Para la cría de larvas y las pruebas de patogenicidad se utilizó suelo esterilizado a 121 °C durante 40 minutos, el cual fue colocado en poncheras plásticas hondas de 0.13 m² de área; se utilizó una capa de suelo de 10 cm de espesor. Todas éstas poncheras fueron perforadas en el fondo con broca de 1.5 mm de diámetro y cubiertas con anjeo plástico para evitar la evasión de larvas (Figura 2).

Especímenes adultos de *Ph. obsoleta* se confinaron en jaulas, para el proceso de cópula y oviposición, empleando como sustrato de oviposición suelo estéril. Cada dos días se retiraron las posturas, para trasladarlas a bandejas y cajas plásticas, de 12 cm de diámetro conteniendo suelo esterilizado (Figura 3); dichas bandejas fueron cubiertas luego con polipropileno hasta la obtención de larvas de primer instar, separando éstas últimas por sitio de origen. Durante los 15 ± 3 días que duró el período embrionario, las bandejas y cajas plásticas permanecieron cubiertas y fueron humedecidas con agua destilada estéril, aplicada con jeringa desechable.

Una vez obtenidas las larvas de primer instar (L1), se colocaron 50 en cada ponchera plástica (Figura 2), con 10 cm de capa de suelo esterilizado. Cada ponchera fue cubierta con tapa de anjeo metálico con 0,5 mm de diámetro, para evitar acción de organismos indeseados.

Una vez colocadas las larvas de primer instar uniformemente distribuidas en el sustrato, se sembró trigo previamente esterilizado en hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos, con el fin de garantizar la producción de raíces para la alimentación de las larvas (Figura 4); dicho alimento fue suministrado



FIGURA 2.



FIGURA 3.



FIGURA 2. Ponchera plástica con tapa de anejo metálico para cría de larvas de *Ph. obsoleta*.

FIGURA 3. Bandejas y cajas plásticas para incubación de huevos de *Ph. obsoleta*.

FIGURA 4. Ponchera plástica con cespedón de trigo para la alimentación de larvas de *Ph. obsoleta*.



FIGURA 4.

por 28 días, es decir, hasta que las larvas se encontraban en el segundo instar. El trigo fue reemplazado cada vez que al ejercer una ligera fuerza hacia afuera, el cespedón se desprendiera fácilmente.

El procedimiento de cría se mantuvo para las larvas de segundo instar hasta transcurridos 43 días, cuando las larvas se encontraban iniciando el tercer instar, disponiéndose del material adecuado para las pruebas, tanto de patogenicidad de *B. popilliae*, como para la evaluación del efecto de la *densidad de la "chisa" sobre dicha patogenicidad*.

En forma paralela a la cría, se buscó larvas de primer y segundo instar de *Ph. obsoleta* provenientes de diferentes localidades y cultivos del Oriente antioqueño; su búsqueda se efectuó desde el mes de marzo hasta el 15 de mayo de 1996; las de tercer instar se buscaron hasta septiembre 4 de 1996. Las larvas de fueron agrupadas por instar y colocadas de a 30 por ponchera con 10 a 15 cm de capa de suelo esterilizado; en cada ponchera se dispuso semillas de trigo lavado en hipoclorito de sodio como se indicó anteriormente.

Las larvas colectadas del campo, fueron sometidas a un período cuarentenario; éste implicó someter una muestra correspondiente al 10% de los especímenes a sangrado, para diagnosticar la presencia de *B. popilliae*. En todos los casos, las larvas fueron agrupadas por localidad de origen, contenidas en las poncheras ya descritas; de cada lote de larvas, se mantuvo un grupo de especímenes en caja plástica transparente de 12 cm de diámetro para verificar la muda característica del cambio de instar.

Confirmada la identidad como *Ph.obsoleta* y después del proceso cuarentenario en casa de malla, las larvas con 20 días de estar en tercer instar, se consideraron adecuadas para ser empleadas en los experimentos, tanto de la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de *B. popilliae* sobre las larvas de *Ph.obsoleta*, como para la prueba del efecto de las densidades sobre la mortalidad de esta especie atribuible a *B. popilliae*

3.2.3 Determinación de la concentración letal media CL_{50} de *B. popilliae* sobre *Ph. obsoleta*.

Bajo condiciones de casa de malla, se evaluó el efecto de las siguientes seis concentraciones de *B. popilliae*: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 esporas/m², sobre el equivalente 100 larvas/m² (13 larvas por ponchera). Se empleó un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones; las observaciones efectuadas fueron mortalidad de larvas por acción de *B. popilliae* para la cual, se realizaron lecturas semanales y se determinó el porcentaje de mortalidad para cada una de las semanas. El porcentaje de mortalidad de larvas fue corregido según la fórmula de Schneider-Orelli (Bayer, 1963), así:

$$P = \{(P' - C)/(100 - C)\} * 100 \quad \therefore \quad P' = \% \text{ mortalidad en cada densidad}$$

P = % mortalidad corregida

C = % mortalidad testigos

A partir de hemolinfa de *Ph. obsoleta*, se procedió a estimar la concentración del entomopatógeno (esporas/ml) y para ello se utilizó el hemocitómetro; estimada la concentración de 5.27×10^6 esporas/ml se preparó una solución madre de 1.0×10^6 esporas/ml, a partir de la cual y, por diluciones seriadas, se obtuvo la concentración para cada tratamiento.

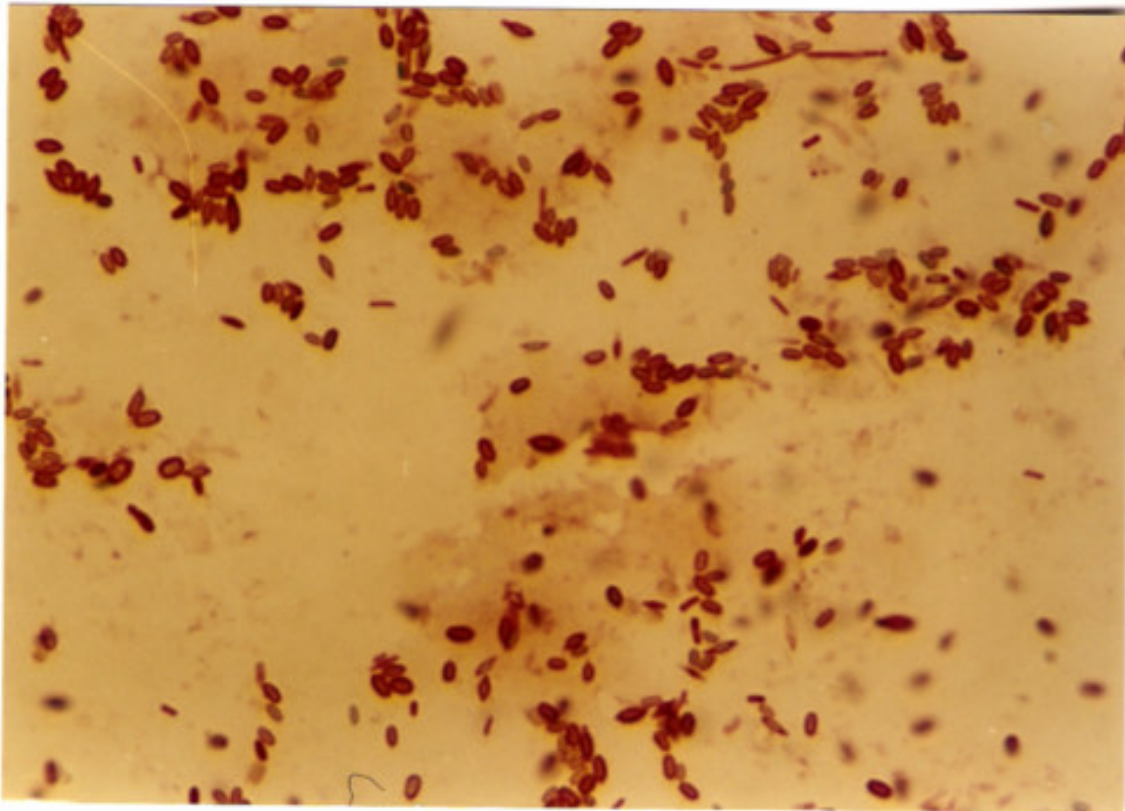


FIGURA 5. Estructuras típicas de *B. popilliae* provenientes de larvas de *Ph. obsoleta*

a. esporangio

b. espora

d. células vegetativas o bastones

f. *B. popilliae* en esporogenesis

c. cristal parasporal

e. cadenas de bastones

g. espora de *B. lentimorbus*

Las soluciones para concentración de esporas, de cada una de las repeticiones, fueron colocadas en viales y luego vertidas en un vaso plástico desechable con capacidad de 150 ml, el cual contenía 40 gr de trigo previamente desinfectado. El recipiente plástico con el trigo y las esporas fue homogenizado y lavado con agua destilada estéril, aplicada a presión con jeringa desechable, con el fin de retirar las esporas allí dosificadas. El trigo, así inoculado, fue sembrado en la ponchera respectiva. A medida que las raíces fueron consumidas por las "chisas" se adicionó mas trigo no inoculado con bacteria, pero sí bajo las condiciones de asepsia esbozadas.

Semanalmente, se revisó el contenido de larvas, retirando las muertas, las cuales fueron rotuladas individualmente y refrigeradas hasta el día siguiente cuando se realizó el diagnostico respectivo.

Para verificar la presencia de *B. popilliae* se extrajo la hemolinfa de cada una de las larvas muertas, se procedió a hacer la tinción utilizando verde de malaquita y safranina. Las larvas se consideraron muertas por *B. popilliae* cuando se apreciaron estructuras típicas de la bacteria, como esporangio, esporas, cristal paraesporal y células vegetativas (Figura 5).

3. 2. 4 Efecto de la densidad de *Ph. obsoleta* sobre la patogenicidad de *B. popilliae* .

Bajo condiciones de casa de malla, en el C. I. "La Selva", se evaluó, en un diseño de bloques completos al azar, el efecto las diferentes densidades poblacionales de larvas de tercer instar de *Ph. obsoleta*, sobre la expresión de la patogenicidad de *B. popilliae* .

