

INVESTIGACIONES

EVALUACION DE CEPAS NATIVAS DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* SOBRE *Otiorhynchus sulcatus* Fab. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)¹

Evaluation of Chilean strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* against *Otiorhynchus sulcatus* Fab. (Coleoptera: Curculionidae)

Macarena Gerding G.², Andrés France I.² y Ernesto Cisternas A.³

ABSTRACT

The pathogenicity of three isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* against the black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) was evaluated in a laboratory test. The isolates were applied in increasing concentrations (0 to 10⁸ conidia mL⁻¹) to the last instar larvae. Larval mortality was evaluated for 20 days, and lethal concentration LC₅₀, LC₉₀, and mortality rates were calculated. The three isolates varied (P ≤ 0.01) in the rate of mortality at different concentrations. The LC₅₀ and LC₉₀ for the most virulent isolate were about 10⁶ and 10⁸ conidia mL⁻¹, respectively. Future field studies will determine the potential of this fungus as a biological control agent for *Otiorhynchus sulcatus* in Chile.

Key words: biological control, black vine weevil, entomogenous fungi, insect pathology.

INTRODUCCIÓN

El gorgojo de la frutilla (Prado, 1991) o capacho de los invernaderos (Artigas, 1994), *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae), es considerada una plaga cuarentenaria en Europa y Norteamérica. En Chile fue detectada por primera vez, el año 1971 (Prado, 1988), diseminándose rápidamente por su hábito polífago y alta tasa de reproducción (Johnson y Lyon, 1988; Moorhouse *et al.*, 1992a; Dill, 1997; Shetlar, 1998). Las larvas de este insecto son las que causan el mayor daño, consumiendo raicillas y anillando las raíces principales, lo que, en ataques severos, provoca la muerte de la planta. Los adultos consumen follaje, produciendo

do muescas en el borde de la hoja, defoliación y enroscamiento en algunos brotes (Moorhouse *et al.*, 1992a; Dill, 1997; Shetlar, 1998).

El control es difícil una vez que *O. sulcatus* se ha establecido en un cultivo, debido al comportamiento alimenticio nocturno del adulto, los hábitos subterráneos de la larva, y la falta de enemigos naturales o la baja contribución de éstos a la mortalidad total (Moorhouse *et al.*, 1992a; Shetlar, 1998). Debido a la baja eficacia de los métodos químicos y a problemas de contaminación ambiental, la aplicación de insecticidas se ha visto limitada y han surgido medidas de control alternativas, como el uso de enemigos naturales, dentro de los cuales se incluye el hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. (Soares *et al.*, 1983; Poprawski *et al.*, 1985; Moorhouse *et al.*, 1992a).

La efectividad de *Metarhizium* en el control de *Otiorhynchus sulcatus* se ha estudiado en Alemania, Francia, Inglaterra y Estados Unidos,

¹Recepción de originales: 29 de septiembre de 1999.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: afrance@quilamapu.inia.cl

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Casilla 24-O, Osorno, Chile.

llegando con algunas aislaciones a obtener casi un 100% de mortalidad de larvas en ensayos de laboratorio (Soares *et al.*, 1983; Propawski *et al.*, 1985). En ensayos realizados en Inglaterra, tanto en invernadero como al aire libre, la mortalidad de larvas ha sido levemente inferior a la observada en laboratorio, indicando el potencial de *Metarhizium* como agente biocontrolador (Moorhouse *et al.*, 1992b; Moorhouse *et al.*, 1993). Asimismo, muestreos en suelos de las zonas Sur y Centro Sur de Chile han permitido encontrar con relativa frecuencia hongos entomopatógenos, entre los cuales se encuentra *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, cuya evaluación parcial ha permitido encontrar aislaciones patogénicas para *O. sulcatus* (France *et al.*, 2000). La selección de estos aislamientos nativos permitiría contar con un método de control para muchas plagas de importancia económica, incluido *Otiorhynchus sulcatus*.

