

Control biológico del coleóptero del maíz *Pagiocerus* sp. con *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio

Rene Andrew¹; Rosario Llerena²; Silvia Quiroga³

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias (FCAYP);

² Técnico de Fiscalización y Laboratorio INIAF Cochabamba; ³ Consultora

E mail: reneandrew22@yahoo.es

Resumen. Con el objeto de evaluar su eficiencia como biocontrolador de *Pagiocerus* sp., se realizó un bioensayo con el hongo *Beauveria bassiana*. Las larvas y adultos de este insecto realizan daños en maíz almacenado. En laboratorio, el insecto fue criado con el objeto de obtener adultos de una misma generación, y el hongo fue aislado y multiplicado con el objeto de realizar el bioensayo. Se utilizó un aislado de *B. bassiana* en cuatro diferentes dosis, a más de un tratamiento testigo con solución de Tween 80 al 0,2%. Se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 4 repeticiones. Se utilizaron 20 adultos del coleóptero por tratamiento, después de lavarlos se los desinfectó sumergiéndolos en hipoclorito de sodio al 1%, posteriormente se los sumergió en los diferentes tratamientos. Una vez secos se infestó el maíz que estaba en frascos pequeños de plástico transparente. Se evaluó la mortalidad de los adultos a los 5 días de inicio del bioensayo, posteriormente cada día hasta 26 días del inicio del bioensayo. Mediante la prueba de Duncan, se observó que todos los tratamientos son diferentes al testigo, habiéndose obtenido la mayor eficiencia con el tratamiento B: $1,35 \times 10^7$ conidias por mililitro, en solución de Tween 80 al 0,2%.

Palabras clave: Biosensayo; Hongos; Biocontroladores

Summary. Biological control of the *Pagiocerus* sp. maize with *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. In order to evaluate its efficiency as a biocontroller of *Pagiocerus* sp., a bioassay with the fungus *Beauveria bassiana* was carried out. The larvae and adults of this insect do damage to stored maize. In the laboratory, the insect was raised in order to obtain adults of the same generation, and the fungus was isolated and multiplied in order to perform the bioassay. A *B. bassiana* isolate was used in four different doses, at more than one control treatment with 0.2% Tween 80 solution. A completely randomized design was applied with 5 treatments and 4 replicates. Twenty adults of the coleoptera were used per treatment. After washing, they were disinfected by immersing them in 1% sodium hypochlorite; then they were immersed in the different treatments. Once dried, maize, which was in small transparent plastic jars, was infested. The mortality of adults was evaluated 5 days after the bioassay was started. Later, each day until 26 days after the bioassay was started. The Duncan test showed that all treatments were different from the witness, with the highest efficiency with treatment B: 1.35×10^7 conidia per milliliter, in 0.2% Tween 80 solution.

Keywords: Bioassay; Fungi; Biocontrollers

Introducción

Las larvas y adultos del coleóptero del maíz, recientemente identificado como *Pagiocerus* sp., provocan daños en maíz almacenado, consumen el interior de los granos constituido por el endosperma y el germen. Se ha observado a simple vista, en granos de maíz blanco, que las larvas por el color crema que tienen, son difíciles de detectarlas, pero no así los adultos que fácilmente se observan en el interior de los granos, porque son de color café a café oscuro. Los granos quedan totalmente vacíos apreciándose solo el pericarpio (cascara) (Figura 1). A medida que pasa el tiempo, se observa que los granos se

van apelmazando por efecto de la “especie” de harina, resultante de los daños y de las heces fecales de la plaga, que son la consecuencia del consumo de los granos.

Los adultos son de color café, miden aproximadamente 2,5 mm de largo (Figura 2), se caracterizan por sus antenas capitadas, observándose suturas curvas en los últimos segmentos finales, este tipo de antenas se caracterizan porque repentinamente son agrandadas, formando una “especie” de cabeza en la parte final de la antena (Figura 3).

