

VIRULENCIA DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, NATIVOS DEL OCCIDENTE DE MÉXICO, CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADIO DE *PHYLLOPHAGA CRINITA* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Miguel B. Nájera-Rincón,¹ M. García Martínez,² R. L. Crocker,² V. Hernández-Velázquez³ y L. A. Rodríguez del Bosque⁴

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Producción Sostenible. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENAPROS-INIFAP). Apdo. Postal 7-116 Morelia, Michoacán, México, CP 58260, c.e.: najera.miguel@inifap.gob.mx

² Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University Research & Extension Center. 17360 Coit Road, Dallas, Texas

³ Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB-DGSV-SAGARPA). Apdo. Postal 133 Tecmán, Colima, México, C P 282 10

⁴ Centro Regional de Investigación del Noreste (INIFAP). Apdo. Postal 172. Río Bravo, Tamaulipas, México, C P 88900

RESUMEN

Tres aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y uno de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin originarios del occidente de México fueron evaluados para uso potencial como agentes de control biológico contra larvas de tercer estadio de la «gallina ciega» *Phyllophaga crinita* (Burm.) (Coleoptera: Melolonthidae), plaga rizófaga de gran importancia económica en el sureste de Estados Unidos y noreste de México. Los aislamientos de los hongos entomopatógenos evaluados pertenecen a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB-DGSV-SAGARPA). El aislamiento M 498 de *M. anisopliae* registró el más alto nivel de virulencia, seguido de M 492, Bb 50 (*B. bassiana*) y M 493 a los 30 días de la inoculación. Todos los aislamientos fueron evaluados a una concentración de 2×10^8 con/g de medio. Los tratamientos fueron estadísticamente diferentes respecto al testigo y tuvieron la habilidad de crecer, esporular y producir micosis, lo que demostró su potencial para causar una epizootia. El aislamiento más virulento y con mayor potencial como agente de control biológico contra larvas de tercer estadio de *P. crinita* fue M 498, originario de Jalisco, México, aislado de larvas del mismo género.

Palabras clave: *Phyllophaga crinita*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, control microbiano

ABSTRACT

Three isolations of entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and one of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin from west Mexico were evaluated for their potential as biological control agents against white grub third instar larvae *Phyllophaga crinita* (Burm.) (Coleoptera: Melolonthidae), a very important root pest from the economical point of view. The evaluated fungus isolations belong to the National Biological Control Reference Center Collection (CNRCB-DGSV-SAGARPA). The isolation M. anisopliae M 498 showed the highest virulence level after 30 days of inoculation, followed by M 492, that showed similar behavior to that of *B. bassiana* Bb 50, and the less virulent was M 493. All isolations were evaluated at 2×10^8 conidia per gram of medium. Treatments were statistically different in comparison to control, and they were capable to grow, produce spores, and produce mycosis, demonstrating their capacity to cause an epizooty. Most virulent isolation showing the highest potential as biological control agent against white grub *P. crinita* third stadium larvae was M 498 from Jalisco, Mexico, isolated from larvae of the same genus.

Keywords: *Phyllophaga crinita*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, microbial control

INTRODUCCIÓN

Los estados inmaduros de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) conocidos como *white grub* o «gallina ciega» representan la plaga de mayor importancia económica tanto en pastos ornamentales como en diversos cultivos de gramíneas en el estado de Texas, Estados Unidos, y Tamaulipas, México, respectivamente. De acuerdo con

Crocker (1982), las pérdidas que ocasiona *P. crinita* en campos de golf y áreas verdes urbanas ascienden a 20 millones de dólares anuales. Por otra parte, Rodríguez del Bosque (1988) estimó pérdidas mayores a 2 t/ha en cultivos de maíz en el norte de Tamaulipas. En pastos ornamentales el síntoma principal del ataque de «gallina

ciega» es el amarillamiento del césped, el cual se levanta fácilmente cuando el daño es severo, mientras que en el cultivo de maíz el mal se asocia con la muerte de plántulas, amarillamiento, encamado de plantas debido a la carencia o deficiente desarrollo del sistema radicular y pérdida en el rendimiento de grano.

