

CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE *Rhynchophorus palmarum* L., 1758 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Omar Francisco Sánchez-Ríos^{1*}✉, Lenys L. Sánchez-Ríos², Katy G. Gutiérrez-López², Edilberto Aragón-Robles³ y Gabriel Córdova-Gámez³

¹Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 37. Km 4.5. Carretera Pochutla-Puerto Ángel, San Pedro Pochutla, Oaxaca. México. C. P. 70900.

²Sociedad Agroecológica de la Costa de Oaxaca S. P. R. de R. L.

³Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex hacienda de nazareno. C. P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

✉Autor de correspondencia: agromarsanchez@gmail.com

RESUMEN. Con la finalidad de demostrar la efectividad de entomopatógenos sobre instares larvales de *R. palmarum*, se evaluaron los hongos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces* sp. y *Metarhizium anisopliae*, los cuales, se reprodujeron en el laboratorio del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca; empleando medios de cultivo Saboraud y PDA (Agar Papa Dextrosa). Posteriormente se siguió una metodología para la reproducción de hongos entomopatógenos; una vez obtenido el inoculo o esporas, se prepararon soluciones de cada entomopatógeno llegando hasta la dilución 1×10^{-2} , el bioensayo se desarrolló bajo un diseño experimental completamente aleatorizado, de diez tratamientos con cinco repeticiones cada uno, incluyendo un testigo absoluto tratado con agua destilada. Las soluciones se aplicaron por aspersión sobre las unidades experimentales; las cuales consistieron en diez larvas de tercer instar. La comparación de medias se hizo por el método Tukey con un nivel de significancia de ($\alpha = 0.05$). El entomopatógeno que causó mayor mortalidad fue *Paecilomyces* sp. con porcentajes de 70, 55 y 28.33 %, mientras que con *M. anisopliae* se alcanzaron mortalidades de 60, 46.66 y 16.66 %, el entomopatógeno *B. bassiana* provocó mortalidades de 53.33, 35 y 33.33 %. Los resultados de las rectas probit-logarítmicas indicaron susceptibilidad de los individuos a *Paecilomyces* sp. debido a que para alcanzar un estímulo de 50 % se necesitan concentraciones de *B. bassiana* de 1.8×10^{12} conidias ml^{-1} , para *Paecilomyces* 3.3×10^7 conidias ml^{-1} y *M. anisopliae* 1×10^9 conidias ml^{-1} , para el 90 % de estímulo, se necesitan concentraciones de 3.24×10^{12} , 2.8×10^{12} y 5.78×10^{11} conidias ml^{-1} para *B. bassiana*, *Paecilomyces* y *M. anisopliae* respectivamente.

Palabras clave: Entomopatógenos, control biológico, cocotero.

Biological control of larvae of *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions

ABSTRACT. This experiment evaluated the effectivity of entomopathogenic fungi on larval stages of *R. Palmarum*. Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces* sp. which were reproduced in the laboratory of the Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. were cultivated either onto Saboraud maltose yeast-extract medium (SMY) or potato dextrose agar (PDA) medium. Entomopathogenic fungi reproduction was done according to methodology. Once the inoculum or spores were obtained, several dilutions of each entomopathogenic fungus was prepared reaching the level of 1×10^{-2} . The bioassay was carried out using a randomized complete block design (RED) with ten treatments and five replications, including the absolute control consisted in spraying only distilled water. Solutions were sprayed in all the experimental units which consisted on ten larvae in third instar. Data were analyzed for each dependent variable by using ANOVA followed by the Tukey test at the $\alpha = 0.05$ level of significance. The entomopathogenic fungus that caused the highest mortality was *Paecilomyces* sp. with percentages of 70, 55 y 28.33 % in each treatment, while *M. anisopliae* reached mortality percentages of 60, 46.66 y 16.66 %. Nevertheless, the entomopathogenic fungus that had the lowest mortality percentage was *B. bassiana* with 53.33, 35 y 33.33 %. The results of the probit-logarithmic lines indicated susceptibility of the individuals to *Paecilomyces* sp. Because to reach a stimulus of 50 %, *B. bassiana* concentrations of 1.8×10^{12} conidia ml^{-1} , for *Paecilomyces* 3.3×10^7 conidia ml^{-1} , and *M. anisopliae* 1×10^9 conidia ml^{-1} . For the 90 % stimulus, concentrations of 3.24×10^{12} , 2.8×10^{12} and 5.78×10^{11} conidias ml^{-1} are required for *B. bassiana*, *Paecilomyces* and *M. anisopliae* respectively.

