

COMPATIBILIDAD DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y *METARHIZIUM ANISOPLIAE* CON ENDOSULFAN 50% C.E. EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Noris B. Padrón,¹ Cecilia Toledo,² L. A. Rodríguez,² D. Núñez² e Irina Pérez¹

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Figueredo 508 e/ Línea y M. Echeverría, Bayamo, Granma, CP 85100

RESUMEN

El uso de los hongos entomopatógenos constituye un elemento importante dentro del manejo integrado de plagas, estos pueden ser encontrados de manera natural en los agroecosistemas, controlando un gran número de plagas de insectos. Por la importancia que reviste conocer el efecto de los insecticidas cuando son mezclados con los entomopatógenos, nos propusimos evaluar la compatibilidad de *Beauveria bassiana* (cepa LBB-1) y *Metarhizium anisopliae* (cepa Niña Bonita) con el endosulfan 50 % C.E. (thiodan). Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Granma, en el periodo comprendido entre mayo-julio de 1995. Se utilizó medio agarizado tratado con dosis completa, media y un décimo de ingrediente activo, y fueron evaluados cualitativa y cuantitativamente. La metodología empleada y la escala utilizada fue la establecida por el INISAV, de acuerdo con la cual el endosulfan resultó tóxico para *Beauveria bassiana* en todas las proporciones, no siendo así para el caso de *Metarhizium anisopliae*, que resultó ligeramente tóxico.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, compatibilidad, endosulfan

ABSTRACT

The use of entomopathogenic fungi in Integrated Pest Management is a key element. These microorganisms can be found naturally occurring in the agroecosystems, controlling a great number of pest insect species. Therefore, it's very important to know the effect of the chemical insecticides on entomogenous fungi when mixed together. In this paper the compatibility between *B. bassiana* (strain Bb-1) and *M. anisopliae* (Niña Bonita strain) and insecticide endosulphan 50 % EC (thiodan) was assessed. This work was developed in the plant health provincial laboratory of Granma dated on May-July 1995. A qualitative and quantitative assessment for the compatibility of *B. bassiana* and *M. anisopliae* with endosulphan was carried out using insecticide treated agar medium with the recommended dose (RD), the half RD and the tenth RD both the evaluation scale and the methodology used are those stated by INISAV. Endosulphan resulted toxic for *B. bassiana* at very concentration tested differing for *M. anisopliae* where the insecticide resulted slightly toxic.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, compatibility, endosulfan

INTRODUCCIÓN

La capacidad toxicológica de los productos químicos aplicados en la agricultura para el control de plagas también afectan otros organismos. Ellos ocasionan el desarrollo de resistencia y resurgencias de insectos, permiten el aumento de plagas secundarias, eliminan los enemigos naturales, destruyen los insectos polinizadores y afectan la fauna silvestre y los animales domésticos [Vergara, 1991].

Bustillo *et al.* (1992) mencionan que los insecticidas en el campo sólo deben usarse como última medida, cuando las otras alternativas hayan sido agotadas.

El uso masivo de hongos entomopatógenos producidos en sustratos naturales para el control de insectos plaga,

viene estudiándose y llevándose a cabo en países como China, Cuba, Brasil y Venezuela [Antía *et al.*, 1992].

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Bals) Vuill (Hyphomycetes) es uno de los agentes de control de muchas plagas. Sus huéspedes son principalmente miembros de los órdenes Lepidoptera y Coleoptera, incluyendo insectos de importancia económica en la agricultura [Storey y Godiner, 1986; Bustillo, 1991; citado por Rivera, 1993].

Por otra parte, *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin (Hyphomycetes) se considera un agente natural de diversas especies de insectos considerados como plagas en cultivos de importancia comercial. Se ha encontra-

do en más de doscientas especies de insectos en siete órdenes, de los cuales, los coleópteros son los más comúnmente atacados. Se encuentra en forma saprofita en el suelo y como parásito de insectos [Barnett and Hunter, 1972] *M. anisopliae* tiene gran afinidad por insectos del suelo [Zinnermann, 1992].

Es posible que dadas las características dentro del marco del manejo integrado de plagas (MIP), la práctica del control microbiológico debe hacerse de forma coordinada con sus componentes para que no interfieran en su ejecución, como podría ocurrir con el uso de plaguicidas que limitan la población de enemigos naturales en los cultivos y reducen su impacto sobre las poblaciones de insectos plaga; además, con el uso de entomopatógenos es posible disminuir en forma racional este impacto. [Rivera, 1993].

