

SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE *Naupactus xanthographus*
(Coleoptera: Curculionidae) A OCHO AISLAMIENTOS DE
Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes)¹

Susceptibility of *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae)
larvae to eight isolates of *Metarhizium anisopliae*
(Deuteromycotina: Hyphomycetes)

Renato Ripa S.² y Fernando Rodríguez A.²

SUMMARY

The susceptibility of *Naupactus xanthographus* (Germar) larvae to *Metarhizium anisopliae* (Met.) Sor. isolates was evaluated at 25, 16, and 13° C.

All isolates showed high virulence when used in suspensions containing 10⁶ and 10⁷ spores/ml.

At 25° C, the strains IP1 and CM-14 caused the highest mortality.

At 16° C, all isolates bioassayed decreased their virulence; however the strain CM-14 showed a promising degree of mortality. At 13° C, pathogenicity was even lower.

INTRODUCCION

El "burrito de la vid", *Naupactus xanthographus* (Germar), es una de las plagas más graves que afecta la vid y otros frutales, en la zona central de Chile. Dado que el mayor daño lo produce la larva, al alimentarse del sistema radical de las plantas, se hace necesario la búsqueda de métodos de control eficientes para este estado del ciclo del insecto.

En la actualidad, para el control del burrito en vides, se utilizan bandas tóxicas colocadas en el tronco y tutores (Ripa, 1984 y 1985). Como un complemento a este control y en casos en que no sea posible usar este método, se pretende utilizar organismos patógenos de estadios larvales de la plaga.

Entre los microorganismos que controlan en forma natural al burrito, solamente se ha mencionado un hongo similar a *Beauveria* sp., que afecta larvas de los últimos estadios (Campos y Sazo, 1983). Hasbún (1982) inoculó larvas neonatas con *B. bassiana*, sin obtener infección.

El empleo de hongos en el control de plagas, es una práctica que se remonta al siglo pasado. Comenzó con el trabajo de Metschnikoff, que aplicó *Metarhizium anisopliae*, para controlar larvas de curculiónidos (Alves, 1986). Según este mismo autor, se ha encontrado a este patógeno en más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes. Nuestro objetivo es evaluar la virulencia de diferentes aislamientos de este hongo, sobre larvas del burrito de la vid, bajo condiciones de laboratorio en distintas dosis y a diferentes temperaturas.

¹ Recepción de originales: 9 de enero de 1989.

Se agradece la colaboración a René Díaz y Marco Palma en la extracción de larvas del suelo y a Viviana Guajardo en la mantención del ensayo.

² Subestación Experimental Control Biológico La Cruz (INIA), Casilla 3, La Cruz, Chile.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó ocho aislamientos de *M. anisopliae*, cuyo origen se indica en el Cuadro 1. Todos ellos fueron inoculados a larvas desarrolladas de *N. xanthographus*,

CUADRO 1. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* bioensayados sobre larvas de *Naupactus xanthographus*

TABLE 1. Isolates of *Metarhizium anisopliae* bioassayed against *Naupactus xanthographus* larvae

Denominación o N° referencia	Hospedero original	Procedencia	Fecha recolección
CM-WT10	<i>Conoderus</i> sp.	Nueva Zelandia	?
CM-5	<i>Deois flavipicta</i>	Jaguapita, PR, Brasil	?
CM-14	Larvas mosquitos?	Nutrilite, E.U.	1974
CM-10P	<i>Oryctes rhinocerus</i>	Nueva Zelandia	?
22	<i>Oryctes rhinocerus</i>	Nueva Zelandia	?
33	?	Vicosa, Brasil	?
53	<i>Sternecus subsignatus</i>	Londrina, Brasil	?
IP1	<i>Aphodius</i> sp.	Isla de Pascua, Chile	Marzo, 87

las que, una vez muertas, fueron incubadas en condiciones de humedad a saturación y $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 15 días, hasta completar la esporulación del patógeno. Luego fueron almacenadas en oscuridad a $5 \pm 1^\circ \text{C}$.