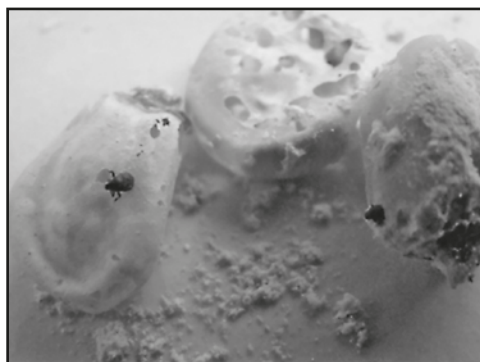
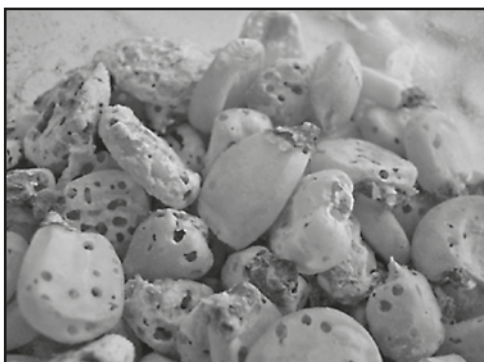


Figura 1. Granos maíz dañados por larvas y adultos de *Pagiocerus* sp.

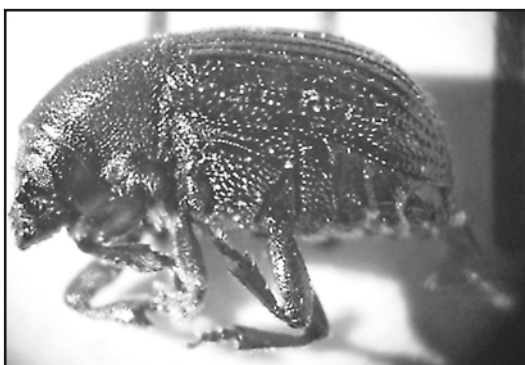


Figura 2. Los adultos de *Pagiocerus* sp. son de color café y miden aproximadamente 2,5 mm de largo

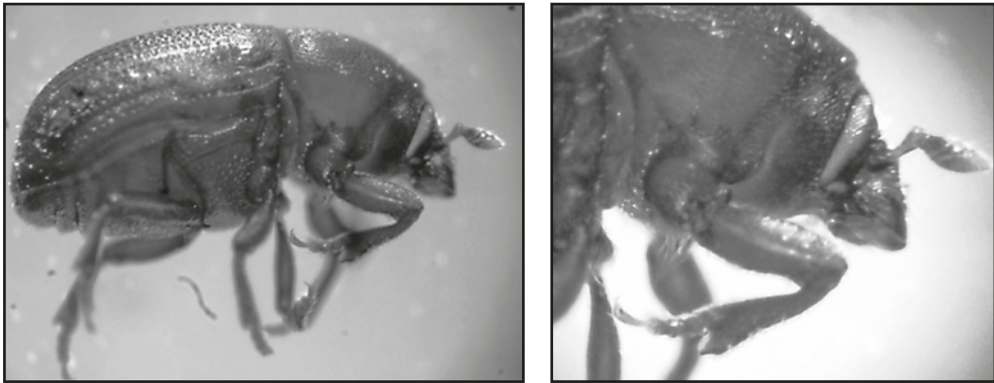


Figura 3. Adultos de *Pagiocerus* sp. mostrando sus antenas capitadas

Según la Fundación Charles Darwin Galápagos (1964), el primer reporte de la introducción de *Pagiocerus frontalis* F., en las islas Galápagos se dio el año 1964, y la vía de introducción fue en semillas o maíz.

Se halla ampliamente distribuido en áreas neo tropicales, desde Estados Unidos a la Argentina. Su papel trófico es barrenador de plantas vivas (semillas), considerándose polífago, taladra el maíz y aguacate, también se encontró sobre hojas de *Scallesia pedunculata*. Crecen en semillas carnosas del género *Lauraceae*, en especial *Persea*.

En cuanto a su reproducción y biología los adultos usualmente hacen agujeros a través de la corteza de árboles y túneles o galerías entre la corteza y la madera. Las larvas viven y se desarrollan en estas galerías. En bases de datos esta reportado en el Orden Coleoptera y en la Familia Scolytidae.

Gómez y Aguilera (1982) mencionan que este escarabajo identificado como *Pagiocerus* sp. efectúa daños severos en granos almacenados de maíz. La larva sale del huevo rompiendo el corión e inmediatamente comienza a alimentarse del conte-

nido interno del grano, cercano al nido; y posteriormente consume el embrión inutilizando el grano para semilla. El daño ocasionado por la larva, en un comienzo, es imperceptible desde el exterior, pero a medida que avanza el desarrollo larvario, el grano se va tornando transparente por el consumo casi total del endosperma que llevan a cabo las larvas de *Pagiocerus* sp.

