

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* VIRULENTOS A *Compsus* n. sp.

Patricia Marín Marín*; Alex Enrique Bustillo Pardey*

RESUMEN

MARÍN M., P; BUSTILLO P., A.E. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* virulentos a *Compsus* n. sp. *Cenicafé*, 59(2):165-173.2008

El picudito de los cítricos, *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae), es una plaga de cítricos en la zona central cafetera y amenaza con distribuirse a 129.000 ha plantadas en Colombia. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* ataca en forma natural larvas y adultos de este insecto. En el laboratorio se evaluaron los aislamientos Bb9806, Bb9807 y Bb9926, y una formulación comercial de *B. bassiana*, primero sin ser reactivados y luego reactivados sobre adultos del picudito. Los resultados mostraron mortalidades entre 42 y 100% para Bb9806 y Bb9807, con tiempos de mortalidad de 5,6 y 4,7 días, respectivamente. En la segunda evaluación, con los aislamientos del hongo reactivados sobre el picudito, las mortalidades fueron superiores y variaron entre 94% para Bb9926, con un tiempo de mortalidad de 4,8 días, y 100% de mortalidad para los demás aislamientos (Bb9806, Biopower y Bb9807, con tiempos de 4,8; 4,6 y 4,5 días, respectivamente). Se concluye que existen varios aislamientos de *B. bassiana* promisorios para control del picudito. Estos resultados también muestran la importancia de reactivar el hongo sobre el insecto al cual se va a dirigir el control, pero se debe determinar la eficacia de los aislamientos en el laboratorio antes de realizar ensayos de campo.

Palabras clave: Mortalidad, reactivación del hongo, picudito de los cítricos, Curculionidae.

ABSTRACT

The small citrus weevil, *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae) is a serious insect pest of citrus in the Central coffee area of Colombia and it is threatening 129.000 ha of planted citrus in Colombia. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* infects naturally adults and larvae of this weevil. Under laboratory conditions the isolates Bb9806, Bb9807 and Bb9926, and a commercial formulation of *B. bassiana* were tested. Initially the isolates were tested using fungi that were not activated on adult weevils and then using activated isolates. Results showed mortality between 42% and 100% for Bb9806 and Bb9807 with mortality times of 5.6 and 4.7 days respectively. In the second evaluation, with the isolations of the fungus reactivated on adult weevils, mortalities were higher varying between 94% for Bb9926 with a mortality time of 4.8 days and 100% of mortality for the other isolations (Bb9806, Biopower and Bb9807, with times of 4.8; 4.6 and 4.5 days respectively). In conclusion, there are several isolates of *B. bassiana*, which can provide satisfactory control of this weevil. These results also show the importance of reactivating the fungus on the insect in which the control is going to be directed, but the efficacy of the isolations under laboratory conditions needs to be determined before field trials are conducted.

Keywords: Mortality, fungus reactivation, citrus weevil, Curculionidae.

* Investigador Asociado e Investigador Principal. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La presencia del picudito de los cítricos, *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae) (Figura 1), fue detectada a finales de 1995 en el departamento del Quindío, en altas poblaciones causando daños de importancia económica (9). Posteriormente se detectaron infestaciones de este insecto en huertos del Valle, Tolima, Antioquia, Cundinamarca y Risaralda, atacando limón Tahití, tangelos, toronja y otros cítricos. Sin embargo, se considera que su presencia en cultivos de cítricos data desde 1970. Este insecto es una seria amenaza para las 129.000 ha de cítricos plantadas en Colombia (21).

El género *Compsus* fue descrito por Schoenherr en 1823, forma parte de la familia Curculionidae; la literatura registra 35 especies distribuidas en Centro y Suramérica. En un principio el picudito de los cítricos fue denominado como *Paracompsus*, luego se registró como *Compsus viridilineatus* Jeckel



Figura 1. Adulto del picudito de los cítricos, *Compsus* n. sp. Observe las líneas verdes características de esta especie.

