

POTENCIAL BIOINSECTICIDA DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS DE PLAGAS EN GRANOS ALMACENADOS

S.B. PADIN¹; G.M. DAL BELLO² y A.L. VASICEK³

Recibido: 29/07/94

Aceptado: 12/07/94

RESUMEN

En este estudio se investigó el potencial antagonista de los entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* y *Verticillium lecanii* sobre tres insectos plaga de los granos almacenados: *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum*. Los hongos fueron aislados de tejidos infectados de *Anticarsia gemmatalis* (*N.rileyi*); *Diatraea saccharalis* (*B. bassiana*); *Acheta assimilis* (*M. anisopliae*) y *Cyclocephala signaticolis* (*V. lecanii*). Se utilizaron insectos de 1 - 15 días de edad criados bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, provenientes de ejemplares recolectados en granos de trigo.

Los hongos fueron cultivados sobre agar papa glucosado (APG) y agar Sabouraud con extracto de levadura (SDA + Y), comparándose la capacidad de esporulación en ambos. También se evaluaron las interacciones entre las técnicas de espolvoreo y pulverización en relación a los porcentajes de mortalidad y colonización a los 6 y 15 días de inoculados los insectos. Sólo *B. bassiana* demostró *in vitro* una alta eficiencia como organismo de biocontrol tanto a los 6 como a los 15 días, existiendo un efecto altamente significativo del medio de cultivo y la especie de insecto. Con APG se obtuvo una mayor producción de conidios, cuya aplicación por espolvoreo tuvo una incidencia altamente significativa, respecto a la pulverización, sobre los porcentajes de mortalidad y colonización. *S. oryzae* fue la especie más susceptible a *B. bassiana* cuando ésta provenía del medio APG y era aplicada por espolvoreo. *T. castaneum* y *R. dominica* demostraron la misma susceptibilidad frente a ambos medios.

Palabras clave: control biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii*, insectos en granos almacenados.

BIOINSECTICIDE POTENTIAL OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN STORED GRAIN PESTS

SUMMARY

In this research the antagonistic potential of the entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* and *Verticillium lecanii* against the stored grain insects *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* was investigated. The fungi were isolated from infected tissues of *Anticarsia gemmatalis* (*N. rileyi*); *Diatraea saccharalis* (*B. bassiana*); *Acheta assimilis* (*M. anisopliae*) and *Cyclocephala signaticolis* (*V. lecanii*). Insects 1 - 15 days old which came from adults collected on wheat grains, were grown under controlled conditions of temperature and humidity. Fungus were cultured on dextrose potato agar (DPA) and Sabouraud yeast agar (SDA + Y), comparing their sporulation capacity in both media. The interactions between dusting and spraying techniques respect of mortality and colonization percentages 6 and 15 days after insect inoculations, were also evaluated. Only *B. bassiana* showed a great efficiency as biocontrol agent at 6 as well as 15 days and the effect of the culture media on the insect species was highly significant. With DPA the highest conidia production was obtained. The dusting inoculation had a highly significant incidence, compared to spraying, on the mortality and colonization percentages. *S. oryzae* was the most susceptible species to *B. bassiana* when this was grown on DPA and the dusting was used. *T. castaneum* and *R. dominica* shown the same susceptibility to both culture media.

Key words: Biological control, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii*, stored grain insects.

^{1,2,3} Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Sanidad Vegetal, 60 y 119 (1900) La Plata, Argentina.

² Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

INTRODUCCION

Del complejo de insectos que atacan a los granos almacenados se destacan principalmente, por las cuantiosas pérdidas económicas que producen, *Sitophilus oryzae* (L), *Tribolium castaneum* Herbst y *Rhyzopertha dominica* Fab.

Entre los daños más importantes ocasionados por estos organismos, han sido citados la disminución del peso, la calidad, el valor comercial y el poder germinativo de las semillas (Campanela y Díaz, 1978; Marsans, 1987).

Las tendencias actuales en el manejo de plagas se orientan hacia la preservación del medio ambiente junto al uso de biocidas con menor toxicidad, constituyendo el empleo del control integrado la estrategia óptima para lograr dichos objetivos. Dentro de ese contexto, el control biológico mediante hongos entomopatógenos es una de las alternativas más ampliamente desarrolladas, pues permite alcanzar exitosos resultados (Oglobin y Jauch, 1943; Bajan y Kmitowa, 1977; Federici, 1981) sin deteriorar los recursos naturales.