Según Barriga - Tuñón y Kirkendall (2013) *P. frontalis* es un coleóptero de la Familia Curculionidae. Su distribución geográfica es: de USA (Carolina del Norte) a Argentina; Antillas (Guadalupe); Argentina; Bolivia; Brasil; Chile (norte, provincia de Arica, Tarapacá; introducida?); Colombia (Antioquia, Tolima); Costa Rica; Cuba; Ecuador; El Salvador; Guatemala; Honduras; México; Panamá; Perú (Tingo María); Estados Unidos de Norteamérica; Venezuela (Caracas). Por su parte, USDA APHIS PPQ CPHST (2011), indican que está distribuido del Sureste de los Estados Unidos (Texas) a Argentina, y las Antillas.

Las plantas hospederas son principalmente: mazorcas de maíz (*Zea mays*); semillas de *Ocotea* spp., *Persea americana*, *Persea* spp. Su época principal de actividad se da entre julio, octubre, noviembre.

Se reporta la especie a una altura media de 1490 metros sobre nivel del mar.

La especie *Pagiocerus* Eichhoff se diferencia de *Cnesinus* LeConte, por las suturas curvas de los segmentos grandes del final de su antena. Las especies de *Pagiocerus* están en el rango de 1,9 a 2,6 mm de longitud, tienen una proporción aproximada de 1,9 veces más largo que ancho. El color de las especies que están en el territorio continental de Estados Unidos es de color marrón oscuro.

El pronoto generalmente es más ancho que largo. El escutelo es pequeño.

Especímenes de *Pagiocerus frontalis* fueron obtenidos en maíz, entre 13°C y 30°C. Por debajo y por encima de estas temperaturas, el desarrollo no se completó. La temperatura óptima de desarrollo fue de 25°C. Este insecto es capaz de producir la F₁ entre 20% y 75% de humedad relativa, la mortalidad es menor cuando la humedad relativa es alta (Okeillo *et al.*, 1996).

Wendt y Schulz (1991) mencionan que el grano de maíz y la semilla de palto, fueron los únicos alimentos en los que se logró la ovoposición y el desarrollo de *Pagiocerus frontalis*.

La duración mínima del ciclo de vida de huevo a adulto, en maíz blando a 23°C y a 90% o 60% de humedad relativa (HR) fue de 21,7 a 25 días, respectivamente. El número de adultos emergidos (F₁) fue reducido significativamente a 60 de HR. Temperaturas más bajas incrementaron la duración del ciclo de vida encima de 26,5 días después de 5,5 días de pre ovoposición.

El número más alto de adultos emergidos en la F₁ fue observado a 20°C y 80% de HR. A 10°C la ovoposición no se realizó.

En cuanto al control de *Pagiocerus frontalis* y *Sitophilus oryzae*, Aldana (1994) determinó que la Deltametrina (K-Biol 2p, 500 g/tonelada) en maíz entrojado con medio amero (con brácteas), es 6 veces menor que en el testigo, y en maíz desgranado 22,7 veces menor que en el testigo.

En nuestro medio, se reporta que la primera vez que se observó este insecto fue en mazorcas de maíz, en almacenamiento, provenientes de Cliza (Andrew R., comentario personal). Posteriormente se crió el insecto en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico, Investigación y Museo de Entomología (CEDIMENTO - FDRyT) y paralelamente en el Laboratorio de Fitopatología del INIAF, con el fin de obtener adultos para realizar los bioensayos con *B. bassiana*. Este hongo entomopatógeno se produjo en el mismo Laboratorio del INIAF.

Materiales y métodos

Aislamiento de B. bassiana

El hongo *B. bassiana*, fue aislado a partir de un ejemplar del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*) (Coleoptera: Curculionidae). Este picudo infestado fue colectado de la localidad de Esmeralda, Trópico de Cochabamba, el año 2005 (Mamani & Llerena, 2005). Este hongo fue aislado en PDA, purificado por el método del estriado y guardado en tubo con PDA inclinado, en refrigeración. En el año 2010, fecha en la cual se realizó este estudio, este aislamiento fue reactivado sembrándose en cajas Petri con PDA.

