

***Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO**

Rebeca Vallejo-González¹, Miguel B. Nájera-Rincón^{2*}, Edmundo Carlos López-Barbosa³ y ⁴John Larsen. ¹Productores de Semilla de Copándaro S.P.R. de R.L. Carr. Copándaro-Chucandiro Km.6 SN. CP 58874. ²Campo Experimental Uruapan, INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, Col Revolución. C.P. 60500, Uruapan, Michoacán. ³Facultad de Biología, UMSNH. Gral. Fco. J. Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, C.P. 58030, Morelia, Michoacán. ⁴Laboratorio de Agroecología, Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco-UNAM). Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex Hacienda de San José de La Huerta. C.P. 58190, Morelia, Michoacán. rebevallejogonzalez@gmail.com *Autor por correspondencia: minaj47@hotmail.com; jlarsen@cieco.unam.mx

RESUMEN: En bioensayo por inmersión se evaluó la patogenicidad y virulencia de tres cepas de hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana* 101, *B. bassiana* 133 y *Metarhizium anisopliae* 201, sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. Por cada cepa se evaluaron cinco densidades de esporas (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4) mL⁻¹. Todos los aislados causaron infección y mortalidad, sin embargo, éstas se incrementaron conforme la densidad aumentó y varió de acuerdo a la cepa. *S. zeamais* mostró mayor susceptibilidad a las cepas de *B. bassiana* 101 y 133 a densidades de 1×10^8 y 1×10^7 registrando 69% y 54% así como 60% y 41% de mortalidad acumulada respectivamente, para ambas densidades la cepa de *M. anisopliae* 201 alcanzó 14% de mortalidad. La cepa de *B. bassiana* 101 registró una DL₅₀ y DL₉₀ de 1.6×10^7 y 5.4×10^8 al sexto día; la cepa 133 obtuvo valores de 3.7×10^7 y 4.8×10^9 al sexto día y para el día 11 fue de 3×10^7 y 3×10^9 .

Palabras clave: *Sitophilus zeamais*, control biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

***Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for the control of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions**

ABSTRACT: We evaluated the virulence and pathogenic potential of three isolates of entomopathogenic fungi, *B. bassiana* 101, *B. bassiana* 133 and *M. anisopliae* 201, against *S. zeamais* using an immersion bioassay technique in the laboratory. Fungi were applied at five conidia densities mL⁻¹ (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4). All isolates caused infection and mortality, but it significantly increased with increased the density, these findings depend of the isolate. *S. zeamais* showed more susceptibility inoculated with isolates *B. bassiana* 101 and 133 at the highest densities (1×10^8 , 1×10^7) with 69%, 54% and 60%, 41% of cumulative mortality respectively, for both densities the isolate of *M. anisopliae* 201 reached 14% mortality. For isolate *B. bassiana* 101, six days after treatment the LD₅₀ and LD₉₀ values were 1.6×10^7 and 5.4×10^8 , for isolate 133 were 3.7×10^7 and 4.8×10^9 , for the eleventh day values were 3×10^7 and 3×10^9 .

Key words: *Sitophilus zeamais*, biological control, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

Introducción

El gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky es considerado una plaga primaria de granos y semillas de maíz almacenado. El insecto se alimenta del endospermo ocasionando una disminución significativa en su capacidad germinativa y valor nutritivo. Por otra parte, su presencia favorece el establecimiento de otras plagas, que en conjunto, crean las condiciones para el desarrollo de hongos que contaminan el producto con micotoxinas y el grano queda inservible para la alimentación (García-Lara *et al.*, 2007) causando pérdidas económicas a nivel mundial.

Existen diversos métodos preventivos y curativos para el control de esta plaga, lo más común es la aplicación de insecticidas sintéticos (White *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha incrementado el uso de métodos naturales en lugar de los químicos por sus efectos negativos sobre el ambiente, salud animal y

humana (Marín-Ruiz y Lozano, 2013), además de la resistencia genética que la plaga ha desarrollado (Pereira *et al.*, 2009; Pérez-Mendoza, 1999).

