

# CAPACIDAD PARASÍTICA DE *Beauveria bassiana* SOBRE EL PICUDO DEL PALMITO (*Metamasius hemipterus*). (Coleoptera: Dryophthoridae).

Cristina Vargas-Chacón<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Capacidad parasítica de *Beauveria bassiana* sobre el picudo del palmito (*Metamasius hemipterus*) (Coleoptera: Dryophthoridae).** El objetivo fue identificar una cepa de *B. bassiana*, eficaz contra adultos de *Metamasius hemipterus* a fin de que sea utilizada en el manejo de la plaga. El estudio se realizó en los laboratorios del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y se concluyó en el año 2013. El ensayo se estableció con un diseño completamente al azar con siete tratamientos y 20 repeticiones. Se estudiaron seis cepas del hongo codificadas como INTA H-25, INTA H-26, INTA H-28, INTA H-29, INTA H-31 e INTA H-50. Los insectos adultos, fueron expuestos al hongo a una concentración de 1X10<sup>8</sup> conidias/ml, se observaron diariamente hasta una semana después de la muerte. Se realizó un ANDEVA y una prueba de separación de medias mediante la prueba Duncan con un 95% de confianza. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tiempos letales TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub> (P<0,0001). La cepa INTA-H-25 eliminó el 90% de la población antes de los cinco días y las cepas INTA-H-26, INTA H-31 e INTA-H-50 eliminaron el 50 % de la población de picudos antes de los cinco días, superando al resto de tratamientos. En el parasitismo se observó, que la cepa INTA-H-50 fue la que produjo más micelio sobre el insecto y la cepa INTA-H-31 la mayor cantidad de conidias; siendo estas características importantes para la diseminación del hongo e infección del insecto. Los mejores tratamientos fueron INTA-H-25, INTA-H-26, INTA-H-31 e INTA-H-50.

**Palabras clave:** Control biológico, pejibaye, hongo entomopatógeno.

## INTRODUCCIÓN

El coleóptero *Metamasius hemipterus* es un “gorgojo barrenador del tallo” que se encuentra en América Central, Sur América y en las Indias Occidentales y es considerada una plaga de importancia económica que afecta a las plantaciones de bromelias, caña de azúcar, bananos y palmas (Weissling *et al.* 2003, Nehei y Pavarini 2011). La cosecha y la poda en algunos de estos cultivos, ofrecen puntos de entrada al insecto (Alpizar *et al.* 2002). La hembra aprovecha estos daños y oviposita (27 días después de aparearse con los machos) en

la base de los tallos cortados. La larva emerge, a los 57 días aproximadamente y perfora la base del tallo y el rizoma iniciando la destrucción de los tallos maduros, ocasionando puntos de entrada a hongos y otras plagas (Alpizar *et al.* 2002, Weissling *et al.* 2003). La larva de *Metamasius* sp., se alimenta de 30-60 días del tallo de la planta y luego produce una pupa, los adultos viven de 60 a 90 días (Alpizar 2002).

El manejo de adultos de *M. hemipterus* se ha realizado tradicionalmente, con formulaciones

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. cvargas@inta.go.cr. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

químicas comerciales, entre las que se encuentran plaguicidas organofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos y neociclotinoides (Giblin-Davis *et al.* 1996). Sin embargo, los métodos de control biológico son una alternativa promisorio al uso de plaguicidas químicos tradicionales (Moraes 2008).

Existen varios estudios, en los cuales se ha demostrado la efectividad de hongos entomopatógenos en el manejo de plagas insectiles, entre éstos se encuentran *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, ambos han sido estudiados en el control del insecto *M. hemipterus* entre otros insectos. En

algunos casos utilizando hongos entomopatógenos nativos, se han obtenido mortalidades del insecto plaga hasta del 80% (Carballo y Arias 1994; Badilla-Fernández 2002; Orduño-Cruz 2011).