Desde hace más de cuarenta años, el combate de *P. crinita* se ha llevado a cabo mediante la aplicación al suelo de insecticidas sintéticos [Plapp & Frankie, 1976; Teetes, 1973, citados por Rodríguez del Bosque, 1988] sin resultados satisfactorios. Esta práctica se ha favorecido gracias a su rápida acción y disponibilidad de equipo para su aplicación; sin embargo, como consecuencia del uso de insecticidas sintéticos se ha contaminado suelo y agua, se ha eliminado fauna benéfica asociada a la rizosfera, además de provocar diversos tipos de daño en la salud de los agricultores [Bejarano, 2004].

Ante esta situación surge la necesidad de implementar alternativas que sean respetuosas del ambiente y eficaces en el combate de esta plaga. Entre varias posibilidades, destaca la utilización de enemigos naturales como los hongos entomopatógenos, los cuales representan una opción para el control biológico de esa plaga [Glare, 1992].

Basado en lo anterior, y como una actividad de cooperación interinstitucional entre el CENAPROS y Texas A&M

University, esta investigación tuvo como objetivo evaluar en laboratorio la virulencia de un aislamiento de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae* nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *P. crinita*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insecto plaga. Se colectaron 450 larvas de tercer estadio de *P. crinita* en dos localidades: 1) Campo Experimental de Texas A&M University Research and Extensión Center at Dallas, Condado de Dallas; 2) Campo de Golf de Plano Texas, Condado de Collin. Las larvas fueron colocadas en bandejas de plástico con suelo y llevadas al laboratorio, donde fueron evaluadas en función de su estado de salud, movilidad, así como de su capacidad de alimentación y seleccionadas para el bioensayo [Klein *et al.*, 2000].

Aislamientos de hongos. Con referencia a lo obtenido en bioensayos del tipo «prueba máxima» [Milner, 1992] contra larvas de *Phyllophaga* spp. y *Anomala* sp., efectuados en México [Nájera, 2000], fueron seleccionados cuatro aislamientos con alta virulencia, uno de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae*, los cuales fueron proporcionados por la Colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (SNRCB-DGSV-SAGAR). El número de aislamiento, clave de identificación, insecto hospedero, cultivo y localidad de origen se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados en el estudio

Número de aislamiento	Clave CNRCB	Hospedero	Cultivo	Origen
M493	MaGC	<i>Phyllophaga</i> sp.	Maíz	Jalisco
M492	MaGC6	<i>Phyllophaga</i> sp.	Maíz	Cofradía de la Luz, Jalisco
M498	MaGC9	<i>Phyllophaga</i> sp.	Maíz	Lagunillas, Jalisco
Bb50	BbGN4	<i>Galleria mellonella</i>	Caña de azúcar	Tepic, Nayarit

Para su evaluación, los hongos entomopatógenos fueron producidos en medios sólidos, con arroz como sustrato [Dorta y Arcas, 1996] y diatomita como medio inerte para su formulación.

Bioensayo de patogenicidad. El sustrato utilizado en el experimento (arena de río) no fue esterilizado. Tuvo un pH de 5,8 y fue tamizado con cedazo de 0,7 mm de diámetro. Las formulaciones de hongos entomopatógenos fueron mezcladas con diatomita para ajustar, en todos los casos, una concentración de 2×10^8 con/g, en 120 g de medio. Cada tratamiento incluyó 1 200 g de medio en la proporción 10% de hongo entomopatógeno formulado a la dosis indicada, más 90% de suelo seco. Esta formulación se mezcló uniformemente y se adicionó 150 mL de agua sin esterilizar (pH 8,33), hasta alcanzar una consistencia húmeda sin llegar al punto de saturación.

Cada tratamiento incluyó 60 vasos (26,6 mL) de plástico transparente limpios, colocados en bandejas de alu-

minio. En cada vaso fue colocada una larva de *P. crinita* con un trozo de camote dulce como alimento (*Ipomoea batatas*) y después se añadió 20 g de inóculo. El tratamiento testigo solo incluyó suelo y diatomita. Las bandejas en estudio fueron colocadas en cámara de incubación con oscuridad total, a temperatura de 27-30°C durante 30 días.

