

USO DE *Metarhizium anisopliae* Y *Cordyceps bassiana* (ASCOMYCETES) PARA EL CONTROL DE *Drosophila suzukii* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) EN CULTIVO DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*)

Juan José Peralta-Manzo¹, Roberto Lezama-Gutiérrez¹, Heraclio Castrejón-Agapito¹, Janneth Cárdenas-de la Mora¹, Oscar Rebolledo-Domínguez¹. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. KM 40 Carretera Colima-Manzanillo, C.P. 28930, Tecomán, Colima, México. rlezama@ucol.mx, juan_peralta@ucol.mx.

RESUMEN: Se evaluó el efecto *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (Ma 198) y *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill. (Cb 249) para el control de *Drosophila suzukii* Matsumura en cultivo de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.), a la a la dosis de 2×10^{13} conidios/ ha, más el testigo sin tratamiento, para el control de adultos de *D. suzukii* y el daño en frutos en campo. Los hongos se aplicaron quincenalmente cinco veces, bajo un diseño de bloques completos al azar. Se instaló un sistema de trapeo para la captura de adultos, se cuantificó la fruta sana, fruta dañada y frutos ponchados. Cb y Ma controlaron el 60.3 y 37 % la densidad de adultos, disminuyeron un 57.1 y 28.2 % el porcentaje de fruta ponchada, incrementaron en un 52 y 39 % el porcentaje de fruta sana y disminuyeron en un 71.1 y 57 % la fruta dañada, respectivamente. Cb 249 tiene potencial como agente de control de *D. suzukii*, en campo.

Palabras clave: *Drosophila suzukii*, Zarzamora, Control Biológico

Use of *Metarhizium anisopliae* and *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) to Control of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Blackberry Orchard (*Rubus fruticosus*)

ABSTRACT: We evaluated the effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (Ma 198) and *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill. (Cb 249), for the control of *Drosophila suzukii* Matsumura in orchard of blackberry (*Rubus fruticosus* L.), the dose of 2×10^{13} conidia/ha, more the witness without treatment, for the control of adult *D. suzukii* and damage to fruit in the field. The fungi were applied for nightly, five times, under a design of a randomized complete block installed a trapping system for the capture of adults, we quantified the whole some fruit, damaged fruit and fruits strike outs. Cb and Ma controlled the 60.3 and 37% the density of adults, decreased by 57.1 and 28.2 % percent of fruit busted, increased by 52 % and 39 % the percentage of healthy fruit and fell by 71.1 and 57% damaged fruit, respectively. CB 249 has been identified as a potential control agent *D. suzukii*, in field.

Key words: *Drosophila suzukii*, Blackberry, Biological control

Introducción

La mosca de las alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) a diferencia de otras moscas de vinagre, cuentan con un ovopositor dentado y durante el proceso de la ovoposición dentro del fruto, les causa daño (Lee *et al.*, 2011). Posterior a la infestación, pueden llegar al fruto otros insectos, como *Drosophila melanogaster* Meigen, los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. y *Rhizopus* spp., que favorecen el deterioro de la fruta (Mortelmans *et al.*, 2012). El daño puede alcanzar hasta un 80 % de pérdida de la fruta (Walsh *et al.*, 2011).

Para el control de *D. suzukii* se utilizan insecticidas químicos (Yee y Alston, 2011). Sin embargo, este método ocasiona un grave problema, debido a que afecta a los polinizadores (Walsh *et al.*, 2010). Se reportan el uso de los insecticidas Malathion (Organofosforado), Zeta-cipermetrina (Piretroide) y Espinetoram (Espinosina) (Van Steenwyk, 2011). También, se utilizan trampas cebadas con atrayentes alimenticios fermentados, para capturar las especies de *Drosophila*, como una forma de monitoreo y control de la misma; los atrayentes más utilizados son vino, vinagre de manzana, etanol y

ácido acético (Landolt *et al.*, 2011) y las trampas Haviland, Droso-trap y otros recipientes plásticos con perforaciones, que presenta más capturas de adultos de *D. suzukii* (Lee *et al.*, 2012).