El banco de microorganismos del INTA mantiene cepas del hongo *Beauveria* sp., obtenidas de diferentes insectos y diferentes zonas geográficas del país. Estos hongos, en estudios previos, han evidenciado cierta especificidad, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar cual de las cepas es eficaz contra adultos de *M. hemipterus*, a fin de poder utilizarlas en el manejo integrado de la plaga en diferentes cultivos agrícolas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Insecto plaga

Los adultos de *M. hemipterus*, fueron capturados en plantaciones de palmito de pejíbaye en la zona atlántica del país, específicamente en la Estación Experimental Los Diamantes (EELD) del INTA. Para ello, se colocaron trampas secas de plástico conteniendo en su interior trozos de caña de azúcar, a fin de atraer los insectos. Los picudos vivos, fueron colocados dentro de una caja entomológica de madera y transportados al Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA, ubicado en San José. En este lugar, los insectos se mantuvieron en cajas de cría de vidrio de 35X35X35 cm durante tres días a temperatura y humedad relativa ambientales (aproximadamente 26 °C y 60% HR). Dentro de la caja se colocaron pequeños trozos de caña de azúcar y una gaza con agua, para que sirvieran de fuente de carbohidratos y agua al picudo. Solo los insectos vivos fueron utilizados en la investigación.

### Tratamientos y revigorización

Los hongos utilizados provenían del banco de microorganismos del INTA. Estos fueron revigorizados para potenciar su virulencia, para lo cual se preparó una suspensión concentrada de esporas de cada una de las cepas a estudiar. Seguidamente, cinco insectos se sumergieron en cada solución durante un minuto, luego fueron colocados individualmente en un vial de vidrio de 25 ml, conteniendo un trozo de toalla húmeda en el fondo. Los insectos fueron observados diariamente y cuando murieron, se esperaron siete días más, hasta visualizar el crecimiento del hongo sobre el insecto.

El hongo fue re-aislado de los insectos parasitados, cultivando el micelio en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés), acidificado con ácido láctico al 25% a un pH de 4,0. Se corroboró la identidad taxonómica de los hongos mediante sus características morfológicas macro y microscópicas. Además, fueron enviados al laboratorio de genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CENIBiot) para su identificación molecular. Los tratamientos utilizados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el estudio. San José, Costa Rica. 2013.

Nº tratamiento	Código	Tratamiento
1	INTA-H 29	<i>Beauveria</i> sp. aislamiento usurpadora
2	INTA-H 50	<i>Beauveria</i> sp. aislado de afido <i>Autocarhum solani</i> en cultivo de lechuga.
3	INTA-H-25	<i>Beauveria</i> sp. aislamiento tijerilla (Dermaptera).
4	INTA-H-26	<i>Beauveria</i> sp. aislamiento San Carlos.
5	INTA-H-31	<i>Beauveria</i> sp. aislamiento San Antonio. Aislado de <i>Hypothenemus hampei</i> en cultivo de café
6	INTA-H-28	<i>Beauveria</i> sp. aislamiento 114 cedido por el CATIE.
7	-----	Testigo: agua con Tween al 0,01%

Por cada tratamiento, se utilizaron 50 ml de una solución acuosa estéril con Tween al 0,01% y las esporas del hongo a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Para lo anterior, se raspó el hongo revigorizado del medio de cultivo PDA y se agregó a la solución de Tween. La suspensión se agitó vigorosamente durante 4 minutos y se determinó la cantidad de conidias/ml utilizando una cámara de conteo de células (hematocitómetro Neubauer), de ser necesario se ajustó la concentración agregando más hongo o realizando las diluciones necesarias.

## Bioensayo

Se utilizaron 20 picudos por tratamiento, los cuales fueron previamente desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por dos minutos, el exceso de cloro se eliminó pasando los insectos por agua destilada estéril (tres lavados). El exceso de humedad se eliminó colocando los insectos en placas Petri estériles con papel absorbente en el fondo.

Los *M hemipterus* de cada tratamiento, fueron sumergidos en la solución de esporas del hongo correspondiente por un minuto, pasándolos luego a placas Petri estériles con papel toalla en el fondo para reducir la humedad. Los insectos fueron colocados en forma individual, en un vial de vidrio estéril con capacidad de 25 ml con papel absorbente en el fondo. Los viales se cubrieron con algodón estéril y papel parafinado para evitar el escape de los picudos.

Los insectos fueron observados a diario y cada dos días se les agregó dos gotas de agua destilada estéril a fin de mantener una humedad relativa alta. Se anotó el día de la muerte y, además se evaluaron las características del micelio producido sobre el insecto.

Para tener alguna forma de clasificar y categorizar el crecimiento micelial, se desarrolló una escala de crecimiento con los parámetros de clasificación que se utilizaron en este estudio.

El parasitismo con *B. bassiana*, se confirmó mediante el re-aislamiento del hongo en PDA, a partir del cuerpo del insecto, utilizando la misma metodología expuesta en la revigorización del hongo.