Muchos estudios han indicado que los insecticidas pueden inhibir la actividad de *B. bassiana* [Ramarajahe et al., 1967; Olmert y Kenneth, 1974; Clark et al., 1982; Osborne y Boncias, 1985; River, 1992; King et al., 1993, citado por Rivera, 1994], puesto que la exposición prolongada *in vitro* del hongo a formulaciones de insecticidas es determinante; la mezcla muestra un proceso que podría ocurrir en el campo [Rivera, 1994].

El control químico debe ir acompañado de otras medidas basadas en prácticas agronómicas, control cultural y control biológico [Bustillo, 1990].

El insecticida más recomendado para el control químico de la broca en muchos países productores de café afectados es el endosulfan. Sin embargo este insecticida es de alta toxicidad [Goebel, 1982], causa impacto adverso al ecosistema y a la fauna benéfica [Jiménez, 1995] y no existen antídotos para tratar casos de envenenamiento.

Bustillo (1992) realizó un experimento con el objetivo de evaluar la eficiencia de diferentes insecticidas para el control de la broca del café. Los insecticidas evaluados fueron: endosulfan, clorpirifos, pirifos-metil, malathion y fenitrothion. Los resultados indicaron que se puede obtener alta mortalidad de adultos de broca (mayor del 90 %) 24 horas después de iniciar la penetración en los frutos o sólo los que se encontraban en el canal de penetración. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de endosulfan, clorpirifos, fenitrothion y pirifos-metil. Sin embargo, el endosulfan causó la mortalidad más alta (98 %) y la menor se obtuvo con malathion (41 %).

La urgente necesidad de desarrollar estrategias para un empleo de programa de manejo integrado de plagas nos llevó a examinar *in vitro* la compatibilidad de *B. bassiana*, cepa LBB-1 y *M. anisopliae* (cepa Niña Bonita) con el insecticida endosulfan 50 % C.E., lo cual constituye el objetivo del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Granma, en el período comprendido entre mayo-julio de 1995. Para su realización se utilizaron cepas procedentes de la micoteca del INISAV, *B. bassiana* (Bals) Vuill, cepa LBB-1 y *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin, cepa Niña Bonita, ambas reproducidas en el laboratorio.

Se utilizaron placas Petri con medio sabouraud-dextrosa-agar (SDA), mezclado con endosulfan 50 % C.E., del cual se emplearon suspensiones basadas en las dosis de aspersión en el campo (DC), dosis media (1/2 DC) y una dosis menor (1/10 DC) para establecer un rango de subdosis.

Los testigos se inocularon en medios de cultivos iguales a los del tratamiento, pero sin mezclar con endosulfan.

En todos los casos los experimentos se organizaron mediante diseños experimentales completamente aleatorizados.

Para determinar el comportamiento de la germinación de *B. bassiana* se emplearon las tres variantes antes mencionadas, y un testigo con seis réplicas y tres repeticiones cada uno.

Se realizó una dilución de *B. bassiana* de 7×10^5 conidios/mL, de la cual se colocaron seis gotas equidistantes por placas. La incubación se realizó por 48 horas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

De cada gota se contaron cinco campos en el microscopio con el objetivo 40x, y se determinó el porcentaje de germinación según Norma Cubana 72-02/1993. Con el fin de estudiar el crecimiento radial de la colonia, así como la influencia sobre la germinación causada por el insecticida, se utilizaron cinco placas con SDA por variante, una de las cuales tenía un cultivo fresco (dos días) de *B. bassiana* en SDA, y las cuatro restantes con la mezcla de SDA con endosulfan a la dosis correspondiente a cada uno de los tratamientos. Asimismo se procedió con el hongo *M. anisopliae* (cepa Niña Bonita). Se practicaron ponchetes en la porción central de cada placa con medio tratado, y los que se realizaron en ella fueron transferidos a las placas con el cultivo del hongo. Se procedió del mismo modo con el testigo.