(17). Sin embargo, *C. viridilineatus* es un “*nomen nudum*”, es decir, la especie recibió el nombre pero no se hizo una descripción morfológica que respaldara la clasificación (4). Cano *et al.* (6) presentan una descripción morfológica para su identificación en el campo.

Compsus n. sp. es un insecto polífago, que se alimenta de una gran variedad de cítricos, como: naranja Valencia, mandarina Oneco, mandarina arrayana, lima ácida Tahití, tangelo Mineola, toronja, swinglea y otra gran diversidad de plantas (4, 5, 20). Su alta capacidad de reproducción y el daño que las larvas y adultos causan a las raíces, hojas, flores y frutos, lo convierten en una seria amenaza para la citricultura colombiana (5, 17).

En recolecciones en el campo de estados biológicos de *Compsus* n. sp., se han encontrado varios organismos causando mortalidad, como los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, que atacan larvas, pupas y adultos del picudito. Además de estos patógenos, también se registra el ataque de insectos parasitoides y entomonematodos en los estados de huevo, larva y adulto del picudo (4, 5, 21).

Beauveria bassiana infecta muchas especies de picudos que afectan diversos cultivos (1, 2, 7, 8, 11, 13, 22), pero no se conocen estudios de su infección sobre esta especie de *Compsus*. La eficacia de este hongo, además de los factores limitantes de campo, depende de la susceptibilidad del insecto y de la virulencia del hongo (1, 3, 10, 19).

La presente investigación tuvo como objetivo seleccionar los aislamientos más virulentos de *B. bassiana* que se puedan utilizar en programas de control de esta especie de *Compsus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo y estandarización del bioensayo.

Se estandarizó un bioensayo que permitió la sobrevivencia de los adultos durante toda la prueba.

Pruebas de desinfección de los insectos.

Se realizaron pruebas de desinfección de los adultos de *Compsus* con hipoclorito de sodio (Clorox® al 5,25%), evaluando dos concentraciones (5 y 10%) partiendo de la muestra comercial, con dos tiempos (5 y 10 min.) de exposición de adultos de *Compsus*. Los insectos se sumergieron en estas soluciones y luego se lavaron cinco veces con agua destilada estéril (ADE), pasándolos por un colador de nailon. Posteriormente, con la ayuda de un pincel, se pusieron los insectos sobre papel toalla esterilizado, para retirar el exceso de agua, y se pasaron a cajas plásticas (11 x 17 x 7 cm) con tapa.

Se hicieron observaciones sobre el tiempo que tardan los adultos de *Compsus* para recuperar su movilidad. Los insectos se mantuvieron en estos recipientes con hojas

de cítricos para su alimentación, las cuales se cambiaron por material fresco, cada dos días. Estas hojas se lavaron previamente con ADE. Se utilizaron 20 individuos por cada una de las concentraciones y tiempos de contacto. Posteriormente, se evaluó la mortalidad y el grado de contaminación durante 30 días.

Pruebas de patogenicidad. Para los ensayos de patogenicidad se evaluaron cuatro aislamientos de *B. bassiana* (Bb), todos provenientes de adultos de *Compsus* n. sp. obtenidos en cultivos de cítricos (Tabla 1). Estos aislamientos de Bb se evaluaron inicialmente sin reactivar sobre el picudito, utilizando el hongo cultivado durante 20 días en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) más ácido láctico, al 0,016%. Luego, se evaluaron reactivados en el insecto, para lo cual los insectos de *Compsus* infectados se colocaron en medio de cultivo SDA más ácido láctico al 0,016% y se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 20 días.

El experimento se organizó en un diseño completamente aleatorio con diez repeticiones, cada una compuesta de cinco individuos.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en los bioensayos de patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Compsus* n. sp.