Keywords: Entomopathogenic fungi, biological control, American palm weevil.

INTRODUCCIÓN

En la costa del estado de Oaxaca, la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia debido a la superficie cultivada, el valor de la producción, el número de familias que dependen de él y la mano de obra que genera. Se cultivan 10,085 ha que rinden en promedio 953 kg ha⁻¹ y producen 9,615 t de copra con un valor de 28.719 millones de pesos (SAGARPA, 2012). Del cultivo de cocotero dependen en forma directa aproximadamente 2,000 productores y sus familias y durante la cosecha se generan cerca de 200,000 empleos.

El picudo negro (*Rhynchophorus palmarum* L.), es la principal plaga del cultivo de cocotero; los daños que ocasiona pueden ser de forma directa o indirecta: En forma directa las larvas penetran por las axilas de las hojas, llegan al cogollo de las plantas y las matan; en forma indirecta el picudo trasmite el nematodo (*Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard) que causa el anillo rojo del cocotero, que también provoca la muerte de las palmas (Ovando *et al.*, 2010). El síntoma característico del daño del insecto, se observa en las hojas de las palmas; las cuales se tornan amarillas, después se secan y caen; es típico que por el ataque del picudo las hojas se doblan en su base formando un codo de 45°. Las galerías que forman las larvas, facilitan la entrada de algunos hongos patógenos como *Phytophthora palmivora* y otros artrópodos que en conjunto causan la muerte de la planta (SENASICA, 2013).

En México la asociación picudo negro-nematodo causa serios problemas en los estados donde se explota este cultivo (Domínguez *et al.*, 1999). La plaga se distribuye en toda la superficie coprera y en áreas sin control puede llegar a causar la pérdida de hasta el 80 % de plantaciones jóvenes de híbridos y ecotipos de alto del pacífico (CESAVEGRO, 2011). Para evitar los daños de esta plaga, es necesario buscar alternativas efectivas que permitan disminuir la población de *R. palmarum* para que se cause el menor daño posible al medio ambiente, así como a la fauna benéfica en el agroecosistema, hasta el momento la principal medida de control ha sido el uso de trampas con feromonas de agregación, cebo alimenticio con insecticida. Por lo anterior se planteó el uso de organismos entomopatógenos, ya que el control ejercido por los enemigos naturales, en forma natural o aumentativa, es barato, efectivo, permanente y no interfiere negativamente con ningún otro proceso del ecosistema (Falguni-Guharay y Pascal, 2004), evaluando bajo condiciones de laboratorio la mortalidad, determinando la DL₅₀ y DL₉₀; así como el tiempo de mortalidad en larvas de *R. palmarum* al ser inoculadas con los hongos entomopatógenos mencionados anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODO

Se colectaron larvas de *R. palmarum* en una huerta ubicada en la comunidad de Zapotengo perteneciente al municipio de San Pedro Pochutla, en la región Costa de Oaxaca. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, donde se confinaron y se depositaron individualmente en recipientes plásticos y se mantuvieron alimentadas con plátano.

Beauveria bassiana se aisló de broca de café (*Hypothenemus Hampei* Ferrari) y *Paecilomyces* sp. de un defoliador de pasto el cual no fue identificado; Los organismos en cuestión fueron encontrados en regiones del estado de Oaxaca, con respecto a *M. anisopliae* se adquirió en un laboratorio comercial, por lo cual se preparó una solución de 10 g de producto en 100 ml de agua destilada y se aplicó sobre ejemplares de *Sitophilus zeamais*, una vez esporulados se procedió a aislarlo y reactivarlo al igual que los entomopatógenos nativos. El medio de cultivo empleado fue PDA, y se incubaron a temperatura de 27 ± 1 °C, posteriormente se siguió la metodología descrita por Aragón (1993) para su reproducción.

