

Control *in vitro* de *Premnotrypes vorax* (Hustache) con aislamientos de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.

Pablo A. Landázuri^{1,2}, Patricio Gallegos¹, Enrique Barriga¹

¹ Departamento de Protección Vegetal Santa Catalina, INIAP

² Dirección actual: Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias Agropecuarias
(IASA) Centro de Investigaciones, Sangolquí-Ecuador., PBX. 171-5-231-B.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la eficiencia y patogenicidad *in vitro* de 13 aislamientos, sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*). Para esto, se realizó una ponderación de las variables porcentaje de mortalidad, días a los primeros insectos muertos, tiempo letal medio y días a la esporulación, utilizando una escala de cinco puntos (el valor más alto correspondió a los aislamientos que tuvieron mayor mortalidad, y presentaron los síntomas de la enfermedad en menor tiempo). Para determinar tratamientos similares en función de la efectividad patogénica, se realizó un análisis de conglomerados. En este análisis se encontraron 3 grupos: el grupo G1, medianamente eficiente para el control de la plaga; el grupo G2, poco eficiente; y el grupo G3, altamente eficiente. El G3 compuesto por aislamientos del género *Beauveria* sp., fue más eficiente para controlar el gusano blanco de la papa, ya que presentó mayor mortalidad, un menor tiempo letal medio, menos días en el apareamiento de los primeros insectos muertos y presencia de esporulación en relación que el resto de grupos.

Palabras clave: Aislamientos, Efectividad, Gusano blanco, Patogenicidad.

ABSTRACT

The goal of this research was to determine the efficiency and pathogenicity of 13 *in vitro* isolates, against white worm of potato (*Premnotrypes vorax*). The efficiency of the isolates was measured based on the percentage of mortality, the first insects dead days, the media half lethal time, and the isolates sporulations days, using five points scale (the isolates highest efficiency value was related with the high mortality and less time in showing symptoms). To determinate similarity among efficiency treatments, We used a cluster. We established 3 groups: group G1 showed a medium efficiency ; group G2 showed low efficiency and group G3 was highly effective in the control of the insect. Group 3 made of isolates of the genera *Beauveria* sp. We concluded that this group was the more efficient to control the white worm of potato,

because the highest mortality, less half lethal time, the first insects deadly days and less sporulation time.

Key words: Isolates, Effectiveness, White worm, Pathogenicity.

ISSN 1390-3004

Recibido: 05-11-2004

Aceptado: 28-01-2005

INTRODUCCIÓN

En la Sierra ecuatoriana, la papa es uno de los cultivos más importantes ya que 42 000 familias cultivan cerca de 66 000 ha, generando alrededor de 60 millones de dólares (Andrade *et al.* 2002). Debido a su cultivo intensivo y continuado, se han incrementado plagas como el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache), provocando pérdidas de hasta el 100% en terrenos altamente infestados con la plaga (Gallegos *et al.* 1997).

Crissman *et al.* (2003) manifiestan que las aplicaciones de plaguicidas contribuyen positivamente a incrementar la producción, y los ingresos de los agricultores, sin tomar en cuenta el impacto ambiental y las consecuencias para la salud humana. El insecticida más utilizado es el Carbofurán, pero también son muy utilizados Metamidofos, Acefato y Profenofos, que son tóxicos (Gallegos *et al.* 1997).

Una alternativa a la aplicación de insecticidas sintéticos para el control del gusano blanco de la papa es el uso de hongos entomopatógenos, como es el caso de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*. Sañudo (1998), destaca la capacidad patogénica de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* spp., para el control de *Premnotrypes* spp. y de otros Coleópteros frecuentes en el cultivo de la papa. En años recientes, se han desarrollado estrategias de control de *Premnotrypes* spp., con el uso de *Beuaveria* spp., a nivel de almacén y su multiplicación artesanal en el campo (Torres *et al.* 1993; Sañudo 1998). Por lo que es necesario llevar a cabo estudios de control biológico que permitan disminuir los efectos tóxicos en la salud y el medio ambiente que producen las aplicaciones indiscriminadas de los productos antes mencionados.

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de los aislamientos de *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp., para controlar adultos de gusano blanco de la papa.

METODOLOGÍA

Este trabajo se lo realizó en el Laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Se probaron 13 aislamientos, 8 provenientes del cepario de la Estación Experimental Santa Catalina, 2 recolectadas en la provincia de Carchi y 3 en la provincia de Cotopaxi (Tabla 1).

Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de mortalidad, días desde la inoculación hasta el apareamiento de los primeros insectos muertos, tiempo letal medio (TL₅₀), días a la esporulación.