El diseño experimental fue completamente al azar y se utilizaron 60 insectos por tratamiento, el cual incluyó seis repeticiones de 10 larvas cada uno. Los datos fueron analizados usando el programa general modelo lineal SuperANOVA con separación de tratamientos determinado por Fisher's Protected LSD [Gagnon *et al.*, 1989].

Las larvas fueron evaluadas cada 24 h a partir del tercer día de iniciado el experimento, y se les adicionó comida cada semana, hasta cumplir 30 días de incubación. La mortalidad se determinó visualmente; las larvas vivas tienden a moverse cuando están expuestas a la luz o cuando

se agitan los vasos de plástico transparente. En caso de sospecha de muerte, fue confirmada por la ausencia de movimiento de la larva al ser tocada la superficie ventral del tórax con unas pinzas esterilizadas. Las larvas muertas fueron seleccionadas en bandejas por separado y colocadas en observación hasta detectar la esporulación de *Metarhizium* o *Beauveria*. Durante el periodo en estudio fue registrado el número de larvas vivas y el de cadáveres con esporulación debido al efecto del hongo entomopatógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza indicó diferencia altamente significativa ($P < 0,0001$) entre tratamientos. Los porcentajes de mortalidad obtenidos en el bioensayo para el lote testigo y tratamientos con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como el análisis estadístico que establece la separación entre medias, se presentan en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad sintomática y valores de significancia estadística en larvas de *P. crinita* a los 30 días después de la infección con hongos entomopatógenos (2×10^8 con/g)

Tratamiento	Clave	Mortalidad (%)
Testigo	–	0,0 a
<i>M. anisopliae</i>	M 493	25,0 b
<i>B. bassiana</i>	Bb 50	49,0 c
<i>M. anisopliae</i>	M 492	54,0 c
<i>M. anisopliae</i>	M 498	80,0 d

Del total de aislamientos evaluados, el M 498 y M 492 superaron el 50% de mortalidad a los 30 días después de iniciado el bioensayo. Este porcentaje confirma la virulencia de tales aislamientos, en particular la del M 498 que, en bioensayos del tipo «prueba máxima» contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga vetula*, registró ciento por ciento de mortalidad después de 18 días. Ambos resultados demuestran su potencial como agente de control microbiano contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga* spp.

Los porcentajes de mortalidad ocasionados por los demás tratamientos fueron superiores al testigo y se ubicaron en dos grupos, uno de regular virulencia integrado por el aislamiento *Bb* 50 –que registró 49% de mortalidad– y otro de baja virulencia, representado por el aislamiento M 493, el cual provocó el menor porcentaje de mortalidad en esta evaluación, situación que contrasta con lo obtenido en una evaluación previa bajo condiciones de «prueba máxima» contra larvas de tercer estadio de *Anomala* sp., donde causó 50% de mortalidad a los 21 días.

En comparación con los porcentajes de mortalidad ocasionados por los hongos entomopatógenos se registraron bajos porcentajes de mortalidad asintomática, debido probablemente a factores de manejo (*Fig. 1*). En este último caso se observó la presencia de ácaros necrófagos alimentándose de la larva muerta, los cuales generalmente acompañan a las larvas desde el momento de su colecta, además de que el sustrato, agua y alimento no fueron esterilizados.

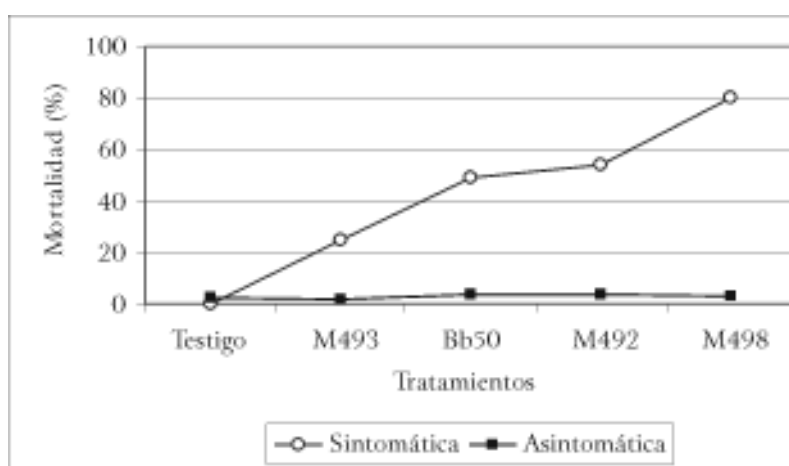


Figura. 1. Porcentajes de mortalidad en larvas de *P. crinita* a los 30 días de aplicar tratamiento con hongos entomopatógenos (2×10^8 con/g)

