



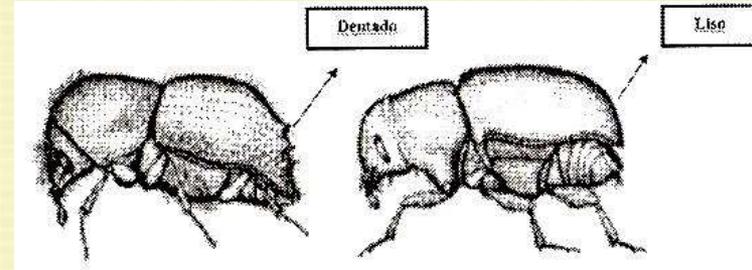
**Evaluación de hongos entomopatógenos para el control de escarabajos descortezadores de pino.  
Pruebas de laboratorio y de campo.**

**Alejandro D. Camacho, Cristina G. Nolasco Romero,  
Alfredo Perea Alcalá, Carolina G. Nolasco Romero,  
Víctor J Arriola Padilla y Francisco Reséndiz Martínez**

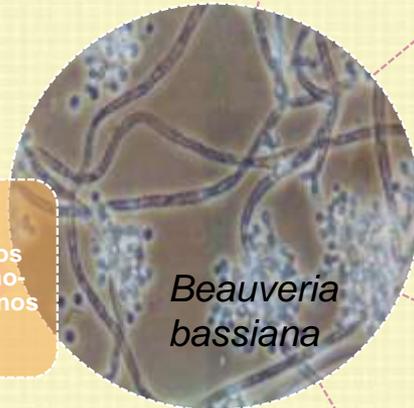


# INTRODUCCIÓN

Los escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus* e *Ips* son plagas forestales de mayor importancia debido a que afectan tanto a árboles individuales, grupos compactos de individuos o masas forestales de cientos de hectáreas.



# ANTECEDENTES



## Susceptibilidad

• *Pityogenes chalcographus*, *Trypodendron lineatum*, *Scolytus scolytus* (Barson, 1977) e *Ips typographus* (Kreutz *et al.*, 2004).

## Aislamiento

• Doberski J. W. *et al.*, (1980) que realizó el aislamiento de *Beauveria bassiana* encontrando la forma conidial en corteza y el suelo de la base de árboles, donde observó que los conidios presentes en la corteza se originaron de insectos infectados sobre o debajo de corteza.

## Evaluación de cepas

• Pabst G. S. y Sikorowski P.P., (1980) aplicaron *B. bassiana*, *Paecilomyces viridis* y *M. anisopliae* con larvas de *D. frontalis* y determinó DL50 y DL90 .

• Doberski J. W., (1981) probó a *B. bassiana*, *M. anisopliae* en adultos de *Scolytus scolytus*, y a *Paecilomyces* aplicado a larvas , concluyendo que *B. bassiana* fue más patógeno.

• Sánchez *et al.*, (2007) aplicó *B. bassiana* en agua a *D. mexicanus* sin encontrar diferencias significativas con el testigo

## Evaluación de aplicaciones

• Rivera *et al.*, (2009) evaluó la efectividad de cepas comerciales de *B. bassiana* para el control del *D. mexicanus* en solución acuosa sobre trozas almacenadas en botes de acero galvanizado. Las pruebas de aislamiento mostraron que en ningún tratamiento se presentó infección por dichos hongos.

## Estrategias prometedoras

• Zhang *et al.*, (2010) prueba el gran potencial de *B. bassiana* para el manejo de algunas especies de escarabajos descortezadores incluyendo la posibilidad de combinar su efectividad con trampas cebadas con semioquímicos

Los métodos comunes de combate poco eficientes (Islas, 1980)

Control Biológico

Hongos entomopatogenos



✓ Los hongos entomopatógenos (HE) son importantes enemigos naturales de muchas especies de insectos y de ácaros debido a :

- ✓ Capacidad patogénica
- ✓ Mínimo efecto negativo en el ambiente



Desarrollo de alternativas comerciales para el control de plagas de importancia económica (Alatorre, 2000; Roy *et al.*, 2010)

✓ Mejorar su eficacia y su permanencia en campo. (Bastidas, 2009).

✓ Principal limitante en el uso de los HE: **proporcionar las condiciones adecuadas como humedad relativa alta y temperatura** para que inicie el proceso de infección



**Formulación.**

(Alatorre, 2000; Cardona, 1998).

El desarrollo de la enfermedad por HE en un insecto esta dividido en tres fases:

(1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto

(2) penetración en el hemocele

(3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto

Referencia: (Tellez- Jurado *et al.*, 2009)

Carballo (2001) reporta que los HE en formulaciones oleosas han dado buenos resultados :

- ❑ Mejor adherencia de los conidios a la cutícula hidrofobia de los insectos

- ❑ Mayor sobrevivencia de conidios

- ❑ En adición con el agua contenida en la formulación favorece al proceso de germinación

- ❑ Emulsiones de hongos:  
aceites soya (Carballo 2001)  
aceite de girasol y de maíz (Bastidas et al. 2009)  
citrolina (Gallegos-Morales et al., 2005)



A)



B)

Figura. Conidios y conidióforos A) *Beauveria bassiana* B) *Metarhizium anisopliae*

Se ha empleado mayormente a *B. bassiana* contra plagas de interés agrícola en formulaciones secas usando sustratos sólidos como arroz (Carballo 2001; Gallegos-Morales et al., 2005) y formulaciones líquidas.

## JUSTIFICACIÓN

Los métodos autorizados para el control y manejo de los descortezadores han provocado, un desfase en el que la plaga va siempre adelante; debido a que implica un aprovechamiento maderero propiciando abusos y grave impacto

Esta problemática se hace más evidente en Áreas Naturales Protegidas.



Se requiere de más opciones para el manejo y control que resulten efectivas, prácticas a nivel operativo y de bajo impacto, para su manejo y control particularmente en zonas en las que los métodos tradicionales resultan inviables como es el caso de las Áreas Naturales Protegidas.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la susceptibilidad de escarabajos descortezadores de los géneros *Dendroctonus* e *Ips* a la infección con hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* inoculados en pruebas de laboratorio y determinar el tipo de formulación adecuada de estos hongos para su aplicación en condiciones de campo con fines de control de los descortezadores.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la viabilidad de las esporas de las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
- Evaluar la efectividad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en diferentes concentraciones para el control de escarabajos descortezadores de los géneros *Dendroctonus* e *Ips*.

# MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, de las cuales se adquirieron dos cepas comerciales: de *Beauveria bassiana* PHC® BEA TRON® en presentación de polvo humectable en una concentración de  $1.2 \times 10^{12}$  conidias en 240 gr.; y de *Metarhizium anisopliae* PHC® META TRON® en polvo humectable en una concentración de  $1.2 \times 10^{12}$  conidias en 240 gr.



# Prueba de Viabilidad y determinación de las concentraciones

## Prueba de Viabilidad

- A cada una de las cepas de los hongos entomopatógenos.
- Se uso la metodología propuesta por Hernández (2011) en el Taller: Control de Calidad de microorganismos entomopatógenos, para ambas cepas .
- Se realizó por triplicado.



## Determinación de las concentraciones a usar

- Cámara de Neubauer
- Técnica de dispersión en superficie con varilla acodada en la cual se utilizó placas con Agar Dextrosa Sabouraud

# BIOENSAYOS

Se colocaron grupos de 10 adultos de *D. adjunctus* en una caja de Petri con papel filtro humedecido.

\* Misma técnica aplicada con *Ips bonanseai*



Se inocularon las dos cepas de hongos en una cantidad de 10  $\mu$ l a diferentes concentraciones \* (Ver tabla 1)



Se dejaron incubar a 12°C



Se conto con un Testigo al que se aplico agua destilada



Se conto con 3 repeticiones observándose a lupa durante 6 días

Cuadro No. 2 Correspondencia entre el factor de dilución y la concentración de esporas para los hongos entomopatógenos empleados.

Factor de dilución	Concentración (esp/ml)	
	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Sol. Madre	6.335x10 <sup>10</sup>	4.26x10 <sup>10</sup>
10 <sup>-1</sup>	6.335x10 <sup>9</sup>	4.26x10 <sup>9</sup>
10 <sup>-2</sup>	6.335x10 <sup>8</sup>	4.26x10 <sup>8</sup>
10 <sup>-3</sup>	6.335x10 <sup>7</sup>	4.26x10 <sup>7</sup>
10 <sup>-4</sup>	6.335x10 <sup>6</sup>	4.26x10 <sup>6</sup>
10 <sup>-5</sup>	6.335x10 <sup>5</sup>	4.26x10 <sup>5</sup>
10 <sup>-6</sup>	6.335x10 <sup>4</sup>	4.26x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-7</sup>	6.335x10 <sup>3</sup>	4.26x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-8</sup>	6.335x10 <sup>2</sup>	4.26x10 <sup>2</sup>

\*Los renglones de color naranja, corresponden a las concentraciones probadas en los bioensayos

# Aplicación en trozas de *Pinus hartwegii*

Preparación de Formulaciones: Acuosa y Oleosa para ambos cepas de hongos.