Para medir el porcentaje de mortalidad, se calculó la cantidad de insectos muertos con respecto al total en cada uno de los tratamientos (La evaluación de ésta variable, se realizó a los 5, 9, 13, 17, 24 y 29 días después de la inoculación de los aislamientos). Según Alves (1986), es importante que el testigo no supere el 10% de mortalidad, por lo que cual se realizó un ajuste mediante la fórmula de Abbot:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ de mortalidad no tratado} - \% \text{ de mortalidad del testigo}}{100 - \% \text{ de mortalidad del testigo}}$$

Tabla 1. Nomenclatura de los tratamientos para el ensayo de patogenicidad de *Beauveria* y *Metarhizium* para el control de *P. vorax*.

Tratamiento	Nombre	Origen	Código
T0	Testigo		
T1	San José de Huaca	Ceparío INIAP	EC-CB1*
T2	Tumbaco	Ceparío INIAP	EC-PB2
T3	Cabañal	Campo	EC-XB2
T4	Pull Chico	Ceparío INIAP	EC-ChB3
T5	San Juan	Ceparío INIAP	EC-ChB4
T6	Cuatro Esquinas	Ceparío INIAP	EC-ChB2
T7	Compostera	Ceparío INIAP	EC-Ma1
T8	FCA - ESPOCH	Ceparío ESPOCH	EC-ChMa1
T9	Yacubamba	Campo	EC-XB3
T10	Chambapongo	Campo	EC-XB1
T11	Sta. Martha de Cuba	Campo	EC-CMa1
T12	Guano	Ceparío INIAP	EC-ChMa2
T13	San Francisco	Campo	EC-CB2

*Interpretación de la columna códigos: EC = Ecuador, C = Carchi, P=Pichincha
X=Cotopaxi, Ch=Chimborazo, B1= *Beauveria* Aislamiento 1

Para determinar el apareamiento de los primeros insectos muertos, se registró el número de días en que se produjo la mortalidad de al menos el 10% de la población inicial.

TL₅₀ se calculó a través de un ajuste de la curva de mortalidad mediante el análisis probits (Hadad 1986).

Después que los insectos aparecieron muertos, se midió los días hasta la esporulación con el 40% de la población, se registró el día en que se presentó la esporulación sobre el cuerpo del adulto de gusano blanco.

Para medir la eficiencia y la patogenicidad de los aislamientos, en el control del adulto de gusano blanco, se realizó una ponderación de las diferentes variables utilizando una escala de cinco puntos. El valor más alto correspondiendo los aislamientos que tuvieron mayor y más rápida mortalidad, y presentaron en menor tiempo los síntomas de la enfermedad (días a la esporulación).

Para determinar tratamientos similares en función de la efectividad patogénica, se realizó un análisis de conglomerados, utilizando el método de distancia mínima de Ward (Villacís Com. Pers.). Para establecer diferencias significativas entre grupos, se hizo un análisis de varianza para las variables porcentaje de mortalidad, días desde la inoculación hasta el aparecimiento de los primeros insectos muertos, TL_{50} y días a la esporulación. Además se realizaron pruebas de comparación de medias de Duncan al 5%.

Manejo del experimento.- se estableció primero una fase de potencialización de los aislamientos y posteriormente una prueba formal, tal como se explica en patogenicidad de los aislamientos.

La patogenicidad puede verse afectada por el tiempo de conservación, por lo que fue necesario realizar una potencialización de los mismos. Para lo que se inoculó en insectos, luego fueron reaislados, purificados y multiplicados en medios específicos con lo que se obtuvo un crecimiento abundante.

Para la obtención de los insectos en el campo, se utilizó el método de Gallegos *et al.* (1997), con la diferencia que en las trampas no se tuvieron insecticidas, a fin de evitar la muerte del insecto.

Para la inoculación de los aislamientos en adultos de *P. vorax*, se empleó una emulsión con aceite de soya al 1% más Tween 80 al 0.1%. Se colocó sobre las cajas petri (10cc) con los diferentes aislamientos y luego se las agitó durante 10 min a 80 rpm.

Finalmente, la emulsión más las esporas se pusieron en contacto con el cuerpo del insecto, en cajas petri limpias, durante 10 a 15 s y luego se los secó en papel toalla, este trabajo se lo realizó en cámara de flujo laminar aislamiento por aislamiento para evitar contaminación y el intercambio de esporas entre sí.

Luego de la inoculación los insectos recolectados se colocaron en recipientes de plástico (10 x 18 cm), con tierra esterilizada. A los adultos se los alimentó con hojas de papa, libres de insecticida,. Las que fueron cambiadas cada tres días.

