

USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE *Diaphorina citri*



Lic. Belén Corallo, Dra. Lina Bettucci, Dra. Susana Tiscornia
Facultad de Ciencias - Facultad de Ingeniería, UdelaR

Def. control biológico (Van Driesche & Bellows, 1996):
el control biológico es el uso de parasitoides,
depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones
competidoras para suprimir una población de plagas,
haciéndola menos abundante y por tanto menos
dañina que en ausencia de los controladoras

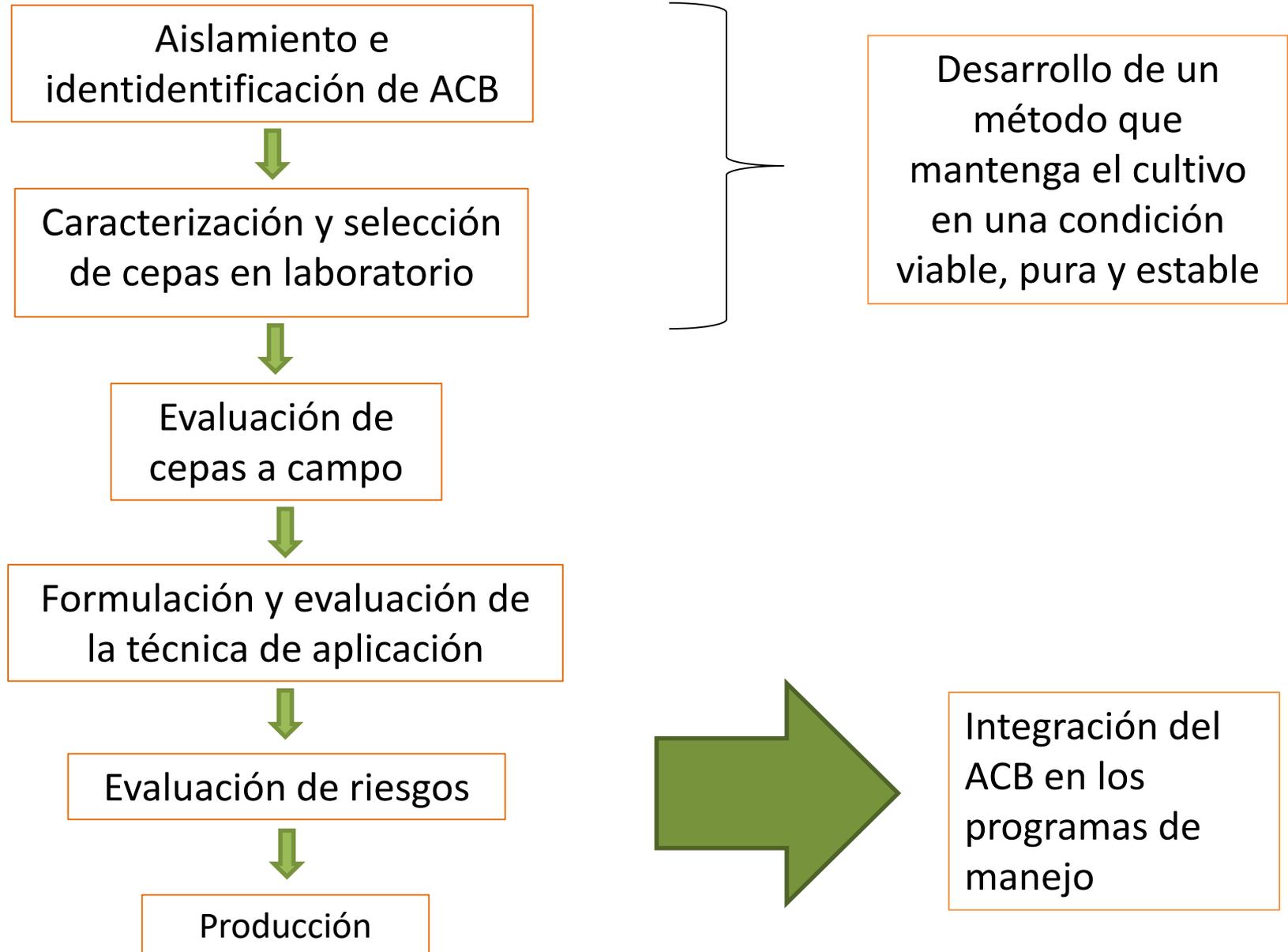
Ventajas

- compatibilidad con el ambiente
- no persistentes
- reducción de residuos de pesticidas
- especificidad de acción
- incremento de la actividad de enemigos naturales
- aplicación con equipamiento convencional
- bajo costo de producción