Solución Acuosa: Tween 20 al 0.1% y las conidias en agua.

Solución Oleosa: Tween 20 al 0.1%, Aceite mineral al 15% y las conidias.

En ambas ocasiones se ajustó el pH a 6 empleando hidróxido de potasio.

En consideración el porcentaje de viabilidad:

*B. bassiana* =  $6.8 \times 10^4$  esp/Lto

*M. anisopliae* =  $6.96 \times 10^4$  esp/Lto

Toma de muestras a los 7 y 14 días después, tomando al azar 3 cuadros de  $10 \times 10$  cm<sup>2</sup> en cada troza y colectando a los adultos emergentes de cada troza.

Se colocaron en bolsas de malla de polyester y se dejaron incubar a 20 °C en cuartos separados para cada tratamiento.

En la aplicación se usó una aspersora manual a razón de 1 Litro por cada 3 trozas a saturación y para el Testigo por triplicado que solo contenía agua destilada.

Se conservaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  para su posterior análisis.

## Registro de datos

**Número y longitud de galerías**

**Número de insectos** en cada estado de desarrollo,:

**Vivos**

**Muertos**

**Infectados** (con evidencia de desarrollo del hongo), estos últimos de mantuvieron en tubos Eppendorf a  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



## Aislamiento

**Técnica de la impronta por cuatro puntos** usando como medio de cultivo Agar Micológico con cloranfenicol y cicloheximida a una temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



## Análisis estadístico

Datos de porcentaje de mortalidad para cada tratamiento se efectuó un transformación Arco-senica ( $p' = \arcseno \sqrt{p}$  ; donde  $0 < p < 1$ )

Los datos transformados fueron sometidos a un Análisis de Varianza (**ANOVA**) de una vía, seguido de una prueba de comparación de medias de Rango múltiple de **Ryan-Einot Gabriel-Welsch** (**REGWQ**).

Trozos: datos de longitud de galerías principales (LGP) y número de galerías principales (GP) en  $100 \text{ cm}^2$  de corteza, se aplicó directamente **ANOVA** y **REGWQ**

En todos los casos se uso  $\alpha = 0.05$ .

Se utilizaron los programas Microsoft EXCEL 2010 y SAS v. 9.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## PRUEBA DE VIABILIDAD

*Beauveria bassiana* = 85% en el transcurso de 48 y 72 hrs de incubación.

*Metarhizium anisopliae* = 87% dentro de las 72 y 96 hrs.

## BIOENSAYOS

Las altas mortalidades registradas en los tratamientos testigo no permitieron un ajuste al modelo matemático del análisis Probit por lo que se procedió a evaluar que formulaciones de los hongos entomopatógenos provocaron mortalidades significativas

Inoculación de *Beauveria bassiana* a los descortezadores

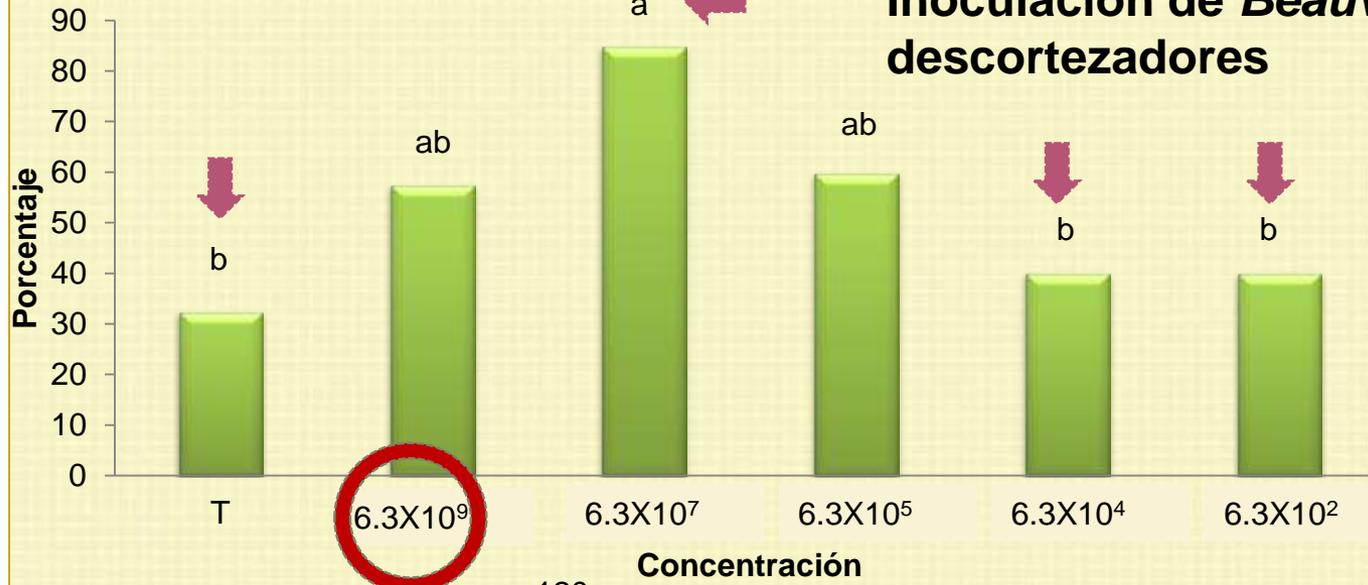
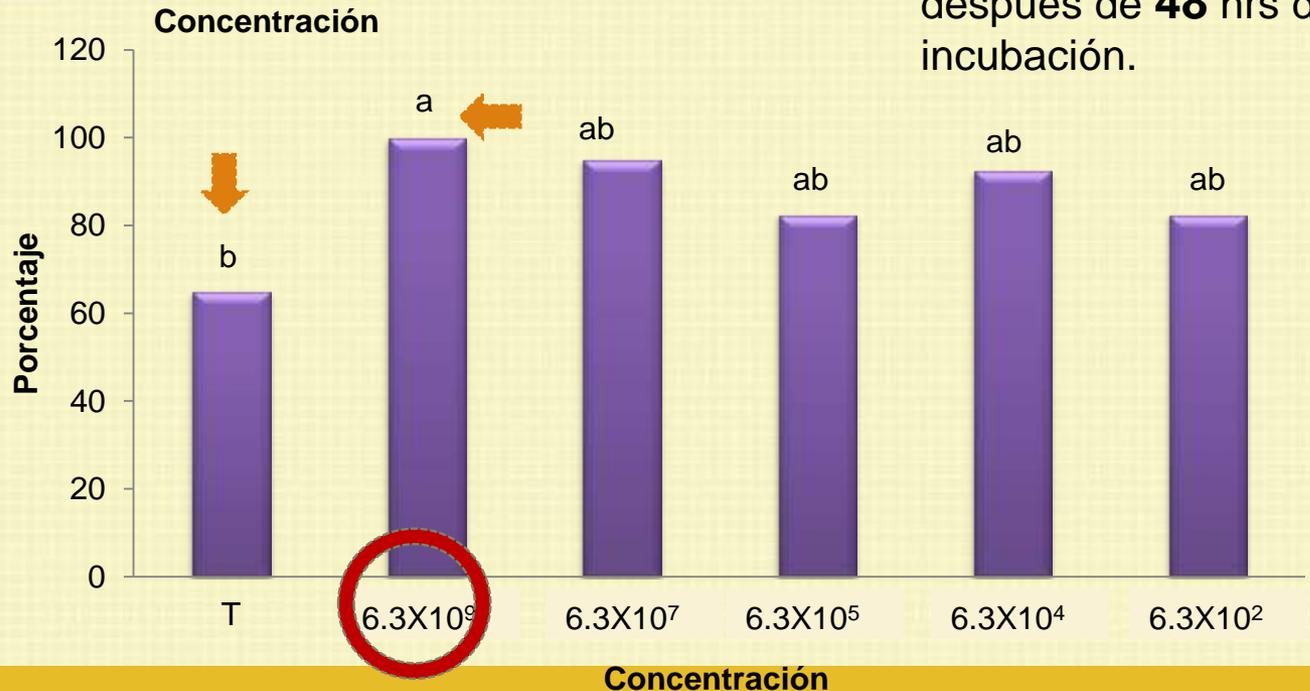


Figura 15. Porcentaje de individuos adultos muertos de *Dendroctonus adjunctus* tratados con *Beauveria bassiana* a diferentes concentraciones después de 48 hrs de incubación.