Debido al intenso efecto parasitario que producen sobre un variado rango de hospedantes (Ignoffo *et al*, 1976; Ferron, 1981; Hall, 1981; Alves, 1986; Lecuona, 1992), *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas, son considerados algunos de los agentes fúngicos con mayores posibilidades en el control microbiano de insectos (Lecuona y Riba, 1991). Este trabajo se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la patogenicidad de esos hongos en relación a la mortalidad de *R. dominica*, *S. oryzae* y *T. castaneum*.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento y cultivo de los hongos

N. rileyi se aisló por transferencia de tejido infectado de *Anticarsia gemmatalis* Nübner al medio agar Sabouraud con extracto de levadura (SDA + Y). Los cultivos de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *V. lecanii* utilizados, pertenecientes a la colección micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y Vectores (CEPAVE) de La Plata, habían sido obtenidos a partir de *Diatraea*

saccharalis Fabricius, *Acheta assimilis* Fabricius y *Cyclocephala signaticolis* Burm. respectivamente, según la técnica de Poinar y Thomas (1982) en el medio agar extracto de malta. Con el fin de obtener suficiente cantidad de inóculo para las pruebas de patogenicidad, las colonias fúngicas se repicaron a tubos con agar papa glucosado (APG) al 2% y SDA + Y, cada uno de los medios dispuestos en pico de flauta. La incubación de los microorganismos fue realizada en estufa a 25°C durante 15 días.

Crianza y selección de los insectos

Las tres especies de insectos estudiadas, se criaron en cámara climatizada con humedad relativa y temperatura controladas ($70 \pm 5\%$ y $27 \pm 2^\circ\text{C}$). Los primeros adultos, provenientes de granos de trigo cosechados en Magdalena (Provincia de Buenos Aires) y libres de todo tipo de contaminación con plaguicidas, se separaron por especies en frascos de vidrio de 250 ml y tapa con malla metálica. En cada envase fueron colocados 50 individuos de la misma especie con 50 g de sus respectivas dietas, las que son indicadas en el cuadro N° 1.

Estos insectos después de permanecer 15 días en los frascos para permitir la oviposición, fueron transferidos a nuevos envases de cría con alimento. El mismo proceso se repitió sucesivamente hasta obtener una cantidad suficiente de individuos, los que luego serían empleados en las pruebas de patogenicidad. Las edades de los insectos seleccionados para el bioensayo variaron entre 1 y 15 días.

Cuadro N° 1: Composición de la dieta utilizada para la crianza de los insectos

Especie insectil	Medio de cría
<i>R. dominica</i>	cebada perlada
<i>S. oryzae</i>	trigo natural
<i>T. castaneum</i>	harina de trigo 85%
	levadura de cerveza en polvo 5%
	leche descremada en polvo 5%
	gérmen de trigo 5%

Pruebas de patogenicidad

Transcurrido el período de incubación de los hongos, fueron extraídas las masas conidiales con ayuda de un ansa para procesarlas según dos métodos distintos de inoculación. La mitad del micelio se destinó al espolvoreo de los insectos y el resto fue suspendido en una solución de agua destilada estéril + 0,05% del tensioactivo Tritón X-100 hasta alcanzar la concentración de 6×10^6 conidios/ml, para ser aplicado por pulverización. En el espolvoreo se utilizó dispositivo manual de goma que funcionó como bomba y depósito del inóculo, insuflando aire a través de una boquilla de vidrio capilar de 1 mm. de diámetro. Otro tubo lateral de 0,5 mm. de diámetro, próximo a la salida del capilar, actuó como obstáculo generando la turbulencia y dispersión del haz de partículas.

Dicho dispositivo permitía depositar cantidades uniformes de 0,16 mgr conidios/100 insectos de cada especie. El recuento de esporas del inóculo fue de aproximadamente 6×10^6 conidios/mgr.

Para la pulverización se empleó un micro-pulverizador de aire comprimido, con el que fue asperjada la suspensión conidial a razón de 800 cm³ de agua/por tonelada de grano. Los testigos sólo fueron pulverizados con una solución de agua

destilada estéril y el tensioactivo. Se efectuaron 3 repeticiones por tratamiento, incluyendo 50 insectos de una misma especie por repetición. A los 6 y 15 días desde el momento de las inoculaciones fue determinado el número de individuos muertos, los cuales se colocaron en cámaras húmedas a fin de establecer los porcentajes de colonización.

Este valor se obtuvo a partir de los insectos que luego de permanecer 7 días en cajas de Petri con papel de filtro esterilizadas y humectación constante, mostraban el signo de la infección fúngica.