Aislamiento	Detalles de obtención de cada aislamiento
Bb9806	Aislamiento de adultos de <i>Compsus</i> en un cultivo de cítricos en Montenegro, Quindío.
Bb9807	Aislamiento nativo en adultos de <i>Compsus</i> proveniente de la finca El Limonar (Armero-Guayabal, Tolima), en donde no se habían realizado aspersiones del hongo.
Bb9926	Obtenido de adultos de <i>Compsus</i> en un cultivo comercial de cítricos en Pereira. Este aislamiento fue suministrado por el ICA seccional Risaralda.
Biopower	Aislamiento de adultos de <i>Compsus</i> infectados con Biopower, una formulación comercial de <i>B. bassiana</i> .
Testigo	Constituido por picudos sin exponer al hongo.

La unidad experimental la conformó el grupo de los cinco adultos de *Compsus* ubicados en una caja de magenta (Sigma) de 7,5 cm de alto x 6,5 cm de ancho x 6,5 cm de largo. La información se analizó a través de un análisis de variación al nivel del 5%, y se establecieron las diferencias entre tratamientos por medio de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey al nivel del 5% de probabilidad.

Los insectos se desinfectaron teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de desinfección previamente realizadas. Por lo tanto, para la desinfección se empleó hipoclorito de sodio al 5% por 5 min. Luego, los insectos se lavaron cinco veces con ADE y se colocaron sobre toallas de papel esterilizadas, para retirar el exceso de agua. Una vez los adultos del picudito se tornaron activos, se tomaron 50 adultos de *Compsus* por tratamiento y se inocularon mediante inmersión, durante un minuto, con la suspensión de *B. bassiana* en concentración de 1×10^7 esporas/mL (Figura 2a). Nuevamente, los insectos se colocaron en toallas de papel

y se pasaron a las cajas de magenta (5 insectos/caja), a las que se adicionaron hojas de cítricos, previamente lavadas con ADE. Las cajas se taparon con tul, ajustado con bandas de caucho, para permitir la aireación y evitar la salida de los insectos (Figura 2b). Cada dos días se cambiaron las hojas de cítricos.

Diariamente se evaluó la mortalidad del picudito; los individuos muertos se retiraron y se colocaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, que contenían rodetes de papel toalla estéril humedecido con ADE, con el fin de proporcionar humedad y favorecer el proceso de la micosis. Durante 30 días, se registró diariamente la mortalidad y los signos característicos de la enfermedad.

Los aislamientos del hongo que conformaron el anterior experimento, también se probaron en una segunda evaluación reactivándolos primero en el picudito y luego, cultivándolos en Sabouraud Dextrosa Agar, durante 20 días. Para esta evaluación se utilizó la misma metodología y los mismos tratamientos descritos con anterioridad.

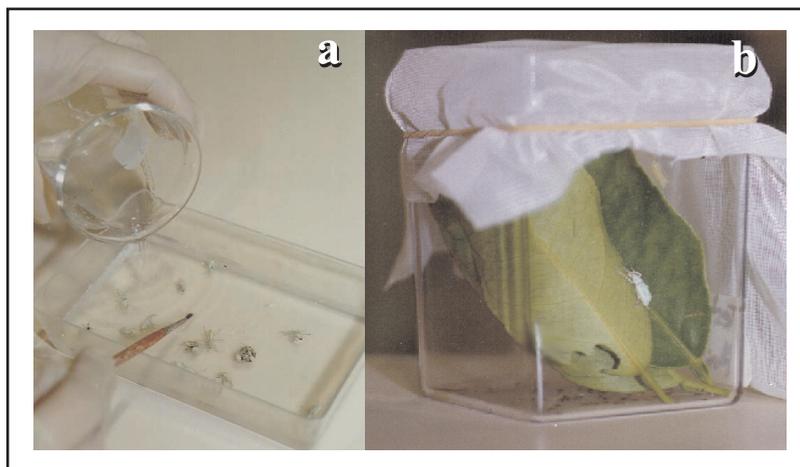


Figura 2. a. Inmersión de picuditos en la suspensión de esporas del hongo; b. Cajas de magenta utilizadas para confinar los picuditos en el bioensayo de patogenicidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo y estandarización del bioensayo.