## Análisis estadístico

Para la determinación de los tiempos de muerte, se utilizó un diseño completamente al azar con repeticiones en el tiempo, con siete tratamientos y 20 repeticiones para un total de 140 unidades experimentales.

Se realizó análisis de varianza para los tiempos letales 50 y 90 ( $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ ) a fin de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los tratamientos y una comparación de medias mediante la prueba Duncan con un nivel de significancia de 0,05.

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS System Versión 9.

El modelo estadístico para el arreglo de los tratamientos fue el siguiente:

$$Y_{ijh} = \mu + T_i + DDT_j + (t_i * DDT)_{ij} + E_{ijk}.$$

Donde:

$Y_{ijh}$  = Variable respuesta

$\mu$  = Media poblacional

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

DDT = Efecto del  $j$ -ésimo tiempo

$(t_i * DDT)_{ij}$  = interacción tiempo \* tratamiento

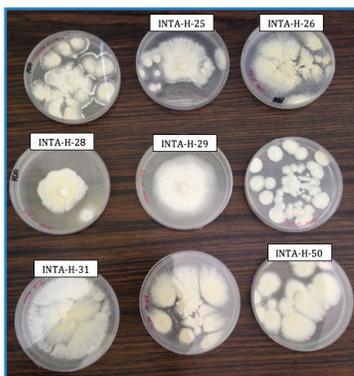
$E_{ijk}$  = Término de error experimental, supuestamente con distribución normal con media cero y varianza constante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Revigorización e Identificación Molecular

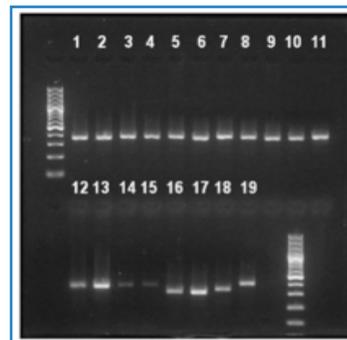
Las cepas de *B. bassiana* incluidas en el estudio fueron revigorizadas mediante la metodología propuesta. Este fue un proceso importante, ya que los hongos han estado inactivos durante su conservación en el banco de microorganismos del INTA, por lo que se requiere reactivar su metabolismo para reestablecer el potencial real que el hongo posee en su capacidad entomopatógena.

Las cepas del hongo *Beauveria* sp., preservadas en el banco de microorganismos del INTA, presentaron diferencias fenotípicas en color, crecimiento en el medio de cultivo artificial, esporulación y textura, así como en la eficacia biológica contra *M. hemipterus*. Esta respuesta, hizo que se considerara la posibilidad de la presencia de diferentes especies de *Beauveria* sp. (Figura 1).



**Figura 1.** Diferencias fenotípicas de cepas de *Beauveria* sp. del banco de microorganismos del INTA. Se resaltan las que se utilizaron en este estudio. INTA. 2013.

En la identificación molecular, la amplificación de las regiones 28S fueron satisfactorias (Figura 2) y mediante los análisis de secuencias ADN<sub>r</sub> con ITS todos los hongos analizados pertenecen a la misma especie *Beauveria bassiana*.



**Figura 2.** Electroforesis del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de un fragmento de subunidad grande (LSU) del gen ribosomal 28S. *Beauveria* INTA (1-6), *Beauveria* control (7). INTA, 2018