Los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Beauveria* sp., *Metarrhizium anisopliaea*, *Metarrhizium* sp. y otros, se utilizan para controlar plagas.

Al constituirse en una alternativa para el control de muchas plagas, existe la necesidad de caracterizarlos, mediante bioensayos con una determinada plaga que se constituya en un “estándar”, cuyas peculiaridades sean: “fácil de criar en condiciones de laboratorio, de reproducción rápida y que su cría sea económica. En este caso se seleccionó al coleóptero *Pagiocerus* sp., que ataca al maíz almacenado, por tener las propiedades mencionadas anteriormente.

Multiplicación masiva de B. bassiana

Aislado el hongo en capsulas Petri conteniendo PDA, se dejó crecer para luego cosechar e inocular arroz que se tenía en bolsas de polipropileno y que fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Con ayuda de un asa estéril, se recolectó el hongo que creció en el medio de cultivo y se colocó en una solución acuosa de Tween 80 al 0.057% que estaba en un matraz, el cual se tapó con papel aluminio esterilizado. Esta suspensión de conidias se agitó dos veces en agitador orbital, durante 30 segundos. Luego se sembró el aislado en el sustrato de arroz con ayuda de micropipeta de capacidad de 1000 a 10000 μ l, se tomaron 15 μ l de la suspensión y se vertieron en el arroz. Se cerró la bolsa realizando dobleces y se engrapó; se esparció el inóculo apretando suavemente la bolsa con las manos, facilitando la dispersión del hongo inoculado en el arroz.

Se dejaron las bolsas en el estante del Laboratorio durante 7 días aproximadamente, observando y verificando el crecimiento del hongo.

Concentración de los aislados

Se determinó utilizando la cámara de Neubauer, la cual debe estar limpia y seca, con la ayuda de una pipeta se tomó un volumen de 10 μ l y se depositó la muestra por cada compartimiento o ranuras de la cámara de Neubauer. Se debe tener cuidado de no formar burbujas, de ser así, la cámara deberá ser lavada, secada y se vuelve a montar la muestra.

Una vez que se tuvo la muestra lista, se la colocó en el microscopio y se enfocó primero con el objetivo 10X, una vez teniendo visualizado el cuadrante central, se observó con el objetivo 40X y se procedió a realizar la lectura de las esporas en los 25 cuadrantes, estos divididos a su vez, cada uno, en 16 cuadrantes más pequeños. La lectura se realizó teniendo un orden de derecha a izquierda, esto se debe realizar en los dos espacios de lectura con los que cuenta la cámara de Neubauer, teniendo así dos lecturas de la misma muestra.

La lectura obtenida se debe registrar en un formato para poder realizar los respectivos cálculos. Se deben realizar tres montajes de la lámina por muestra, ya que se lee en los dos espacios que tiene la cámara, esto se realiza para las dos repeticiones realizadas. Se debe tener en cuenta la dilución a la cual se realiza la lectura y el factor de dilución en la cámara de Neubauer que es $1 \cdot 10^{-4}$.

El resultado indicó que la concentración obtenida fue de $1,1 \cdot 10^8$ esporas/mililitro.

Este resultado se multiplica por la cantidad de agua destilada más Tween 80 al 0,057% que se adiciono al aislado, en este caso fueron 100 mililitros, entonces:

$$1,1 \cdot 10^8 \text{ esporas/mililitro} \cdot 100 \text{ mililitros} = 1,1 \cdot 10^{10} \text{ esporas totales en la solución}$$

De esta forma se determinó la concentración del inóculo utilizado para producir las diferentes formulaciones de hongos entomopatógenos.

Bioensayo utilizando adultos de *Pagiocerus* sp.