El presente estudio permitió comprobar que el bioensayo planteado era apropiado para establecer diferencias entre los aislamientos de *B. bassiana* evaluados. La desinfección de los adultos de *Compsus* n. sp., mostró diferencias en cuanto a las evaluaciones de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de contacto. Con la solución al 10%, en contacto por 10 min., se observó un efecto drástico, ya que hubo pérdida de movilidad en los insectos y su recuperación tardó entre 10 y 60 min., además de observarse decoloración en el insecto, especialmente de las líneas longitudinales que varían entre verdes, azules o cafés iridiscentes (4). Posiblemente, el efecto observado en la decoloración del insecto, se debe a que este producto además de desinfectante es un blanqueador.

Con la concentración al 10% y durante 5 min. de contacto, la recuperación de los insectos fue más rápida, pero aún se observó decoloración en el insecto, aunque en menor proporción. Al 5% de concentración y 10 min. de contacto se presentó recuperación de la movilidad de los insectos después de 2 a 10 min., y la decoloración de los élitros apenas se percibió. Para la misma

concentración y 5 min. de contacto, la recuperación de la movilidad de los insectos fue casi inmediata y se observó una sutil decoloración de los élitros sólo en dos de los insectos evaluados.

La concentración de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min. de contacto, causó la mayor mortalidad de los insectos (40% en 11,8 días). La mortalidad más baja se observó con la concentración al 5% y 5 min. de contacto (15% en 20,3 días) (Tabla 2). En los insectos muertos no se observaron signos de contaminación con hongos saprófitos. Lo anterior indica que adultos de *Compsus* n. sp., no resisten el contacto con soluciones de hipoclorito de sodio por periodos prolongados, y que la concentración debe ser menor a la utilizada para desinfección de otros insectos del orden Coleoptera, que resisten la desinfección con hipoclorito al 10% por 10 min. (14). Por lo tanto, la desinfección debe hacerse con NaOCl al 5% durante 5 min. y luego, retirar el exceso del producto lavando los insectos cinco veces con agua destilada estéril.

Pruebas de patogenicidad. En la primera evaluación, cuando los aislamientos no habían sido reactivados en insectos, los resultados mostraron diferencias significativas (Tukey

Tabla 2. Mortalidad de adultos de *Compsus* n. sp. después de ser desinfectados con hipoclorito de sodio, en diferentes concentraciones (a partir de un producto comercial al 5,25%) y tiempos de contacto.

Concentración NaOCl (%)	Tiempo de contacto (min.)	Mortalidad				Tiempo de evaluación (días)
		N	%	Tiempo		
				Días	D.E.	
10	10	20	40,0	11,8	± 2,1	30
10	5	20	30,0	11,0	± 2,4	30
5	10	20	35,0	11,6	± 2,1	30
5	5	20	15,0	20,3	± 4,5	30

5%) entre los tratamientos. El aislamiento Bb9806 presentó el porcentaje de mortalidad más bajo ($42,0 \pm 9,2$) (Figura 3), mientras que el Bb9807 mostró el mayor porcentaje de mortalidad por el hongo (100%). En el testigo no hubo mortalidad por el hongo.

En la segunda evaluación, cuando todos los aislamientos fueron reactivados sobre adultos de *Compsus*, las mortalidades en todos los casos fueron superiores y variaron entre $94,0 \pm 4,3\%$ para Bb9926, y 100% para los demás aislamientos (Bb9806, Biopower y Bb9807); no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3). En el testigo no se presentó mortalidad por el hongo.

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada y el promedio del tiempo en que se causó la muerte de los adultos de *Compsus*, en las evaluaciones realizadas. En la primera evaluación con Bb9926 se registró el mayor tiempo de mortalidad ($6,0 \pm 0$ días), sin embargo no hubo diferencias significativas con el aislamiento Bb9806 y el producto Biopower ($5,6 \pm 1,4$ y $5,8 \pm 0,9$ días, respectivamente), pero sí con el Bb9807, que presentó el menor tiempo de mortalidad ($4,7 \pm 0,9$ días). En la segunda evaluación se observó que la mortalidad de los insectos se causó en menor tiempo con todos los aislamientos, con relación a la primera evaluación. No se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos (Bb9926 $4,7 \pm 1,3$; Bb9806 $4,8 \pm 1$; Biopower, $4,6 \pm 0,6$ y Bb9807, $4,5 \pm 0,6$ días).