Los resultados en la presente evaluación coinciden con los registrados por Poprawski and Yule (1991) quienes evaluaron aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra larvas de *Phyllophaga anxia*, y concluyeron que esta especie es más susceptible a la infección causada por *Metarhizium*. Por otra parte, Shannon *et al.* (1993) encontraron una actividad similar al evaluar la virulencia de aislamientos costarricenses y exóticos de estos dos hongos entomopatógenos contra larvas de segundo y tercer estadio de *P. menetriesi* y *P. vicina*, respectivamente.

En este mismo sentido Rodríguez del Bosque *et al.* (2003), al evaluar bajo una modificación de la «prueba máxima» diversas cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra larvas de *P. crinita*, concluyen en términos generales que las cepas de *M. anisopliae* fueron mas virulentas que las de *B. bassiana* al registrar en uno de sus tratamientos un 96% de mortalidad a los 10 días de haberse aplicado.

CONCLUSIONES

- El aislamiento M 498 de *M. anisopliae* a la dosis de 2×10^8 con/g, originario de Jalisco, México, y aislado de *Phyllophaga* sp., fue el más virulento contra larvas de tercer estadio de *P. crinita*, con un registro de mortalidad de 80% a los 30 días de iniciado el experimento.
- Los resultados de esta evaluación indican que *M. anisopliae* es un agente de control microbiano con potencial para ser incluido en programas de manejo integrado de la «gallina ciega», tanto en parcelas agrícolas como en áreas urbanas.

REFERENCIAS

Bejarano, F.: «Daños crónicos a la salud provocados por los plaguicidas». Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM), México, 2004.

Crocker, R. L.: «Write Grub Management in Southwestern Turfgrass». Proc. Southwest Turfgrass Conf., E.U., 1982, pp. 44-47.

Dorta, B.; J. Arcas: «Producción de hongos entomopatógenos», *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*, Buenos Aires, Argentina, 1996, pp. 195-206.

Gagnon, J. J. *et al.* *SuperANOVA: Asscessible General Linear Modeling*. Abacus Concepts, Inc., Berkeley, 1989.

Glare, T. R.: «Fungal Pathogens of Scarabs», *Use of Pathogens in Scarab Pest Management*, Intercept, Andover, Hampshire, Inglaterra, 1992, pp. 63-77.

Klein, M. G. *et al.*: «Lawn Turf and Grassland Pests», *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 2000, pp. 681-706.

Milner, R. J.: «Selection and Characterization of Strains of *Metarhizium anisopliae* for Control of Soil Insects in Australia», *Biological Control of Locust and Grasshoppers*, CAB International, 1992, pp. 200-207.

Nájera-Rincón, M. B.: «Control biológico del complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) por hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en el occidente de México». Informe final proyecto CONACYT-SIMORELOS. Clave 970301, Morelia, Michoacán, México, 2000.

Poprawski, T. J.; W. N. Yule: «Incidence of Fungi in Natural Population of *Phyllophaga* spp. and Susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina)», *J. Appl. Ent.* 112:359-365, E.U., 1991.

Rodríguez del Bosque, L. A.: «*Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae): historia de una plaga del suelo (1955-1988)», *Memorias III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo*, Soc. Mex. Entomol., Morelia, Michoacán, México, 1988, pp. 53-79.

Rodríguez del Bosque, L. A. *et al.*: «Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* Against *Phyllophaga crinita* and *Anomala flavipennis* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae», *Estudios sobre coleópteros del suelo en América*, Publ. Esp. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, 2003, pp. 337-345.

Shannon, P. J.; S. M. Smith; E. Hidalgo: «Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. contra larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae)», *Diversidad y manejo de plagas subterráneas*, Publicación Especial Soc. Mex. Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México, 1993, pp. 203-215.