Figura 16. Porcentaje de *Dendroctonus adjunctus* muertos, tratados con *Beauveria bassiana* a diferentes concentraciones después de 72 hrs de incubación.

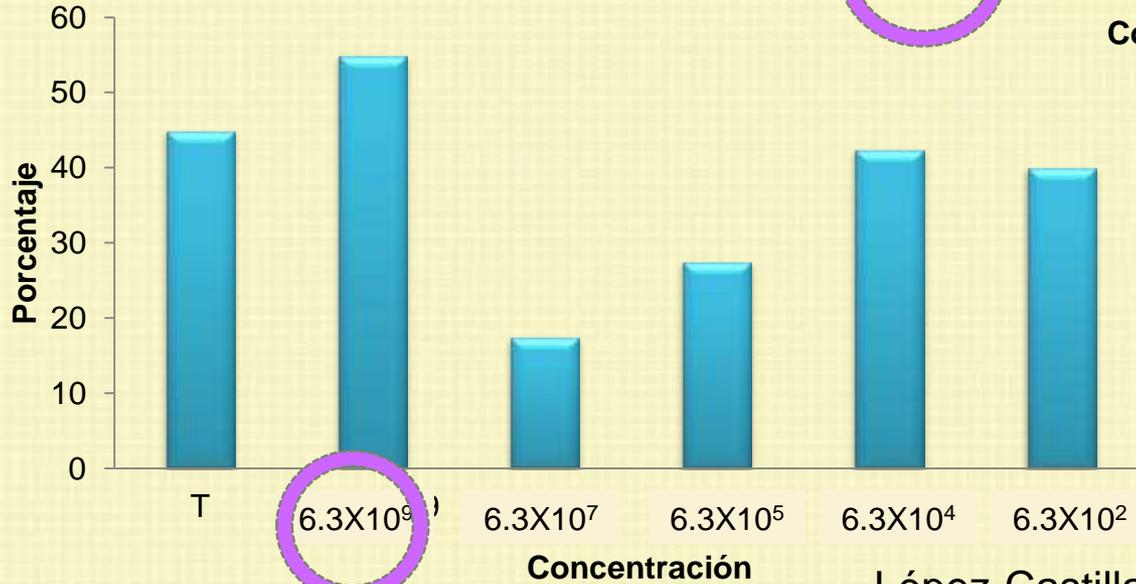


Barras con la misma letra son estadísticamente iguales,  $\alpha = 0.05$ .

Los datos analizados a las 72 hrs de la aplicación (Figura 16) mostraron que el tratamiento que presenta diferencias significativas con respecto al testigo (ANOVA y REGWQ) correspondió a la inoculación con la concentración  $6.3 \times 10^9$ , lo cual sugiere que algunas esporas tardan más en infectar a los insectos o bien que se requiere de una mayor cantidad de inóculo para rebasar la respuesta inmune de los insectos y más tiempo para definir el curso de la infección.

La tendencia inicial con la concentración de  $6.3 \times 10^7$  se mantiene (Figura 15) sin embargo, no se alcanza la diferencia significativa con respecto al testigo, probablemente debido a un aumento en la mortalidad del testigo o por la acción de los mecanismos de defensa del insecto que actúan frente a una concentración mayor y los mecanismos de patogenicidad del hongo como lo indican Téllez-Jurado *et al.*, (2009), que mencionan que los insectos pueden modificar su comportamiento como una defensa contra los agentes patógenos.

**Figura 17.** Porcentaje de mortalidad, aplicación de *B. bassiana* a adultos de *Ips bonansea* en un periodo de incubación de 48 hrs.



**Figura 18.** Porcentaje de mortalidad. Aplicación de *B. bassiana* a adultos de *Ips bonansea* a 72 hrs. de incubación.

López-Castilla *et al.*, 2009, reportan que en secciones de pino a las 72 hrs de la infestación de *Ips* a las que se les aplicó *B. bassiana* en solución acuosa no mostraron diferencias significativas.

Inoculación de *Metarhizium anisopliae* a los descortezadores

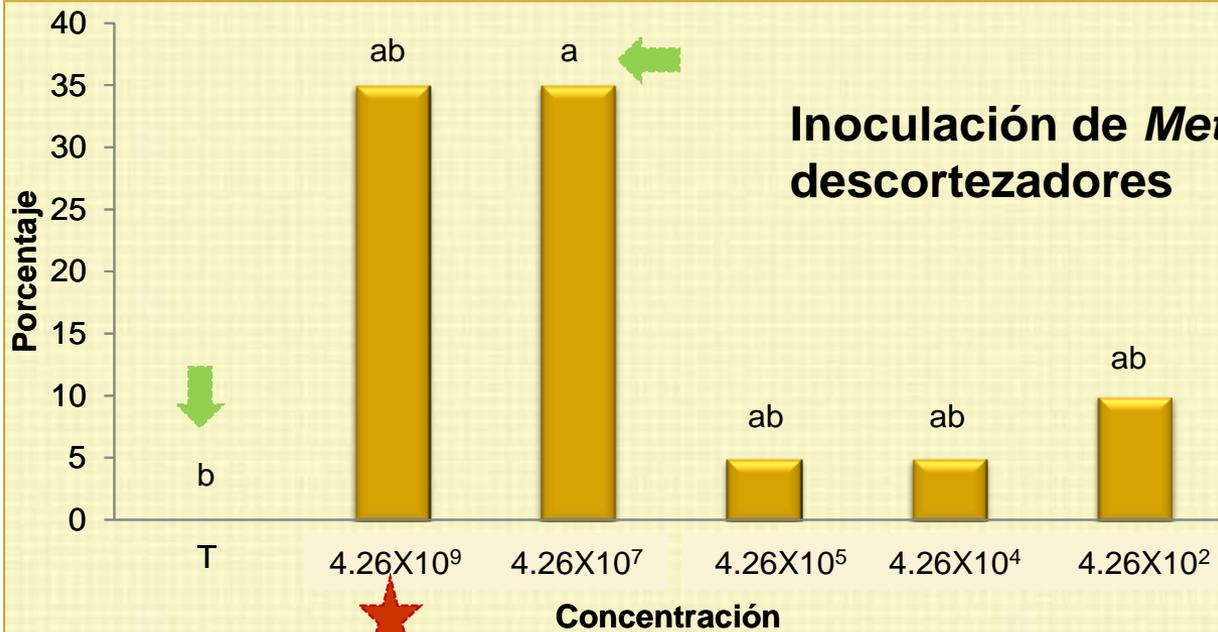
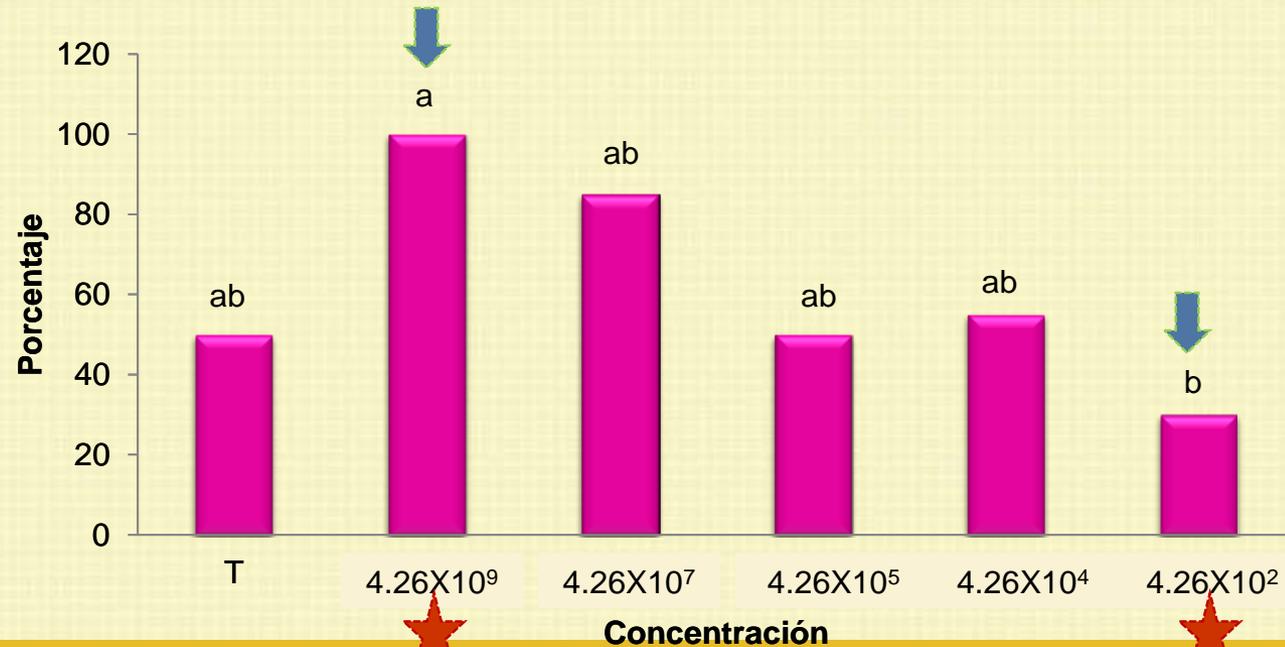


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de *D. adjunctus* inoculados con *M. anisopliae* después de 72 hrs.