Pasados cinco días se realizaron las evaluaciones. Se preparó un medio de cultivo líquido en tubos de ensayos (agua peptona) y se sembró por asada en cuatro tubos por variantes, tomando de la porción central de cada uno de los discos con *B. bassiana*, que permanecieron durante cinco días en las placas con SDA mezclados con endosulfan a las diferentes dosis. Se realizó la incubación por 48 horas, y luego se procedió a determinar el porcentaje de germinación de la media de cada tratamiento, como establece la NC-72-2/1993, y además se halló el porcentaje de inhibición de la germinación de la media por variante, en relación con el testigo según la fórmula de Abbot modificada, citado por Viñuela et al. (1993).

$$\text{Por ciento de reducción de la capacidad beneficiosa} = \frac{\text{diámetro de la colonia testigo} - \text{colonia conc.}}{\text{diámetro de la colonia testigo}} \times 100$$

Los valores en por cientos obtenidos se compararon con la escala de clasificación de plaguicidas del grupo de trabajo de la OILB [Jacas y Viñuela *et al.*, 1993].

Los resultados obtenidos en las revisiones del crecimiento radial de las colonias fueron procesados del modo anteriormente expuesto.

Se tomaron cuatro placas con el hongo *B. bassiana* crecidas sobre SDA (dos días) y se depositaron gotas equidistantes de una solución de la DC de endosulfan. Para el testigo se utilizó agua destilada estéril. La evaluación se realizó a los siete días, efectuando la medición en mi-

límetros de los halos de inhibición. Las medias se compararon con la escala citada por Calderón (1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede apreciarse en la *Tabla 1*, a las 48 horas la inhibición de la germinación de *B. bassiana* en las tres concentraciones de endosulfan alcanzó un ciento por ciento tóxico para este entomopatógeno, según la escala de la OILB. Resultados similares obtuvo Rivera (1993), el cual encontró que el endosulfan (thiodan) inhibió totalmente la germinación conidial de *B. bassiana* a las mismas dosis utilizadas en este experimento.

Tabla 1. Porcentaje de germinación promedio de *B. Bassiana* en SDA mezclado con endosulfan 50 % C.E. y testigo 48 horas después de la inoculación

Endosulfan 50%	Réplicas				Toxicidad
	I	II	III	Inhibición (%)	
DC	0,00	0,00	0,00	100	Tóxico
1/2 DC	0,00	0,00	0,00	100	Tóxico
1/10 DC	0,00	0,00	0,00	100	Tóxico
Testigo	93,9	88,8	90,0		

Rivera *et al.* (1994) plantean que el efecto inhibido de la germinación conidial se produce tempranamente en la mezcla debido al tipo de solvente utilizado, que tiene propiedades desecantes de la membrana citoplasmática, afectando la viabilidad de la conidia.

En la *Tabla 2* se refleja el comportamiento de la germinación de *B. bassiana* posterior a la inoculación en agua peptona, luego de haber permanecido durante cinco días en la porción central de las placas con SDA, mezclados con las tres dosis de endosulfan comparadas con el testigo. Como se observa, se manifiesta un proceso inhibitorio que está en relación directa con la concentración del insecticida, resultando tóxico para la dosis completa (DC), moderadamente tóxico para la mitad de ella y ligeramente tóxico para la décima parte. Rivera *et al.* (1994) coinciden con otros autores [Ramara-jahé *et al.*, 1977; Olmert y Kennet, 1974; Clark *et al.*, 1982; Osborne y Bucías, 1985; Rivera, 1992; King *et al.*, 1993] en afirmar que se observa un efecto fungistático de los insecticidas, cuyo efecto inhibitorio aumenta a través del tiempo de mezcla y, puesto que la exposición prolongada *in vitro* del hongo a formulaciones del insecticida es determinante, este mismo proceso podría ocurrir en el campo. Por otra parte, Gordon Lock-wood (1991), citado por Rivera *et al.* (1994) hallaron que mediante el análisis provit de dosis-mortalidad contra niveles de funguicidas, revelan una significativa tendencia de aumento en los valores

de la dosis letal media (DL 50) con el incremento de la fungistasis.