Los objetivos de esta investigación fueron determinar patogenicidad, concentración letal y tasa de mortalidad de tres aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, seleccionados en pruebas preliminares, para el control de *O. sulcatus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de insectos

Larvas de *Otiorhynchus sulcatus* fueron colectadas en abril de 1998 desde un huerto de fram-

buesa ubicado en la localidad de San Pablo (40° 25' S, 73° 01' W), Osorno, X Región, las que luego fueron criadas en el Laboratorio de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional Quilmapu, Chillán, en cajas con tierra pasteurizada y raíces de frambuesa desinfectadas en hipoclorito de sodio al 0,4%. La tierra fue pasteurizada en microondas a la máxima potencia (1.450 W), por un período de un minuto por kilogramo de suelo. Las cajas fueron mantenidas en una cámara de incubación a 17 °C, hasta cuando las larvas alcanzaron el último estadio larval requerido para realizar las pruebas de patogenicidad.

Cultivo de *Metarhizium*

Se utilizaron tres aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Cuadro 1), previamente seleccionados por su mayor virulencia a *O. sulcatus*, e identificados desde una colección de hongos entomopatógenos existentes en el INIA, Centro Regional Quilmapu (France *et al.*, 2000). Los tres aislamientos fueron sembrados en placas Petri con agar papa dextrosa (DIFCO) e incubados a 25 °C por 20 días aproximadamente, hasta que el hongo hubo esporulado. Las conidias fueron obtenidas desde la superficie del cultivo disolviéndolas en agua destilada estéril con 0,1% de humectante (Tween 20) y luego llevadas a un agitador magnético (Thermolyne) por 30 minutos para disgregar las conidias. La concentración de conidias fue determinada utilizando una cámara de recuento Neubauer.

Cuadro 1. Origen y localidad de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae*

Table 1. Origin of *Metarhizium anisopliae* isolates

Nº de aislamiento	Localidad	Origen
M 151b	Desembocadura Río Chamiza (X Región)	Pradera degradada
M 232	Maicolpue (X Región)	Bosque nativo
M 271	Coihueco (VIII Región)	Larva enferma de curculiónido, frambuesa

Estudio de CL_{50} y tasa de mortalidad

Se utilizaron suspensiones de esporas en concentraciones de 0 (testigo), 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias mL^{-1} de los tres aislamientos seleccionados, los que fueron aplicados por inmersión de 3 s a cada unidad experimental que correspondió a 5 larvas en el último estadio de desarrollo (L4), previo a pupar. Las larvas fueron depositadas en placas Petri con suelo pasteurizado y raicillas desinfectadas de frambuesa. Los tratamientos fueron incubados a $18\text{ }^{\circ}C$ y en oscuridad. Las evaluaciones se realizaron cada 24 h, registrándose larvas muertas y aparición de micelio y esporas. El diseño utilizado fue uno completamente al azar con 5 repeticiones por aislamiento; los datos fueron evaluados a través del test de Chi cuadrado y análisis de regresión. La concentración letal del 50% (CL_{50}) y del 90% (CL_{90}) de la población fueron interpolados luego de una transformación probit de los resultados (Alves *et al.*, 1998); se asumió normalidad para cada observación (Fry, 1993). La tasa de mortalidad a concentraciones crecientes y la mortalidad a concentraciones mínimas se comparó entre aislamientos a partir de las pendientes e intersecciones de las regresiones lineales, estos parámetros fueron sometidos a análisis de varianza y de separación de medias mediante la prueba protegida de Fischer, utilizando como observación los parámetros obtenidos de las regresiones realizadas en cada repetición (Gomez y Gomez, 1984).