Desventajas

- sujeto a influencia ambiental
- perdida de persistencia
- velocidad de acción
- pueden mutar
- costo relativo en comparación a biocidas químicos
- pueden no ser compatibles con algunas prácticas de manejo
- inóculo pierde viabilidad en el tiempo
- en personas inmunodeprimidas pueden ser riesgosos

Etapas para la producción de un ACB



- Se conocen más de 700 especies pertenecientes a 90 géneros
- Pertenecen principalmente a Ascomycota y Entomophthoromycota
- Hay patógenos obligados y patógenos facultativos
- Epizootia: cuando la población de un hospedero crece mucho y se reduce dramáticamente a causa de los entomopatógenos, la relación es densidad-dependiente
- Los hongos entomopatógenos a diferencia de los virus y bacterias no requieren ser ingeridos para causar infección, ya que su mecanismo de acción es la penetración directa

Dispersión de las esporas en la superficie



Germinación



Formación de apresorios



Penetración de la cutícula



Proliferación dentro de la cutícula



Invasión de los tejidos
por hifas normales

Invasión de la epidermis e
hipodermis

Proliferación de cuerpos
hifales o blastosporas
en la hemolinfa



Muerte del
insecto



Crecimiento saprotrófico



Dispersión asexual por esporas



Estado asexual o sexual latente

- Proteasas
- Peptidasas
- Quitinasas
- Lipasas
- Fosfolipasas

Espece fúngica	Nombre del producto	País	Espece objetivo	Cultivo
<i>B. bassiana</i>	Mycotrol, Botanigard	EEUU	Mosca blanca Áfidos Tisanópteros	Tomates de invernadero Ornamentales
	Naturalis	EEUU	Insectos chupadores	Algodón Cultivos de invernadero
	Ostrinol	Francia	Taladrador	Maíz
	Proecol	Venezuela	Áfidos	Caña de azúcar
<i>B. brogniartii</i>	Engerlingspilz	Suiza	Larva de escarabajos	Pasturas
	Beauveria Schweizer	Suiza	Larva de escarabajos	Pasturas
<i>L. longisporum</i>	Vertalec	Reino Unido /Europa	Áfidos	Cultivos de invernadero
<i>L. muscarium</i>	Mycotal	Reino Unido /Europa	Mosca blanca Tisanóptero	Cultivos de invernadero
<i>L. lecanii</i>	LECAFOL	Uruguay	Mosca blanca	Tomates
<i>M. anisopliae</i>	BioBlast	EEUU	Termitas	Casas
	Green Muscle	Sur Africa	Langostas	Matorrales
<i>M. flavoviride</i>	BioGreen	Australia	Abejorro	Pasturas
<i>I. fumosorosea</i>	PFR-97	EEUU/ Europa	Mosca blanca y Tisanóptero	Cultivos de invernadero

El manejo del HLB se basa en: producción de plantas sanas, erradicación de las plantas enfermas y control del vector

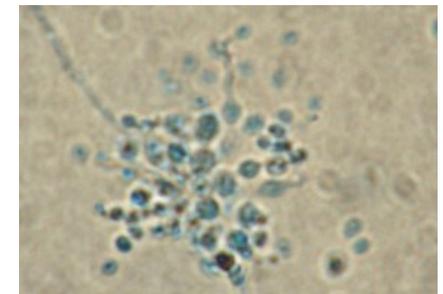
Los enemigos naturales juegan un papel importante en la regulación de las poblaciones del vector

Predadores: principalmente coccinélidos, crisopas, sírfidos y arañas

Parasitoides: *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae)