Del mismo modo, se menciona una falta de información sobre los enemigos naturales (Chabert *et al.*, 2012). Brown *et al.* (2011) reportan al ectoparásito de pupa *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (= Dubius, Hymenoptera: Pteromalidae); en Japón se encuentran a los parasitoides de larvas *Ganaspis xanthopoda* Ashmead (Hymenoptera: Figitidae), *Asobara tabida* Nees y *Asobara japónica* Belokobylskij (Hymenoptera: Braconidae) en campo (Mitsui *et al.*, 2007). Chabert *et al.* (2012) evaluaron la efectividad de dos parasitoides de pupa (*P. vindemmiae* y *Trichopria* cf. *Drosophilae*) y tres de larvas (*Leptopilina heterotoma* Thomson, *L. boulandi* Barbotin, Carton y Kelner-Pillault (Hymenoptera: Eucoilidae) y *A. tabida*) en *D. suzukii* y reportan que los parasitoides de pupas alcanzan porcentajes de parasitismo de hasta 57 %.

Por su parte, Lee (2013) documenta a los depredadores *Orius insidiosus* Say (Hemiptera: Anthocoridae) y *Atheta coriaria* Kraatz (Coleoptera: Staphylinidae); este autor menciona que se han llevado a cabo experimentos con los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae), *Steinernema feltiae* (Filipjev) y *S. carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), pero con porcentajes de infección baja.

En México Naranjo-Lázaro *et al.* (2012) evaluaron la susceptibilidad en laboratorio de adultos de *D. suzukii* a tres cepas del hongo *Isaria fumosorosea* Wize (Ifr) (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Cordycipitaceae) y a una de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (Clavicipitaceae) y reportan hasta un 85 % de mortalidad con *I. fumosorosea* y 12.5 % con *M. anisopliae*, respectivamente; así mismo, Naranjo-Lázaro *et al.* (2013) utilizaron a *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill., con un 38.8 %. Hasta el momento no se tiene conocimiento sobre la evaluación de hongos entomopatógenos en condiciones de campo, tendientes a disminuir la densidad de la plaga y el daño en frutos, causado por *D. suzukii* en el cultivo de zarzamora.

Materiales y Método

Lugares: El trabajo de investigación se desarrolló en dos partes: una en el Laboratorio de Control Biológico No. 1, de Patología de Insectos y Ácaros de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad de Colima, ubicado en el Km 40 de la carretera Colima-Manzanillo en Tecmán, Colima, México y la segunda parte en una parcela con cultivo de zarzamora, variedad Tupy con una edad de 4 años, en el Rancho Casa Grande, propiedad del Ing. Luis Ramírez Arellano, ubicada en el Ejido Quesería, Colima, México.

Los hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* cepa Ma 198 y *C. bassiana* cepa 249, que se utilizaron en esta investigación, están depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad de Colima. Ellos fueron obtenidos de adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), en el estado de Colima en 2010. Las cepas se multiplicaron en agar dextrosa Sabouraud (Decton Dickinson, Bioxon, México), enriquecido con 1 % (p/v) de extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.) y con 500 ppm de cloranfenicol (Merck®, México) como antibiótico, se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 70 % HR y 12 horas luz/oscuridad durante 21 días (Sun y Liu, 2006). Lo anterior, para obtener inóculo para la producción masiva de los hongos en granos de arroz. Una vez obtenidos los conidios se secaron durante ocho días en una cámara de flujo laminar (Labconco Calsse II, Modelo 36208-36209, U.S.A) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y se almacenaron a 5°C hasta su uso (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Tratamientos. Se utilizaron tres tratamientos, tratamiento uno, el testigo, el cual consistió en las prácticas realizadas por el productor sin aplicación de hongos; tratamiento dos, que fueron las

prácticas que realiza el productor más la aplicación quincenal de *M. anisopliae* cepa 198; tratamiento tres las prácticas del productor más la aspersión quincenal de *C. bassiana* cepa 249. Se realizaron cinco aspersiones, una cada 15 días, realizadas por la tarde (17:00 h), con mochila de motor (EFCO, Modelo IS2026, Italia), los hongos se aplicaron en suspensión acuosa con adherente agrícola (Inex-A) (500 mL/ha), a la concentración de 1×10^8 conidios/ mL. El experimento se realizó del 28 de septiembre del 2013 al 30 de noviembre de 2013.