Para cada concentración de inóculo, se graficó la mortalidad a través del tiempo y, utilizando el test de Chi cuadrado para bondad de ajuste, se determinó si las curvas se ajustaron a una sigmoidea. Luego de una transformación de Probit se calculó la pendiente de la regresión lineal, que corresponde a la tasa de mortalidad a través del tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de CL_{50} y tasa de mortalidad

Los aislamientos seleccionados fueron patogénicos a larvas del gorgojo de la frutilla, sin observarse mortalidad en el testigo. Las larvas muertas tomaron en principio una consistencia dura, luego de 2 d de incubación se observaron los primeros signos del hongo sobre el cuerpo de la larva, los que correspondieron a micelio blanquecino que al cuarto día se cubrió de esporas verde oliva. Lo anterior fue coincidente con lo observado en investigaciones realizadas con aislamientos nativos de otros países (Soares *et al.*, 1983; Poprawski *et al.*, 1985; Moorhouse *et al.*, 1992b). Respecto a la aparición de los signos de enfermedad, no hubo diferencia entre los aislamientos.

El porcentaje de mortalidad a distintas concentraciones de inóculo fue evaluado el día 15 después de la inoculación (Figura 1A), tiempo necesario para que la primera aislación de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (M 151b) produjera un 100% de mortalidad de larvas con la mayor concentración de inóculo (10^8 conidias mL^{-1}). Para los tres aislamientos, el aumento de la mortalidad a distintas concentraciones de inóculo se ajustó a curvas sigmoideas, lo que fue corroborado con el test de Chi cuadrado para bondad de ajuste ($P \leq 0,01$) (Gomez y Gomez, 1984). El análisis de las pendientes de las curvas linearizadas mediante transformación probit (Figura 1B), indicó que la aislación M 151b mostró una pendiente superior a los otros aislamientos (Cuadro 2), según test de Fischer ($P \leq 0,01$), lo que indica que la población de larvas tratadas tuvo una respuesta más rápida a mayores concentraciones de inóculo. Sin embargo, la intersección obtenida con la aislación M 151b fue significativamente inferior ($P \leq 0,01$), lo que indica que a concentraciones mínimas de inóculo el porcentaje de mortalidad fue superior para los aislamientos M 271 y M 232. No hubo diferencias estadísticas entre los aislamientos M 232 y M 271 en cuanto a pendiente e intersección con el eje.

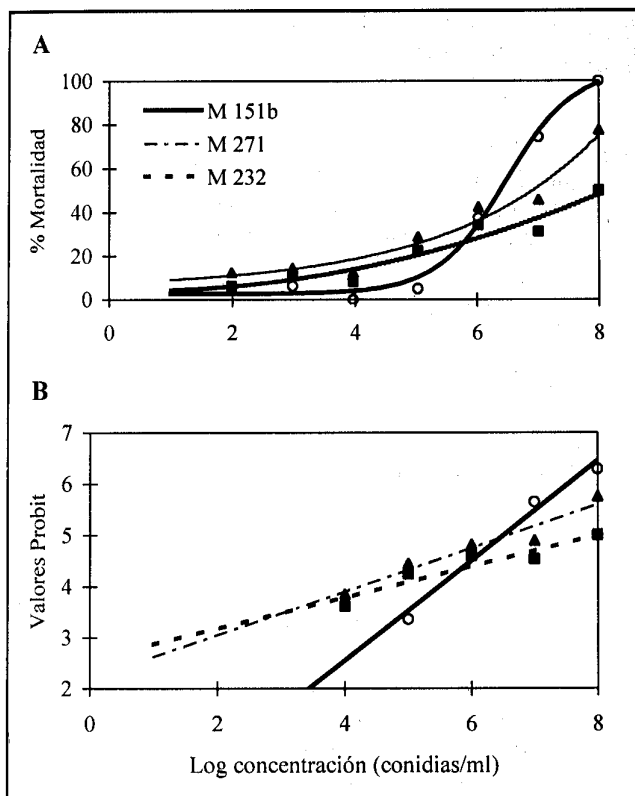


Figura 1. Porcentajes de mortalidad (A) y transformación probit (B) para las curvas de mortalidad de *Otiorynchus sulcatus* inoculados con distintas concentraciones de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, para las aislaciones M 151b (o), M 232 (■) y M 271 (▲).