Entre los métodos naturales, se ha sugerido por su efectividad la aplicación de hongos entomopatógenos (HEP), como *Beauveria bassiana* y *Metathizium anisopliae* para el control de *S. zeamais* (Adane *et al.*, 2010). En los últimos diez años en México la producción y comercialización de micoinsecticidas a partir de esporas de estos hongos ha ido en aumento a escala comercial (Schrank y Vainstein, 2010), sin embargo, no existe en el mercado mexicano un micoinsecticida validado para el control de *S. zeamais*.

Con este trabajo se pretende mostrar el potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control de *S. zeamais* mediante la evaluación de tres cepas comerciales.

Materiales y Método

Identificación y cría de *S. zeamais*. La identificación de machos y hembras de *S. zeamais* se efectuó de acuerdo a los criterios de Ikponmwoza y Ayertey (2009).

La cría se mantuvo en frascos con semilla de maíz quebrada y esterilizada a -4°C durante 48 hrs (Silva *et al.*, 2004) y se mantuvieron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Hongos entomopatógenos. Se evaluaron tres bioinsecticidas comerciales (Cuadro 1). Ninguno antes probado para el control de *S. zeamais*. Se evaluó la pureza del producto y viabilidad de las esporas siguiendo el método sugerido por Nájera-Rincón (2010).

Cuadro 1. Relación de origen de los aislados utilizados en el experimento.

HONGO	NÚMERO DE CEPA	INSECTO HOSPEDERO				
		NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTIFICO	ESTADIO	CULTIVO	LUGAR
<i>B. bassiana</i>	Bb101	Picudo chico de la hoja del maíz	<i>Geraeus senilis</i> Coleoptera : Curculionidae	adulto	Maíz	Cuauhtémoc, Colima.
<i>B. bassiana</i>	Bb133	Gallina ciega	<i>Phyllophaga</i> spp Coleoptera : Melolonthidae	larva	Caña de azúcar	Tepic, Nayarit. Ingenio de Puga
<i>M. anisopliae</i>	Ma201	Picudo chico de la hoja del maíz	<i>Geraeus senilis</i> Coleoptera : Curculionidae	adulto	Maíz	Cuauhtémoc, Colima.

Bioensayo patogenicidad y virulencia. En medio de cultivo (PDA) se sembraron las cepas de los productos comerciales y se mantuvieron en obscuridad a 26°C , transcurridos 20 días se colectaron las esporas con agua destilada y esterilizada más 300 μL de Tween al 0.1%, la solución obtenida se pasó al vórtex durante tres minutos y se ajustó la densidad de esporas en cámara de Neubauer hasta obtener cinco diluciones (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 esporas mL^{-1}). De estas se determinó la viabilidad de las esporas a las 16 hrs siendo para todas mayor al 95%.

Por cada dilución se tomó 1 mL en el cual se sumergió durante 1 min un grupo de quince insectos sin sexar de uno a quince días de edad tomados al azar de la cría. Posteriormente se vertió la solución y los insectos en una caja Petri (3.5 cm de diámetro) con papel filtro con el fin de absorber el exceso de humedad y permitirle a los insectos un segundo contacto con las esporas (Adane *et al.*, 2010). Se selló la caja Petri con cinta Parafilm y se incubó a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sin alimento. Transcurridas 24 hrs cada grupo de insectos se colocó en un recipiente con 30 g de maíz quebrado esterilizado. Se selló el recipiente con una tapadera perforada y así se mantuvieron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Por cada dilución se realizaron seis repeticiones del tratamiento, más un testigo tratado con agua destilada y dispersante (300 μ L Tween al 0.01%). Los conteos de mortalidad se realizaron diariamente hasta el onceavo día a partir de la aplicación del tratamiento. Los insectos muertos, se lavaron por separado en etanol al 70% durante 1 min y se enjuagaron tres veces en agua destilada. Posteriormente, el cadáver se colocó en un recipiente de plástico con papel filtro al cual se agregaron 400 μ L de agua destilada y se mantuvieron en obscuridad a 26°C. Se revisaron diariamente las larvas y aquellas que mostraron formación de micelio, conidióforos y producción de conidios fueron considerados como infectados.