Para realizar el bioensayo se efectuaron los siguientes pasos:

- Conteo de conidias para que los aislados tengan la misma concentración; se utilizó la Cámara de Neubauer.
- Lavado de los coleópteros en agua.
- Desinfectado de los coleópteros con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto. Para evitar intoxicación, inmediatamente se los lavó con agua destilada estéril.
- Se sumergieron 20 adultos del coleóptero en cada uno de los tratamientos durante 1 minuto.
- Se sacaron los coleópteros para dejarlos secar e infestar los granos de maíz.
- Se dividieron los 20 coleópteros en cuatro frascos de plástico que ya tenían granos de maíz, cada frasco correspondió a una unidad experimental. Se anotó el tratamiento y la fecha en el frasco, y se colocó un pedazo de tela fina afirmada con elástico, en la entrada del frasco para evitar que los insectos se escapen. Se colocaron los frascos en una bandeja para dejarlos en la sala de cría (Figura 4).



Figura 4. Frascos de plástico que se utilizaron para el bioensayo con adultos de *Pagiocerus* sp.

Diseño experimental y variables de respuesta

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones. Las variables de respuesta fueron: mortalidad de los coleópteros a los 5 días de inicio del bioensayo, posteriormente cada día hasta 26 días del inicio del bioensayo.

Tratamientos

- 1,35 * 10⁸ conidias por mililitro en solución de Tween 80 al 0.2%.
- 1,35 * 10⁷ conidias por mililitro en solución de Tween 80 al 0.2%.
- 1,35 * 10⁶ conidias por mililitro en solución de Tween 80 al 0.2%.
- 1,35 * 10⁵ conidias por mililitro en solución de Tween 80 al 0.2%.
- Testigo: Tween 80 al 0.2%

Resultados y discusión

Mediante la Prueba de F, se observó diferencias significativas entre los tratamientos a los niveles 5% y 1%, esto quiere decir que existen tratamientos que se comportaron de manera diferente, respecto a la mortalidad de *Pagiocerus* sp.

Mediante la prueba de Duncan, se observa que todos los tratamientos son diferentes al testigo, habiéndose obtenido la mayor eficiencia con el tratamiento B; que es la segunda dosis más alta después del tratamiento A. También se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos C y D, esto quiere decir que ambos son iguales en eficiencia para controlar a *Pagiocerus* sp. El tratamiento A, que es el de mayor dosis, mostró la menor eficiente en el control del coleóptero, posiblemente porque una sobredosis puede inhibir el proceso de colonización del hongo biocontrolador, sin embargo es más eficiente que el testigo (Figura 5). Estos resultados muestran

que el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, es una alternativa para el control de la plaga considerada, por lo cual se recomienda continuar estos bioensayos, utilizando otros aislados de *B. bassiana* u otros hongos entomopatógenos. El crecimiento de *B. bassiana*, en los coleópteros utilizados, se puede ver en la Figura 6. El hongo, a medida que pasa el tiempo, llega a cubrir casi todo el cuerpo del insecto. La mortalidad de los insectos muertos por el hongo fue comprobada dejando los adultos sospechosos de estar muertos en cámara húmeda, utilizando para ello cápsulas Petri y dejando dichas cápsulas en el laboratorio a temperatura ambiente.

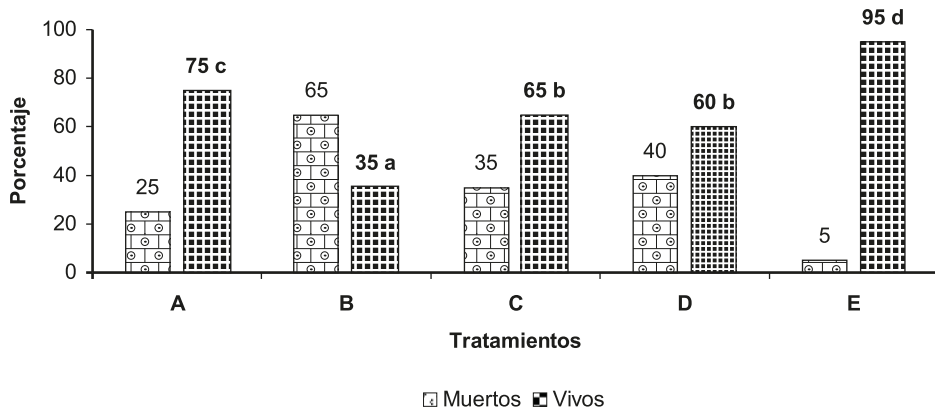


Figura 5. Porcentaje de adultos muertos y vivos del coleóptero *Pagiocerus* sp., como efecto de cinco tratamientos con el biocontrolador *B. bassiana* (Laboratorio de Fitopatología INIAF, Cochabamba, 2010) (Valores de columnas con la misma letra, son iguales al 5% según la prueba de Duncan)