Las inoculaciones de la bacteria se realizaron sobre densidades de población correspondientes a 30, 100, 200 y 300 larvas/m² con la concentración única de 10⁶ esporas/m² provenientes de *Ph. obsoleta*.. La metodología de inoculación y determinación del porcentaje de mortalidad fueron iguales a lo esbozado en el numeral 3.2.3.

La información esquemática de este bioensayo se puede apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3. Densidades larvales de *Ph. obsoleta* inoculadas con *B. popilliae*

Tratamiento	larvas/ponchera	Larvas/tratamiento
Densidad poblacional (Larvas/m ²)	n	N
30	4	16
100	13	52
200	25	100
300	38	152
TOTAL		320

La variable considerada fue el número de larvas muertas por *B. popilliae*. Semanalmente se revisó el contenido de larvas de cada una de las poncheras . Las evaluaciones se realizaron hasta la semana 13 (82 días) después del establecimiento del experimento. Las larvas muertas por semana fueron individualizadas, rotuladas y refrigeradas hasta el día siguiente en que se realizó la actividad de diagnóstico, similar a la descrita para el numeral 3.2.3

3.2.5 Evaluación de medios de cultivo

Se evaluó la capacidad de diferentes medios para producción de células vegetativas y reproductivas de *B. popilliae*; para esto se empleó el diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones.

Los medios fueron: Agar Younsten, Agar J, Agar Agar, puros y en adición con urea, hemolinfa y agua de coco; el agua de coco igualmente fue evaluada como medio de cultivo puro, para un total de 13 medios de cultivo.

Para efectos prácticos se numeraron los medios de cultivo de la siguiente manera:

- | | |
|----------------------------|--------------------------------|
| 1. Younsten | 7. Agar J - Agua de coco |
| 2. Younsten - Urea | 8. Agar J - Hemolinfa |
| 3. Younsten - Agua de coco | 9. Agar - Agar |
| 4. Younsten - Hemolinfa | 10. Agar - Agar - Urea |
| 5. Agar J | 11. Agar - Agar - Agua de coco |
| 6. Agar J - Urea | 12. Agar - Agar - Hemolinfa |
| | 13. Agua de coco |

Los medios de cultivo fueron preparados según su composición y esterilizados a 121 °C , durante 15 minutos, al cabo de los cuales se dejaron reposar para adicionarles el antibiótico vancomicina al 0.3%. A los tratamientos que lo requerían se adicionó hemolinfa de *Ph. obsoleta*, urea al 0.3% y agua de coco al 1%, la cantidad de hemolinfa adicionada al tratamiento que así le correspondiera fue de 0.4% en volumen.. El tratamiento correspondiente al agua de coco no fue esterilizado para evitar su desnaturalización y tampoco se le adicionó vancomicina. Una vez preparados los medios, se procedió a hacer el vaciado en las respectivas cajas petri adicionando 20 ml en cada una de ellas

Los medios de cultivo contenidos en las cajas petri fueron inoculados con 0.1 ml de hemolinfa en concentración de 1×10^8 esporas/ml. La metodología de siembra fue en estría o en G. Una vez inoculadas las cajas fueron selladas con polipropileno e incubadas en ambiente de anaerobiosis. A las 72 horas después de la inoculación se verificó el crecimiento de *B. popilliae*, evaluando tanto el aspecto macro y microscópico. El objetivo de la verificación microscópica de los crecimientos fue determinar la correspondencia de la apariencia macroscópica de las colonias con la presencia de estructuras, tanto vegetativas como reproductivas del

microorganismo. Después de cada revisión, el material fue sometido de nuevo a condición de anaerobiosis.

Transcurridos 10 días se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y la cantidad de esporas/ml producidas en cada medio. De cada UFC se tomó una muestra con ayuda del asa, y se diluyó en 1 ml. de agua destilada estéril; del material diluido se hizo el conteo de esporas empleando el hemocitómetro con la dilución 1 en 10, lo que permitió el factor de dilución de 1 en 1000. Se determinó además el tamaño promedio ponderado de las UFC, para lo cual se estimó el tamaño según la abundancia relativa, donde:

$$\text{Tamaño de UFC(mm)} = T_{(UFC)} \sum_i^n [\text{No. UFC} \times \emptyset] \therefore$$

\emptyset = diámetro de UFC; i = posible tamaño de las UFC.

3.2.6 Temperatura para almacenamiento *B. popilliae* .

En instalaciones del Centro de Investigación "La Selva" de CORPOICA y siguiendo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, se evaluaron

cinco temperaturas diferentes para almacenamiento de esporas de *B. popilliae*, a saber: -176°C (en nitrógeno líquido), -15°C (en congelador de nevera convencional), 4°C (al interior de puerta de nevera), 17°C (a temperatura ambiente), todos estos en glicerol al 20% y, a 17°C , en agua destilada estéril. Para todas las temperaturas evaluadas se emplearon 10^6 esporas/ml en el diluyente respectivo, utilizando cryoviales de 2 cc de capacidad.

El conteo de esporas por unidad de volumen fue establecido 30 días después de inoculados los medios de cultivo. Se realizaron observaciones del aspecto de las estructuras vegetativas y reproductivas. En todos los casos la presencia de esporas fue verificada mediante la tinción de verde de malaquita y safranina.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 FASES DE LA ENFERMEDAD LECHOSA

De acuerdo con lo observado macro y microscópicamente cada semana en las larvas L3 expuestas a la acción patogénica de *B. popilliae*, se procedió a agrupar en cuatro fases (I a IV) el estado de desarrollo de la enfermedad lechosa, como se discrimina en la Figura 6, así:

FASE I

Las larvas de tercer instar con enfermedad lechosa incipiente conservan sus características, tanto de movilidad como de ingestión de alimento. La larva adquiere un aspecto ligeramente opaco en su hemolinfa. Al arrancar una pata, el color de la hemolinfa que brota es ligeramente translúcido, igual que la hemolinfa que se ve desplazar en el abdomen en vista dorsal. Al observar la hemolinfa al microscopio, a 400 aumentos (en directo y sin tinción), como en tinción a 900 aumentos, se aprecian abundantes células sanguíneas y cuerpos grasos en los que hay esporas y abundantes células vegetativas de *B. popilliae*; las esporas son escasas.

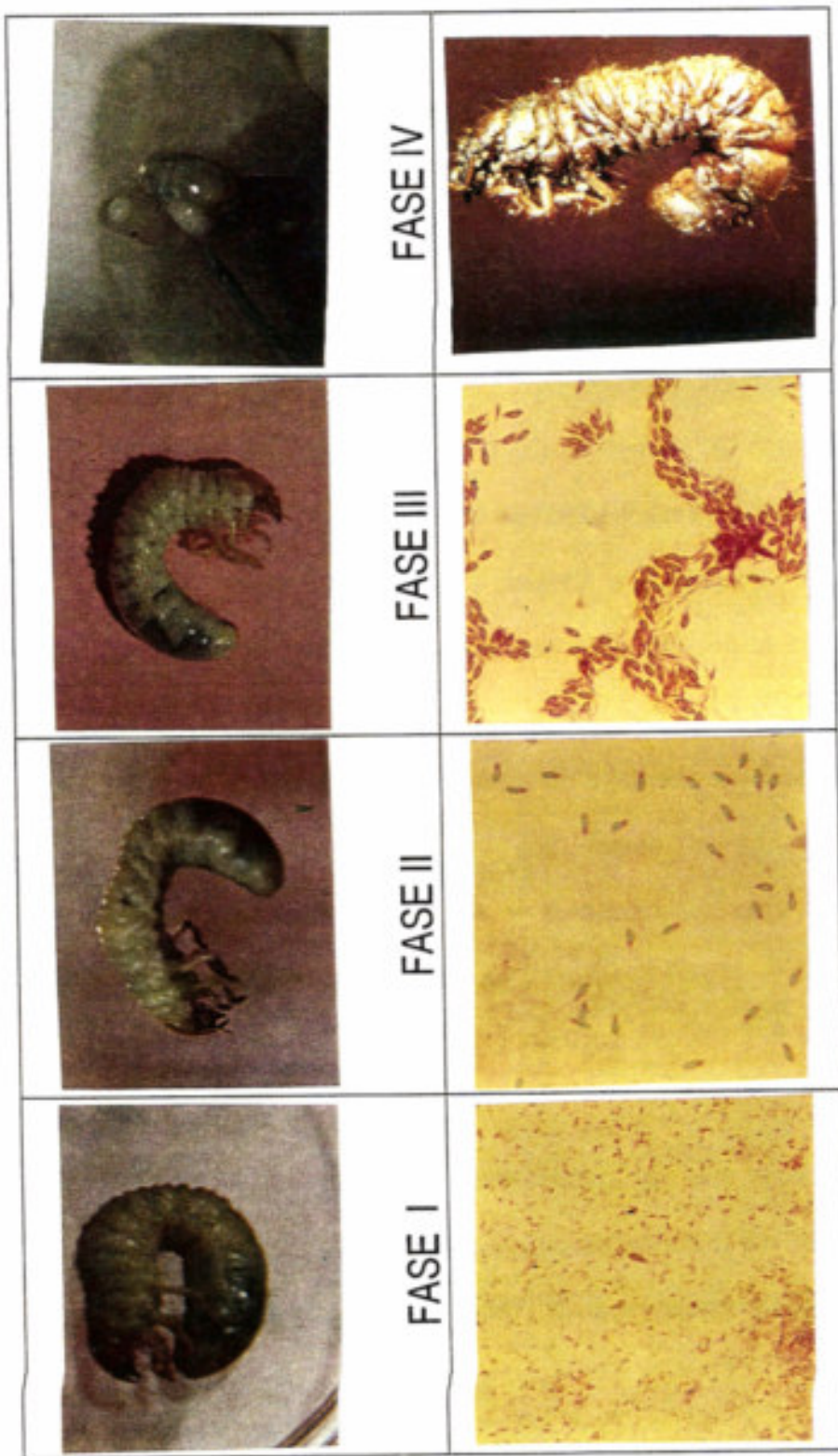


FIGURA 6. Estados de desarrollo de la enfermedad lechosa en larvas de *Ph. obscura*

Fase I : El color de la hemolinfa es casi traslucido, hay desarrollo de células vegetativas y reproductivas.