Diseño experimental. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño de bloques completos al azar, con tres tratamientos y seis repeticiones; cada repetición estuvo formada por cinco surcos de 10 m de longitud y dos m de separación entre ellos y la parcela útil formada por el surco central, eliminando un metro al inicio y al final para evitar efecto de orilla.

Variabes. Se registró el número de adultos capturados por trampa que consistió en un recipiente plástico de un litro de capacidad perforada con 10 orificios de menos de 0.5 cm de diámetro cada uno, cebada con vinagre de manzana (150 mL), levadura (3 g), porcentaje de frutos dañados; para lo cual se seleccionaron 60 frutos al azar de la parcela útil y se determinaron los frutos dañados (ponchados) con respecto al total, el peso de los frutos sanos; fue el peso total de los frutos que se cortaron para empaque y peso de fruta de proceso (desecho), la cual estuvo constituida por la fruta que no pasó el control de calidad y tiene imperfecciones, esto se realizó cada ocho días. Del mismo modo, se determinó la efectividad con cada una de las variables, con la fórmula: $E = A - B / A \times 100$, en donde: E = Efectividad; A = datos del testigo y B = dato del tratado (Goettel e Inglis, 1997).

Análisis Estadístico. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y pruebas de media por Tukey al 0.05 de probabilidad, previa transformación de valores relativos mediante el arc sen \sqrt{p} , utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 1997).

Resultados y Discusión

Porcentaje de frutos de zarzamora ponchados por *D. suzukii*. Los análisis de varianza, para el porcentaje de frutos de zarzamora ponchados por *D. suzukii*, mostraron efectos altamente significativos ($p < 0.05$) en la primera, tercera, cuarta y quinta aplicación (Cuadro 1). Con respecto al efecto de los bloques, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$). La prueba de medias entre los tratamientos para la primera aplicación, indicó el mayor porcentaje de frutos ponchados (53.80 %) en el testigo. *C. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron el menor porcentaje y sin diferencia entre ellos; en tanto que en la tercera, cuarta y quinta aplicación de los tratamientos, el testigo y Ma 198 mostraron el mayor porcentaje de frutos dañados y con el menor fue *C. bassiana* alrededor de 22.45 y 26.5 % de frutos ponchados (Cuadro 1).

Densidad de adultos de *D. suzukii*, fruta sana y fruta dañada de zarzamora. La efectividad de *C. bassiana* y *M. anisopliae*, sobre la disminución de la densidad de adultos de *D. suzukii*, resultó diferente entre ambas especies de hongos; *M. anisopliae* presentó una efectividad de máxima de 37 %, mientras que *C. bassiana* un 60.3%. Para la reducción del daño frutos *M. anisopliae* mostró una efectividad máxima del 55.7 % y *C. bassiana* un 71.1 %; en relación a la efectividad de los hongos sobre el incremento de fruta sana cosechada, *M. anisopliae* presentó un máximo de 39.3 %, *C. bassiana* un 52 %; en cuanto a la reducción de frutos ponchados el tratamiento *M. anisopliae* presentó una efectividad máxima del 28.2 % y *C. bassiana* un valor máximo del 57.1 %, con respecto al testigo (Cuadro 2).

Cuadro 1. ANDEVA y porcentaje de frutos de zarzamora ponchados por *D. suzukii*, bajo el efecto de *C. bassiana* y *M. anisopliae*.