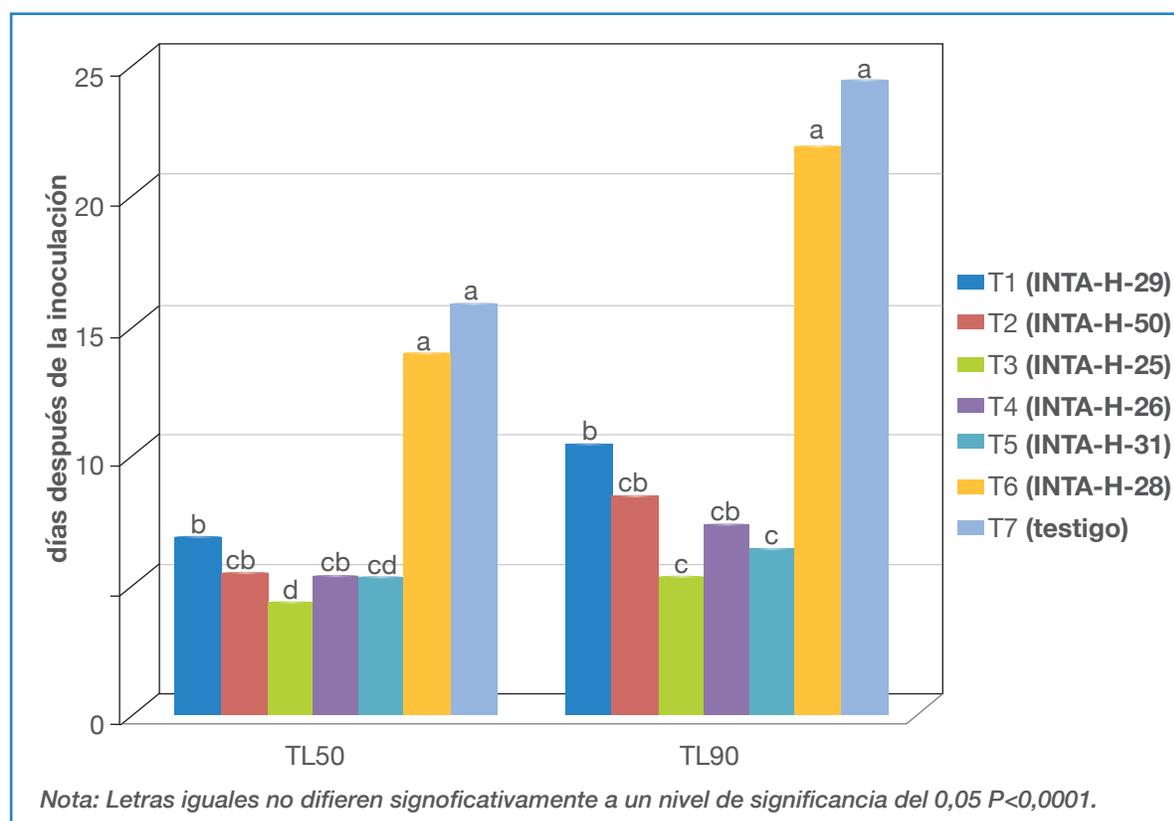
La no detección de especies diferentes en el organismo entomopatógeno estudiado, podría deberse a que las pequeñas características moleculares que los hace fenotípica y biológicamente diferentes, no se detectaron mediante los marcadores moleculares utilizados en la identificación. De acuerdo con estos resultados, se recomienda en el futuro utilizar marcadores moleculares que sean capaces de identificar pequeños cambios en las bases nitrogenadas dentro de un segmento genómico. Al respecto varios autores han logrado encontrar diferencias moleculares entre cepas de la especie *B. bassiana*,

mediante el uso de marcadores de secuencias simples repetidas (SSR por sus siglas en inglés) o microsátelites (Hollingsworth *et al.* 2011, Rehner *et al.* 2011).

## Mortalidad

El análisis de varianza obtuvo resultados altamente significativos con  $p < 0,0001$  y un  $R^2$  de 0,76 a un nivel de significancia de 0,05. Los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 se diferenciaron estadísticamente del testigo, lo cual no se dio con el tratamiento 6. Los tratamientos 1, 2, 4 y 5 no se diferenciaron estadísticamente entre sí en los

tiempos  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ . El tratamiento 3 se diferenció estadísticamente del resto de los tratamientos según los  $TL_{50}$ , a excepción del tratamiento 5. En el  $TL_{90}$  el tratamiento 3 no se diferenció de los tratamientos 2, 4 y 5. De acuerdo con lo anterior los mejores tratamientos para alcanzar una mortalidad del 50% de la población antes de los cinco días fueron los tratamientos 3 y 5. Para un 90% de mortalidad no se encontró diferencia entre los tratamientos 2, 3, 4 y 5, pero el tratamiento 3 causó una mortalidad del 90% de la población antes de los cinco días, seguido por el tratamiento 5 (Figura 3).



**Figura 3:** Tiempos letal medio ( $TL_{50}$ ) y 90% ( $TL_{90}$ ) del *M. hemipterus* según los días después de la inoculación con *B. bassiana*. INTA. 2013.

