

EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE HONGOS Y NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LA MORTALIDAD DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Jaime Ruiz-Vega✉, Carlos I. Cortés-Martínez y María E. Silva-Rivera

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca. Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán Oax., 71230.

✉Autor de correspondencia: jvega@ipn.mx

RESUMEN. El control de plagas edáficas se realiza generalmente con agroquímicos de alto poder residual y toxicidad. Tal es el caso del control de las larvas conocidas como “gusanos de alambre” (*Agriotes* sp., Elateridae), el cuales ha cobrado importancia en los Valles Centrales de Oaxaca ante la disrupción del equilibrio ecológico asociado al uso de insecticidas de amplio espectro y el monocultivo del maíz. Una opción para su control sostenible es utilizar hongos y nematodos entomopatógenos, La acción conjunta de estos agentes puede incrementar la eficiencia de los nematodos para invadir larvas con alta tolerancia a éstos. En este estudio, la aplicación diferida en tiempo (4 días) de los hongos y nematodos disminuyó la tasa de penetración de *Steinernema glaseri*, pero no el porcentaje de mortalidad (MOR) de larvas de *Tenebrio molitor*, insecto modelo del gusano de alambre. Por sí solo, el hongo *Metarhizium anisopliae* fue más efectivo que *Beauveria bassiana*. Se observó un efecto sinérgico entre *Steinernema glaseri* y *B. bassiana*, ya que al aplicar el nematodo a los 4d después del hongo, incrementó significativamente la MOR. Sin embargo, *S. glaseri*, por sí solo, tuvo una MOR estadísticamente igual a la obtenida con la combinación hongo-nematodo.

Palabras clave: Gallina ciega, gusano de alambre, control biológico, maíz.

Effects of different application times of entomopathogenic fungi and nematodes on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae

ABSTRACT. The control of soil insect-pests is usually performed with chemicals of high toxicity and residual power. Such is the case of the control of larvae known as "wireworms" (*Agriotes* sp., Elateridae), which have gained importance in the Central Valleys of Oaxaca because of the disruption of the ecological balance associated with using broad-spectrum insecticides and maize monoculture. One option for sustainable control is to use entomopathogenic fungi and nematodes, which joint action can increase the efficiency of nematode larvae to invade insect species with high tolerance to these. In this study, the delayed application time (4 days) of fungi and nematodes decreased the rate of penetration of *Steinernema glaseri*, but not the percent mortality (MOR) of *Tenebrio molitor* larvae, a model insect for wireworms. By itself, the fungus *Metarhizium anisopliae* was more effective than *Beauveria bassiana*. A synergistic effect between *Steinernema glaseri* and *B. bassiana* was observed as the MOR increased significantly when the nematodes were applied 4d after the fungi. Nevertheless, *S. glaseri* alone produced a MOR statistically equal to that obtained with the fungus-nematode combination.

Keywords: White grubs, wireworms, biological control, maize.

INTRODUCCIÓN

Algunas de las plagas agrícolas que atacan distintos cultivos en Oaxaca son las larvas conocidas como “gallinas ciegas” (*Phyllophaga* y *Anomala* (Ruiz-Vega *et al.*, 2003; Aquino, 2003)), gusanos de alambre (Elateridae), así como el gusano cogollero (Noctuidae), los cuales han cobrado mayor importancia ante la disrupción del equilibrio ecológico (Jackson, 2000). En los Valles Centrales de Oaxaca se cultivan anualmente unas 108,000 ha de maíz, por lo cual es el cultivo más extensamente sembrado. Además de limitantes como lluvia errática y suelos pobres, el maíz de temporal se ve afectado por plagas edáficas de los géneros, además de *Melanothus* sp. y *Agriotes* sp.

Los efectos sobre el rendimiento de semillas se reflejan en pérdidas promedio del 30 al 50 %. Una opción para su control sostenible es utilizar hongos (Rodríguez *et al.*, 2005) y nematodos

entomopatógenos (NEP), organismos benéficos que parasitan a sus larvas y producen descendencia que puede volver a infectar otras larvas (Ruiz *et al.*, 2003).

En el caso de los hongos, las esporas que producen pueden germinar sobre los insectos e invadirlos, provocando su muerte. Los infectivos juveniles (IJ) de los NEP penetran larvas de distintas especies para reproducirse, ocasionando la muerte del insecto por septicemia. Después de 2-3 ciclos reproductivos abandonan el cadáver para buscar nuevos hospederos. Los IJ pueden suspenderse en agua y aplicarlos a insectos plaga o formularse en reservorios que los contengan, tales como los pellets de tierra de diatomeas (TD).