Obtenido el inóculo se tomó una muestra de 10 g de sustrato de cada hongo y de manera separada se mezcló en 100 ml de agua destilada estéril y se le añadió 1 ml de adherente, dispersante y humectante (Nonil Fenol Etoxilado con 10 moles de Óxido de Etileno). A las mezclas se les

denomino soluciones madre (SM), posteriormente se prepararon diluciones de cada uno hasta tener la dilución 1×10^{-2} (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Tratamientos a evaluar en larvas de *Rhynchophorus palmarum*.

No. tratamiento	Entomopatógeno	Dilución
1	<i>B. bassiana</i>	SM
2	<i>B. bassiana</i>	1×10^{-1}
3	<i>B. bassiana</i>	1×10^{-2}
4	<i>Paecilomyces</i> sp.	SM
5	<i>Paecilomyces</i> sp.	1×10^{-1}
6	<i>Paecilomyces</i> sp.	1×10^{-2}
7	<i>M. anisopliae</i>	SM
8	<i>M. anisopliae</i>	1×10^{-1}
9	<i>M. anisopliae</i>	1×10^{-2}
10	Testigo absoluto	Agua destilada

Las concentraciones se aplicaron por aspersión sobre cada unidad experimental, las cuales constaron de cinco larvas de tercer instar de un tamaño aproximado de 1.5 cm de largo y 0.2 cm de diámetro, las cuales fueron alimentadas con plátano. Setenta y dos horas posteriores a la inoculación se colocaron en cámara húmeda para inducir la proliferación de estructuras reproductivas de los hongos. El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado con diez tratamientos y cinco repeticiones. Se registró el número de larvas muertas cada 24 horas, los datos se analizaron en el programa computacional SAS (1997), una vez obtenido el análisis de varianza, los porcentajes de mortalidad se transformaron a unidades probit y la concentración a su respectivo logaritmo, con estos valores transformados y estandarizados se empleó el método PROBIT para calcular las rectas en unidades probit (dosis-mortalidad) y determinar DL_{50} y DL_{90} de acuerdo con lo propuesto por Lagunes y Vásquez (1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos entomopatógenos empleados mostraron ser una alternativa para el control de *R. palmarum*, debido a que mostraron porcentajes de mortalidad altos sobre larvas de tercer instar. En el análisis de varianza se observó diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que los hongos ejercieron diferente grado de control, el aislamiento con mayor mortalidad fue el tratamiento cuatro solución madre de *Paecilomyces* sp., con una concentración de 2.05×10^8 conidias ml^{-1} causó mortalidad de 70 %, seguido por el T7 del entomopatógeno *M. anisopliae* (5.9×10^8 conidias ml^{-1}) con 60 %, siendo estos dos tratamientos los más altos y con cierta similitud en su efectividad.

En un tercer sitio se ubicó el T5 de *Paecilomyces* sp., (2×10^7 conidias ml^{-1}) con 55 % de infección, el entomopatógeno *B. bassiana* con el T1 (1.052×10^{10} conidias ml^{-1}) influyó en 53.33 %. Las diluciones de *B. bassiana*, *Paecilomyces* sp. y *M. anisopliae*: T2 y T3, T6 y T9, respectivamente, provocaron mortalidad del 16.66 al 35 %, debido a que su concentración de esporas fue menor ya que son diluciones de la solución madre. Por su parte el T8 de *M. anisopliae* (5.1×10^7 conidias ml^{-1}) provocó 46.66 % de mortalidad (Fig. 1).