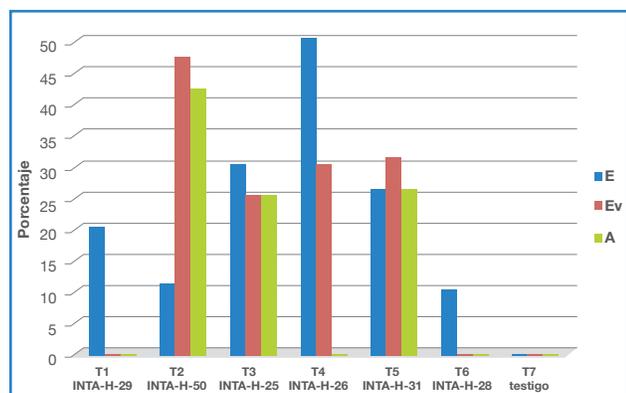
La producción de micelio y esporas en el cuerpo del insecto parasitado, es otro factor importante, además de los tiempos letales, para seleccionar el hongo a ser utilizado en el manejo en campo. Esto porque la producción de micelio y la esporulación favorecerá la dispersión del hongo y el efecto entomopatógeno se incrementa, lo que se favorece también por las características gregarias de *Metamasius hemipterus*.

Al morir todas las unidades experimentales, se observó que los tratamientos presentaron diferencias en el crecimiento sobre el cuerpo del insecto y dado que no se encontró en la literatura una forma de diferenciar este hecho, se desarrolló una escala de crecimiento micelial (Figura 4) con la cual se lograron obtener los porcentajes de cada tratamiento según cada clasificación o categoría.

Crecimiento de micelio sobre el insecto	Clasificación	Apariencia
Sin micelio	0	
Micelio visible solamente en antenas y articulaciones de patas	E: Escaso 1	
Micelio visible entre segmentos de cabeza tórax y abdomen	EV: Evidente 2	
Micelio sobresaliente, que cubre gran parte del cuerpo del insecto.	A: Abundante 3	

**Figura 4.** Escala utilizada en la evaluación del crecimiento y cantidad de micelio del hongo *B. bassiana* sobre *M. hemipterus*. INTA. 2013.

Los porcentajes de clasificación de crecimiento micelial, según el tratamiento se muestran en la Figura 5. En forma general, con el tratamiento 2, un 90 % de los insectos presentó micelio y con el tratamiento 5 un 83%, con muy poca diferencia le siguieron los tratamientos 3 y 4 con un 80%. El tratamiento 4, presentó aproximadamente un 50% de micelio escaso y menos de un 30% de micelio evidente. Los menores porcentajes de desarrollo micelial los obtuvieron los tratamientos 1 y 6 con valores que variaron entre 10 y 20 %. Las características de estos aislamientos dificultarían la diseminación del hongo en campo, al tener pocas estructuras expuestas.



E: Escaso Ev: Evidente A: Abundante

**Figura 5:** Producción de micelio según tratamiento a un 100% de mortalidad. INTA. 2013.

La presencia de micelio sobre el insecto parasitado va a favorecer la transmisión de estructuras infectivas del hongo hacia otros insectos cercanos. Solo tres de los hongos produjeron abundante micelio que cubrió más de la mitad del cuerpo del insecto. Los mayores porcentajes de micelio abundante se dieron con el tratamiento 2, con una incidencia del 41%, seguido por los tratamientos 3 y 5 con un 24% y 25% respectivamente. Los tratamientos 1 y 6 presentaron un micelio escaso, observable en algunas articulaciones de las patas y en la porción distal de las antenas (Figura 5).

En la categoría de micelio evidente, nuevamente el tratamiento 2 con un 46% supero al resto de los tratamientos, observándose micelio en articulaciones de patas, antenas y algo del mismo en cabeza, tórax y abdomen. Le siguieron los tratamientos 3, 4 y 5 con 24 %, 29% y 30% respectivamente.

Se observó que los insectos parasitados con el tratamiento 5 presentaron gran cantidad de conidias, el cual es otro aspecto para tomar en cuenta al seleccionar un hongo, dado el potencial que presenta el poseer estructuras infectivas y de fácil dispersión por el agro-ecosistema.

Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos 2, 3 ,4 y 5 (INTA-H-50, INTA-H-25, INTA-H-26 e INTA-H-31). Se deberán realizar más estudios controlando las condiciones ambientales en las que se desarrolla el insecto plaga ya que este estudio se realizó a una temperatura aproximada de 26 °C y 60% HR condiciones óptimas para el hongo. Además es recomendable realizar estudios en campo con estas tres cepas, para evaluar su eficacia biológica contra *M. hemipterus* ya que la caracterización de diferentes aislamientos, respecto a la preferencia de temperatura y la virulencia contra el organismo plaga, son herramientas útiles en la selección de hongos entomopatógenos dentro de un programa de control biológico bajo condiciones climáticas particulares (Orduño-Cruz *et al.* 2011). Algunos autores indican que el mejor aislamiento debe ser seleccionado en relación con la temperatura a la cual el hospedero normalmente ocurre (Yeo *et al.* 2003).

Varios autores (Feng *et al.* 1985, Pena *et al.* 1995Gindin *et al.* 2006; Ondiaka *et al.* 2008; Orduño-Cruz 2011) han demostrado que hay variación en la susceptibilidad de diferentes aislamientos de

hongos según edad, estado de desarrollo y sexo del insecto plaga, así como las condiciones ambientales a las cuales pueden afectar la biología y ecología de los entomopatógenos. Debido a lo anterior, se

recomienda realizar estudios de eficacia biológica contra estadios inmaduros de *M. hemipterus*, ya que pueden presentar variaciones en la susceptibilidad a las diferentes cepas de *B. bassiana*

## LITERATURA CITADA

Alpízar, D; Fallas, M; Oehlschlager, AC; González, LM; Chinchilla, CM; Bulgarelli, J. 2002. Pheromone mass trapping of the west indian sugarcane weevil and the american plan weevil (Coleoptera: Curculionidae) in palmito palm. Florida Entomologist 85(3):426-430.

Badilla-Fernández, F. 2002. Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 64: 77-87.

Carballo, VM; Arias de López, M. 1994. Evaluation of *Beauveria bassiana* for the control of *Cosmopolites sordidus* and *Metamasius hemipterus* (Coleoptera:Curculionidae) under field conditions. 1994. Manejo Integrado de Plagas 31:22-24.

Feng, Z; Carruthers, RI; Roberts, DW; Robson, DS. 1985. Age specific dose mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal Invertebrate Pathology 46: 259-264.

Gindin, G; Levski, S; Glazer, I; Soroker, V. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. Phytoparasitica 34:370-379.

Giblin-Davis, RM; Pena, JE; Duncan, RE. 1996. Evaluation of an entomopathogenic nematode and chemical insecticides for control of *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Entomological Science 31:240-251.

Hollingsworth, RG; Lysy, A; Matsumoto, TK. 2011. Preliminary study of genetic variation in Hawaiian isolates of *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Cordycepsales). Journal of Invertebrate Pathology 106:422-425

Moraes, APR; Angelo, I da C; Fernandes, EKK; Bittencourt, VREP; Bittencourt, AJ. 2008. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to eggs and immature stages of *Stomoxys calcitrans*. Annals of the New York Academy of Sciences 1149:384-387.

Nehei SS; Pavarini, R. 2011. Taxonomic redescription and biological notes on *Diagia angusta* (Diptera, Tachinidae): parasitoid of the palm boring weevils *Metamasius ensirosris* and *M. hemipterus* (Coleoptera Dryophthoridae). ZooKeys 84:23-36.

Ondiaka, S; Maniania, NK; Nyamasyo, GHN; Nderitu, JH. 2008. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. Annals of Applied Biology 153(1):41-48.

Orduño-Cruz, NO; Guzmán-Franco, AW; Rodríguez-Leyva, E; López-Collado, J; Valdéz-Carrasco, JM; Mora-Aguilera, G. 2011. Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. Journal of Applied Microbiology 111:939-948.

Pena, JE; Gilbin-Davis, RM; Duncan, R. 1995. Impact of indigenous *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on banana weevil and rotten sugarcane weevil (Coleoptera: Curculionidae) populations in banana in Florida. Journal of Agricultural Entomology 12:163-167.

Rehner, SA; Minnis, AM; Sung, GiHo. 2011. Phylogeny and systematics of theanamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria* (en línea). Mycologia 103(5):1055-1073. Consultado 22. may. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.3852/10-302>

Weissling, T; Giblin-Davis, R; Center, B; Heath, R; Peña, J. 2003. Oviposition by *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Dryophthoridae: Rhynchophorinae). Florida Entomologist. 86:174-177.

Yeo, H; Pell, JK; Alderson, PG; Clark, SJ; Pye, BJ. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science 59:156-165.