La patogenicidad de los aislamientos se midió en 20 insectos por unidad experimental con cinco repeticiones y con aislamientos purificados.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 2 se presenta la ponderación por variable para los diferentes tratamientos.

Tabla 2. Ponderación por variable para los tratamientos.

Tratamientos	Origen	% de mortalidad	TL ₅₀	Primeros insectos muertos	Días a la esporulación
t0 = Testigo	-	0	0	0	0
t1 = Huaca	EC-CB ₁	4.4	5	5	5
t2 = Tumbaco	EC-PB ₂	3.2	3	2.5	4
t3 = Cabañal	EC-XB ₂	3.4	3	2.5	3
t4 = Pull Chico	EC-ChB ₃	3.7	4	4	3
t5= Trebon	EC-ChB ₄	4.3	4	5	1
t6= 4 esquinas	EC-ChB ₂	3.6	3	4	2
t7 =Compostera	EC-P-Ma ₁	2.0	1	1	0
t8= ESPOCH*	EC-CH Ma ₁	2.9	2	2	2
t9 =Yacubamba	EC- X B ₃	4.8	5	4	5
t10=Chambapono	EC - XB ₁	5.0	5	5	4
t11=Sta.Mde Cuba	EC - Cma ₁	3.6	3	5	3
t12= Guano	EC - ChMa ₁	3.9	4	4	3
t13=San Francisco	EC - CB ₂	4.0	4	3	3

*ESPOCH= Escuela Politécnica del Chimborazo, St. M. de Cuba = Santa Marta de Cuba .

Similitud de tratamientos en función de la efectividad patogénica.- Al realizar el análisis de conglomerados, se encontró tres grupos principales: el grupo G1, medianamente eficiente para el control de la plaga; el grupo G2, poco eficiente; y el grupo G3, altamente eficiente (Fig. 1). Las variables componentes principales que explican el 99% de la conformación de los grupos principales fueron las variables TL₅₀ y mortalidad.

Diferencias entre grupos de los tratamientos .- El G3 controló de mejor manera *P. vorax*, ya que tuvo mayor mortalidad ($F_{2,11} = 26.11$, $p= 0.0001$), un menor TL₅₀ ($F_{2,11} = 29.77$, $p= 0.0001$), menos días en apareamiento de los primeros insectos muertos ($F_{2,11} = 21.611$, $p= 0.0001$) y presencia de esporulación ($F_{2,11} = 21.611$, $p= 0.0001$) que los grupos G1 y G2 (Tabla 3).

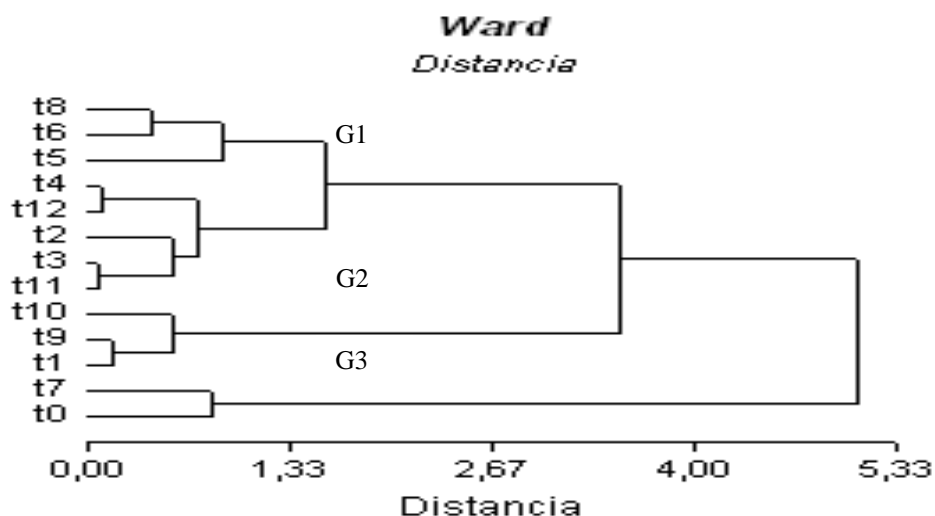


Figura 1. Dendrograma de los tratamientos en base a las variables en estudio (coeficiente de correlación cofenética 0.66).

Los tratamientos, que componen G3 pertenecen a aislamientos de *Beauveria* sp., que es el género de hongo biocontrolador más importante para *Premnotrypes* spp. (Yabar 1986). La mayor patogenicidad de G3 hacia *P. vorax* está dada por la especificidad parasitaria, que está relacionada con la germinación de las conidias sobre el tegumento del insecto (Al-Aidroos & Roberts 1978); esto hace que los aislamientos de este grupo sean eficientes para el control *in vitro* del gusano blanco de la papa y puedan ser considerados para un plan de manejo integrado. En la actualidad se están realizando pruebas de campo con este grupo (Gallegos & Asaquibay en prep.).