La acción conjunta de hongos y nematodos puede incrementar la habilidad de los nematodos para invadir larvas con alta tolerancia (Ruiz *et al.*, 2012), tales como larvas de estadios superiores o aquellas con mecanismos de defensa más eficientes (Ruiz *et al.*, 2000). En consecuencia, en esta investigación se evaluó la interacción entre nematodos y hongos entomopatógenos, a fin de determinar el periodo de interacción óptima entre especies de nematodos y hongos para el control de plagas edafícolas en Oaxaca.

MATERIALES Y MÉTODO

A fin de evaluar la posible sinergia o antagonismo entre hongos y nematodos entomopatógenos, se inocularon larvas de último estadio de *Tenebrio molitor*, un insecto modelo del gusano de alambre, con los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Ma) ó *Beauveria bassiana* (Bb) a una dosis de 1×10^6 esporas/caja en dos cajas Petri por especie. Primero se aplicaron las esporas en suspensión acuosa al papel filtro, depositando enseguida 15 larvas de último *Tenebrio molitor* por caja. Los hongos provienen de la colección del CIIDIR Sinaloa, *B. bassiana* cepa B9cog y *M. anisopliae* cepa M1cog.

El nematodo *Steinernema glaseri* (Sg) cepa NJ-43 se aplicó a razón de 4500 IJ por caja (300 IJ/larva) a los 4 y 8 días después de la infección con los hongos. En otras dos cajas se aplicó solo el nematodo en el día 1. Antes de aplicar los nematodos, en cinco larvas escogidas al azar, se evaluó la mortalidad ocasionada por los hongos a los 4 y 8 d después de aplicarlos; si la larva no se movía al contacto con una aguja de disección, se consideraba muerta. Para esto, después de dos días de aplicados los NEP, se diseccionaron, incluyendo cinco larvas tratadas solamente con nematodos, en Pepsina, previa incubación a 38 °C por 4 horas y se contabilizaron los IJ que penetraron. La mortalidad de las 10 larvas restantes de cada caja se evaluó de manera visual 4 días después. Las larvas muertas se colocaron en trampas White para verificar la producción de nematodos. El experimento se realizó por duplicado bajo temperaturas promedio de 23.5 ± 1.3 °C, utilizando el paquete SAS versión 9.1 para realizar el ANOVA y comparación de medias por la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la columna de mortalidad debida al hongo ó al nematodo (M x H ó N inicial) del Cuadro 1, se tiene que a los 4d después de aplicados, *Ma* produjo 100 % de MOR mientras que *Bb* alcanzó sólo un 16.5 %. A los 8d por si solo *Ma* llegó al 100 %, mientras que al aplicar sólo *Bb* se obtuvo un 66.5 %, diferente estadísticamente de 16.5 %; sin embargo, *Sg* por si sólo obtuvo 95 % de MOR, resultado que no difirió significativamente del % de MOR obtenido con *Ma*. Entonces, *Ma* y *Sg* produjeron el mayor nivel de MOR a lo 4d, seguidos por *Sg*, mientras que *Bb* produjo el menor % de MOR. En estudios similares los tiempos de control medios han variado de 6-7 d para hongos (Gabarty *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2010) y de 3-7 d para nematodos (Ruiz-Vega *et al.*, 2003), lo cual indicaría que la cepa de *Ma* era muy virulenta contra *T. molitor* o que no se evaluó objetivamente la mortalidad.

Cuadro 1. (M x H o N): Mortalidad (M) inicial por los hongos (H) *M. anisopliae* (Ma), *B. bassiana* (Bb) o el nematodo (N) *S. glaseri* (Sg) a los 4 u 8 días antes de aplicar el N, M por efecto combinado de M x H + N y penetración de infectivos juveniles (PIJ).

Hongo	Nematodo	Oportunidad del N (días)	M x H o N (%) inicial	M x H + N (%)	PIJ x larva
Ma	Sg	4	100.0 a*	100 a	5.3 b
Bb	Sg	4	16.5 b	100 a	5.0 b
Ma	Sg	8	100.0 a	100 a	7.2 ab
Bb	Sg	8	66.5 a	90 a	9.0 a
0	Sg	1	95.0 a		11.0 a

*Prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad; tratamientos con la misma literal dentro de columnas no son estadísticamente diferentes de los demás.