En la *Tabla 3* se observa que el endosulfan inhibió el incremento de *B. bassiana* resultando tóxico, según la escala de la OILB. Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Rivera (1993), pues este refiere que el endosulfan causó una alta inhibición (96,07%) en el tratamiento fúngico de la DC. En un medio de la DC la inhibición fue de 71,65%, y en un décimo de DC la inhibición fue de 42,38 %. Sus resultados concuerdan con los hallados por Olmer y Kennet (1974) y Alves (1986), quienes encontraron que el producto tiene efecto sobre el crecimiento de *B. bassiana*. Al evaluar la acción de gotas de disolución de endosulfan a la DC sobre un cultivo de *B. bassiana* desarrollado formando un césped, se pudo observar la presencia de un halo alrededor de cada una. Las mediciones realizadas aparecen en la *Tabla 4*, las cuales, al ser comparadas con la escala utilizada por Calderón (1982), dan como resultado incompatibilidad entre endosulfan y *B. bassiana*. Inferimos que la presencia de estos halos está motivada por la acción determinante del insecticida y las propiedades desecantes de la membrana citoplasmática debido al tipo de solvente utilizado en las formulaciones, planteamientos realizados por Rivera *et al.* (1994). Consideramos que es importante profundizar en este sentido para poder concluir con certeza que, además del efecto fungistático, existe una acción fungicida relacionada con la dosis.

Tabla 2. Porcentaje de germinación e inhibición de *B. bassiana* a las 48 horas de inoculado por asada en agua peptona a partir de ponchetes que permanecía por cinco días en SDA

Producto	\bar{X} en %		Toxicidad
	Germinación	Inhibición	
Endosulfan 50% C.E			
DC	0,00	100	Tóxico
1/2 DC	16,67	82,11	Med. tóxico
1/10 DC	56,52	39,35	Med. tóxico
Testigo	93,20	-	-

Tabla 3. Crecimiento radial y porcentaje de reducción de la capacidad beneficiosa de *Beauveria bassiana* por endosulfan mezclado con SDA en relación con el testigo, a los cinco días de la inoculación

Endosulfan 50 % C.E.	\bar{X} crecimiento (mm)	Reducción de la capacidad beneficiosa (%)	Toxicidad
DC	0,0	100	Tóxico
1/2 DC	0,0	100	Tóxico
1/10 DC	0,0	100	Tóxico
Testigo	20,5	-	-

Tabla 4. Medida promedio de los halos de inhibición de *Beauveria bassiana* provocados por el contacto de gotas de endosulfan diluido a la DC después de siete días

	Réplicas			\bar{X}	\bar{X}	
	I	II	III	General	Testigo	
\bar{X} (mm)	2,125	1,857	2,071	2,018	0,00	Incompatible

Para el entomopatógeno *M. anisopliae* se evaluó el efecto que sobre este ejerce el endosulfan, midiendo el incremento radial de las colonias así como el porcentaje de disminución de la capacidad beneficiosa, cuyos datos aparecen en la Tabla 5. En ella se observa que a la DC y 1/2 DC se produjo un ciento por ciento de inhibición del crecimiento hasta el duodécimo día, mientras que para la dosis menor (1/10DC) se mantuvo entre 36,0% y 40,3% de inhibición o reducción de la capacidad beneficiosa. Al comparar estos resultados con la es-

cala de valores de la OILB, encontramos que para la DC y para 1/2 DC el endosulfan resulta tóxico al hongo, mientras que resulta ligeramente tóxico a la concentración de 1/10 DC. En la literatura consultada no se reportan trabajos de compatibilidad entre *M. anisopliae* y endosulfan. Atehortea *et al.* (1994) encontraron que clorpirifos, a una concentración de 50 ppm, inhibe totalmente la esporulación del hongo *M. anisopliae*, incluso a los 16 días después de sembrado, así como en el crecimiento micelial a los 18 días de sembrado en SDA.

Tabla 5. Crecimiento radial y por ciento de reducción de la capacidad beneficiosa de *M. anisopliae* por endosulfan mezclado con SDA en relación con el testigo a los 5, 7, 9, 12 días posteriores a la inoculación

	\bar{X} crecimiento (mm)						Reduc. de la capacidad beneficiosa (%)		
	5	7	9	12	5	7	9	12	Toxicidad
Endosulfan									
DC	0,0	0,0	0,0	0,0	100	100	100	100	Tóxico
1/2 DC	0,0	0,0	0,0	0,0	100	100	100	100	Tóxico
1/10 DC	21,75	25,5	34,38	41,63	36,0	40,1	39,2	40,3	Lig. tóxico
Testigo	34,0	44,25	56,63	69,75	—	—	—	—	