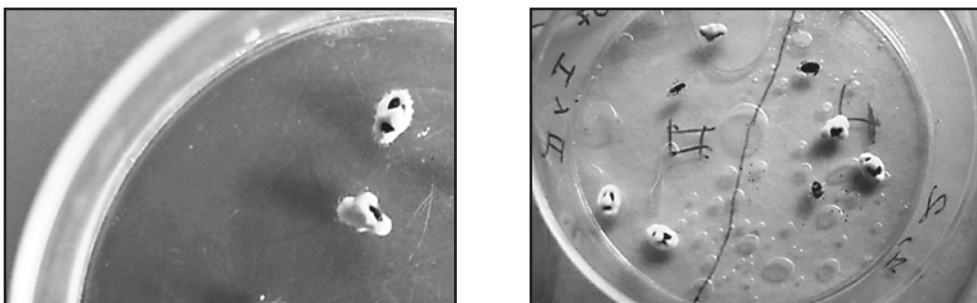


Figura 6. Adultos de *Pagiocerus* sp. muertos por el hongo *B. bassiana* (Laboratorio de Fitopatología INIAF, Cochabamba, 2010)

Conclusiones

- El coleóptero utilizado para realizar la investigación sobre control biológico, es del género *Pagiocerus*.
- En condiciones de laboratorio, este insecto se reproduce en granos de maíz, obteniéndose nuevos adultos que se pueden utilizar para realizar bioensayos con biocontroladores.
- Con el tratamiento B se obtuvieron 13 muertos de 20 adultos utilizados en total, este resultado se considera eficiente respecto del testigo, con el que se obtuvo 1 muerto de 20 adultos, significativamente diferentes mediante la prueba de Duncan (5%).

Referencias citadas

- Aldana A. 1994. Eficiencia de la Deltrametrina en polvo (k-obiol) en el control de los gorgojos del maíz (*Sitophilus oryzae* (L.) y *Pagiocerus frontalis* (F.) en la zona maicera de Caqueza (Cundinamarca). *En línea*. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/> Consultado en febrero de 2016.
- Barriga-Tuñón J.; Kirkendall L. 2013. *Pagiocerus frontalis* (Fabricius, 1801: 389). *En línea*. Disponible en: <http://www.coleoptera-neotropical.org> Consultado en octubre de 2014.

Fundación Charles Darwin. Base de datos de invertebrados introducidos a Galápagos. Islas Galápagos. 1964. *En línea*. Disponible en: http://rockbugdesign.com/invert_ref/ Consultado en julio de 2014.

Gómez D.; Aguilera P. 1982. Biología de *Pagiocerus frontalis* (Fab.) Coleóptera: Scolytidae) en la I Región de Chile.

Okello S.; Reichmuth Ch.; Schultz F. 1996. Laboratory investigations on the developmental rate at low relative humidity and the developmental temperature limit of *Pagiocerus frontalis* (Fab.) (Col., Scolytidae) at high and low temperatures. *Anzeiger für Schädlingkunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*. November/December 1996, Volume 69, Issue 8, 180-182. *En línea*. Disponible en: <http://link.springer.com/article/> Consultado en julio de 2014.

USDA APHIS PPQ CPHST. 2011. Bark Beetle Genera of the United States. *En línea*. Disponible en: <http://idtools.org/id/wbb/bbgus/> Consultado en enero de 2014.

Wendt; Schulz. 1991. Studies on the biology and ecology of *Pagiocerus frontalis* (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae) infesting stored maize in Ecuador. pp. 61-68. In: F. Fluérat-Lessard and P. Ducom (eds.). Proceedings of the 5th International Working Conference and Stored - Products Entomology, Bourdeaux, France. *En línea*. Disponible en: <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcsspp/> Consultado en octubre de 2014.

Trabajo recibido el 07 de marzo de 2016 - Trabajo aceptado el 20 de junio de 2016

Agradecimiento:

Ejemplares adultos del insecto se enviaron al Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia (España), para confirmar su identificación. Se agradece especialmente al Profesor Joaquín Baixeras (PhD) por su colaboración.