Fase II : El color de la hemolinfa es ligeramente traslucido, hay abundancia de esporas.

Fase III : La hemolinfa es mas opaca, hay equilibrio en la producción de células vegetativas y reproductivas.

Fase IV : El cuerpo de la larva es totalmente blanco, una ligera punción permite la salida de hemolinfa, como lo indica la flecha. Una larva contiene al rededor de $5,37 \times 10^{10}$ esporas. Una vez muere la larva sobreviene un inmediato pardamiento de ésta

FASE II

El color de la larva se torna un poco más opaco a nivel de la pleura en vista dorsal y lateral; se hace evidente el cambio de tonalidad de la hemolinfa a medida que se mueve, con el color del contenido intestinal; la hemolinfa llega en ocasiones a cubrir totalmente el color terroso del contenido intestinal. Al desprender una pata, se nota que la hemolinfa tiene esa tonalidad opaca que le confiere *B. popilliae*. Al observar al microscopio un extendido de la hemolinfa a 100X, se aprecia una reducción en la cantidad de células sanguíneas e incremento en la abundancia de esporas de *B. popilliae*; además es notoria la abundancia de bastones en cadena y en diferentes estados de esporogénesis. Las larvas conservan su apariencia macroscópica de movilidad y voracidad, el color de las patas es característico de las larvas sanas.

FASE III

El color de la larva es totalmente blanco, con una tonalidad que difiere del color crema que caracteriza las larvas sanas. Sin embargo, no puede asumirse que todas las "chisas" con color blanco padecen la enfermedad lechosa.

En las larvas de *Ph. obsoleta* con enfermedad lechosa, el color de las extremidades es totalmente blanco y no se diferencia el contenido intestinal, vistas desde cualquier ángulo. En los lóbulos pleurales, se aprecia la tonalidad del blanco característico de las larvas de *Ph. obsoleta* infectadas por *B. popilliae*. En cualquier parte del exoesqueleto en que se haga punción y se permita la salida de hemolinfa, ésta será de un color blanco, diferente al opaco que caracteriza a las larvas en la fase II ya descrita.

Las larvas en esta fase de la enfermedad han reducido su consumo de alimento, no regurgitan y de hacerlo será una sustancia blanca y no oscura, señal de que la hemolinfa está totalmente invadida y en contacto con el contenido intestinal.

Las larvas de *Ph. obsoleta* en fase III conservan el movimiento de sus extremidades pero su desplazamiento se torna un poco más pesado de lo habitual.

En estas larvas, con estado de la enfermedad en fase III, colocadas lateralmente sobre una superficie, la hemolinfa se sedimenta de una manera característica; el sedimento se hace evidente y al colocar la larva sobre el otro lado, de inmediato las partículas que conformaban el sedimento

empiezan a desplazarse hacia la nueva posición. Las larvas en esta fase dan una sensación térmica de "frías al tacto", sensación que no se consigue en larvas saludables.

Al hacer un extendido y tinción de hemolinfa de la larva que se considere esté en esta fase, se observa que la cantidad de esporas será tal que no se hacen presentes las células sanguíneas como sí son evidentes en las fases I y II de la enfermedad. La cantidad de esporas estimadas para una larva en esta fase de la enfermedad es de 5.37×10^{10} esporas/ml de hemolinfa. En esta fase las células vegetativas no están presentes; todo campo que aparece al microscopio estará dominado por abundantes esporas; los cuerpos grasos están ausentes en su totalidad. La larva aún está viva.

FASE IV

Estando la larva en fase III con el color blanco característico, así como con la producción de sedimento y, conservando aún movimiento, sufre un dramático cambio de color de blanco a pardo, se hinchan y mueren. La larva en fase IV se caracteriza entonces por el pardeamiento, eventualmente la hinchazón y susceptibilidad a vaciado con el mas leve contacto. No obstante, las larvas muertas por *B. popilliae* pueden adquirir distintas

características, una es hinchazón de la totalidad del cuerpo, que puede llegar a incrementar en cerca del 40% su volumen habitual; también pueden llegar a adquirir distintas tonalidades como un color rosado rojizo y por último la larva se pardea totalmente. En el campo es difícil encontrarlas en esta fase, pues la larva se vacía totalmente, aglomerando las partículas del suelo que la rodean. En condiciones de casa de malla es posible encontrar ese aglomerado de partículas de suelo compactado alrededor de la larva vaciada.

Las larvas diagnosticadas, presentan equilibrio en abundancia de las diferentes células tanto vegetativas como reproductivas. En esta fase es frecuente encontrar distintos tipos de células vegetativas en el proceso de esporogénesis; esto se evidencia con la tinción de verde de malaquita.

4. 2 CONCENTRACION LETAL MEDIA DE *B. popilliae*

SOBRE *Ph. obsoleta*.

Mediante análisis Probit se determinó que la concentración de *B. popilliae* requerida para matar al 50% (CL_{50}) de las larvas de *Ph. obsoleta* fue de $10^{6.8}$ esporas/m², de acuerdo con el siguiente análisis:

$$Y = a+bx; \text{ siendo } Y = \text{Probit}(P_Y) = \text{Probit}(P_{50}) = 5$$

$x = \text{concentración de } B. \text{ popilliae.}$

la línea estimada es:

$$Y = 3.788277 + 0.177710x$$

haciendo

$$Y = 5, \text{ dado que } \text{Probit}(P_Y) = 5$$

$$\text{Probit}(P_{0.5}) = 5,$$

Hallamos

$$x=6.8185414,$$

entonces

$$CL_{50} = 10^{6.8185414}$$

En la Figura 7, se observa la construcción de la regresión lineal simple que expresa el comportamiento de la mortalidad de *Ph. obsoleta* causada por las concentraciones de *B. popilliae* a través del tiempo (semanas).

En la misma figura, proyectando ortogonalmente al eje X, se estimó el tiempo que debió transcurrir para matar al 50% de las larvas expuestas (TL_{50}) a la concentración de 10^7 esporas/m², el cual fue de aproximadamente 12 semanas (75 días).

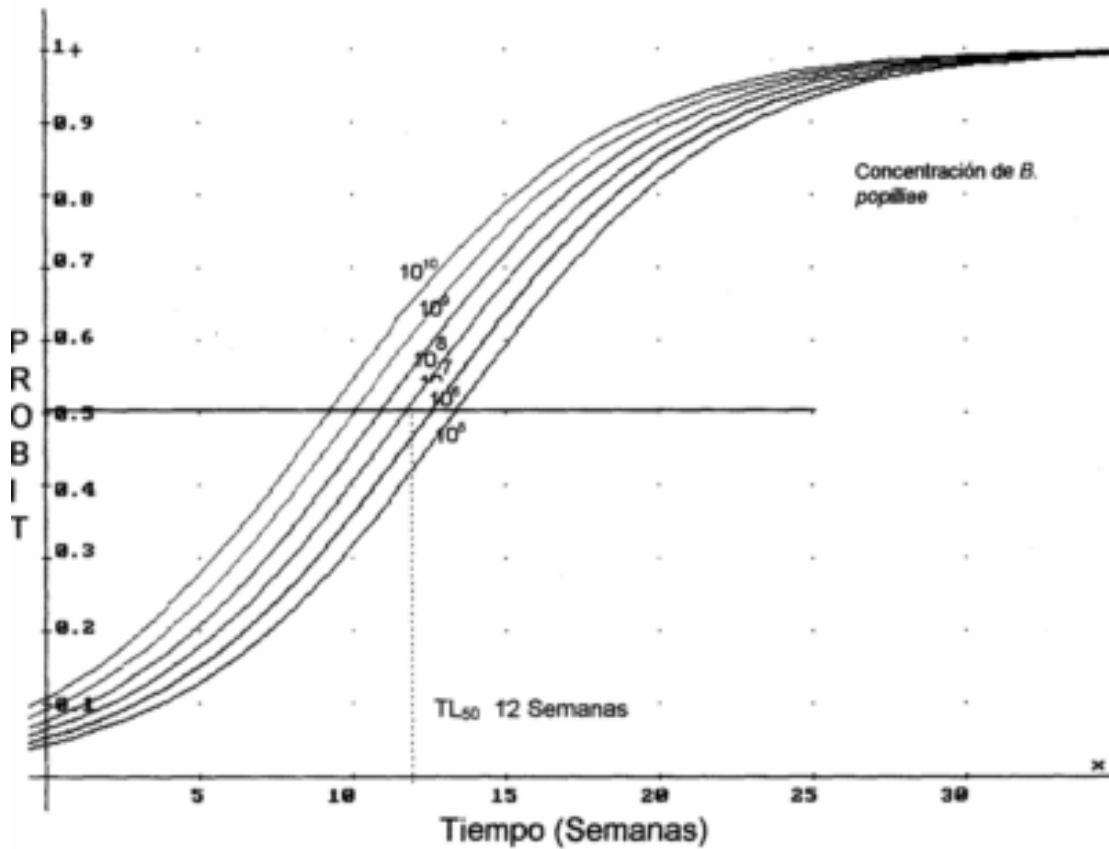


FIGURA 7. Mortalidad de *Ph. obsoleta*, expresada en curvas logarítmicas, causadas por *B. popilliae*

En la Figura 8 también puede estimarse gráficamente el TL_{50} para las diferentes concentraciones evaluadas; obsérvese que el TL_{50} correspondiente a $10^{6.8}$ esporas/m² (CL_{50}), fue el de aproximadamente 12 semanas.