Figure 1. Mortality percentage (A) and probit transformations (B) for the mortality curves of *Otiorynchus sulcatus* inoculated with different concentrations of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, for the isolates M 151b (o), M 232 (■) and M 271 (▲).

La CL_{50} fue similar para los aislamientos M 151b y M 271 (Cuadro 2), sin embargo, para la CL_{90} se observó que el valor obtenido por M 151b fue inferior al de M 271, debido a la mayor tasa de mortalidad. Respecto a los límites de confianza ($P \leq 0,05$) del CL_{50} , éstos se traslaparon para las tres regresiones lineales, lo que indica que los valores no difirieron significativamente entre los tres aislamientos. Con un 85% de confianza, los valores de CL_{50} para las aislaciones M 151b y M 271 fueron superiores a M 232. La CL_{50} es la que se ha establecido como medida de comparación de la toxicidad, debido a que a este

nivel los límites de confianza se estrechan y, por lo tanto, la respuesta al inóculo es menos variable (Lagunes y Villanueva, 1994).

La tendencia de la mortalidad de *O. sulcatus* a través del tiempo, con concentraciones de inóculo desde 10^2 hasta 10^5 , fue lineal, presentando un alto coeficiente de correlación, por lo que la tasa de mortalidad fue calculada directamente (Cuadro 3). Con concentraciones superiores a 10^5 conidias mL^{-1} , la respuesta observada fue sigmoidea y las curvas fueron linealizadas mediante transformación probit, calculándose a partir de ellas las tasas de mortalidad (Cuadro 4). A bajas concentraciones de inóculo, las mayores tasas de mortalidad se observaron con el aislamiento M 271, lo que constituye una buena opción para evaluar en terreno, ya que la cantidad de conidias que entran en contacto con una larva en el suelo es baja (Ferron, 1978). La cepa M 271 fue aislada de una larva de curculionido, lo que explica la mayor tasa de mortalidad observada, ya que en general los organismos entomopatógenos atacan a una especie en particular o a individuos de una misma familia. A mayores concentraciones de inóculo, las tasas de mortalidad fueron similares para los tres aislamientos. A pesar que Glare (1992) señala que la temperatura óptima para el crecimiento de *Metarhizium* varía

entre 20 a 30 °C, la temperatura de incubación en los ensayos realizados fue de 18 °C, por lo que cabría esperar mayores tasas de mortalidad con temperaturas superiores a la utilizada.

La respuesta diferencial de *O. sulcatus* a las tres aislaciones podría deberse a la especificidad presentada por distintas cepas de *Metarhizium*, característica mencionada por Vey et al. (1982), la que está relacionada con variabilidad, tanto en la capacidad de adherencia y penetración de la conidia en el integumento, a su actividad toxicogénica, como por la capacidad de defensa del insecto.

Cuadro 2. Parámetros de las transformaciones probit de la mortalidad de *Otiorhynchus sulcatus* inoculados con distintas concentraciones de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y concentración letal CL_{50} y CL_{90} para los tres aislamientos, al día 15 de post inoculación

Table 2. Regression coefficients of *Otiorhynchus sulcatus* mortality (probits) inoculated with different concentrations of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and lethal concentrations LC_{50} and LC_{90} for the three isolates at 15 days after inoculation

Nº aislamiento	Pendiente	Intersección	R ²	CL_{50} Log(conidias mL ⁻¹)	CL_{90} Log(conidias mL ⁻¹)
M 151b	0,97 a**	-1,34 b	0,98	6,53 (± 1,02)*	7,82
M 232	0,31 b	2,56 a	0,89	7,90 (± 1,40)	12,17
M 271	0,43 b	2,19 a	0,94	6,58 (± 0,96)	9,59

**Valores con letras distintas indican diferencias significativas según prueba protegida de Fischer ($P \leq 0,01$).

*Límites con un 95% de confianza.