Estos resultados confirman lo señalado por diferentes investigadores sobre el aumento de la virulencia del hongo una vez se inocula sobre el huésped susceptible (3, 12, 14, 15, 16, 18), igualmente se comprueba la necesidad de desarrollar bioensayos en el laboratorio, con el fin de aplicar los postulados de Koch. De esta manera es

posible seleccionar aislamientos con mayor virulencia antes de utilizarlos en programas de control en el campo.

En cuanto al desarrollo del hongo *B. bassiana* sobre *Compsus n. sp.* se pudo establecer que una vez causada la muerte del insecto, la presencia de micelio se observa a los $2 \pm 0,5$ días, y comienza por las partes menos quitinizadas, como son las patas y la proboscis, posteriormente el hongo comienza

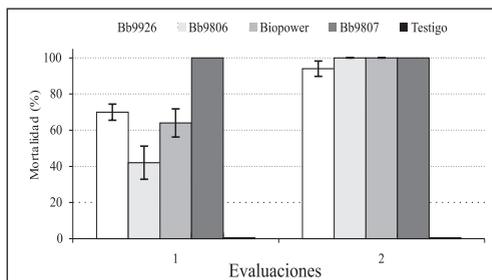


Figura 3. Mortalidad en adultos de *Compsus n. sp.*, causada por diferentes aislamientos del hongo *Beauveria bassiana*. 1- Aislamientos no reactivados; 2- Aislamientos reactivados sobre el picudito.

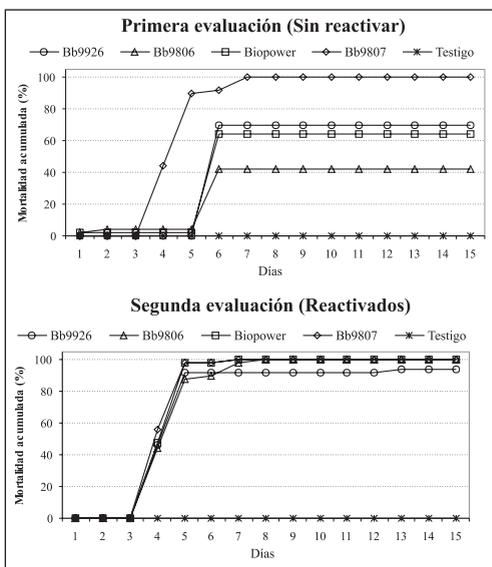


Figura 4. Porcentaje de mortalidad acumulada de *Compsus n. sp.* a través del tiempo, causada por los diferentes aislamientos del hongo *Beauveria bassiana*.

a diseminarse y cubrir al insecto al cabo de $1 \pm 0,5$ días. La producción de esporas se presenta en $1 \pm 0,5$ días siguientes, por lo tanto el proceso hasta obtener esporas demora $4,5 \pm 1,5$ días (Figura 5).

El bioensayo descrito en este estudio permite la selección de aislamientos para evaluarlos en el campo, para el control de esta plaga. El aislamiento Bb9807, obtenido de poblaciones del insecto en el campo, presentó el mayor porcentaje de mortalidad sobre *Compsus* en la primera evaluación. Sin

embargo, después de la reactivación (segunda evaluación) se presentó un aumento de la mortalidad con todos los aislamientos. Lo anterior confirma la necesidad de reactivar el hongo sobre el insecto al cual va dirigido, con el fin de aumentar su virulencia y potenciar su acción en el control de la plaga. Todos los aislamientos de *B. bassiana* evaluados mostraron alta eficacia en el bioensayo, lo cual indica que se pueden utilizar en pruebas de campo.