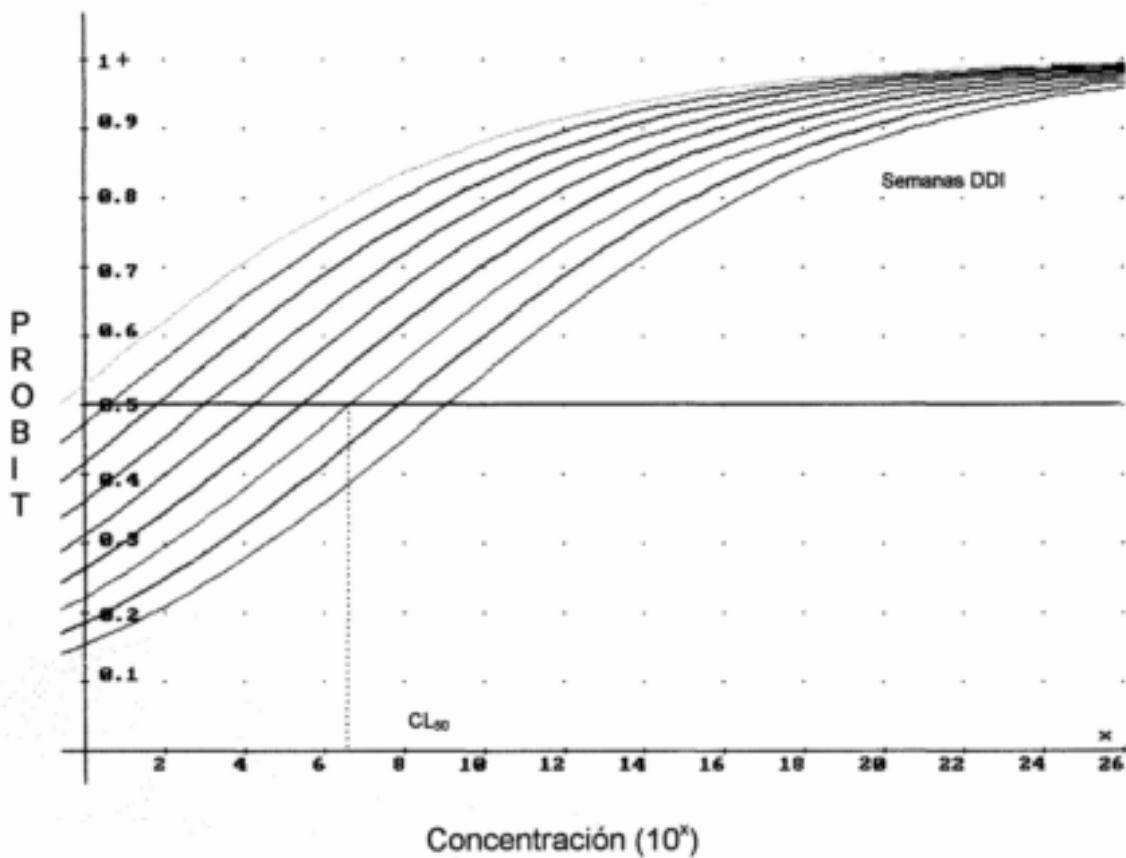


FIGURA 8. Concentración letal media CL_{50} de *B. popilliae* sobre *Ph. obsoleta*

Analizando los resultados, se aprecia como *B. popilliae* tiene una acción lenta sobre *Ph. obsoleta*. Aunque las mortalidades se presentan desde los 7 días después de inoculado, solo se alcanza el 50% de mortalidad alrededor de los 82 días para la mayoría de las concentraciones (Anexo 1). No obstante, en los reconocimientos de enemigos naturales de las "chisas" realizados en el Oriente antioqueño (Londoño y Pérez, 1994) se ha visto que *B. popilliae* aporta más del 50% de las mortalidades en estos insectos. Es posible que algunos factores de clima estén afectando el crecimiento del microorganismo, su multiplicación o modo de acción y por ello el proceso infectivo sea lento en las condiciones locales. No obstante, siendo *B. popilliae* un microorganismo que pesa tanto en el control natural de esta especie es de interés considerarlo dentro de las alternativas de manejo de "chisa", teniendo en cuenta el tiempo que tarda en expresar su acción patogénica. Es de interés también conocer qué condiciones pueden acelerar el proceso infectivo, por lo que podría medirse el efecto de las condiciones climáticas, así como el de la adición de cal, materia orgánica, fertilizantes, y otros microorganismos entomopatógenos, etc., al suelo. De igual manera, sería importante comparar diferentes métodos de inoculación de *B. popilliae*.

4. 3 EFECTO DE LA DENSIDAD DE *Ph. obsoleta* SOBRE LA PATOGENICIDAD DE *B. popilliae* .

El efecto de la densidad poblacional de *Ph. obsoleta* sobre la manifestación de la mortalidad a causa de *B. popilliae* se midió en un total de 320 larvas. Desde los primeros 7 días, después de la inoculación (DDI) empieza a presentarse la mortalidad en las diferentes densidades poblacionales, excepto cuando se tuvo el equivalente a 30 larvas/m²; no obstante las mortalidades están entre 3 - 13% para esta época, ascienden al rango entre 19 - 60% a los 55 días y a un rango entre 48 - 87% a los 82 días (Anexo 2).

Observando la tendencia general (Figura 9), el mayor número de larvas muertas se presenta en la densidad 300 larvas/m², siendo este número decreciente en relación directa cuando disminuye la densidad.

En la figura 10, construida con los porcentajes de mortalidad respectivos para cada densidad, se aprecia una tendencia similar, excepto con la densidad 30 larvas/m², la cual se sale del patrón general, alrededor de los 35 días. En la misma figura se puede ver como el 50 % de mortalidad se

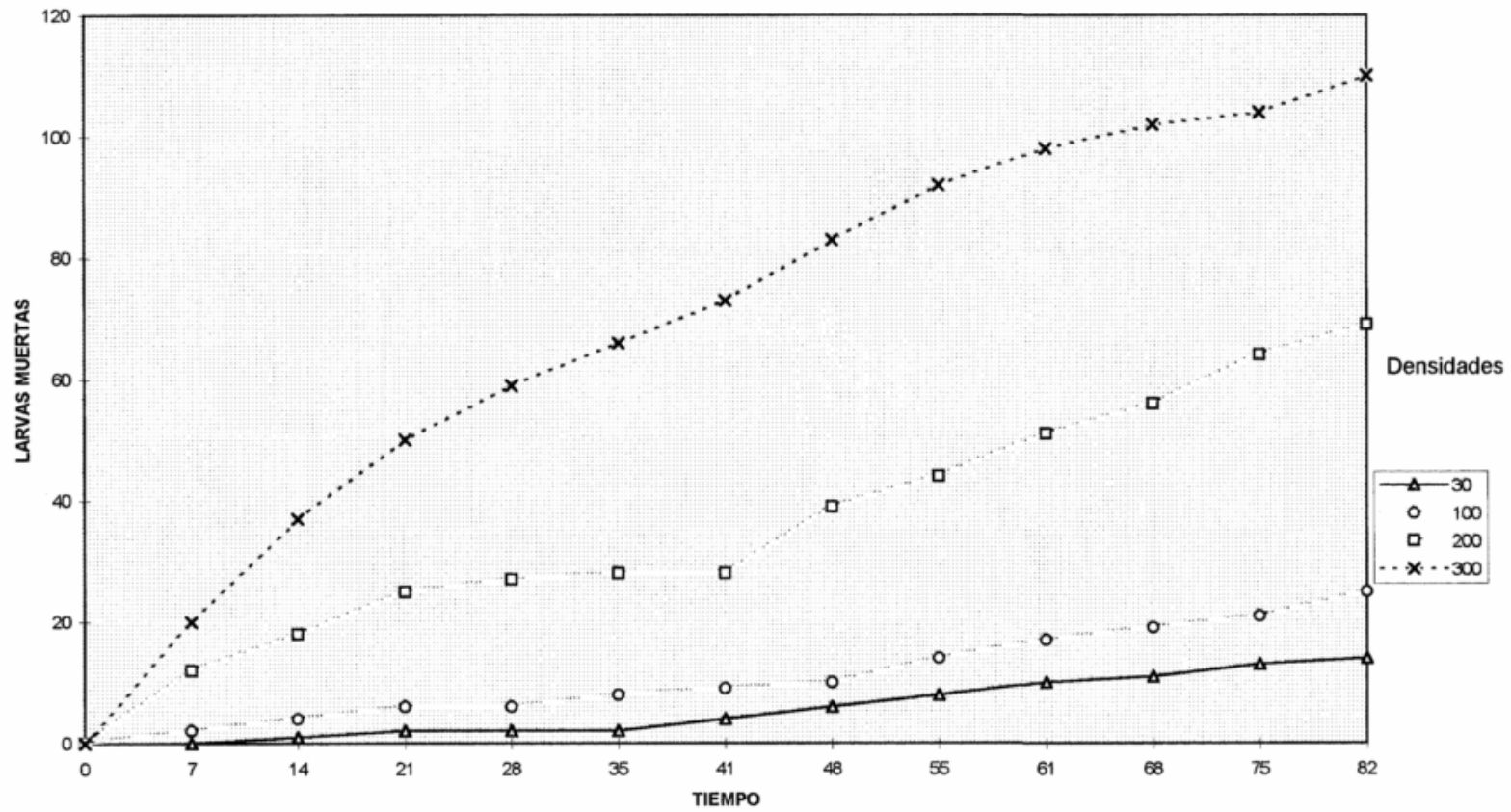


FIGURA 9. Larvas de *Ph. obsoleta* en diferentes densidades muertas por *B. popilliae*