Tratamientos	Número de Aplicaciones*					
	0 28/Sep/13	1 5/Oct/13	2 19/Oct/13	3 2/Nov/13	4 16/Nov/13	5 30/Nov/13
Testigo	40.93 a	53.80 a	51.83 a	36.87 a	35.70 a	32.20 a
Cb 249	38.80 a	40.73 b	45.97 a	26.50 b	22.45 b	22.45 b
Ma 198	41.90 a	43.07 b	48.87 a	35.70 a	34.53 a	28.40 a
DMS	12.021	8.4569	6.1072	4.815	6.5625	4.865
F trat	0.26	10.21	3.47	20.90	18.78	15.34
P	0.7749	0.0038	0.0718	0.0003	0.0004	0.0009
F bloques	0.21	0.69	0.31	1.00	0.76	1.00
P	0.9498	0.6399	0.8948	0.4651	0.5985	0.4651
C.V (%)	18.73	11.65	7.89	9.21	13.42	11.10

*Medias transformados mediante $\arcsen \sqrt{p}$; Medias entre columnas con diferente letra indican diferencia estadística, según prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Cuadro 2. Efectividad de *M. anisopliae* y *C. bassiana* para el control de la densidad de adultos de *D. suzukii* y el daño en frutos de zarzamora.

Número de aplicación tratamientos	Reducción de la densidad (%)		Reducción de fruta dañada (%)		Incremento de fruta sana (%)		Reducción de frutos pochados (%)	
	Cb 249	Ma 198	Cb 249	Ma 198	Cb 249	Ma 198	Cb 249	Ma 198
1 (5/Oct/13)	0.0	28.6	23.0	30.2	52	39.3	33.4	28.2
2 (19/Oct/13)	45.3	28.4	16.5	3.2	18.4	2.7	16.2	8.1
3 (2/Nov/13)	57.3	25.6	52.0	21.6	21.6	21.0	45.5	4.6
4 (16/Nov/13)	59.8	37.0	61.6	54.5	4.7	0.0	57.1	9.4
5 (30/Nov/13)	60.3	19.0	71.1	55.7	18.5	17.2	50.0	22.3
Media	44.5±6.9	27.7±5.7	44.8±21.1	33±19.7	23±15.4	16±13.9	40.4±14.2	14.5±9

En el presente trabajo de investigación se puso a prueba la hipótesis de que *M. anisopliae* y *C. bassiana* afectan la densidad de adultos de *D. suzukii* y reducen el daño en frutos causado por la hembra de *D. suzukii*, en el cultivo de zarzamora, bajo condiciones de campo. Los resultados obtenidos mostraron que *C. bassiana* cepa Cb 249 y *M. anisopliae* cepa Ma 198 fueron capaces de reducir la densidad de adultos hasta un 60.3 % y 37 % en relación al testigo, respectivamente. Del mismo modo, se observó que al utilizar estas cepas y bajar la densidad de adultos, se logra reducir el daño en la fruta de hasta un 71.1 % con *C. bassiana* y 55.7 % en la parcela que se aplica *M. anisopliae* cepa Ma 198. También, se logra reducir hasta un 57.1 % la cantidad de fruta dañada “frutos pochados” directamente por las hembras de *D. suzukii* con *C. bassiana* y en un 28.2 % con *M. anisopliae*. Por lo que se acepta la hipótesis planteada originalmente.

No obstante, se hace necesario mencionar que este insecto presenta una alta movilidad horizontal y vertical dentro de las parcelas (Mitsui *et al.*, 2010), lo anterior, pudiera explicar el por qué en las aplicaciones cero, una, cuatro y cinco, no se detectó diferencias entre el número de adultos atrapados en los tratamientos. Lo anterior, al inicio del experimento (sin aplicación), con una, cuatro y

cinco aplicaciones de los tratamientos, no se observaron diferencias para el número de adultos de *D. suzukii* capturados. Posiblemente debido a que en las dos primeras semanas de iniciada la cosecha, la población de adultos inicia su incremento en la densidad; lo mismo se detecta en las dos últimas fechas en las que se observa una disminución en la misma. Lo anterior, en respuesta al incremento de la maduración de la fruta y por lo tanto un aumento en la cantidad de sitios de ovoposición y reproducción de la plaga. Walsh *et al.* (2011) mencionan que los frutos son susceptibles a partir de que inician la maduración.