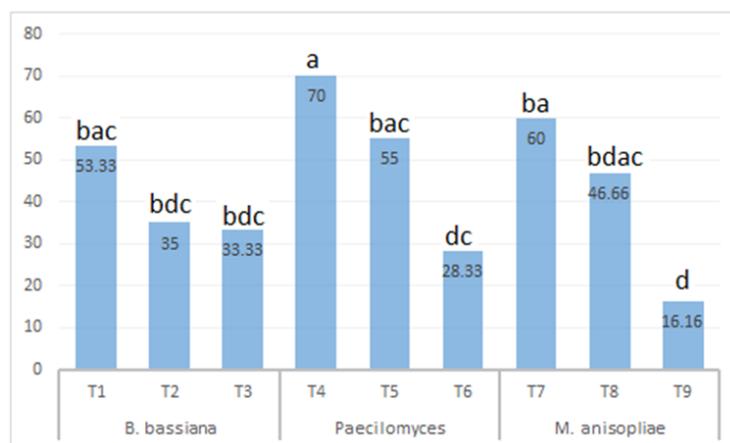


Figura 1. Porcentajes de mortalidad de larvas de *Rhynchophorus palmarum*, según la prueba de medias Tukey ($\alpha = 0.05$).

El tiempo transcurrido de la inoculación a presentarse la micosis de cada hongo en los tratamientos con mayor mortalidad, vario de acuerdo con el entomopatógeno empleado. La sintomatología de *Paecilomyces* sp., se observó a las 96 h con un 35 % de mortalidad actuando más rápido que *B. bassiana* con 15 % y *M. anisopliae* cuyos síntomas se observaron hasta las 168 h posteriores a la inoculación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de cada tratamiento sobre larvas de tercer instar de *Rhynchophorus palmarum* de 96 a 288 h posteriores a la inoculación.

Entomopatógeno	Concentración	Tiempo (h)								
		96	120	144	168	192	216	240	264	288
<i>B. bassiana</i>	1.052×10^{10}	15	21	23	30	36	43	50	52	53.3
<i>B. bassiana</i>	9.95×10^9	8	11	20	26	31	31	33	33	35
<i>B. bassiana</i>	9.52×10^9	2	10	20	25	25	28	31	32	33.3
<i>Paecilomyces</i>	2.05×10^8	35	43	50	52	65	65	68	68	70
<i>Paecilomyces</i>	2.0×10^7	22	33	42	48	50	52	52	55	55
<i>Paecilomyces</i>	1.7×10^6	10	15	18	18	20	22	23	23	28.3
<i>M. anisopliae</i>	5.9×10^8	0	0	0	16	32	38	48	56	60
<i>M. anisopliae</i>	5.1×10^7	0	0	0	5	18	30	40	40	46.7
<i>M. anisopliae</i>	5×10^6	0	0	0	3	5	13	14	15	16.7

Los niveles de mortalidad por debajo del 50 % de la población expuesta, en el resto de tratamientos se debieron a que fueron las diluciones y por consecuencia su concentración de conidias.mL⁻¹ fue menor. La aparición del micelio se dio después de las 24, 48 y 72 horas confirmando a que la muerte fue causada por el hongo de acuerdo a lo descrito por Pariona *et al.*, (2007). Se observó que *Paecilomyces* sp. tuvo mayor efectividad, que los otros entomopatógenos al necesitar menor concentración de esporas para alcanzar la DL₅₀ y DL₉₀ (Cuadro 3).

Del mismo modo, para alcanzar un estímulo de 50% de la población expuesta se necesitan concentraciones de *B. bassiana* de 1.8×10^{12} esporas ml⁻¹, para *Paecilomyces* 3.3×10^7 esporas ml⁻¹ y *M. anisopliae* 1×10^9 esporas ml⁻¹, para el 90 % se necesitan concentraciones de 3.24×10^{12} , 2.8×10^{12} y 5.78×10^{11} esporas ml⁻¹ para *B. bassiana*, *Paecilomyces* y *M. anisopliae*, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 3. Dosis de esporas ml⁻¹ aplicadas, porcentajes de mortalidad observados y DL₅₀ DL₉₀ obtenidas.