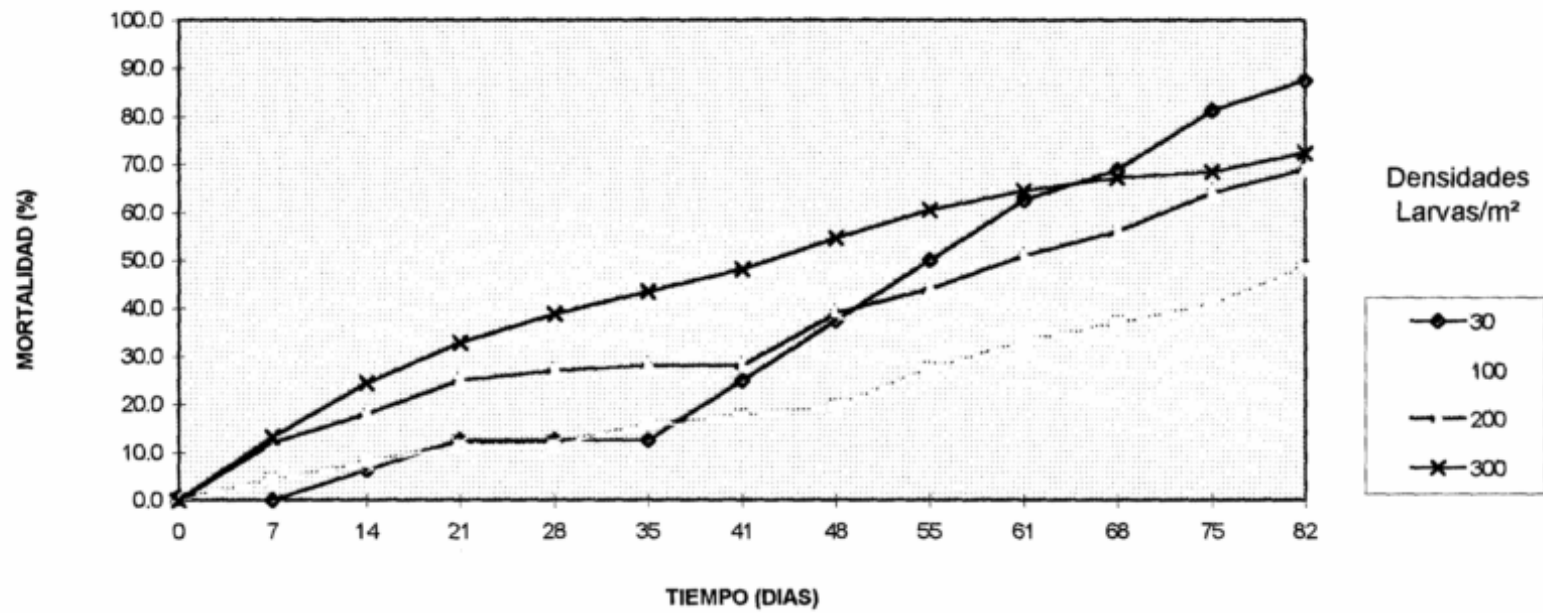


FIGURA 10. Efecto de la densidad de *Ph. obsoleta* sobre la mortalidad producida por *B. popilliae*

consigue primero con la densidad 300 larvas/m², aproximadamente a los 45 días.

Mediante la construcción de tablas de contingencia, se verificó que la mortalidad obtenida con cada tratamiento fue debida a *B. popilliae* (Anexo 3), con una probabilidad de acierto del 99.9%. Sin embargo, al comparar estadísticamente las mortalidades conseguidas con las distintas densidades poblacionales, mediante la prueba de Rangos de Friedman, se aprecia que no hay evidencia de que la densidad tenga un efecto sobre la manifestación de la mortalidad a causa de *B. popilliae* (Tabla 4).

TABLA 4. Porcentaje de mortalidad en diferentes densidades poblacionales de *Ph. obsoleta* causada por *B. popilliae*, 82 DDI (17°C, H. R. 78%).
C. I. La Selva 1996.

Densidad (larvas/m ²)	Mortalidad (%)				ΣRi	d
	Bloques					
	I	II	III	IV		
300	70.6	94.1	91.1	88.3	14	
30	66.7	66.7	100	100	11.5	2.5 ns
200	66.7	80.9	80.9	85.7	8.5	3.0 ns
100	70.0	39.9	59.9	10.0	6	1.5 ns

$$DMS = 4 \quad X_r^2 = 5.48 < X^2 = 7.82; CV = 21\%$$

Cualquier diferencia expresada entre tratamientos se debe al azar. Respuestas similares a este tipo de comportamiento han sido mencionadas en la literatura para las especies *Maladera castanea*, *P. japonica* y *A. Orientalis*. Hanula y Andreadis (1988), determinaron que la tasa de infección por *B. popilliae* no estuvo correlacionada con la densidad larval para las especies referidas. En estos términos, los resultados obtenidos difieren de los encontrados por White y Dutky (1940), Polivka (1956), Warren y Potter (1983), quienes argumentan que a bajas densidades larvales de *P. japonica* es difícil encontrar la enfermedad lechosa, mientras que la incidencia de enfermedad aumenta rápidamente a medida que crece la población del hospedero.

Teniendo en cuenta la variabilidad de los datos (CV = 21%), es posible que aumentando el número de repeticiones se pueda dilucidar mejor el efecto de las densidades, especialmente en lo referente a 30 larvas/m², densidad a la que solo le corresponde 4 larvas por ponchera; esto es, una sola larva sensibiliza el 25 % de la mortalidad en dicho tratamiento (Tabla 5). Es posible también, que mediante la adición de mas densidades poblacionales intermedias y superiores a las evaluadas en este trabajo, pueda precisarse la

tendencia que explique la respuesta de distintas poblaciones de la plaga a la acción de la bacteria.

TABLA 5. Porcentaje de mortalidad corregida, según Bayer, 1963, causada por *B. popilliae* en diferentes densidades larvales de *Ph. obsoleta* (17 °C, 78% H. R.). C. I. La Selva. 1996.

Densidades (larvas/m ²)	N	Mortalidad (%) DDI		
		7	55	82
30	16	0	32.55	81.25
100	52	3.8	19.2	42.3
200	100	12.0	36.0	65
300	152	13.1	58.4	68.2

N= Unidades experimentales

4. 4 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se evaluó la capacidad de 13 medios de cultivo para permitir la proliferación bajo condiciones de laboratorio, de *B. popilliae* mediante la formación de colonias (UFC) y el respectivo conteo de esporas 18 DDI.

Los 13 medios de cultivo se compararon, mediante la prueba chi cuadrado (X^2), con un coeficiente de confianza de 0.99 y 12 grados de libertad y, la prueba de Rangos de Friedman. El tamaño de las UFC fue superior en el

medio Younsten - hemolinfa (4), seguido por el medio Younsten solo (1) (Tabla 6), del cual se diferencia estadísticamente. Lo anterior permite ver la importancia de la hemolinfa como sustrato natural.

Tabla 6. Diámetro (mm) de las UFC de *B. popilliae* en diferentes medios de cultivo 18 DDI (24.8 °C, H. R. 78%, N=4). C. I. Tulio Ospina 1996.

Medio de Cultivo	Diámetro (mm)				ΣRi	Diferencias
	Bloques					
	I	II	III	IV		
4	2.67	2.87	2.0	1.5	50.0	
1	1.08	0.9	1.33	2.0	44.5	5.5*
8	0	2	1.08	1.6	37.0	7.5*
2	1.07	0.7	1.16	0.49	35	2
3	1.06	1.0	0.99	0.71	35	0
6	0	0.9	1.6	0	29	6*
5	1.5	0	0	1.3	29	0
7	1.0	0	1	0.5	27.5	1.5
12	0	0	1	0	19	8.5*
9	0	0	0	0	14.5	4.5*
10	0	0	0	0	14.5	0
11	0	0	0	0	14.5	0
13	0	0	0	0	14.5	0

DMS = 4; $X^2 = 28.8$; GL = 12; $\alpha = 0.01$

4>1>8=2>3>6=5=7>12>9=10=11=13

* diferencia significativa

Los tamaños de colonia de *B. popilliae* que se consiguen con el medio Younsten adicionado con hemolinfa de *Ph. obsoleta*, oscilan entre 1.5 - 2.9 mm. En los medios con base en Agar - Agar, se da un crecimiento nulo de *B. popilliae*, con una incipiente formación de colonias cuando es adicionado con hemolinfa (Tabla 6). Crecimientos de colonia intermedios se pueden conseguir con los medios basados en Agar J.

Mediante la prueba de Chi cuadrado (X^2), y la de Rangos de Friedman, con coeficiente de confianza del 99% y 12 grados de libertad, se pudo comprobar que el medio Younsten - Hemolinfa permite el mejor crecimiento de colonias de *B. popilliae*, seguido estadísticamente por el medio Younsten solo. Vale la pena destacar como la adición de hemolinfa al medio Agar J, le confiere propiedades que permiten una formación de colonias con crecimiento aceptable, aunque el tamaño de dichas UFC sea estadísticamente menor que las UFC obtenidas en los 2 medios anteriormente descritos.

La adición de Urea o Agua de coco al medio Younsten, no estimula el crecimiento de la bacteria y por el contrario, el medio solo, sigue siendo superior. Similar situación ocurre con el agar J en el que la adición de urea

o agua de coco no permite superar el tamaño de las UFC obtenidas en el Agar J solo. Los medios con base en Agar - Agar no parecen satisfacer los requerimientos nutricionales de *B. popilliae*, aún adicionados con hemolinfa. De acuerdo con estos resultados el mejor medio de cultivo para la producción de colonias *B. popilliae* es Younsten el cual puede ser mejorado con la adición de Hemolinfa de *Ph. obsoleta*, consiguiéndose entonces tamaños de UFC superiores. Este medio puede ser sustituido con Agar J, pero adicionado con hemolinfa, aunque el tamaño de UFC conseguido en este último pueda ser menor.

Si se compara esta variable con el número de colonias formadas en cada medio de cultivo, puede verse como los medios basados en Younsten (solo o adicionado), permiten la mayor formación de colonias. En dichos medios, el promedio de UFC es creciente en el tiempo con un aumento más acentuado en el período comprendido entre los 10 y 18 días. A partir de este momento, la pendiente de la línea que indica la tendencia disminuye. Es interesante anotar que a partir de los 18 DDI las colonias de *B. popilliae* tienden a unirse, lo cual se refleja en una "aparente" disminución en el número de UFC (Figura 11).