Las conidias cosechadas por raspado directo de las larvas, fueron suspendidas con un homogenizador en 1 ml de solución 0,1% TWEEN 80 y luego, en 9 cc de agua destilada. Se calibró las suspensiones con cámara de Neubauer y microscopio de fase contrastada, en concentraciones de 10^6 y 10^7 conidias/ml. La inoculación se efectuó con el método usado por Sosa Gómez y Alves (1983). Para ello, se depositó las esporas sobre el insecto, sumergiendo cuatro ejemplares, dos veces consecutivas, en las suspensiones durante tres segundos, empleando un recipiente acondicionado como cámara de inoculación. Se usó 50 larvas por tratamiento, utilizando agua destilada y 1 ml de solución 0,1% TWEEN 80, como control.

La cantidad de larvas usadas en el bioensayo fue alrededor de 1.500 ejemplares, recolectados en plantaciones de vid en Los Andes, dos días previos a cada ensayo. Su peso varió entre 110 y 150 mg, lo que corresponde al último estadio de la larva de *N. xanthographus*. Se desechó individuos poco activos o cuya coloración fuera diferente a la normal.

Las larvas inoculadas fueron mantenidas individualmente en el interior de cajas plásticas cilíndricas de 5 cm de diámetro por 2 cm de alto, con cuatro subdivisiones en su interior. Cada ejemplar se colocó sobre papel filtro humedecido con 0,2 ml de agua destilada e incubado a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Los aislamientos IP1, CM-5, CM-14, 53, CM-10P y CM-WT10 en la concentración mayor, además fueron incubados a $13 \pm 2^\circ \text{C}$. Sólo los aislamientos IP1, CM-5 y CM-14 fueron incubados a $16 \pm 1^\circ \text{C}$. La mortalidad se registró diariamente, hasta el vigésimo séptimo día a 25°C y 16°C y hasta los dos meses, a 13°C . Los insectos

muertos fueron apartados en cajas nuevas con humedad a saturación e incubados a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, para observar signos del patógeno y corroborar si la mortalidad se debió a *M. anisopliae*.

La virulencia de este patógeno fue medida a través del tiempo necesario para provocar el 50% de mortalidad o tiempo letal medio (TL50). El cálculo de esta variable se realizó mediante análisis de regresión, usando la metodología propuesta por Busvine (1971), que transforma la mortalidad corregida a probit y el tiempo a logaritmo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los ocho aislamientos de *M. anisopliae* mostraron ser patogénicos sobre el último estadio larval de *N. xanthographus*. Se observó larvas muertas con signos de la enfermedad producida por el hongo, a partir del cuarto día, con una concentración de 10^7 conidias/ml y, desde el sexto día después de la inoculación, con 10^6 conidias/ml, en ensayos a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. A 16°C , se observó evidencia del patógeno al 7º día, con los aislamientos CM-5 y CM-14 y al 11º día, con el aislamiento IP1. En las pruebas realizadas a $13 \pm 2^\circ \text{C}$, la esporulación fue evidente sólo a partir del 15º día, con el aislamiento CM-WT10.

El efecto de dosificaciones diferentes en cinco aislamientos ensayados a 25°C , mostró que un aumento en la concentración del inóculo, produjo en la mayoría una disminución en los respectivos TL50. Llama la atención que el aislamiento 53 causó una mortalidad similar en ambas dosis, desconociéndose la causa. Se observa que entre aquellos usados en concentración de 10^7 conidias/ml, el más virulento fue IP1, seguido por CM-14, CM-5, 33, 22 y 53, en orden

decreciente. Con 10^6 conidias/ml, el orden decreciente de virulencia de los aislamientos fue como sigue: IP1, CM-14, CM-WT10, 53, 33, CM-10P y CM-5 (cuadros 2 y 3).

Los resultados con los aislamientos probados a 16°C y una concentración de 10^7 conidias/ml, se muestran en el Cuadro 4. El aislamiento más virulento a esta temperatura fue CM-14, seguido por CM-5 e IP1. En el Cuadro 5, aparecen las ecuaciones de regresión y los TL50 de los aislamientos ensayados a 13°C .