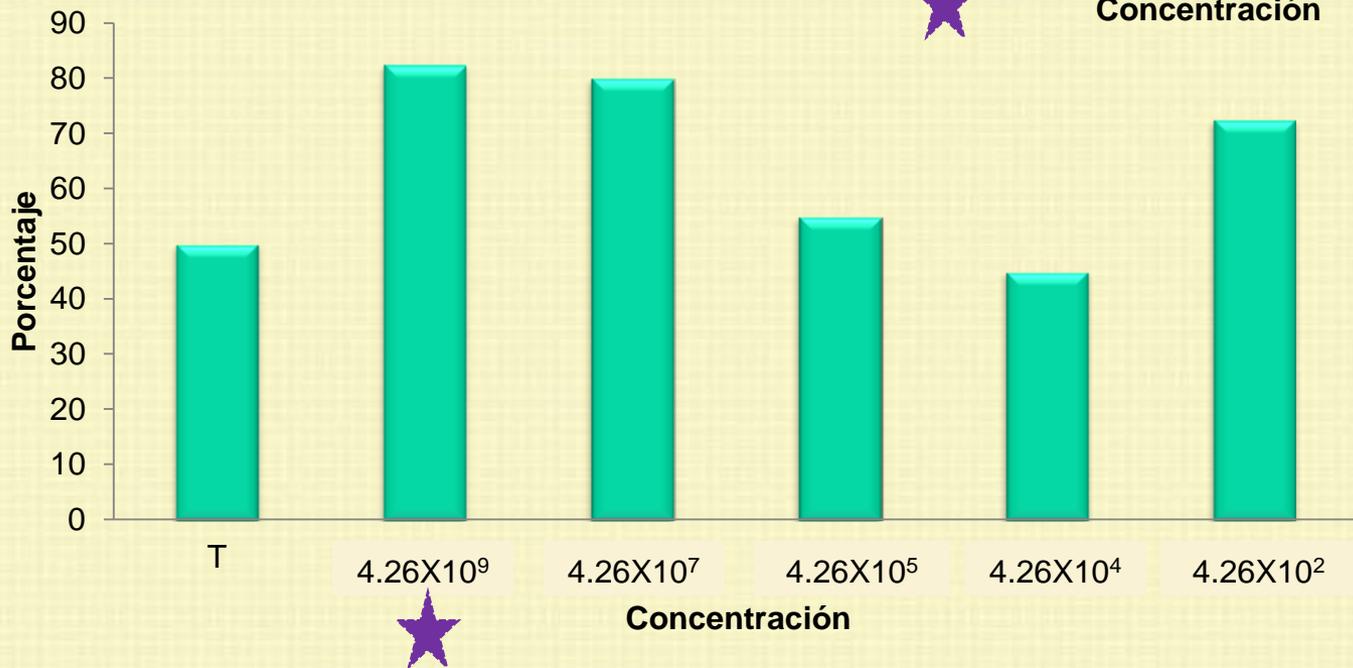
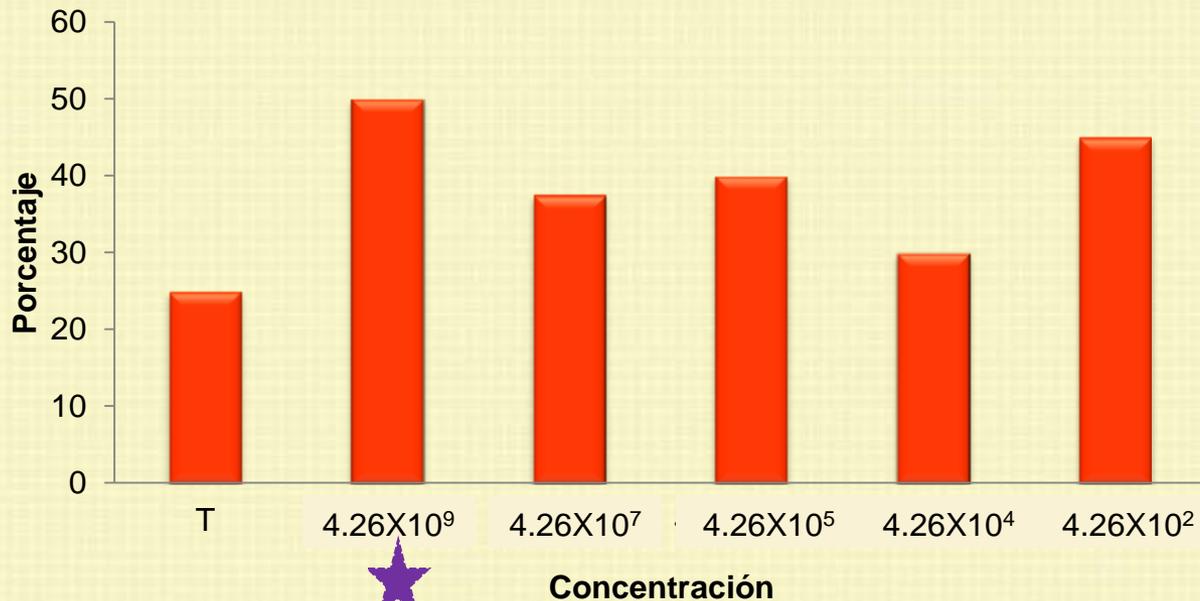
Figura 20. Porcentaje de mortalidad de *Dendroctonus adjunctus* inoculados con *M. anisopliae* después de 96 hrs.



★ Efecto dosis-respuesta

Barras con la misma letra son estadísticamente iguales,  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 21.** Mortalidad de *I. bonanseai* inoculados con *M. anisopliae* después de 72 hrs.