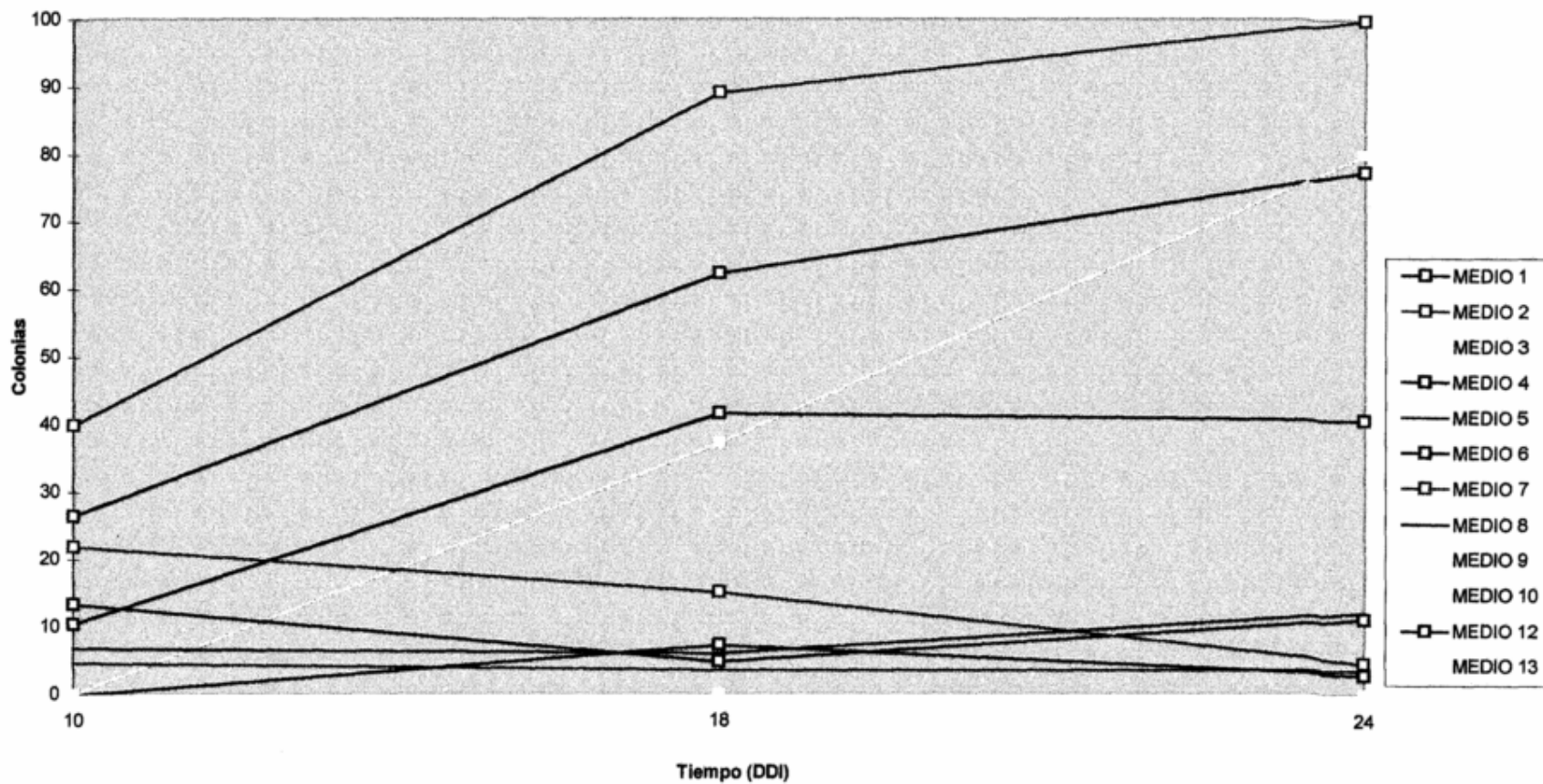


FIGURA 11. Promedio de UFC producidas por *B. popilliae* en diferentes medios de cultivo

Al hacer comparaciones estadísticas, mediante los rangos de Friedman, los medios basados en Younsten son iguales entre si pero se diferencian del resto de los medios evaluados en términos de UFC producidas (Anexo 4).

Los medios basados en Younsten, en general, permiten la mayor producción de esporas de *B. popilliae* y son seguidos por los medios con base en Agar J. En los medios con base en Agar - Agar la esporulación es nula, salvo cuando son adicionados con hemolinfa, caso en el cual se presenta una pobre e inconsistente producción de esporas (Tabla 7). En Agua de coco tampoco se presenta esporulación.

El medio Younsten solo permite una producción de 4.15×10^4 esporas/ml, seguido por el medio Younsten - Hemolina con 3.83×10^4 , el medio Agar J solo, produce 1.38×10^4 esporas/ml, en tanto que si se adiciona con urea se aumenta a 3.35×10^4 esporas/ml. El medio Agar J - Hemolinfa, presentó muy baja producción con 0.63×10^4 . El medio Agar J adicionado con agua de coco y Agar - Agar adicionado con Hemolina producen solo 0.38×10^4 esporas/ml, cada uno. El medio Agar - Agar solo y adicionado con urea o con agua de coco no dieron lugar a la producción de esporas; lo mismo que el medio compuesto solamente con agua de coco (Figura12)

TABLA 7. Cantidad de esporas de *B. popilliae* (UFC) producidas en 13 medios de cultivo 18 DDI (24.8 °C, H. R. 78%, N=4). C. I. Tulio Ospina . 1996.

		UFC				ΣRi	d
		Bloques					
		I	II	III	IV		
M E D I O S D E C U L T I V O	4	3.5	3.7	3.6	4.5	47.0	
	1	3.0	4.0	6.0	3.6	47.0	0
	2	4.8	4.1	1.7	3.6	46.5	0.5
	3	3.0	2.1	4.0	3.0	41.5	5*
	6	2.0	2.5	2.8	2.1	37.5	4*
	5	2.0	1.0	0.5	2.0	29.0	8.5*
	8	0.5	1.0	0.5	0.4	27.0	2
	7	0.5	0	1.0	0	20.5	6.5*
	12	0	0	1.5	0	18.0	2.5
	9	0	0	0	0	12.5	5.5*
	10	0	0	0	0	12.5	0
	11	0	0	0	0	12.5	0
	13	0	0	0	0	12.5	0

$$X_r^2 = 40.8 > X^2 = 32.91; \quad GI \ 12; \quad \alpha = 0.001; DMS=4$$

$$4=1=2=3>6>5>8=7>12=9>10=11=13$$

Al hacer comparaciones estadísticas entre los diferentes medios, usando la prueba de rangos de Friedman, se observa como los medios con base en Younsten permiten una mejor condición para el crecimiento y desarrollo de la bacteria, lo cual se expresa tanto en el tamaño de las UFC como en la producción de esporas (Figura 12). Sin embargo, en términos exclusivos de producción de esporas, no se diferencian los medios Younsten solo, con los adicionados con hemolinfa y urea.

La adición de agua de coco parece deteriorar el medio, ya que la producción de esporas en éste, es estadísticamente inferior a los anteriormente relacionados.

El medio Agar J por el contrario, se ve favorecido por la urea para la producción de esporas, cuando se le compara con el medio solo, o adicionado con agua de coco o hemolinfa.

Es entonces consistente, que el mejor medio dentro de los evaluados para producir *in vitro* *B. popilliae*, sea con base en Younsten, solo o adicionado con hemolinfa de *Ph. obsoleta*.

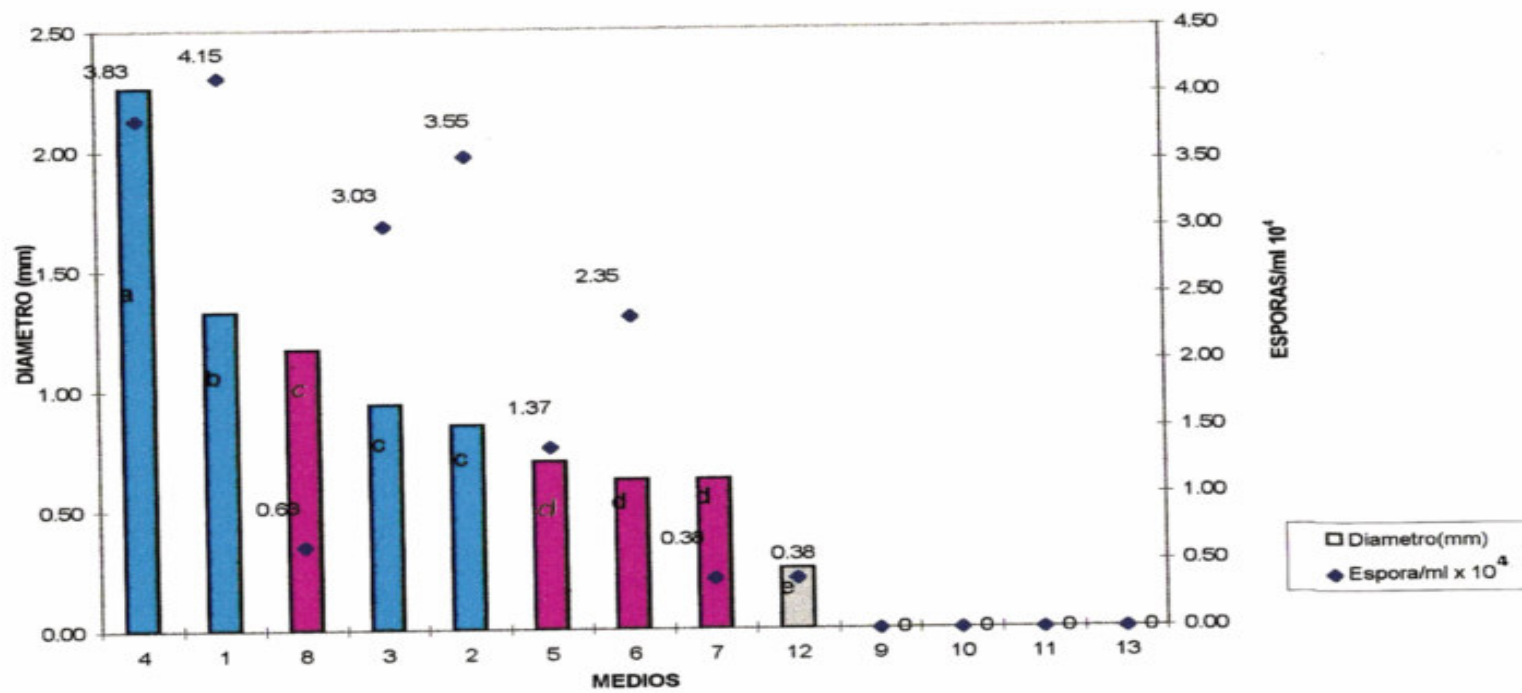


FIGURA 12. Diámetro promedio de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y Concentración de esporas producidas por *B. popilliae* en diferentes medios de cultivos.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la producción de esporas por *B. popilliae*, depende de las características nutritivas del medio de cultivo (Stahly y Klein, 1992). Este hecho, unido a las características de virulencia que tienden a perderse en los medios de cultivo, restringen el uso generalizado de éstos para la multiplicación de la bacteria (Stahly y Klein, 1992; Warren y Potter, 1983).