Análisis estadístico. Los porcentajes de mortalidad acumulada fueron transformados con arcoseno, la heterogeneidad de la varianza entre los tratamientos fue corregida con $\log(1 + \text{Asen} \% \text{Mort})$ y sometidos a análisis de varianza de una y dos vías. Las medias de los tratamientos se compararon con la Desviación Mínima Significativa (DMS) con el programa Statgraphics Centurion XV[®] 2006. Se realizó un análisis Probit para estimar la DL₅₀ y DL₉₀ de los aislados con límites de confianza de 95% con el programa Polo Plus 2.0 (2002-2014).

Resultados

Los productos evaluados cumplieron los parámetros de calidad sugeridos por Nájera Rincón (2010). Las tres cepas de HEP ocasionaron infección y mortalidad en adultos de *S. zeamais* en los cuales se observó esporulación en los cadáveres después de su muerte. La mortalidad del grupo control (2%) no mostró micosis. Los resultados del análisis de varianza registraron diferencias significativas entre tratamientos ($P = 0.0000$). El porcentaje de mortalidad acumulada se incrementó a partir del cuarto día después de iniciado el experimento (Fig. 1). Por otra parte, se demostró que hay interacción entre la cepa de HEP y la densidad de esporas ($P = 0.0003$) ya que conforme pasaron los días el porcentaje de mortalidad se acumuló a diferentes tasas dependiendo de la cepa y densidad de esporas (Cuadro 2).

De las tres cepas de HEP, la que ocasionó mayor porcentaje de mortalidad sobre *S. zeamais* fue Bb101 seguida en orden descendente por Bb133 y Ma 201 (Fig. 1). En los tratamientos con *B. bassiana* a las densidades 1×10^8 y 1×10^7 la mortalidad de *S. zeamais* comenzó al tercer día, sin embargo, el pico más alto se registró al cuarto día. Para la cepa Bb101 la mortalidad de insectos al cuarto día a la densidad 1×10^8 fue del 59% mientras que a 1×10^7 fue del 46%, acumulándose gradualmente hasta alcanzar 69% al sexto día y al octavo 54% respectivamente. Por otra parte, para la cepa Bb133 la mortalidad de insectos al cuarto día a la densidad 1×10^8 fue de 48% y a 1×10^7 de 33%, acumulándose hasta un 60% y 41% respectivamente el onceavo día (Fig.1).

Con base en lo anterior, Bb101 en comparación con Bb133 registró un mayor porcentaje de mortalidad en menor tiempo, sin embargo, estadísticamente no fueron diferentes (Fig. 2). Los tratamientos inoculados con la cepa Ma201 registraron un porcentaje de mortalidad máximo del 14% al noveno día (Fig.1). Todas las cepas de HEP registraron los mayores porcentajes de mortalidad acumulada a densidades 1×10^8 y 1×10^7 (Fig. 2). Todas las cepas registraron los menores porcentajes de mortalidad ($\leq 3\%$) a las densidades 1×10^5 y 1×10^4 (Fig. 2). Los resultados del análisis Probit se presentan en el cuadro 3.

Discusión

Bb101 y Ma201 fueron aisladas de un curculiónido, mientras que Bb133 de un melolóntido (Cuadro 1), por lo que se podría suponer que las cepas aisladas a partir de un curculiónido fueran más virulentas a *S. zeamais*