Al comparar la acción patogénica de los aislamientos a diferentes temperaturas se observó, por ejemplo, que el aislamiento IP1 fue el más virulento a 25°C ; en cambio, a 16°C es superado por los otros dos aislamientos.

También es interesante destacar el comportamiento del aislamiento 53, que en dosis de 10^7 conidias/ml, a 25°C muestra una baja virulencia y a 13°C , es el más virulento de los aislamientos ensayados.

En general, la disminución de la virulencia o aumento de TL50 a temperaturas más bajas es muy notoria, resultado que coincide con lo obtenido por Soares, Marchal y Ferron (1983), para el mismo patógeno sobre *Otiorhynchus sulcatus*. Los resultados obtenidos reflejan la adaptación de estos aislamientos, tanto a sus hospederos específicos como a las condiciones ambientales que imperan en sus sitios de origen. Se confirma la importancia que tiene la elección adecuada de un aislamiento, si se desea utilizarlo eficientemente en un hospedero y ambiente distinto del original.

En este bioensayo, se observa que la temperatura es un factor que modifica el grado de virulencia del patógeno estudiado. En condiciones de temperatura similares a las que se registran en primavera y bajo el suelo, en zonas de abundancia del burrito, sobresalen en pruebas de laboratorio, los aislamientos 53, CM-14 y CM-WT10.

CUADRO 2. Análisis de regresión de la mortalidad (probit/log. tiempo) de larvas de *N. xanthographus* inoculadas con diferentes aislamientos de *M. anisopliae* a 25°C . Dosis 10^7 conidias/ml

TABLE 2. Regression analysis of mortality (probit/log. time) of *N. xanthographus* larvae inoculated with isolates of *M. anisopliae* at 25°C . Dosage 10^7 conidia/ml

Aislamiento	Ecuación de regresión	TL50 (días)	Int. Conf. (95%) TL50 (días)
IP1	$Y = -4,35 + 4,97X$	7,6	7,1 - 8,2
CM-14	$Y = -5,98 + 5,60X$	9,1	8,6 - 9,8
CM-5	$Y = -2,93 + 3,94X$	10,3	9,6 - 11,1
33	$Y = -4,35 + 4,42X$	13,0	12,2 - 14,0
53	$Y = -5,13 + 4,61X$	15,8	14,4 - 17,3
22	$Y = -4,50 + 4,00X$	14,1	13,2 - 15,1

CUADRO 3. Análisis de regresión de la mortalidad (probit/log. tiempo) de larvas de *N. xanthographus* inoculadas con diferentes aislamientos de *M. anisopliae* a 25°C . Dosis 10^6 conidias/ml

TABLE 3. Regression analysis of mortality (probit/log. time) of *N. xanthographus* larvae inoculated with isolates of *M. anisopliae* at 25°C . Dosage 10^6 conidia/ml

Aislamiento	Ecuación de regresión	TL50 (días)	Int. Conf. (95%) TL50 (días)
IP1	$Y = -5,06 + 5,03X$	10,0	9,2 - 10,8
CM-14	$Y = -6,23 + 5,32X$	12,9	12,0 - 13,9
CM-WT10	$Y = -13,66 + 8,60X$	14,8	14,1 - 15,5
53	$Y = -5,09 + 4,60X$	15,6	14,3 - 17,1
33	$Y = -3,13 + 3,58X$	18,7	16,2 - 21,5
CM-10P	$Y = -7,94 + 5,61X$	20,3	18,8 - 21,9
CM-5	$Y = -3,57 + 3,67X$	21,6	19,1 - 24,6

CUADRO 4. Análisis de regresión de la mortalidad (probit/log. tiempo) de larvas de *N. xanthographus* inoculadas a 16° C, con tres aislamientos de *M. anisopliae* con una concentración de 10⁷ conidias/ml