La información generada solo cuantifica la producción de esporas de cada medio, siendo importante ajustarla con la evaluación de la patogenicidad de las esporas de *B. popilliae* producidas *in vitro* sobre *Ph. Obsoleta*. Además debe indagarse sobre el número de repiques o generaciones que pueden producirse en un medio de cultivo, cuantificando la patogenicidad lograda con cada uno.

4.5 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE *B. popilliae*

Las condiciones de almacenamiento de *B. popilliae* mostraron una diferencia altamente significativa para los distintos tratamientos ($\alpha = 0.0001$) y para las repeticiones ($\alpha=0.0455$) (Tabla 8 y Anexo 5).

TABLA 8. Concentración de esporas/ml de *B. popilliae* almacenadas a distintas temperaturas (H. R 78%, N=4). C. I. La Selva 1996.

Tratamientos	Repeticiones				Total	1 x 10 ⁸
	I	II	III	IV		Media
4 °C	1.16	1.02	1.25	1.18	4.61	1.15 a
-176° C	1.15	1.09	1.14	1.11	4.49	1.12 a
17 °C	1.02	1.01	1.05	1.03	4.1	1.02 b
17 °C Agua	0.85	0.84	0.96	0.99	3.64	0.91 c
-15 °C	0.97	0.89	0.89	0.98	3.55	0.89 c
Total	5.15	4.84	5.3	5.28	20.56	
Media	1.03	0.97	1.06	1.06		1.03

Con apoyo en la prueba de comparación de medias de Duncan ($\alpha = 0.05$) se afirma que después de 30 días, el tratamiento de almacenamiento de esporas en glicerol, en nitrógeno líquido (-176 °C) es estadísticamente igual al tratamiento de preservación de esporas a 4 °C en puerta de nevera, con concentraciones de $1,12 \times 10^8$ y 1.15×10^8 esporas/ml, respectivamente, comparado con la concentración inicial de esporas almacenadas (10^8 esporas/ml).

El tratamiento de almacenamiento de *B. popilliae* en glicerol a temperatura ambiente, 17 °C, difiere en su media con los demás tratamientos ($\alpha = 0.05$);

la cantidad de células reproductivas contadas para este medio fue de 1.02×10^8 esporas/ml. El almacenamiento en glicerol, en congelador de nevera, a $-15\text{ }^\circ\text{C}$, fue estadísticamente igual al de la dilución de esporas en agua destilada estéril. En estas dos últimas condiciones de almacenamiento se disminuyó la cantidad de esporas a 0.93×10^8 y 0.90×10^8 esporas/ml, respectivamente.

Desde el punto de vista práctico, preservar esporas de *B. popilliae*, proveniente de *Ph. obsoleta* es más conveniente en glicerol al 20% dispuesto en puerta de nevera a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Las condiciones de almacenamiento, en este mismo solvente, en congelador de nevera a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ y en agua destilada estéril, a $17\text{ }^\circ\text{C}$, afectan la carga de esporas, así como las características físicas, aglomerando las esporas y causándoles daños mecánicos.

Sería interesante determinar, a través del tiempo, la viabilidad y el comportamiento de diferentes características del entomopatógeno, preservado en las condiciones descritas anteriormente.

CONCLUSIONES

Para las condiciones propias de esta investigación y con base en la metodología planteada se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

La bacteria *Bacillus popilliae* proveniente de *Phyllophaga obsoleta* causa mortalidad sobre larvas sanas de esta especie, cuando se inocula sobre semilla de trigo.

La mortalidad de *Ph. obsoleta* por enfermedad lechosa se caracteriza en cuatro fases. Esta información es de importancia en el proceso de industrialización del entomopatógeno y para futuros procesos de investigación, sabiendo que la fase II ó III son de mayor idoneidad en la obtención de inóculo para esos procesos.

B. popilliae, es un importante agente de control biológico de *Ph. obsoleta*, predominante en el complejo de "chisas" del Oriente antioqueño, por esto se hace necesario emprender acciones que permitan incluir la bacteria en un paquete de recomendaciones para el manejo integrado de estos insectos.

B. popilliae proveniente de *Ph. obsoleta* del Oriente antioqueño se multiplica *in vitro*, hecho que permite aumentar el inóculo inicial encontrado en el campo. Este hallazgo es de importancia, pues hace posible la utilización de este importante entomopatógeno como alternativa en programas de manejo integrado de chisas

B. popilliae agente causal de la enfermedad lechosa, puede ser almacenada a corto plazo, bajo condiciones artesanales, y utilizada por los agricultores como un insumo en la actividad productiva.

BIBLIOGRAFIA

- BAYER PFLANZENSCHUTZ - NACHRICHTEN 1963. Las bases para ensayos fitosanitarios de campo. Alemania 176p.
- BOUCIAS, D. G.; R. H. CHERRY, and D. L. ANDERSON. Incidence of *Bacillus popilliae* in *Ligyris subtropicus* and *Cyclocephala* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Florida Sugarcane Fields. En: Environmental Entomology. Vol. 15, No. 3 (jun., 1986); p. 703-705.
- BULLA, L.; R. COSTILOW and S. SHARPE. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. *Adv. Appl. Microbiol.* 23 : 1 - 18.
- DUNBAR, D. M. and R. L. BEARD. Present status of Milky Disease of Japanese and Oriental Beetles in Connecticut. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 68, No. 4 (Aug., 1975); p. 453-457.
- GLARE, T. R.; T. JACKSON and G. ZIMMERMAN. Occurrence of *Bacillus popilliae* and two nematodes Pathogens in populations of *Amphimallon solstitialis* (Col: Scarabaeidae) near Darmstadt

Germany. En: Entomophaga. Vol. 38, No. 4 (sm,1993); p. 441-450.

GLARE, T.; N. M. UPADHYAYA and K. MAHANTY. Genetic Manipulation Towards Strain Improvement of Scarab Pathogens. 1 ed. Andover: Athenaeum Press, 1992. 298 p. : il. ISBN 0-946707-35-9

GUARIN, J. H. *Bacillus popilliae* agente causal de la enfermedad lechosa en el complejo de "chisas" del Oriente antioqueño. En : Actualidades CORPOICA. Vol. 10, No. 106 (Julio - septiembre 1996a). Medellín.

——— Uso de *Bacillus popilliae* Dutky en el manejo de poblaciones de "chisas". Medellín : Universidad Nacional de Colombia, 1996b, 89 p.: il. Seminario (Maestría en Entomología). Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

——— Y J. P. MESA. Potencialidad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Medellín, 1987. 59 p. : il. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía

HALL, H. H.; G. St. JULIAN, and G. ADAMS. Observations on the Infections of Japanese Beetle Larvae with *Bacillus popilliae*. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 61, No. 3 (Jun., 1968); p. 840-843.

HANULA, J. and T. ANDREADIS. Parasitic Microorganism japanese Beetle (Coleoptera : Scarabaeidae) and Associated Scarab Larvae in Connecticut Soils. En: Environmental Entomology. Vol. 17, No. 4 (Aug., 1988); p. 709-714.

IBARRA, J. Bacterias Entomopatógenas. p 72-84 En: Curso De Control Biologico. (3-5 OCT. : 1994 : Oaxaca). V Curso de Control Biologico Oaxaca : Sagitario, 1994. 162 p

JACKSON, T. and M., O'CALLAGHAN, 1995. *Bacillus popilliae* Unavailable in USA. En: Scarab Biocontrol News, New Zeland. (June. 1995): p. 3-4.

JACKSON, T. Scarabs- Pest of the Past or the Future?. p. 1-10. En: Use of Pathogens in Scarab Pest Management. U. K.: Jackson, T. and Glare, T., 1992. 298 p. : il.

KING, A. Biology and Identification of White Grubs (Phyllophaga) of Economic Importance in Central America. En: Tropical Pest Management. Vol. 30, No. 1 (Mar., 1984); p. 36-50.

- KLEIN, M. Advances in the Use of *Bacillus popilliae* for Pest Control 1970-1981. En: Microbiol Control of Pest and Plant Diseases.. London : Academic Press, 1981. 949p. : il. ISBN 012-143360-9.
- KLIEN, M. and KAYA, H. *Bacillus* and *Serratia* species for Scarab Control. En: Mem Inst. Oswald Cruz. Vol. 90, No. 1 (Jan-Feb, 1995); p, 87-95.
- KLEIN, M. and JACKSON, T. Bacterial Diseases of Scarabs. p. 43-61. En: JACKSON, T. and GLARE, T. Use of Pathogens in Scarab Pest Management. U. K.: Intercept, 1992. 298p. ISBN 0-946707-35-9.
- LADD, T. L. and J. McCABE. Persistence of Spores of *Bacillus popilliae*, the Causal Organism of type A Milky Disease of Japanese Beetle Larvae, in New Jersey Soils. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 6. No. 2 (Ab.,1967); p. 493-49 .
- LONDOÑO, M. Posibilidades de control biologico en el manejo de la chisa (Col: Scarabaeidae) para el departamento de Antioquia.En: Socolen Miscelánea no. 28 ,Medellín, 1992, p. 85-100.