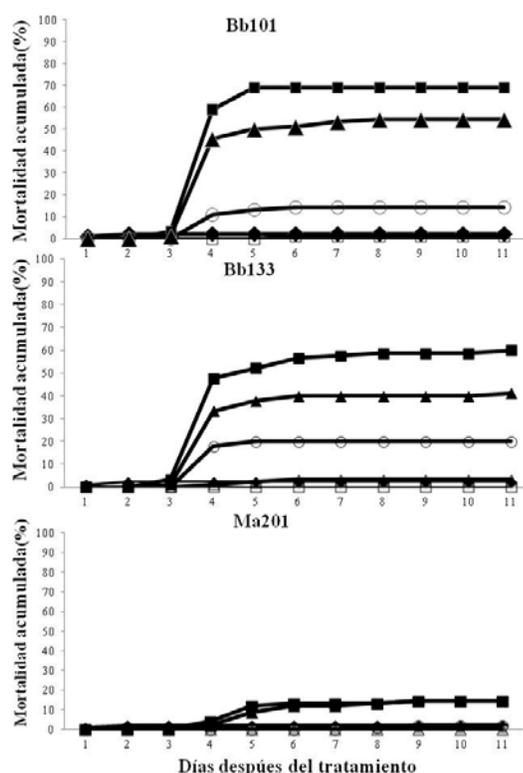


Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada de *S. zeamais* a diferentes densidades de esporas mL⁻¹: control (◆), 1x10⁴ (□), 1x10⁵ (△), 1x10⁶ (○), 1x10⁷ (▲) y 1x10⁸ (■) de dos aislados de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae*.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el origen de la cepa no es tan importante como el género de hongo, dado que *B. bassiana* aislado de curculiónido y melolóntido registró mayor porcentaje de mortalidad que *M. anisopliae* aislado de picudo. Sin embargo, el número de cepas evaluadas en el experimento no es suficiente como para considerar éste resultado como un patrón. Algunos autores (Rodrigues y Pratissoli, 1990; Lourenção *et al.*, 1993; Moino *et al.*, 1998) observaron mayor mortalidad en plagas de granos almacenados inoculados con *B. bassiana* con respecto a *M. anisopliae*; no obstante, Adane *et al.*, 2010 reportó porcentajes de mortalidad equivalentes entre aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *S. zeamais*, pero los mayores porcentajes de mortalidad se obtuvieron con aislados de *B. bassiana*. A través de su trabajo Lourenção *et al.*, 1993 indicó que en comparación con *B. bassiana*, *M. anisopliae* ocasionó mortalidad con mayor lentitud.

Para el caso de Ma201 el ajuste al modelo Probit no se logró debido a la baja mortalidad registrada. Con Bb101 el modelo funcionó para los datos obtenidos al sexto día después de la inoculación con valores de DL₅₀ y DL₉₀ de 1.6x10⁷ y 5.4x10⁸ respectivamente, siendo las densidades más bajas para alcanzar una DL₅₀ y DL₉₀ a los 6 días de tratamiento (Cuadro 3). Finalmente, para Bb133 el modelo se ajustó utilizando los datos obtenidos del día 6 al 11.

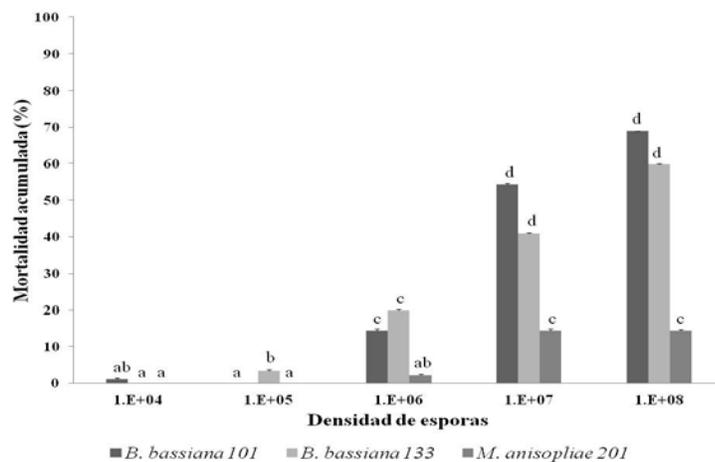


Figura 2. Las medias de las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (p< 0.001, LSD).

Cuadro 2. Análisis de Varianza para porcentaje de mortalidad entre especie de hongos y densidad de esporas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Densidad	143.473	4	35.8683	94.77	0.0000
B:Hongo	23.2604	2	11.6302	30.73	0.0000
AXB	12.8659	8	1.60824	4.25	0.0003
RESIDUOS	28.3858	75	0.378477		
TOTAL (CORREGIDO)	207.985	89			

Cuadro 3. Parámetros de regresión Probit para porcentaje de mortalidad de *S. zeamais* tratado con cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Prueba de bondad de ajuste con límites de confianza del 95% (prueba χ^2 , g.l = 2).