Cuadro 3. Parámetros de las regresiones lineales de mortalidad de *Otiorhynchus sulcatus* y coeficiente de correlación para las concentraciones (conidias mL⁻¹) menores de inóculo de los tres aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Table 3. Regression coefficients and coefficients of correlation of *Otiorhynchus sulcatus* mortality for the lower inoculation concentrations of the three isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Conc.	Nº de aislamiento	Pendiente (tasa de mortalidad)		R ²
			Intersección	
10 ²	M 151b	0,003	-0,02	0,83
	M 232	0,006	0,03	0,88
	M 271	0,012	-0,06	0,88
10 ³	M 151b	0,005	-0,01	0,88
	M 232	0,007	-0,01	0,93
	M 271	0,015	-0,08	0,91
10 ⁴	M 151b	0,006	-0,03	0,91
	M 232	0,005	-0,02	0,83
	M 271	0,016	-0,09	0,85
10 ⁵	M 151b	0,008	-0,03	0,91
	M 232	0,013	0,02	0,96

Cuadro 4. Parámetros de las regresiones lineales de mortalidad de *Otiorhynchus sulcatus* obtenidas mediante transformación de probit y valor de χ^2 (bondad de ajuste) para las concentraciones (conidias mL⁻¹) mayores de inóculo de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Table 4. Regression coefficients of *Otiorhynchus sulcatus* mortality obtained through probit transformations and goodness of fit (χ^2) values for the higher inoculation concentrations of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolates

Conc.	Nº de aislamiento	Pendiente (tasa de mortalidad)		χ^2
			Intersección	
10 ⁵	M 271	0,19	1,32	<0,001
10 ⁶	M 151b	0,3	0,47	0,0012
	M 232	0,14	2,24	<0,001
	M 271	0,26	0,47	<0,001
10 ⁷	M 151b	0,24	1,94	0,001
	M 232	0,15	2,26	0,0011
	M 271	0,22	2,26	0,0017
10 ⁸	M 151b	0,4	1,01	<0,001
	M 232	0,26	1,51	0,0016
	M 271	0,29	1,17	<0,001

Los hongos entomopatógenos son capaces de vivir en forma saprofítica sobre materia orgánica, por esto los lugares en donde se encuentran con mayor frecuencia corresponden a zonas poco intervenidas o a huertos orgánicos (A. France y M. Gerding, datos sin publicar), donde existe una alta cantidad de materia orgánica y el uso de productos químicos, que afectan la sobrevivencia y germinación del hongo, es muy bajo o nulo. Por consiguiente, un factor importante a considerar al momento de la aplicación en terreno, es mantener un adecuado nivel de materia orgánica en el suelo y evitar el uso de pesticidas químicos, para asegurar la sobrevivencia del inóculo y por ende un eficiente control de la plaga.

En Chile no se han publicado estudios sistemáticos sobre hongos entomopatógenos ni tampoco formulaciones comerciales en base a cepas nativas, por lo que este trabajo permite avanzar en esta línea de control biológico. La metodología utilizada puede servir para ser aplicada a otras plagas de importancia económica, seleccio-

nando aislamientos específicos y formulando adecuadamente el producto.

CONCLUSIONES

Los aislamientos de *Metarhizium* de origen chileno fueron patogénicos a la larva L4 del gorgojo de la frutilla, con grado variable de virulencia.

La mortalidad de larvas de *Otiorhynchus sulcatus* a distintas concentraciones de inóculo se ajustó a una curva sigmoidea, lo que permitió interpolar y diferenciar CL_{50} ($P < 0,15$).

El aislamiento M 151b causó una mayor tasa de mortalidad y fue más agresivo a mayores concentraciones de inóculo. Sin embargo, con bajas concentraciones de inóculo, el aislamiento M 271 provocó tasas de mortalidad superiores a los otros aislamientos, pudiendo constituir una buena alternativa para evaluar en terreno el control de *Otiorhynchus sulcatus*.