- _____. Estrategias para el manejo de la chisa (Col: Scarabeoidea) en Antioquia. En: Il Simposio Nacional del Crisantemo, Plagas y Enfermedades. ASOCOLFLORES (Rionegro), 1995 p. 17-22.
- LONDOÑO, M. y M. PEREZ. Reconocimiento de los enemigos naturales de chisa o mojoy (Coleoptera : Scarabaeidae) en el oriente Antioqueño. En: Revista Colombiana de Entomología. Vol. 20, No. 3 (Jul.-Sept., 1994); p. 199-206.
- MILNER, R. J. Identification of the *Bacillus popilliae* group of insect Pathogens. p. 45-59. En: BURGESS, H. D. Microbial Control of pest and plant diseases. 1970. 1980. U. K.: Academic Press, 1981. 949 p. : il. ISBN 012-143360-9
- NANCLARES, O. A., RAMIREZ, E. J. Reconocimiento de "chisas" (Coleoptera : Scarabaeidae) en cuatro municipios del Oriente antioqueño. Medellín, 1992. 89 p. : il. Tesis (Ingeniero Agronomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias Agropecuarias.
- NUÑEZ, M. E. Perspectiva de la Biología molecular en el control de larvas de Scarabaeidae de importancia agrícola. p. 218 - 233. En: Moron, M. A. Diversidad y Manejo de Plagas Subterráneas. Mexico: Sociedad Mexicana de Ecología, 1993. 261p.

POINAR, G. O. and G. M. THOMAS. Laboratory Guide to Insect Pathogen and Parasites. 1 ed. New York : Plenum Press, 1984. 365p. : il.

POLIVKA, J. B. Effectiveness of Milky Disease in Controlling Japanese Beetle in Ohio. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 49, No. 1 (feb., 1956); p. 4-6.

POSADA, O. L.; Y. Z.; I.S. de AREVALO; A. SALDARRIAGA; F. GARCIA; M. R. CARDENAS. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. 3a. ed. Bogotá : ICA, 1976. 484 p. (Boletín técnico No. 43)

REDMOND, C. T. and D. A. POTTER. Lack of Efficacy of *In Vivo* and Putatively *In Vitro*- Produced *Bacillus popilliae* Against Field Populations of Japanese Beetle (Coleoptera : Scarabaeidae) Grubs in Kentucky. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 88, No. 4 (Aug., 1995); p. 846-854.

RODRIGUEZ, D. A. Biología y manejo de "chisas" en la Sabana de Bogotá. En: III Congreso ACOPAFLOR; Plagas del suelo en Floricultura. Santa fe de Bogotá. ACOPAFLOR. 1996.

SIEGEL, S. Nonparametric Statistics for The Behavioral Sciences. MacGraw - Hill Co., USA, 99. 166-173. 312pp.

- SHINDE, V. K. and S. K. SHARMA. *Bacillus popilliae* Pathogenic to *Lachnosterna consanguinea*. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 64. No. 5 (Oct.,1971); p. 1301-1302.
- STAHLY, D. ; S. TAKEFMAN; C. LIVASY; D. DINGMAN. Selective Medium for Quantitation of *Bacillus popilliae* in Soil and in Commercial Spore Powders. En: Applied Environmental Microbiology. Vol. 58, No. 2 (Feb, 1992); p. 740-743.
- STAHLY, D. and M. KLEIN. Problems with *in-vitro* Production of Spores of *Bacillus popilliae* for Use in Biological Control of the Japanese Beetle. En: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 60, No. (sm , 1992); p. 283-291.
- STEINKRAUS, K. Plasmids in *Bacillus popilliae*. En: Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 56, sn (sm , 1990); p. 286-288.
- SUTTER, G. Treatment of Corn Rootworm Larvae and adults with *Bacillus thuringiensis* and *B. popilliae* . En: Journal of Economic Entomology. Vol. 62, No. 3 (Jun.,1969); p. 756-757.

- TANADA, Y. and H. K. KAYA. Bacterial Infections. p. 83-146, 554-594.
En: Insect Pathology. 1a. ed. San Diego, California: Academic Press, Inc., 1993. 666 p. : il. ISBN 0-12-683255-2
- TASHIRO, H. Susceptibility of European Chafer and Japanese Beetle Larvae to Different Strain of Milky Disease Organisms. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 50, No. 3 (Jun.,1957); p. 350-352.
- TASHIRO, H. and R, WHITE. Milky Diseases of European Chafer Larvae.
En: Journal of Economic Entomology. Vol. 47. No. 6 (Dec.,1954); p. 1087-1092.
- THURSTON, G.; H. KAYA; T. BURLANDO and R. HARRINSON. Milky Disease Bacterium as Stressor to Increase Susceptibility of Scarabeid larvae to an Entomopathogenic Nematode. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 61, sn (sm, 1993); p. 167-72.
- TRAVERS, R.S. and R. M. FAUST. Effects of Oxigen on Glucose Utilization in *Bacillus popilliae*. En: Journal of Invertebrate Pathology. Vol 39 (sm, 1982); p. 236-237
- VALLEJO, F. Las "chisas" en el oriente antioqueño, perspectivas biológicas para el establecimiento de un programa de control. p. 69-78. En: II.

Simposio Nacional del Crisantemo, Plagas y Enfermedades.
Rionegro ASOCOLFLORES. 1995

VILLANI, M. ; S. KRUEGER and J. NYROP. A Case Study of the Impact of the Soil Environmental on Insect/ Pathogen Interactions Scarabs in Turfgrass. p.111-126. En: T. JACKSON and T. GLARE. Use of Pathogens in Scarab Pest Management. U.K. : Academic Press, 1992. 260 p. ISBN 0-946707-35-9

WARREN, G. W. and D. A. POTTER. Pathogenicity of *Bacillus popilliae* (*Cyclocephala* Strain) and other Milky Disease Bacteria in Grubs of Southern Masked Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). En: Journal of Economic Entomology. Vol. 76, No. 1 (Feb., 1983); p. 69-73.

WHITE, R. T. Survival of Type A Milky Disease of Japanese Beetle Larvae Under Adverse Field Condition. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 33, No. 2 (ap.,1940); p. 303-306.

WHITE, R. T. and S. R. DUTKY. Effect of the Introduction of Milky Disease on Populations of Japanese Beetle Larvae. En: Journal of Economic Entomology. Vol. 33, No. 2 (Ap.,1940); p. 306-309.

ANEXO 1. PORCENTAJE DE MORTALIDAD ACUMULADA CAUSADA POR DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *B. popilliae* SOBRE LARVAS DE *Ph. obsoleta* (N=52, 17°C, H. R. 78%).

Concentración (esporas/m ³)	Mortalidad Ajustada(%) DDI		
	7	55	82
10 ³	0	24.42	42.78
10 ⁶	4.03	32.60	55.09
10 ⁷	4.03	34.71	55.09
10 ⁸	0	50.95	67.5
10 ⁹	15.1	34.74	59.13
10 ¹⁰	6.05	26.54	44.90

ANEXO 2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD (ACUMULADA), CAUSADA POR *B. popilliae* SOBRE DIFERENTES DENSIDADES LARVALES DE *Ph. obsoleta* (17 °C, H. R. 78%).

Densidades (larvas/m ³)	N	Mortalidad (%) DDI		
		7	55	82
30	16	0	32.55	81.25
100	52	3.8	19.2	42.3
200	100	12.0	36.0	65
300	152	13.1	58.4	62.8

N = Unidades Experimentales

ANEXO 3. TABLAS DE CONTINGENCIA RESUMIDAS PARA EL EFECTO DE LA DENSIDAD DE *Ph. obsoleta* SOBRE LA PATOGENICIDAD DE *B. popilliae* (17 °C, H. R. 78%, GL = 1).

Densidad	DDI	Categoría de Mortalidad				Total	Valor de X ²	Probabilidad
		Sanos		Muertos				
		Observado	Esperado.	Observado	Esperado			
30		10		6.0				
30 Testigo	55	15	12.5	1.0	3.5	16	9.92	0.01 NS
100		42		1.0				
100 Testigo	55	52	47.0	0	5.0	52	8.96	0.01 NS
200		61		39.				
200 Testigo	55	97	79.0	3	21	100	37.0	0.001 *
300		69		83				
300 Testigo	55	149	109.0	3	43.0	152	102.2	0.001 *
30		20		14.0				
30 Testigo	82	15	8.5	1.0	7.5	16	18.07	0.001 *
100		27		25.0				
100 Testigo	82	49	38.0	3.0	14.0	52	24.8	0.001 *
200		31		69				
200 Testigo	82	96.0	63.5	4	36.5	100	60.3	0.001 *
300		42		110				
300 Testigo	82	148	95.0	4	57.0	152	154	0.001 *

ANEXO 4. NUMERO DE UFC DE *B. popilliae* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, 18 DDI (N=4, 24 °C, H. R 78%).

Tratamiento Medio de cultivo	Repeticiones				Media	ΣRi	d
	I	II	III	IV			
2	63	84	120	90	89.25	49	
1	120	40	70	20	62.5	46.5	2.5
3	30	40	40	39	37.25	44	1.5
4	20	30	78	39	41.72	42.5	1.5
8	0	2	6	17	6.25	28	14.5*
7	10	0	43	8	15.25	27	1
6	0	15	5	0	5.0	23	4*
5	5	0	0	10	3.75	22.5	0.5
12	0	0	30	0	7.5	21.5	1
9	0	0	0	0	0	14.5	7*
10	0	0	0	0	0	14.5	0
11	0	0	0	0	0	14.5	0
13	0	0	0	0	0	14.5	0

DMS = 4; $X^2 = 32.6$; GL = 12; ($\alpha = 0.005$)

2=1>3=4>8=7>6=5=12>9=10=11=13

ANEXO 5. ANALISIS DE VARIACIÓN DE LAS ESPORAS/ml DE *B. popilliae* CONSERVADAS EN DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO (N=20).

Fuente de Variación	SC	Gl	CM	F Calc	$P_r \Rightarrow F$
Tto. por Bloque	216838.65	7	30976.95	12.68	0.001 *
Error	29304.30	12	2442.05		
Total	246142.95	19			
Tratamiento	190327.7	4	47581.93	19.48	0.0001**
Bloque	26510.95	3	8836.99	3.62	0.0455 *

C.V. = 4.81%