El diseño experimental utilizado fue un factorial completamente aleatorizado sin la existencia de bloques. Los datos originales, expresados en porcentajes, fueron modificados mediante la transformación arcoseno %, llevándose a cabo un análisis de la varianza. El estudio estadístico se completó con la prueba de Tuckey.

RESULTADOS

De los hongos entomopatógenos que formaron parte del ensayo, *M. anisopliae*, *N. rileyi* y *V. lecanii* produjeron una mortalidad de los insectos muy baja, nula o inferior al 30% tanto por espolvoreo como por pulverización (Cuadro N°2). Debido a ello el estudio se continuó con *B. bassiana*, la única especie que demostró *in vitro* una alta

Cuadro N° 2. Porcentaje de mortandad de insectos a los 15 días de la aplicación de *M. anisopliae*, *N. rileyi* y *V. lecanii*.

Especie insectil	Técnica de aplicación	Entomopatógenos % mortandad de insectos			Testigo sin tratar
		<i>M. anisopliae</i>	<i>N. rileyi</i>	<i>V. lecanii</i>	
<i>S. oryzae</i>	espolvoreo	S/C	22	S/C	TV
	pulverización	S/C	5	S/C	TV
<i>T. castaneum</i>	espolvoreo	S/C	14	S/C	TV
	pulverización	S/C	5	S/C	TV
<i>R. dominica</i>	espolvoreo	S/C	16	S/C	TV
	pulverización	S/C	S/C	S/C	TV

TV: todos vivos S/C: sin control

eficiencia como organismo de biocontrol. En ese sentido, los resultados de las inoculaciones (Cuadros N°3 y 4) evidenciaron un elevado porcentaje de mortalidad y colonización, tanto a los 6 como a los 15 días de iniciado el tratamiento.

De los dos medios empleados para el cultivo de *B. bassiana*, sobre APG la masa de micelio fue más abundante, obteniéndose un volumen de inóculo mayor con respecto al medio SDA + Y. Entre las 24 y 72 hs *post mortem* de casi todos los insectos mantenidos en cámara húmeda, se observó la emergencia de micelio blanco algodonoso (*B. bassiana*) o blanco verdoso (*N. rileyi*) a través de las membranas intersegmentales y los orificios orales y anales, con tendencia a reducir totalmente la superficie del cuerpo (Fig. 1, 2 y 3). Sobre el resto de los cadáveres, una cantidad ínfima de insectos inoculados pero no infectados, así como en los testigos muertos, sólo desarrollaron algunos hongos saprobios.



Fig. 1. Cadáver de *Sitophilus oryzae* infectado por *Beauveria bassiana* (x 18).

Cuadro N° 3. Porcentajes y promedios de mortandad y colonización de *B. bassiana* por la técnica de espolvoreo y pulverización en *S. oryzae*, *T. castaneum* y *R. dominica*.

Fuentes de variación	% de mortandad a los días del tratamiento		% de colonización a los días del tratamiento	
	6	15	6	15
Técnicas				
Espolvoreo	80,7 a	81,7 a	80,1 a	80,9 a
Pulverización	22,8 b	25,0 b	19,4 b	21,1 b
Insectos				
<i>S. oryzae</i>	73,7 a	74,5 a	68,3 a	68,3 a
<i>T. castaneum</i>	29,2 c	33,2 c	28,8 c	32,5 c
<i>R. dominica</i>	52,3 b	52,3 b	52,2 b	52,2 b
Espolvoreo				
<i>S. oryzae</i>	99,0 a	99,0 a	97,7 a	97,7 a
<i>T. castaneum</i>	49,0 b	52,0 b	49,0 b	51,3 b
<i>R. dominica</i>	94,0 a	94,0 a	93,7 a	93,7 a
Pulverización				
<i>S. oryzae</i>	48,3 a	50,0 a	39,0 a	39,0 a
<i>T. castaneum</i>	9,3 b	14,3 b	8,7 b	13,7 b
<i>R. dominica</i>	10,7 b	10,7 b	10,7 b	10,7 b
C V	7,5 %	7,08 %	5,63 %	5,57 %

Los valores con letras iguales dentro de una misma columna no tienen diferencias al $P \leq 5\%$ (Test de Tukey).



Fig. 2. *B. bassiana* emergiendo del cuerpo infectado de *Tribolium castaneum* (x 12).



Fig. 3. Cadáver de *T. castaneum* totalmente cubierto por el micelio de *B. bassiana* (x 15).

Cuadro N° 4. Valores promedios del porcentaje de mortandad y colonización de *B. bassiana*, en dos medios de cultivo, sobre *S. oryzae*, *T. castaneum*, *R. dominica* y sus interacciones.