Aislamiento	Dosis conidias ml ⁻¹	% de Mortalidad	DL ₅₀	DL ₉₀
<i>B. bassiana</i>	1.052 x 10 ¹⁰	53.33	1.8 x 10 ¹²	3.24 x 10 ¹²
	9.95 x 10 ⁹	35.00		
	9.52 x 10 ⁹	33.33		
<i>Paecilomyces</i>	2.05 x 10 ⁸	70.00	3.3 x 10 ⁷	2.8 x 10 ¹²
	2.0 x 10 ⁷	55.00		
	1.7 x 10 ⁶	28.33		
<i>M. anisopliae</i>	5.9 x 10 ⁸	60.00	1 x 10 ⁹	5.78 x 10 ¹¹
	5.1 x 10 ⁷	46.66		
	5 x 10 ⁶	16.66		
Testigo	0	5.00	-	-

CONCLUSIÓN

Los tres aislamientos evaluados presentaron actividad patogénica contra larvas de *R. palmarum* en condiciones de laboratorio, destacándose el aislamiento de *Paecilomyces* ya que una vez estandarizada su concentración mostró ser más virulento, necesitando menor concentración para alcanzar los porcentajes de mortalidad descritos anteriormente.

Por otro lado, aunque *B. bassiana* provoca mortalidades de 53.33 %, por lo cual, es importante seguir trabajando con este hongo debido a que fue colectado cerca de la región donde se encuentra el problema fitosanitario, el cual ya está adaptado a las condiciones de la zona y su efectividad no se verá afectado por las condiciones del ambiente en una posible inclusión dentro de los programas de manejo integrado de cultivo (MIC).

En este trabajo se seleccionó emplear estos entomopatógenos por su mayor potencial para el control biológico de insectos, resultando ser virulentos en larvas de *R. palmarum* bajo condiciones de laboratorio; ya que, aunque se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones letales de los hongos, *Paecilomyces* actúa más rápido y con menor concentración de esporas.

Literatura Citada

- Aragón, R. E. 1993. *Potencial reproductivo y virulencia de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Hypomycetes) y su incidencia natural sobre broca del café Hypothenemus hampei Ferr. (Coleóptera: Scolytidae) en la Costa de Oaxaca*. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México. 93 pp.
- CESAVERGO (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guerrero). 2011. Programa de trabajo de la campaña “Manejo fitosanitario del cocotero”, a operar con recursos del componente de sanidades del programa de prevención y manejo de riesgos 2011 en el estado de Guerrero. Disponible en: cesavegro.org.mx/?page_id=218. (Fecha de consulta: 30-III-2017).
- Domínguez, C. E., López, A. J. I., Castillo, G. R. y B. P. Ruíz. 1999. *El cocotero Cocos nucifera L. Manual para la producción en México*. INIFAP. Centro de investigación regional Golfo Centro, Campo experimental Huimanguillo. Libro técnico núm. 6. Tabasco. México. 132 pp.
- Falguni-Guharay y C. Pascal. 2004. Control biológico ayer, hoy y siempre. Pp. 11–23. In: M. Carballo y G. Falguni. (Eds.). *Control biológico de plagas agrícolas*. Serie Técnica Manual Técnico N° 53. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE) Managua Nicaragua
- Lagunes, T. A. y N. M. Vásquez. 1994. El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 159 pp.
- Ovando, C. M. E., Serrano, A. V., Ríos, L. T., Ariza, F. R. y M. F. Barbosa. 2010. *Manejo fitosanitario del cocotero en la Costa de Oaxaca*. Folleto técnico Núm. 26. Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Santo Domingo Barrio Bajo, Etla, Oax. México. 71 pp.

- Pariona, N., Castellanos, P. y E. León. 2007. Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). *Revista Peruana de Biología*, 14(2): 253–257.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2012. Anuario estadístico 2010. Sistema de Información Agropecuaria-SAGARPA. México, D. F.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2013. Problemas fitosanitarios del cocotero en México. Disponible en: www3.diputados.gob.mx/camara/content/.../file/Prob_fitos_cocotero_Colima.pdf. (Fecha de consulta: 30-III-2017).