CONCLUSIONES

- Endosulfan 50% C.E. resultó tóxico a *B. bassiana* al evaluar el porcentaje de germinación para las tres dosis utilizadas.
- La viabilidad de los conidios de *B. bassiana* mezclado con endosulfan fue afectada de modo directamente proporcional a la concentración del insecticida, pues resultó tóxico para la dosis completa, moderadamente tóxico para un medio de DC y ligeramente tóxico para un décimo de DC.
- Una mezcla de endosulfan a la dosis de aspersión en el campo en contacto con un cultivo de *B. bassiana* desarrollado provoca un halo de incompatibilidad.
- El crecimiento radial de las colonias de *M. anisopliae* resultó inhibido a un ciento por ciento en presencia de mezcla de endosulfan a la dosis comercial como a la mitad de esta, manifestándose tóxico a estas concentraciones, mientras que a un décimo de la dosis comercial resultó ligeramente tóxico.
- Las aplicaciones de mezcla de endosulfan con *B. bassiana* y *M. anisopliae* no son recomendadas, pues los resultados *in vitro* muestran que la germinación es afectada por este.

REFERENCIAS

- Antía L. et al.: «Producción en finca del hongo *B. bassiana* para el control de la broca del café», CENICAFE, Chinchina, Caldas, Colombia, no. 182, pp. 1-12, octubre 1992.
- Atehorta, C. et al.: «Efectos de algunos agroquímicos en el crecimiento y esporulación del hongo *M. anisopliae*», *Revista Colombiana de Entomología* 20 (4): 255-260, 1994.
- Barnett, H. L.: B. B. Hunter: *Illustrated general of imperfect fungi* 3 the., Burgespubl., Ca, Minneapolis, 1972.
- Bustillo P. A. E.: «Perspectivas de manejo integrado de la broca del café en Colombia», Seminario sobre la Broca del Café, Medellín (Colombia), 21 de mayo 1990.
- Bustillo, P. A. E. et al.: «Guía para manejo de la broca del café en Colombia», Chinchina, Colombia, 1992.
- Bustillo, P. A. E.: «Evaluación de otros insecticidas para el control de la broca del café», Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Disciplina de entomología. Chinchina, Colombia. Informe Anual de Labores, 1992.
- Calderón, A.: «Metodología para la prueba de compatibilidad con el hongo *B. bassiana* (Bals) Vuill con herbicidas y fertilizantes», *Manual metodológico*, pp. 24-25, Cuba, 1982.
- Goebel, H; S. Gorbach: «Properties, Effects, Residues, and Analytics of the Insecticide Endosulfan», *Residues Review* (E.U.) 83 (1): 1-174, 1982.
- Jacas J. A. y E. Viñuela: «Los efectos de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos en la agricultura. II. Fungicidas», *Phytoma* 48, España, 1993.
- Jiménez R. M. T.: *Impacto del uso del endosulfan y clorpirifos sobre Apis mellifera L. y Bombix mori L. en ecosistemas cafeteros*, Santafé de Bogotá (Colombia) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 1995.
- Rivera, M. A.: «Estudio sobre la compatibilidad del hongo *B. bassiana* (Bals) Vuill con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas», *Revista Colombiana de Entomología* 19 (4): 151-158, 1993.
- : «Compatibilidad de dos aislamientos de *B. bassiana* (Bals) Vuill en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari)», *Revista Colombiana de Entomología*, 20 (4): 209-214, 1994.
- Norma Cubana 72-02. Biopreparados Entomopatógenos. Métodos de ensayos. Biotecnología Agrícola, Cuba, 1993.
- Vergara, R. R.: «Análisis de la problemática de los plaguicidas en Colombia y alternativas de solución», Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 18 Cali, Miscelánea, Sociedad Colombiana de Entomología, Colombia, 21: 23-44, julio 1991.
- Viñuela, E; J. A. Jacas; V. Marcos: «Los efectos de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos en la agricultura y el grupo de trabajo de la OILB. Plaguicidas y Organismos Beneficiosos», España, no. 45, 1993.
- Zinnermann, G.: «*M. anisopliae* and Entomopathogenic Fungus in Biological Crop Protection», *Symposium* 24, Bayer, 45 (63): 113-128, 1992.