Fuentes de variación	% de mortandad a los días del tratamiento		% de colonización a los días del tratamiento		
	6	15	6	15	
Medios					
APG	80,7 a	81,7 a	80,1 a	80,9 a	
SDA + Y	65,1 b	66,8 b	65,1 b	66,8 b	
Insectos					
<i>S. oryzae</i>	80,2 a	82,7 a	79,5 b	82,0 b	
<i>T. castaneum</i>	45,8 b	47,3 b	45,8 c	47,0 c	
<i>R. dominica</i>	92,7 a	92,7 a	92,5 a	92,5 a	
Medios/insectos					
APG	<i>S. oryzae</i>	99,0 a	99,0 a	97,7 a	97,7 a
	<i>T. castaneum</i>	49,0 b	52,0 b	49,0 b	51,3 b
	<i>R. dominica</i>	94,0 a	94,0 a	93,7 a	93,7 a
SDA + Y	<i>S. oryzae</i>	61,3 b	66,3 b	61,3 b	66,3 b
	<i>T. castaneum</i>	42,7 b	42,7 c	42,7 c	42,7 c
	<i>R. dominica</i>	91,3 a	91,3 a	91,3 a	91,3 a
C V	6,7 %	6,78 %	5,56 %	5,71 %	

Tratamientos con letras en común no se diferencian estadísticamente, de acuerdo con el Test de Tukey para el nivel de $P \leq 5\%$

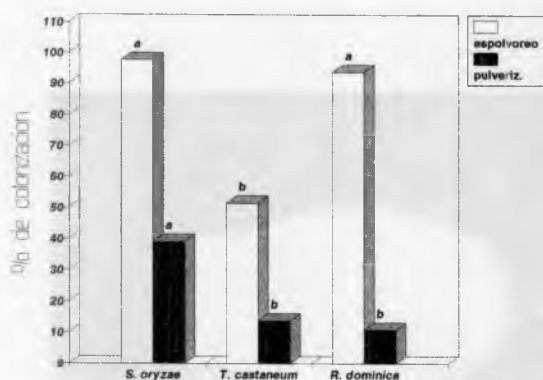


Fig. 4. Porcentajes de colonización a los 15 días de la aplicación de *B. bassiana*. Porcentajes con la misma letra no son significativamente diferentes al $P = 0,05$ de acuerdo con el Test de Tukey.

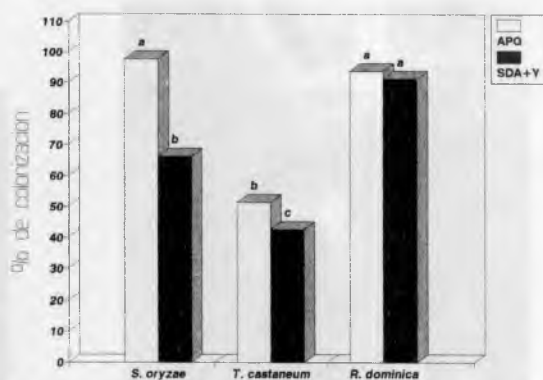


Fig. 5. Porcentajes de colonización a los 15 días de la aplicación de *B. bassiana* cultivada en los medios APG y SDA + Y. Porcentajes con la misma letra no son significativamente diferentes al $P = 0,05$ de acuerdo con el Test de Tukey.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Según Lecuona y Riba (1991) de los agentes entomopatógenos, pocas especies se consideran candidatos seguros para el control microbiano de insectos, entre ellas *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp., *B. bassiana*, *hyphomycete* que por su fácil manejo y alto grado de esporulación llegó a superar a *M. anisopliae*, *N. rileyi* y *V. lecanii*, tuvo sobre ellos la ventaja adicional de ejercer una acción patogénica más intensa en relación a *R. dominica*, *S. oryzae* y *T. castaneum*. Con respecto a la eficiencia de los dos métodos de inoculación, se observó que para todos los casos (% de mortalidad y % de colonización a los 6 y 15 días) existió un efecto altamente significativo de la forma de aplicación en relación a las tres especies de insectos. En general el espolvoreo produjo un mayor control que la pulverización, siendo *S. oryzae* el hospedante más susceptible. La presencia de interacción indicó que el tipo de tratamiento no efectaba por igual a las distintas plagas y que *T. castaneum* fue el menos afectado por el espolvoreo (Fig. 4).