Cepa	Tiempo (días)	a	b	χ^2	DL ₅₀	DL ₉₀
Bb133	6	-4.59 ± 0.51	0.60 ± 0.07	2.63	3.7x10 ⁷	4.8x10 ⁹
	7	-4.65 ± 0.52	0.61 ± 0.07	2.37	3.5x10 ⁷	4.2x10 ⁹
	8,9 y 10	-4.71 ± 0.52	0.62 ± 0.07	2.13	3.3x10 ⁷	3.6x10 ⁹
	11	-4.78 ± 0.52	0.63 ± 0.07	2.12	3.0x10 ⁷	3.0x10 ⁹
Bb101	6	-6.13 ± 0.59	0.84 ± 0.85	5.33	1.6x10 ⁷	5.4x10 ⁸

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas Bb101 y Bb133 pueden considerarse como alternativas para el manejo de *S. zeamais* a las densidades (1x10⁸ y 1x10⁷ esporas/mL). No obstante, se sugiere una continua búsqueda y selección de HEP que muestren mayor virulencia sobre *S. zeamais*, tomando en cuenta que un aislado altamente virulento causa mortalidades altas a bajas densidades de esporas.

Agradecimientos

A la empresa Agrobiológicos del Noroeste, S.A. de C.V. (AGROBIONSA) por facilitar las cepas de HEP. En particular al Ing. Enrique Garza González y Quím. Emilia Cárdenas. A la Dra. Ana

Mabel Martínez Castillo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales por su apoyo en el análisis Probit.

Literatura Citada

- Adane, K., Moore, D. and S. A. Archer. 1996 Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Product Research*, 32:105-113.
- Adane, K., A., Zimmermann, G., Stephan, D. and S. Vidal. 2010. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to Entomopathogenic Fungi from Ethiopia. *Biocontrol Science and Technology*, 12:6 727-736.
- García-Lara, S., Espinosa-Carrillo, C. y D.J. Bergvinson. 2007. Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, D.F.
- Ikponmwo, N.E and J.N. Ayertey. 2009. Identification of *Sitophilus* species (Coleoptera: Curculionidae) Infesting Cowpea Seeds in Ghana. *Savannah Journal of Agriculture*, 4:1-4
- Lourenção, A. L., Komatsu, S. B. é S.B. Alves. 1993 Aplicação de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e pirimifós-metil em milho para controle de *Sitophilus zeamais*. *Ecosistema*, 18: 69-70.
- Marín-Ruiz, J. y L.M. Lozano. Intoxicación por fosforo de aluminio. <http://www.civatox.com/fosfina.pdf>. (Accesada en Noviembre 2013).
- Moino, J. R. A., Alves, S. B. and R.M. Pereira. 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. *Journal of Applied Entomology*, 122:301-305.
- Nájera-Rincón, M.B. 2010. Producción de Hongos Entomopatógenos: Memorias del Curso-Taller Producción de Hongos Entomopatógenos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Los Reyes, Michoacán, México.
- Pereira, C.J, Pereira, E.J.G., Cordeiro, E.M.G, Della Lucia, T.M.C., Tótola, M.R. and R.N.C. Guedes. 2009. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. *Crop Protection*, 28: 168-173.
- Pérez-Mendoza, J. 1999. Survey of insecticide resistance in Mexican population of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 35: 107-115.
- POLO-Plus[®] 2.0. 2002-2014. Probit and Logit Analysis. LeOra Software, Petaluma, CA, USA.
- Rodrigues, C. and D. Pratisoli. 1990. Pathogenicity of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. and *Metarhizium anisopliae* (Mols.) Sorok. and its effect on corn weevil and bean beetle. *Annals of the Entomological Society of Brazil*, 19:302-306.
- Schrank, A. and M. H. Vainstein. 2010. *Metarhizium anisopliae* and toxins. *Toxicon*, 56:1267-1274.
- Silva, A. G., González, P., Hepp R y P. Casals. 2004. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes. *Agrociencia*, 38 (5): 529-536.
- Statgraphics[®] Centurion XV. 2006. Stat Point Technologies. Inc. Warrenton, VA. USA.
- White, N.D.G. and J.G. Leesch. 1995. Chemical Control. *Integrated Management of Insects in Stored Products*, pp.287-330.