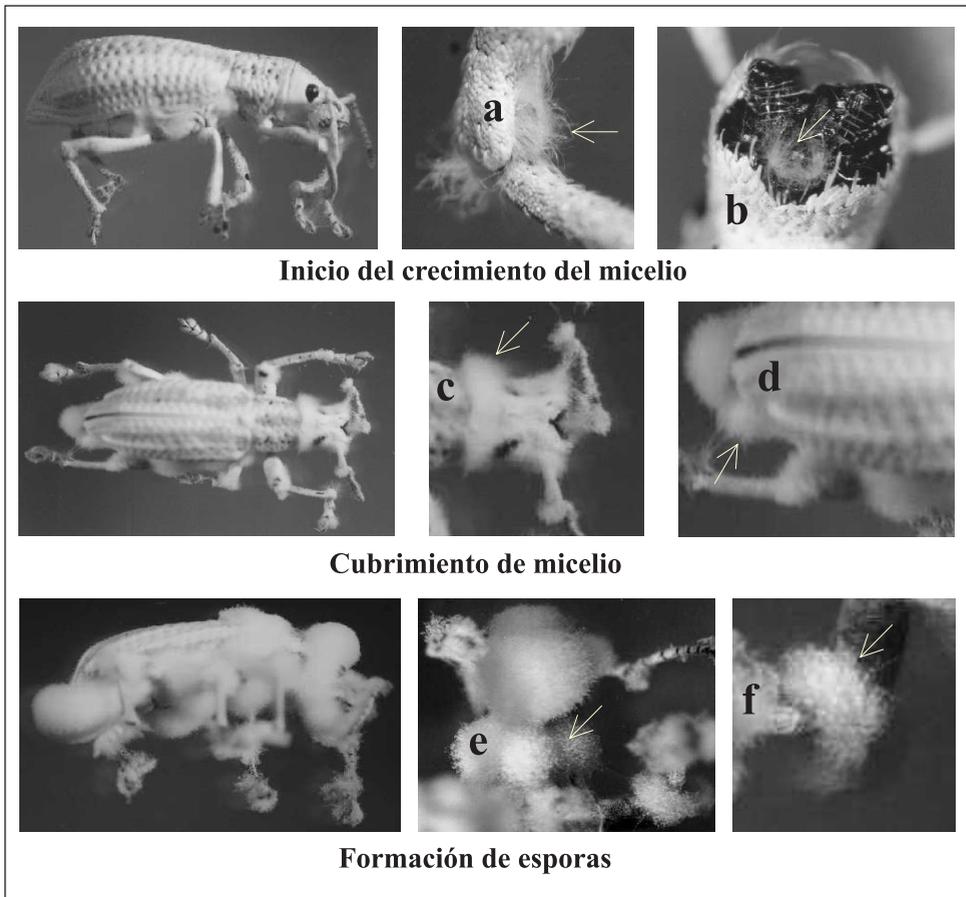


Figura 5. Desarrollo del hongo *Beauveria bassiana* sobre el cuerpo de un adulto de *Compsus* n. sp. El inicio del micelio comienza por las partes menos quitinizadas como las patas (a) y la proboscis (b). El cubrimiento ocurre con la diseminación del micelio sobre el insecto (c y d). Posteriormente ocurre la formación de esporas (e y f).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimientos a la Ing. Agr. Diana María Cano, por el suministro de los insectos. También agradecen a los auxiliares del laboratorio, Sergio Sánchez y Carlos A. Quintero por la ayuda en la toma de la información.