TABLE 4. Regression analysis of mortality (probit/log. time) of *N. xanthographus* larvae inoculated at 16° C, with isolates of *M. anisopliae*. Dosage 10⁷ conidia/ml

Aislamiento	Ecuación de regresión	TL50 (días)	Int. Conf. (95°/o) TL50 (días)
CM-5	Y = - 1,41 + 2,65X	26,2	23,1 - 29,9
CM-14	Y = - 2,54 + 3,28X	19,9	18,4 - 22,5
IP1	Y = - 2,01 + 2,81X	31,2	26,2 - 36,7

CUADRO 5. Análisis de regresión de la mortalidad (probit/log. tiempo) de larvas de *N. xanthographus* inoculadas a 13° C con seis aislamientos de *M. anisopliae* con una concentración de 10⁷ conidias/ml

TABLE 5. Regression analysis of mortality (probit/log. time) of *N. xanthographus* inoculated at 13° C, with isolates of *M. anisopliae*. Dosage 10⁷ conidia/ml

Aislamiento	Ecuación de regresión	TL50 (días)	Int. Conf. (95°/o) TL50 (días)
53	Y = - 44,96 + 3,72X	47,6	43,6 - 52,0
CM-14	Y = - 6,01 + 4,11X	47,7	44,1 - 51,8
CM-WT10	Y = - 8,22 + 4,92X	48,6	45,3 - 52,1
IP1	Y = - 11,26 + 5,87X	58,9	54,0 - 64,3
CM-10P	Y = - 9,68 + 5,20X	62,5	55,7 - 70,1
CM-5	Y = - 4,96 + 3,20X	129,6	63,4 - 264,9

RESUMEN

Se evaluó la susceptibilidad de larvas de *Naupactus xanthographus* a ocho aislamientos de *Metarhizium anisopliae*. Con los datos de mortalidad, se calculó el tiempo letal medio (TL50) de cada aislamiento, a diferentes temperaturas y concentraciones del inóculo, utilizando el análisis de probit.

Los resultados mostraron que el TL50, empleando 10⁶ y 10⁷ conidias/ml a 25° C, varió entre 8 y 22

días. Con temperaturas menores, el tiempo de infección aumenta notoriamente.

Los resultados obtenidos muestran la importancia del factor temperatura en la virulencia de los aislamientos ensayados sobre *N. xanthographus* e indican una pauta para la elección de los aislamientos más adecuados para la realización de ensayos, utilizando el suelo como sustrato.

LITERATURA CITADA

-
- ALVES, SERGIO B. 1986. Controle microbiano de insetos. Brasil. Edit. Manole. 407 p.
- BUSVINE, J.R. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides (2nd. ed.). The Commonwealth Institute of Entomology, London. 345 p.
- CAMPOS, LUCIANO y SAZO, LUIS. 1983. Plagas de la vid en Chile y su control. Santiago, Univ. de Chile, Fac. de Cs. Agrarias, Veterinarias y Forestales. Serie Antumapu Nº 9: 151.
- HASBUN Ch., RICARDO. 1982. Desarrollo del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro* y en el suelo y estudios preliminares de patogenicidad en larvas de *Naupactus xanthographus* (Germ.). (Tesis Ing. Agr.) Santiago, Chile, Universidad de Chile, Escuela de Agronomía. 76 p.
- RIPA S., RENATO. 1984. Control del burrito de los frutales *Naupactus xanthographus* (Germar) con Banda INIA 82.2. Revista Frutícola 5 (3): 80–83.
- RIPA S., RENATO. 1985. Evaluación de la Banda Insecticida INIA 82.2 contra el burrito de los frutales *Naupactus xanthographus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). Agricultura Técnica (Chile) 45 (2): 167–170.
- SOARES, G.G., MARCHAL, M., and FERRON, P. 1983. Susceptibility of *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. Environ. Entomol. 12: 1887–1891.
- SOSA GOMEZ, DANIEL R. y ALVES, SERGIO B. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorox. I. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON, Rev. Invest. 1 (3): 83–102.