En este trabajo se puede remarcar que por la alta movilidad que presentan los adultos de *D. suzukii* en el cultivo de zarzamora, sería muy recomendable seleccionar *C. bassiana* mediante aspersión en todo el cultivo a fin de que los adultos se inoculen e infecten por el hongo al momento de la aspersión, ya que con el uso de este hongo se logra una reducción de fruta dañada de hasta un 71 % y de frutos ponchados 52 %, en comparación con el testigo. Con la presente investigación se sienta el precedente de la utilización de *M. anisopliae* y *C. bassiana*, para el control de la densidad de adultos de *D. suzukii* y su daño en frutos de zarzamora, en condiciones de campo y que con la elección de la cepa *C. bassiana* Cb 249 es posible reducir el daño de frutos ponchados hasta en un 52 %.

Literatura Citada

- Brown, P. H., Shearer, P. W., Miller, J. C. y H. M. A. Thistlewood. 2011. The discovery and rearing of a parasitoid (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* in Oregon and British Columbia. ESA annual Meetings, Reno NV, USA.
- Chabert, S., Allemand, R., Poyet, M., Eslin, P. y P. Gibert. 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control*, 63: 40–47.
- Goettel, M. S. e G. D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes, pp: 213-249. Chapter V-3 in: *Biological Techniques Manual of techniques in insect pathology*. Lacey, L. A. (Ed.), Academic Press, New York.
- Landolt, P. J., Adams, T., y H. Rogg. 2011. Trapping spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) with combinations of vinegar and wine, and acetic acid and ethanol. *Journal of Applied Entomology*, 136: 148-154.
- Lee, J. C., Bruck, D. J., Dreves, A. J., Vogt, H., Loriatti, C. y P. Baufeld. 2011. In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Management Science*, 67: 1349–1351.
- Lee, J. C., Burrack, H. J., Barrantes, L., Beers, E. H., Dreves, A. J., Hamby, K. A., Haviland, D. R. y R. Isaacs. 2012. Evaluation of monitoring traps for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1350-1357.
- Lee, J. 2013. Predators and pathogens of spotted wing *Drosophila*. *IOBC-NRS Newsletter*, 35(1): 1.
- Mitsui, H., Van Achterberg, K., Nordlander, G. y M. T. Kimura. 2007. Geographical distributions and host associations of larval parasitoids of frugivorous Drosophilidae in Japan. *Journal of Natural History*, 41:25-28.
- Mitsui, H., Beppu, K. y M. T. Kimura. 2010. Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. *Entomology Science*, 13: 60-67.
- Mortelmans, J., Casteels, H. y T. Beliën. 2012. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A pest species new to Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, 142 (2): 143-146.
- Naranjo-Lázaro, J. M., Mellín-Rosas, M. A., González-Padilla, V. D., Moreno-Carrillo, G., Sánchez-González, J. A. y H. C. Arredondo-Bernal. 2012. Avances en la selección de cepas de hongos

- entomopatógenos como agentes de control microbiano de adultos de *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae). XXXV Congreso Nacional de Control Biológico, Puebla, Pue. 7-9 de noviembre del 2012. Pp. 523-526.
- Naranjo-Lázaro, J. M., Mellín-Rosas, M. A., González-Padilla, V. D. y H. C. Arredondo-Bernal. 2013. Selección de cepas de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de adultos de *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae). XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Oaxaca de Juárez, Oax. 7-8 de noviembre del 2013. Pp. 172-176.
- SAS Institute, Inc. 1997. "SAS/STAT Use's Guide, "Relase 6. 10 ed. SAS Institute Inc; Cary, North Carolina.
- Sun, M. H. y X. Z. Liu. 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic Hypomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathology*, 161: 295-305.
- Van Steenyk, R. A. 2011. Spotted wing *Drosophila* recommendations for sweet cherry. Consultado el 18 de junio en: http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/MISC/2011_Cherry_Spotted_Wing_Drosophila.pdf.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J. y D. J. Bruck. 2010. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 2: 1-7.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee J., Bruck, D. J., Walton V. M., O'Neal, S. D. y G. Z. Frank. 2011. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Integrated Pest Management*, 106: 289-295.
- Yee, W. L. y D. G. Alston. 2011. Behavioral responses, rate of mortality, and oviposition of western cherry fruit fly exposed to Malathion, zeta-cypermethrin, and Spinetoram. *Journal of Pest Science*, 85: 141-151.