Al combinar el nematodo con los hongos, en ambas oportunidades y con cualquier especie de hongo, se obtuvieron altos niveles de MOR no diferentes entre sí (M x H + N). Sin embargo, cuando se aplicó Sg a los 4 d después de Bb, el grado de MOR incrementó de 16.5 a 100 %, lo que indicó que existió sinergia entre ambos agentes entomopatógenos, mientras que aplicando 8 d después hubo un incremento no significativo de 66.5 a 90 %. En cambio, *M. anisopliae* ya había controlado casi al 100 % de las larvas por si solo tanto a los 4 como a los 8 d. Un estudio de laboratorio y de invernadero, donde se evaluó la interacción entre cuatro nematodos y dos hongos entomopatógenos, concuerda con estos resultados; las especies de NEP fueron aplicadas después de los hongos a diferentes tiempos; la aplicación de solo *B. bassiana* y *M. anisopliae* no redujo la población de larvas de tercer estadio de *Cyclocephala lurida* Bland (Martínez-Hernández *et al.*, 2015). En laboratorio se han observado interacciones aditivas entre *H. megidis* y *B. bassiana*, y entre *H. bacteriophora* y *B. bassiana* o *M. anisopliae* en la mayoría de las combinaciones. Sin embargo, el efecto combinado no fue significativamente diferente para las aplicaciones simultáneas de nematodos u hongos o realizadas en diferentes tiempos (Wu, *et al.*, 2014).

De acuerdo a Ansari *et al.* (2006, 2008), la aplicación combinada de hongos y NEP ha producido mayores porcentajes de MOR en varias especies de escarabeidos, es decir se ha observado un efecto sinérgico entre ambos entomopatógenos. Éste podría atribuirse a una condición de “estrés” causada por uno de los patógenos sobre las larvas, la cual facilita al otro agente infectarlas. También Wu *et al.* (2014) estimaron el efecto de combinar hongos y nematodos como equivalente a un tratamiento con el insecticida imidacloprid. Sin embargo, en el presente estudio el nematodo *S. glaseri* por si solo tuvo un porcentaje de control estadísticamente igual al obtenido con la combinación hongo-nematodo, lo cual indica que éste nematodo no requiere de la participación de otro organismo para producir altos porcentajes de MOR en larvas de *T. molitor*. Koppenhofer y Grewal (2005) concluyen que en la mayoría de los casos la eficacia de un organismo entomopatógeno ya es alta, por lo cual hay poco margen para mejorarla al combinarlo con otro.

El número promedio de IJ que penetraron por larva a los 4 d mostró diferencias significativas (Tukey al 0.05) con relación a aplicar únicamente el N, lo cual indica que existió un efecto de exclusión del H sobre el N, ya que el porcentaje de penetración fue significativamente menor con Sg inoculado a los 4 d sobre Bb que cuando Sg se inoculó a los 8 d (Cuadro 1), lo cual concuerda con resultados de Correa-Cuadros *et al.*, 2016. A los 8 d, aun cuando tendió a haber una mayor penetración, no se registraron diferencias significativas para el número de IJ por larva con ninguno de los hongos evaluados. Sin embargo, los IJ presentes dentro de las larvas inoculadas a los 8d fueron significativamente mayores, o iguales a las registradas usando solamente Sg, que los presentes al inocularlas a los 4 d. La penetración de IJ en larvas infectadas por hongos no implica que vayan a producir progenie, pero puede ocurrir. Resultados de Morris *et al.* (2015) y Wuet *et*

al. (2014) apoyan la hipótesis de una mayor tasa de penetración en larvas con más días de exposición al hongo; en este caso, a medida que se aumentaba el tiempo de exposición de larvas de *T. molitor* al hongo *Beauveria* sp., mayor era el número de nematodos que penetraban las larvas, sin que esto tuviera relación con la producción de juveniles infectivos por larva. Sin embargo, Molina *et al.* (2007) concluyen que aun cuando la combinación tuvo efectos sinérgicos, la producción de IJ disminuyó.