**Figura 22** Mortalidad de *Ips bonanseai* inoculados con *M. anisopliae* después de 96 hrs.

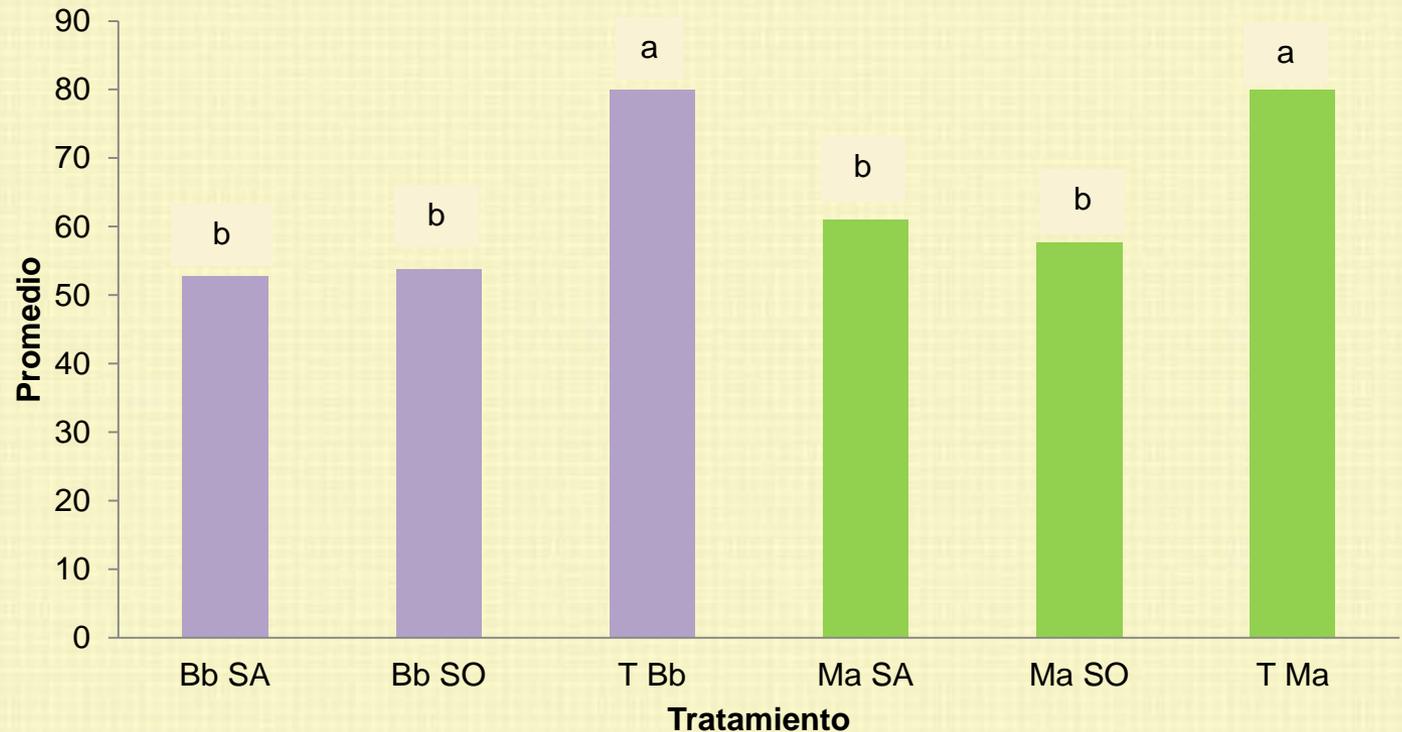
★ Efecto dosis-respuesta

NS: ANOVA no significativa,  $p > 0.05$ .

# EVALUACIÓN DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN TROZAS

## Longitud de galerías

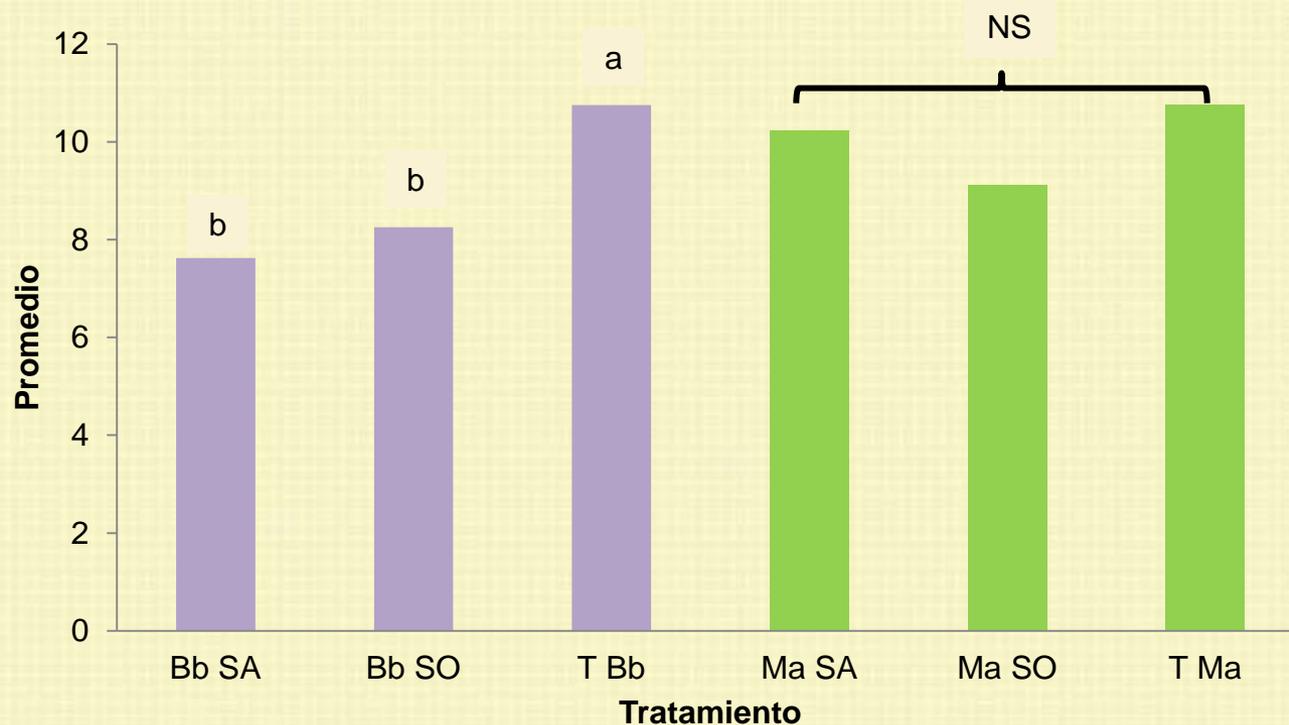
✓ Dato más informativo ya que está directamente asociado a la actividad de adultos vivos.



**Figura 23.** Promedio de longitudes de galerías principales por tratamiento con cada hongo entomopatígeno en las diferentes soluciones (Bb SA: Solución Acuosa de *Beauveria bassiana*; Bb SO: Solución Oleosa de *B. bassiana*; T Bb: Testigo *B. bassiana*; Ma SA: Solución Acuosa de *Metarhizium anisopliae*; Ma SO: Solución Oleosa de *M. anisopliae*, T Ma: Testigo *M. anisopliae*). 14 días después de la aspersion.

Barras con la misma letra son estadísticamente iguales,  $\alpha = 0.05$ .