RESUMEN

Se evaluó en laboratorio la patogenicidad de tres aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* sobre el gorgojo de la frutilla (*Otiorhynchus sulcatus*). Los aislamientos fueron aplicados en concentraciones crecientes (0 a 10^8 conidias mL^{-1}) sobre larvas en el último estadio de desarrollo. Se evaluó durante 20 días la mortalidad de larvas, calculándose la concentración letal CL_{50} y CL_{90} , y la tasa de mortalidad. La tasa de mortalidad a distintas concentraciones

fue distinta para los tres aislamientos ($P \leq 0,01$). La CL_{50} y CL_{90} para el aislamiento más agresivo, fue de 10^6 y 10^8 respectivamente. Futuros estudios a nivel de campo permitirán determinar el potencial de este hongo como agente de control biológico de *O. sulcatus* en Chile.

Palabras claves: control biológico, gorgojo de la frutilla, hongo entomopatógeno, patología de insectos.

LITERATURA CITADA

- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J.; MOINO, A. JR. Y ALVES, L. F. 1998. Técnicas de laboratorio. In: Alves, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Fundacao de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil. p. 637-711.
- ARTIGAS, J. 1994. Entomología económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario. Concepción, Chile. Vol II. Ediciones Universidad de Concepción. 943 p.
- DILL, J. F. 1997. Strawberry root weevils. Cooperative Extension Pest Management Office. University of Maine. Disponible en: <http://pmo.umext.maine.edu/factsht/strawpro.htm>. Conectado el 20 de octubre de 1997.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology 23: 409-442.
- FRANCE, A.; GERDING G., M.; GERDING P., M. Y SANDOVAL, A. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. Agricultura Técnica (Chile) 60(3): 205-215.
- FRY, J. C. 1993. Bivariate regression. In: Fry, J. C. (Ed.) Biological data analysis. A practical approach. New York, USA. Oxford University Press. p. 81-122.
- GLARE, T. R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. In: Glare, T. R. and Jackson, T. A. (Eds.). Use of pathogens in scarab pest management. Andover, England. Intercept Ltda. p. 63-77.
- GOMEZ, K. AND GOMEZ, A. A. 1984. Statistical procedures for agricultural research, 2nd ed. New York, USA. Wiley & Sons. p. 680.
- JOHNSON, W. AND LYON, H. H. 1988. Insects that feed on trees and shrubs. Ithaca, New York, USA. Cornell University Press. 556 p.
- LAGUNES A. Y VILLANUEVA, J. A. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 253 p.
- MOORHOUSE, E. R.; CHARNLEY, A. K. AND GILLESPIE, A. T. 1992a. A review of the biology and control of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). Ann. Appl. Biol. 121: 431-449.
- MOORHOUSE, E. R.; GILLESPIE, A. T. AND CHARNLEY, A. K. 1992b. Effect of potting media on the control of *Otiorhynchus sulcatus* larvae on outdoor strawberry plants using the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Biological Control 2: 238-243.
- MOORHOUSE, E. R.; GILLESPIE, A. T. AND CHARNLEY, A. K. 1993. Application of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. conidia to control *Otiorhynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae) larvae on glasshouse pot plants. Ann. Appl. Biol. 122: 623-636.
- POPRAWSKI, T. J.; MARCHAL, M. AND ROBERT, P. H. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. Environmental Entomology 14: 247-253.
- PRADO, E. 1988. Notas sobre insectos de importancia agrícola en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 48: 51-54.

- PRADO, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile. Serie Boletín Técnico N° 169. 207 p.
- SHETLAR, D. J. 1998. Black vine weevil and other root weevils. Ohio State University. Extension Fact Sheet. Disponible en: <http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/2000/2016.html>. Conectado el 20 de octubre de 1997.
- SOARES, G. G.; MARCHAL, M. AND FERRON, P. 1983. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviridae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. Environmental Entomology 12: 1887-1891.
- VEY, A., FARGUES, J. AND ROBERT, P. 1982. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for scarabeid larvae. Entomophaga 27: 387-397.