LITERATURA CITADA

1. ALCALÁ DE M., D.; MARCANO A., J.; MORALES, M. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia 16 (2): 52-63. 1999.
2. BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vaurie (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* en condiciones de laboratorio y campo. Manejo Integrado de Plagas Nos. 20-21: 34-38. 1991.
3. BUSTILLO P., A. E.; MARÍN, P. ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café?. Revista Manejo Integrado de Plagas No. 63: i - iv. 2002. (Hoja Técnica No. 40).
4. CANO, D. M. Biología, comportamiento y enemigos nativos del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae) en la zona central cafetera. In: Seminario Nacional sobre el Picudo de los Cítricos, *Compsus* sp. Pereira, mayo 11, 2000. Memorias . Pereira, Asocitricos – SOCOLEN – Cenicafé, 2000. p. 1 – 17.
5. CANO, D. M.; BUSTILLO P., A. E.; CÁRDENAS, R., OROZCO, L. Biología y enemigos nativos del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae). Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 43- 52. 2002
6. CANO, D. M.; SERNA, F. J.; BUSTILLO P., A. E. Características anatómicas de una nueva especie de *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae) plaga de cítricos en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 33- 41. 2002.
7. CASTRILLÓN A., C.; URREA J., C. F. El plátano. Control biológico del picudo negro. Agrocambio 2 (6): 26-32. 1996.
8. CONTRERAS, T.; CARBALLO, M.; HIDALGO, E.; BUSTAMANTE, E. Evaluación de trampas de pseudotallo y formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals.) en el combate del picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas No. 46: 44-49. 1997.
9. CORRALES G., A.; CASTAÑO P., N.; SANINT S., A. El picudo de los cítricos. Hojas de Sanidad Vegetal No. 12: 14-15. 1997.
10. CHARNLEY, A. K. Mycoinsecticides: present use and future prospects. In: McFARLANE, N.R. Progress and prospects in insect control. Farnham, British Crop Protection Council, 1989. p. 165-181. (BCPC Monograph No. 43).
11. DURÁN, J.; CARBALLO, M. Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad del picudo del chile *Anthonomus eugenii*. In: Semana Científica “Logros de Investigación para el nuevo milenio”, 4. Turrialba, Abril 4-6., 1999. Actas. Turrialba, CATIE, 1999. p. 108-111..
12. FERRÓN, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology 23: 409-442. 1978.
13. GARCÍA M., M.; SÁNCHEZ P., S. R. Aplicación en laboratorio y campo de hongos entomopatógenos contra el picudo de la yema del manzano *Crocidema* sp. (Coleoptera: Curculionidae). In: Congreso Nacional de Control Biológico, 21. Rio Bravo, Tamaulipas, Noviembre 5-6, 1998. Memorias. México, SAGAR-INIFAP-Sociedad Mexicana de Control Biológico, 1998. p. 252 – 254.
14. GONZÁLEZ G., M. T.; POSADA F., F. J.; BUSTILLO P., A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé 44 (3): 93-102. 1993.
15. GONZÁLEZ G., M. T.; VALENCIA, A.; BUSTILLO P., A. E. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. Manejo Integrado de Plagas 60: 31 -35. 2001.
16. HALL, R. A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology 84: 205-240. 1982.
17. HINCAPIÉ H., L. A. El picudo de los cítricos *Compsus viridilineatus* Jeckel. Pereira, ICA, Pereira, 1998. 4 p. (Plegable de Divulgación)

18. HINCAPIÉ V., R.; OSPINA Z., H. A.; BUSTILLO P., A. E.; SALDARRIAGA V., A. Evaluación del entomopatógeno *Verticillium lecanii* en el control del áfido *Myzus persicae* en crisantemos. Revista Colombiana de Entomología 16 (2): 21-27. 1990.
19. MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and Information 14 (2): 31N -40N. 1993.
20. SÁNCHEZ G., G. Manejo del picudo de los cítricos. In: Seminario Nacional sobre el Picudo de los Cítricos, *Compsus* sp. (Coleoptera: Curculionidae). Pereira, mayo 11 de 2000. Pereira, Asocitricos – Cenicafé – Socolen – ICA, 2000. p. 23-26.
21. SOTO G., A. Nuevo registro de parasitoide del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. en Colombia. Manizales, Universidad de Caldas, 2002. 2 p. (Fitotecnia No. 60).
22. TINZAARA, W.; KARAMURA, E.; TUSHEMERIRWE, W. Observaciones preliminares sobre enemigos naturales del picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus* (Germar) en Uganda. Infomusa 8(1): 28-29. 1999.