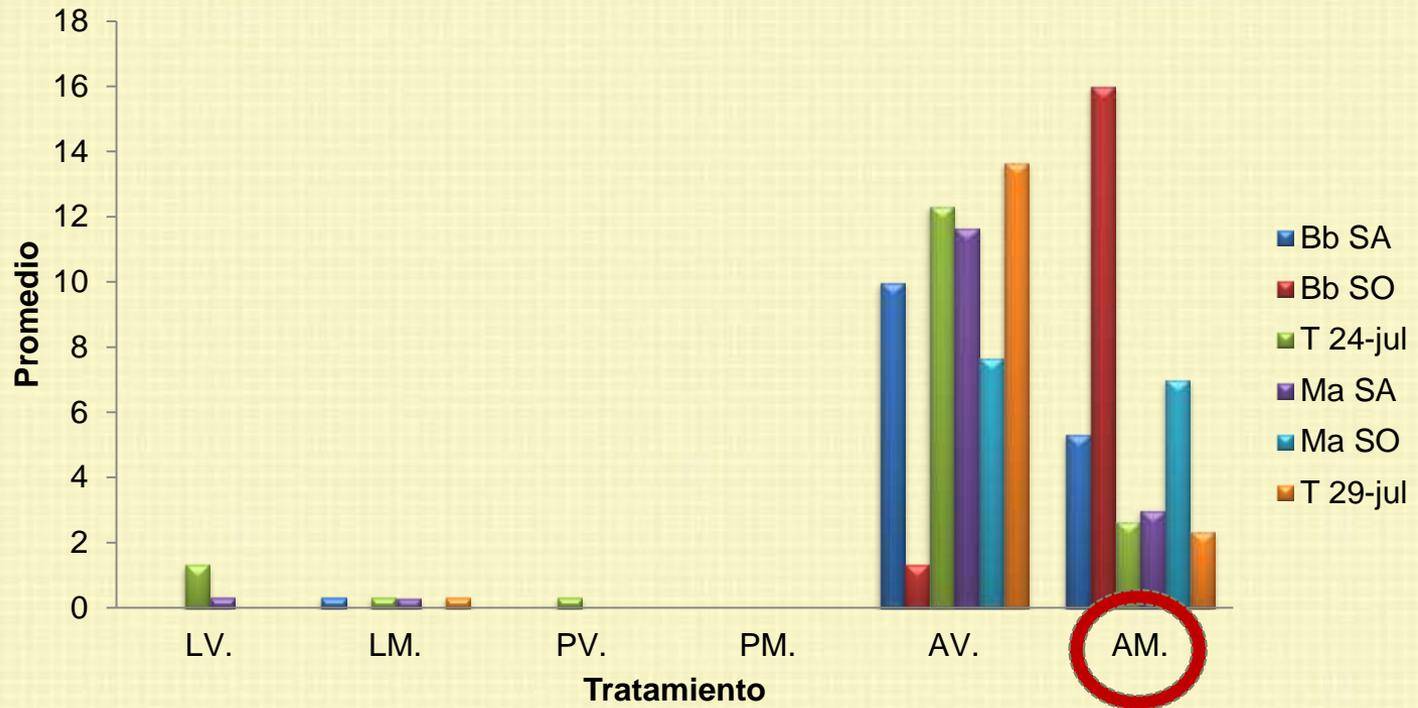
## Número de galerías



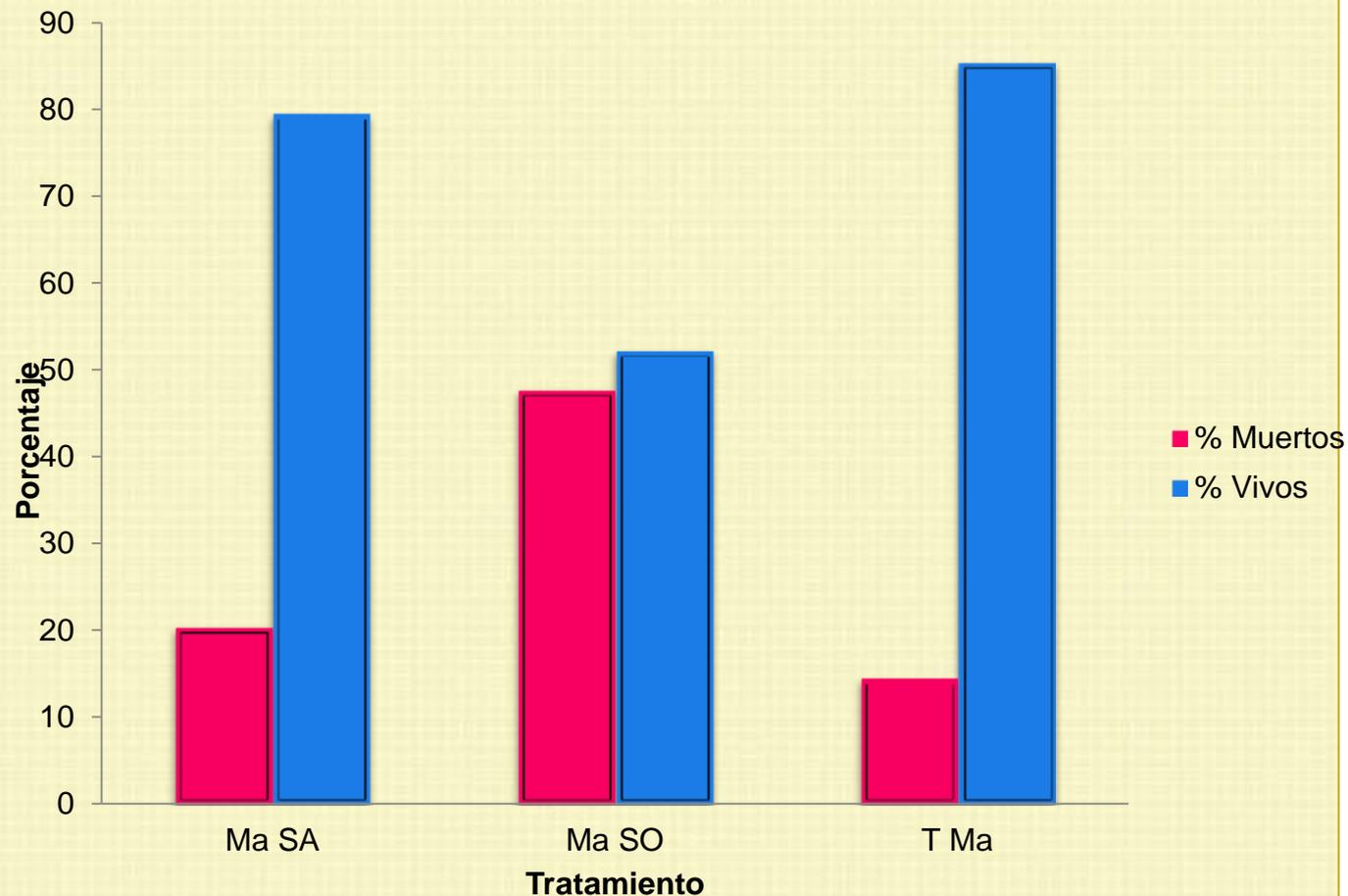
**Figura 24.** Promedio del número de galerías principales registradas a los 14 días de la aplicación de los tratamientos Solución Acuosa y Oleosa con *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Bb SA: Solución Acuosa de *Beauveria bassiana*; Bb SO: Solución Oleosa de *B. bassiana*; T Bb : Testigo *B. bassiana*; Ma SA : Solución Acuosa de *Metarhizium anisopliae*; Ma SO: Solución Oleosa de *M. anisopliae*, T Ma: Testigo *M. anisopliae*.

Barras del mismo color con la misma letra son estadísticamente iguales,  
NS: ANOVA no significativa,  $p > 0.05$   $\alpha = 0.05$ .

## Número promedio de individuos encontrados



**Figura 25.** Número promedio de individuos vivos y muertos encontrados en los estadios de larvas (LV: larvas vivas, LM: larvas muertas), pupas (PV: pupas vivas, PM: pupas muertas) y adultos (AV: adultos vivos, AM: adultos muertos), encontrados en todos los tratamientos Bb SA: solución acuosa de *B. bassiana*; Bb SO: solución oleosa de *B. bassiana*; T Bb: Testigo *B. bassiana*; Ma SA: solución acuosa de *Metarhizium anisopliae*; Ma SO: solución oleosa de *M. anisopliae*, T Ma: Testigo *M. anisopliae*) con los respectivos testigos en la toma de muestra: 14 días



Solución Oleosa vs Testigo  
(47.7% vs 14.6% )

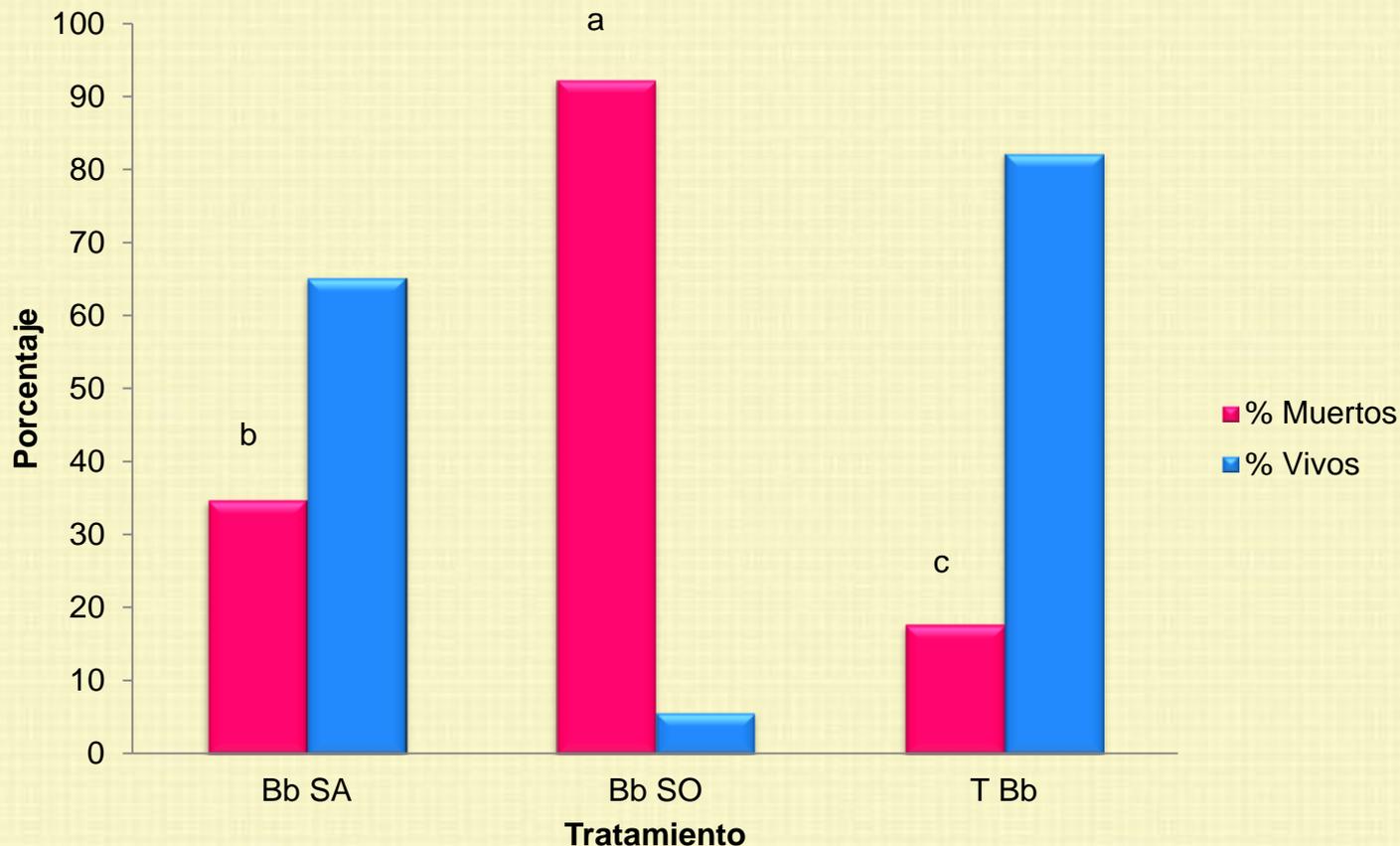
- ✓ Variabilidad de los datos
- ✓ Pequeño tamaño de muestra

**Figura 26.** Porcentaje de adultos vivos y muertos tratados con *M. anisopliae* en solución acuosa (Ma SA) y oleosa (Ma SO) y el Testigo. Las muestras se tomaron a los 14 días posteriores a la aplicación a las trozas.