El análisis estadístico correspondiente, demostró una incidencia altamente significativa del medio de cultivo y la especie de insecto, como así también una interacción altamente significativa

entre ambas fuentes de variación. Esto quedó reflejado en el mayor número de individuos muertos cuando el hongo se desarrolló en APG. *R. dominica* fue en promedio la especie menos resistente al patógeno y la interacción surgió por el comportamiento diferencial de *S. oryzae*, el más sensible cuando el hongo provenía del medio APG y se lo aplicó por espolvoreo. *T. castaneum* y *R. dominica* demostraron la misma susceptibilidad frente a cualquiera de los dos medios (Fig. 5)

Así como algunos autores comprobaron que existe especificidad parasitaria en las asociaciones patógeno - hospedante (Farguez, 1976; Pekrul y Grula, 1979; Lecuona, 1989), otros hallaron lo contrario (Milner, 1982; Boucias y Latge, 1988). Los resultados aquí registrados indican presencia de especificidad en *M. anisopliae* y *V. lecanii*, una especificidad intermedia en *N. rileyi* y ausencia de la misma en *B. bassiana*. Del conjunto de hongos entomopatógenos utilizados en este ensayo, sólo con *B. bassiana* pudieron lograrse niveles de mortalidad y colonización significativos. El hecho permite considerar como muy promisorio, la inclusión del hongo para el biocontrol de estos insectos en granos almacenados.

BIBLIOGRAFIA

- ALVES, S.B. 1986. Fungos entomopatogénicos. In: Controle microbiano de insectos. Ed. Manole, Sao Paulo, Brasil, 73 - 126.
- ALVES, S.B. 1986. Métodos utilizados em patologia e controle microbiano. Técnicas de laboratório. In: Controle microbiano de insectos. Ed. Manole, Sao Paulo, Brasil, 237 - 277.
- BAJAM, C. and KMITOWA, K. 1977. Contribution of the entomopathogenic fungi to the natural winter reduction of Colorado beetle adults. *Polish Ecol Studies*, 3: 107 - 114.
- BOUCIAS, D.G. and LATGE, J.P. 1988. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non host cuticle extracts. *J. Invert Pathol.*, 51: 168 - 171.
- CAMPANELA, C.P. y DIAZ, E.A. 1978. Almacenaje y conservación de granos. Información Agropecuaria, Buenos Aires, 2: 18 - 21.
- FARGUEZ, J. 1976. Spécifité des champignon pathogenes imparfaits (hyphomycetes) pour les larves de coléopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae). *Entomophaga*, 21: 313 - 323. 7)
- FEDERICI, B.A. 1981. Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces*. In: Microbial control of pest and plant diseases 1970 - 1980 (Burgess, H.D., ed.), London, Academic Press, 555 - 572.
- FERRON, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Microbial control of pest and plant diseases 1970 - 1980 (Burgess, H.D., ed.), London, Academic Press. 465 - 482.
- HALL, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Microbial control of pest and plant diseases 1970 - 1980 (Burgess, H.D., ed.), London, Academic Press, 483 - 493.
- IIGNOFFO, C.M. PUTTLER, B.; HOSTETTER, D.L. and DICKERSON, W.A. 1976. Susceptibility of the Cabbage hooper, *Trichoplusiani*, and the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the Entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invert Pathol.*, 28: 259 - 262.
- Lecuona, R.E. 1989. Role des lipides épicuticulaires des insectes la dans pathogenese des Hyphomycetes. These Doctorat. Paris, Université Pierre et Marie Curie (208 págs.).
- LECUONA, R.E. y RIBA, G. 1991. Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos. *Bol. Divulg. Tecn. INTA* 87 (30 págs.).
- LECUONA, R.E. 1992. Control microbiano de plagas en general con especial referencia a los hongos entomopatógenos. *Bol. Divulg. Tecn. INTA* 95 (39 págs.)
- MARSANS, G.J. 1987. Manejo y conservación de granos. Hemisferio Sur, ed., Buenos Aires (263 págs.)
- MILNER, R.J. 1982. On the occurrence of the pea aphids, *Acyrtosipon pisum*, resistant to isolates of the fungal pathogen *Erynia neoaphidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32: 23 - 27.
- OGLOBIN, A. y JAUCH, C. 1943. Reacciones patológicas de acrididos por *Aspergillus parasiticus*. *Rev. Arg. Agric.*, Buenos Aires, 10: 256 - 267.
- PEKRUL, S. and GRULA, E.A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invert Pathol.*, 34: 238 - 247.
- POINAR, G. and THOMAS, G. 1982. Diagnostic Manual for the identification of insect pathogens. (Poinar and Thomas, ed.), Plenum Press, New York (218 págs.).