CONCLUSIONES

El hongo *Metarhizium anisopliae* causó mayor mortalidad de larvas de *T. molitor* que *Beauveria bassiana*. Se observó un efecto sinérgico entre *Steinernema glaseri* y *B. bassiana* aplicando el nematodo 4 d antes, ya que sin el nematodo el hongo habría producido una MOR baja. *S. glaseri* por si solo tuvo un porcentaje de control ligeramente menor pero estadísticamente igual al obtenido con la combinación hongo-nematodo. La mejor oportunidad para aplicar el nematodo *S. glaseri* en combinación con *B. bassiana* fue a los 8 días de aplicar el hongo, ya que con ésta se observó un mayor porcentaje de penetración de IJ, es decir a los 4 d todavía los nematodos penetraron las larvas en menor cuantía, evidenciando un efecto antagónico de éste hongo contra los IJ.

Agradecimientos

A la SIP-IPN por el apoyo económico otorgado, proyecto no. 20160475.

Literatura Citada

- Aquino, B. T. 2003. *Manejo intergrado de gallina ciega Phyllophaga spp. En maíz de temporal*. Tesis de Maestro en Ciencias, ITAO No. 23, Nazareno Xoxocotlán, Oax. 91 pp.
- Ansari, M. A., Shahb, F. A., Tirryc, L. and M. Moensa. 2006. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 39(3): 453–459.
- Ansari, M. A., Shahb, F. A. and T. M. Butt. 2008. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(3): 340–347.
- Correa-Cuadros, J. P., Sáenz-Aponte, A. and M. X. Rodríguez-Bocanegra. 2016. In vitro interaction of *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Beauveria bassiana* Bb9205 with *eterorhabditis bacteriophora* HNI0100 for the control of *Plutella xylostella*. *SpringerPlus*. 5(1): 2068. doi:10.1186/s40064-016-3745-5.
- Gabarty, A., Salem, H. M., Fouda, M. A., Abas, A. A. and A. A. Ibrahim. 2014. Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.) *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7: 95–100.
- Jackson, T. 2000. Corn growing in crisis in the valleys of Mexico. *Scarab Biocontrol news* 5: 3–4.
- Koppenhofer, A. M. and P. S. Grewal. 2005. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. Pp. 362–381. In: P. S. Grewal, R. U. Ehlers, D. Shapiro-Iian. (Eds.). *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Martínez-Hernández, A., Alatorre-Rosas, R., Guzmán-Franco, A. W. and E. Rodríguez-Leyva. 2015. Effect of dual inoculation with nematodes and fungal pathogens on the survival of *Phyllophaga polyphylla* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) *Biocontrol Science and Technology* (25)11: 1221–1232.
- Molina, A. J. P., Samuels, R. I., Machado I. R. and C. Dolinski. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 87–192.

- Morris, E. E., Jensen, A. B., Wynns, A. A. and J. Eilenberg. 2015. Co-infection interactions between entomopathogenic fungi and *Steinernema feltiae* using *Tenebrio molitor* as a model system. In: 48th Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Vancouver, Canada, 9-13 August.
- Qin, Yi., Sheng-Hua, Ying., Ying, Chen., Zhi-Cheng, Shen. and Feng Ming-Guang. 2010. Integration of Insecticidal Protein Vip3Aa1 into *Beauveria bassiana* Enhances Fungal Virulence to *Spodoptera litura* Larvae by Cuticle and *Per Os* Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14): 4611–4618.
- Rodriguez-Del Bosque, L. A., Silvestre, F., Hernandez, V. M., Quiroz, H. and J. E. Throne. 2005. Pathogenicity of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* Against *Phyllophaga Crinita* and *Anomala Flavipennis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Entomological Science*, 40: 67–73.
- Ruiz, V. J., Aquino, B. T and H. K. Kaya. 2000. *Controlling white grubs (Phyllophaga spp.) with entomopathogenic nematodes and fungi in Oaxaca, México*. P. 84. In: Abstracts del XXXIII congreso de la Society for Invertebrate Pathology, agosto 13-18 del 2000. Guanajuato, Gto.
- Ruiz, V. J., Aquino, B. T., Kaya, H. K. y P. Stock. 2003. Colecta y evaluación de nematodos entomopatógenos para el control de gallinas ciegas *Phyllophaga vetula* (Horn) en Oaxaca, México. *Folia Entomológica Mexicana* 42(2): 167–175.
- Ruiz Vega, J., Aquino Bolaños, T., Silva-Rivera, M. E. y S. P. Girón. 2012. Control integrado de la gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con agentes entomopatógenos en Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola* 12(3): 609–616.
- Wu, Shaohui., Roger, R. Youngman, Loke, T. Kok, Curt, A. Laub. And G. Douglas. Pfeiffer. 2014. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. *Biological Control* Volume 76: 65–73.