NS: ANOVA no significativa  $p > 0.05$ .

✓ Los tratamientos en solución oleosa provocaron mayor mortalidad, en el tratamiento con *B. bassiana* (BbSO) se observaron los valores más altos de mortalidad.

Formulación  
Oleosa = 92.30%  
Formulación  
Acuosa = 34.78 %  
Testigo = 17.785

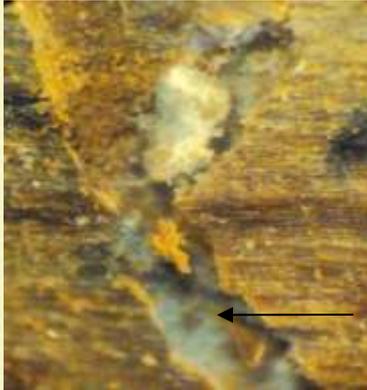


**Figura 27.** Porcentaje de adultos vivos y muertos en el tratamiento con *B. bassiana* en solución acuosa (Bb SA) y solución oleosa (Bb SO) y el Testigo a los 14 días después de la aplicación.

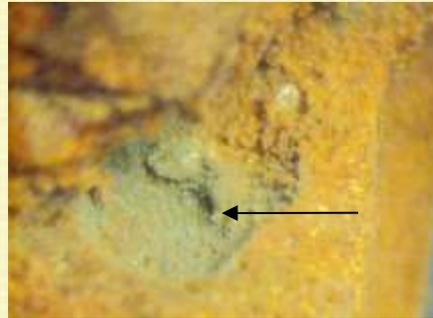
Barras con la misma letra son estadísticamente iguales,  $\alpha = 0.05$ .

# AISLAMIENTO

## Observaciones de los individuos infectados y posiblemente infectados



A)



B)

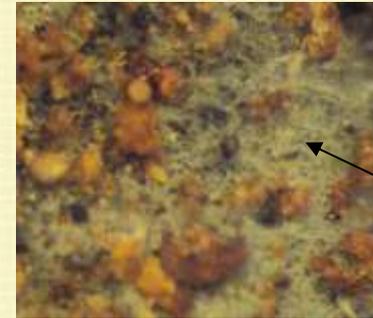


Figura .A) Galería con sospecha de infección por hongo. B) Interior de cámara de pupación mostrando crecimiento de hongo. Vista a lupa.



Figura . Capsula cefálica de larva con presencia de hongo

# Materiales y método

## Pruebas de campo



- Se seleccionaron árboles de la especie *Pinus hartwegii* con síntomas de ataque reciente por *Dendroctonus adjunctus* en el Parque Nacional Nevado de Toluca



# MATERIAL Y MÉTODOS

- Cada formulación de Hongos entomopatógenos se aplicó en 6 árboles seleccionados al azar.
- Para la aplicación se utilizó una aspersora de mochila, asperjando la corteza a saturación, desde 0.5 m de la base del árbol hasta una altura de 4 m aproximadamente.
- Previo a la aplicación del tratamiento se tomó una muestra de la corteza de 10 x 10 cm de cada árbol inoculado de la manera anterior para cerciorarnos que hubiera galerías en el interior de la corteza.

## Elaboración y aplicación de los tratamientos

### Tratamiento 1. Solución oleosa de *Beauveria bassiana*

Se utilizó un producto comercial del hongo *Beauveria bassiana* (PHC® BEATRON®) en formulación oleosa a una concentración de  $9.1 \times 10^9$  conidias/L.

Se pesaron 15 g del producto (PHC® BEATRON®), los cuales se agregaron a 5.943 L de agua; la mezcla se agitó, después se agregó 1.05 L de aceite mineral y 7 ml de Tween® 20 (polisorbato 20), todo para dar un total de 7 litros de solución.

Por último, se ajustó a 6.5 el pH de la solución utilizando hidróxido de potasio. Se aplicó un factor por evaluación de viabilidad de las esporas de 85 % para *B. bassiana*.

### Tratamiento 2. Solución oleosa de *Metarhizium anisopliae*

El segundo tratamiento se elaboró de la misma manera que el anterior, únicamente sustituyendo el producto comercial de *B. bassiana* por su homólogo de *Metarhizium anisopliae* (PHC® METATRON®). Se aplicó un factor por viabilidad de las esporas de 87 % para *M. anisopliae* (Nolasco 2013), teniendo entonces una concentración de

### Análisis estadístico

Para los datos de mortalidad de insectos en cada tratamiento, se calculó el porcentaje de individuos muertos y debido a la abundancia de datos con valor cero se aplicó la prueba no-paramétrica de ANOVA de Rangos de Friedman,

### Análisis estadístico

Los datos de número de galerías y longitud de galerías fueron sometidos a un proceso de detección de datos aberrantes de acuerdo al criterio del intercuartil ( $LI = Q1 - (1.5 \text{ IQR})$  ;  $LS = Q3 + (1.5 \text{ IQR})$ ).

### Análisis estadístico.

- Se analizaron los datos de longitud de galerías principales (LGP) y número de galerías principales (GP) en 100 cm<sup>2</sup> de corteza, se aplicó directamente ANOVA y REGWQ En todos los casos se uso  $\alpha = 0.05$ .
- Se utilizaron los programas Microsoft EXCEL 2010 y SAS v. 9.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Prueba de viabilidad

En un primer lote de hongos entomopatógenos se observaron niveles muy bajos de viabilidad (debajo del 25%) y se descartó el lote.

En un segundo lote se obtuvo:

*Beauveria bassiana* = 85%

En 48 y 60 hrs de incubación.