Tabla 3 Promedios (\pm Se) de la efectividad patogénica para las diferentes variables en estudio.

Grupos	Mortalidad	TL ₅₀	Primeros insectos muertos	Días a la esporulación
G1	3.62 \pm 0.32 b	3.33 \pm 0.41 b	2.67 \pm 0.61 c	2.67 \pm 0.61 c
G2	1.00 \pm 0.32 c	0.50 \pm 0.41 c	0.00 \pm 0.61 b	0.00 \pm 0.61 b
G3	4.73 \pm 0.32 a	5.00 \pm 0.41 a	4.67 \pm 0.61 a	4.67 \pm 0.61 a

Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas, $p < 0.005$.

Los síntomas más importantes que se evidenciaron en los insectos adultos de gusano blanco después de la inoculación de los aislamientos de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. fueron la disminución de la alimentación, pérdida de movimiento y la momificación del insecto.

Se observaron signos tales como la salida del hongo del cuerpo del insecto , la presencia de esporulación blanca en *Beauveria* sp. y, verde en el caso de *Metarhizium* sp. (Fig. 2).



Figura 2. Síntomas en *P. vorax*: a) Micelio de *Beauveria* sp., que emerge del interior del insecto por medio de los intersegmentos, b) Presencia de micelio de *Beauveria* sp. en un grupo de adultos.

CONCLUSIONES

El grupo más importante para controlar *P. vorax* fue G3 (t1, t9 y t10), porque presentó mayor mortalidad, un menor TL_{50} , menos días en el apareamiento de los primeros insectos muertos y presencia de esporulación, en relación a los otros grupos. Esto se debe a que los tratamientos, que componen G3 pertenecen a aislamientos de *Beauveria* sp., que es el género de hongo biocontrolador más importante para *Premnotrypes* spp.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Departamento de Protección Vegetal de INIAP (Santa Catalina), al Ing. Jaime Villacís por su colaboración en el análisis estadístico y a los Editores de este Boletín por las revisiones al borrador del presente artículo.

REFERENCIAS

- Al-Aidroos, K & D.W. Roberts.** 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal Genetic and Cytology* 20: 211-219.
- Alves, S.B.** 1986. Técnicas de Laboratorio Pp. 265 In S.B. Alves (Coordinador) *Control Microbiano de Insetos*. Editorial Manole. São Paulo
- Andrade, H., O. Bastidas & S. Sherwood.** 2002. La papa en el Ecuador. Pp. 22. In: M. Pumisacho y S. Sherwood. (Eds.) *El Cultivo de la Papa en Ecuador*, Quito.

- Crisman, Ch., S. Sherwood & D. Yanggen.** 2003. Introducción Pp. 5. In: D. Yanggen, Ch. Crissman & P. Espinoza (eds) *Los Plaguicidas Impactos en Producción, Salud y Medio Ambiente en Carchi, Ecuador* CIP-INIAP Editorial Abya-Yala. Quito.
- Gallegos, P.** 1996. Relación entre la población de adultos de *Premnotrypes vorax* (Hustache) al inicio del cultivo de papa y el daño de tubérculos a la cosecha. *Revista Latinoamericana de la papa*, (1994/95)7: 61-66.
- Gallegos, P., G. Avalos & C. Castillo.** 1997. *El gusano de la papa en el Ecuador: Comportamiento y Control*. INIAP, Programa Nacional de Raíces y Tubérculos. Quito.
- Hadad, M.L.** 1986. Análisis de probites Pp. 374-382 In S.B. Alves (Coordinador) *Controle Microbiano de Insetos* . Editora Manole. São Paulo.
- Sañudo, B.** 1998. Nuevo enfoque sobre el uso de entomopatógenos en el control de plagas de suelo. Pp. 68-70 In: *Manejo sanitario del cultivo de papa*. Comité Departamento de Sanidad del Cultivo de Papa. Nariño.
- Torres, H., A.M. Ortega, J. Alcazar, T. Ames & L. Palomino.** 1993. *Control Biológico del gorgojo de los Andes (Premnotrypes vorax) con Beauveria brongniartii*. Guía de investigación CIP 8, Centro de Investigación de la Papa. Lima.
- Yábar, E.** 1994. *Manejo ecológico:del gorgojo de los Andes*. Edición RAAA. Lima.