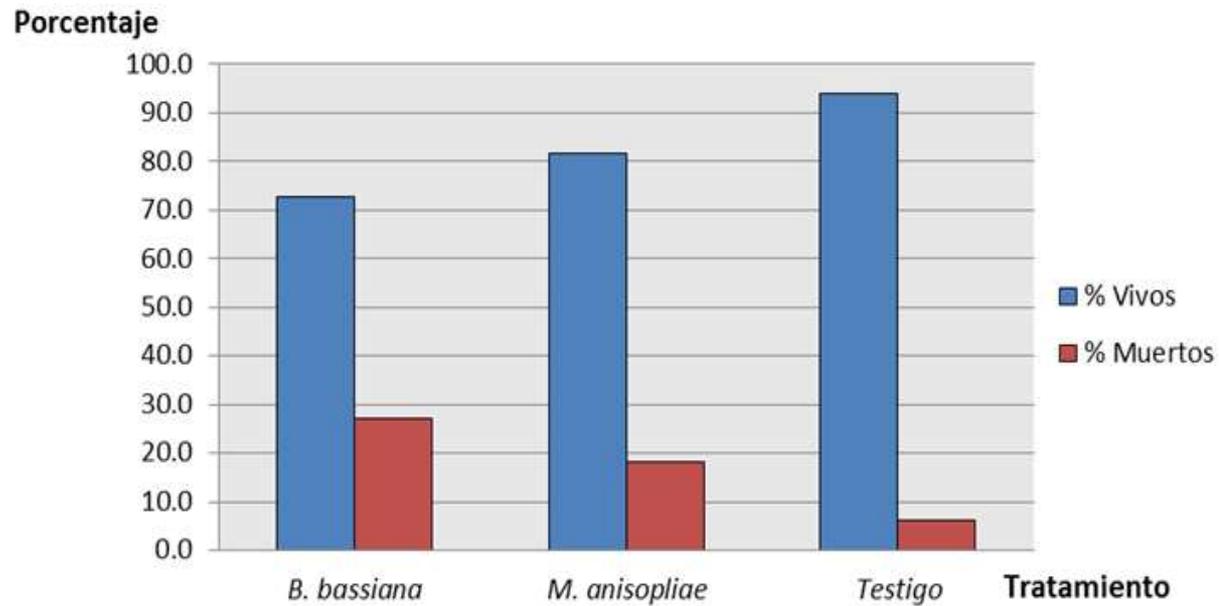
*Metarhizium anisopliae* =87%

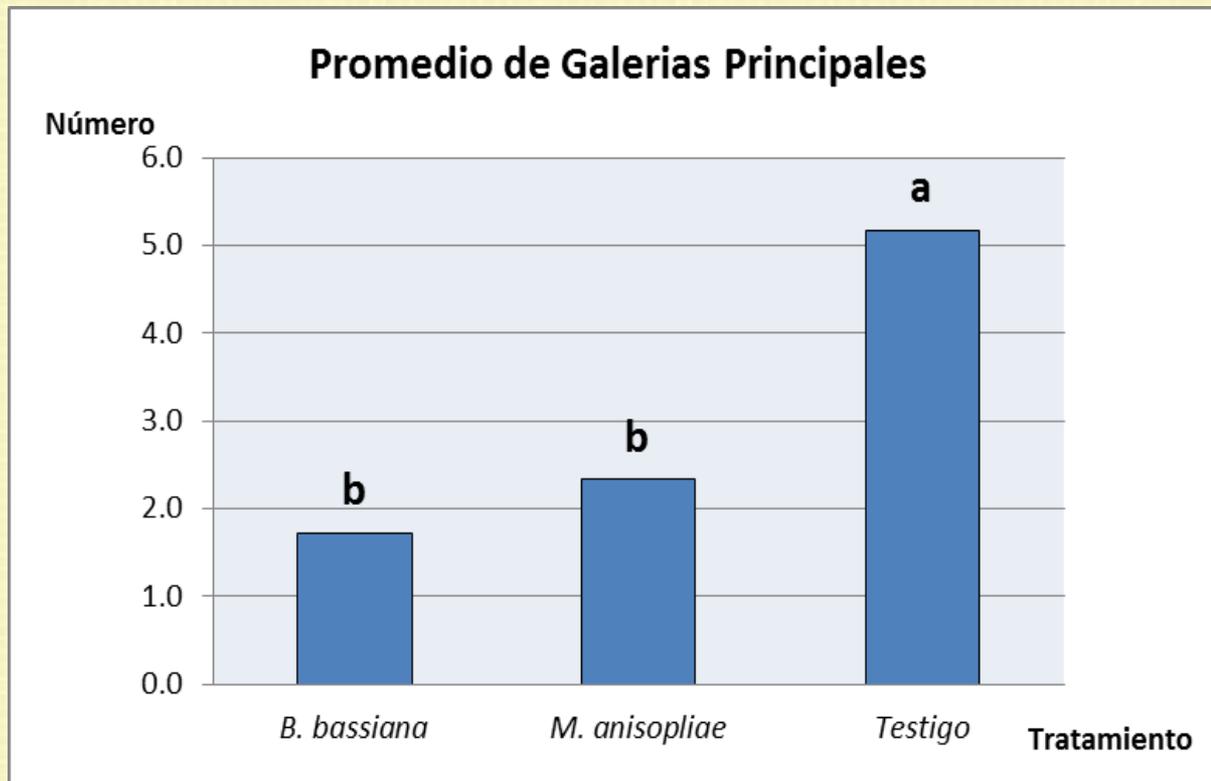
Con 72 Y 96 hrs de incubación.

**Aplicación de los  
formulados oleosos  
de *B. bassiana* y de  
*M. anisopliae***



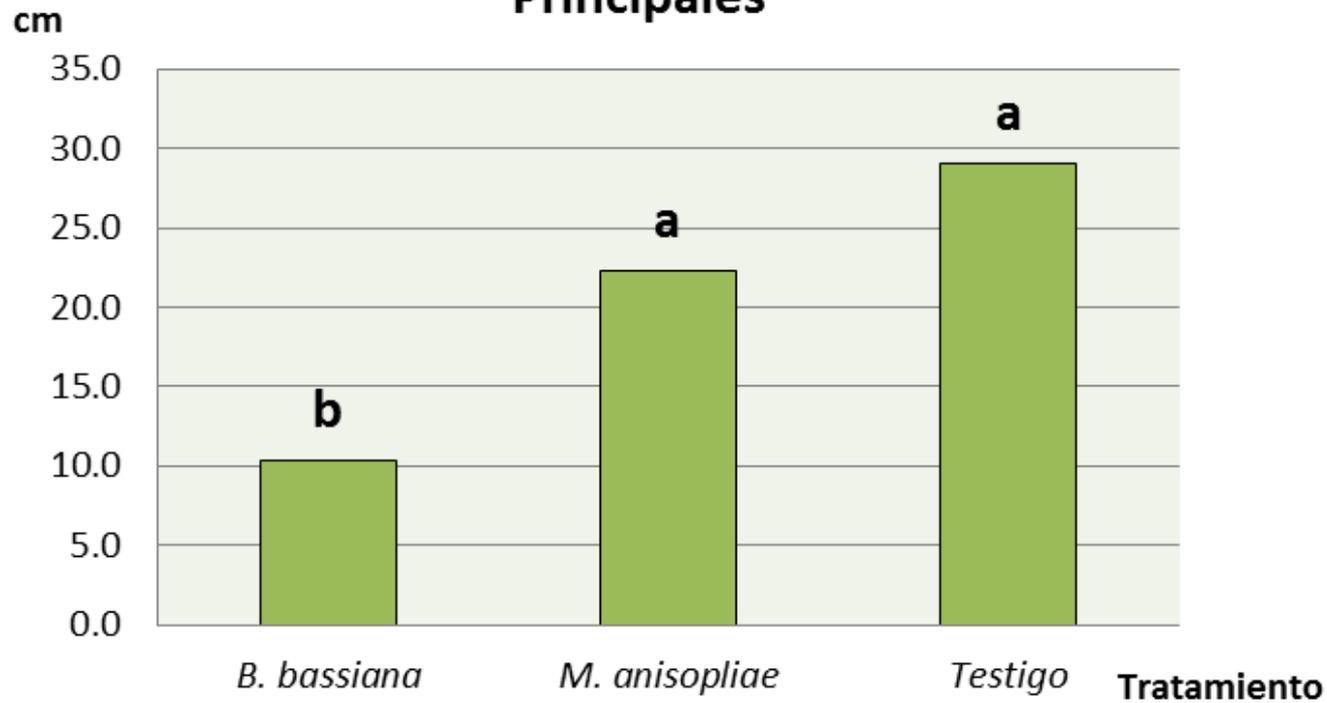
## Porcentaje de Individuos Vivos y Muertos. ANOVA NS





Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

## Longitud Promedio de la de Galerias Principales



Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

# CONCLUSIONES

- **Es importante realizar pruebas de viabilidad a la cepa a emplear para que con base en los resultados se pueda tomar una decisión adecuada para su uso, particularmente en lo referente a la formulación operativa. Estos resultados pueden variar mucho en función del lote incluso dentro de una misma cepa o marca.**
- ✓ **En la evaluación en el laboratorio de la efectividad de las concentraciones de HE para el control de *Dendroctonus adjunctus* e *Ips bonanseai*, las concentraciones de esporas que produjeron resultados significativos para el caso de *B. bassiana*  $6.3 \times 10^9$  y  $6.3 \times 10^7$  mientras que para *M. anisoliae*  $4.26 \times 10^9$ .**

## Continua ....CONCLUSIONES PRUEBAS DE LABORATORIO

- ✓ Para el caso de *Ips bonansea*, no se observó aumento significativo de la mortalidad al inocular con los hongos entomopatógenos *B. bassiana* ni con *M. anisopliae*.
- ✓ Los adultos de *Ips bonansea* parecen ser menos susceptibles a la infección por *B. bassiana* y *M. anisopliae*
- ✓ El aislamiento de los hongos entomopatógenos de los individuos infectados no fue exitoso por lo que se sugiere la aplicación de técnicas específicas que complementarían el trabajo.

# CONCLUSIONES

- Los resultados indican que la inoculación con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en adultos *D. adjunctus*, tiene un efecto significativo en la disminución del número de galerías y de la longitud de galerías.
- Las concentraciones de esporas que produjeron resultados significativos con *Dendroctonus adjunctus*, fueron: *B. bassiana*  $9.1 \times 10^9$  ; para *M. anisopliae*  $9.3 \times 10^9$
- Los resultados de la aplicación en laboratorio y campo, indican que la formulación oleosa de *B. bassiana* fue la que tuvo mayor impacto sobre insectos descortezadores

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT a través del proyecto 2010-CO1-136785 “**Alternativas para el manejo de plagas y enfermedades forestales en áreas naturales protegidas del Eje Neovolcánico Transversal**”.