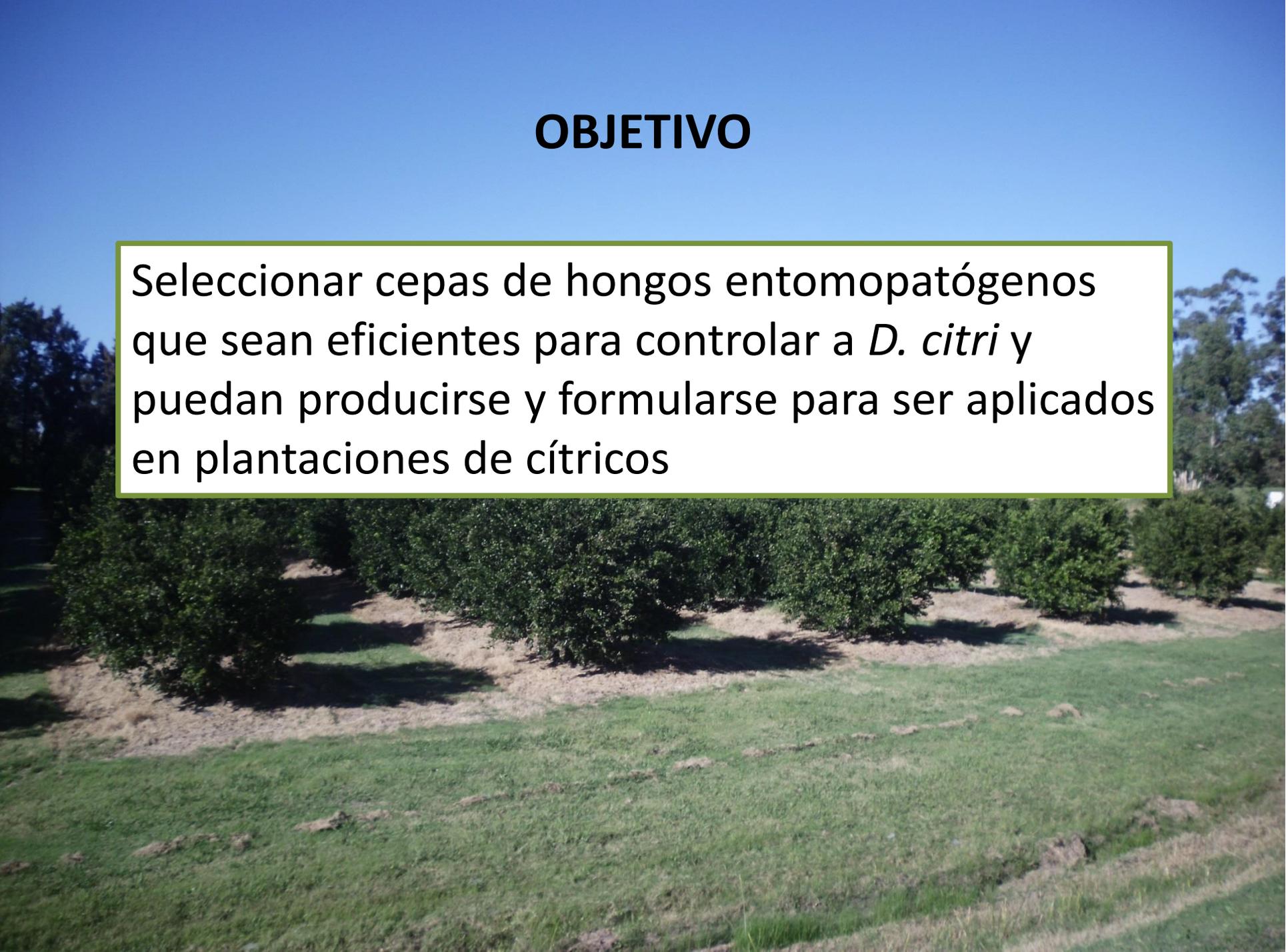
Tamarixia radiata hay en Uruguay

Hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *Hirsutella citriformis*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium*, *Metarhizium anisopliae* y *M. brunneum*



OBJETIVO

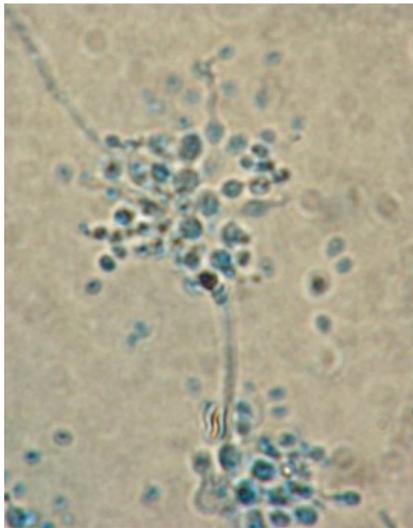
Seleccionar cepas de hongos entomopatógenos que sean eficientes para controlar a *D. citri* y puedan producirse y formularse para ser aplicados en plantaciones de cítricos



1. Evaluación de la eficiencia de cepas de hongos entomopatógenos para infectar *D. citri*

Cepas de hongos utilizadas y origen de las mismas

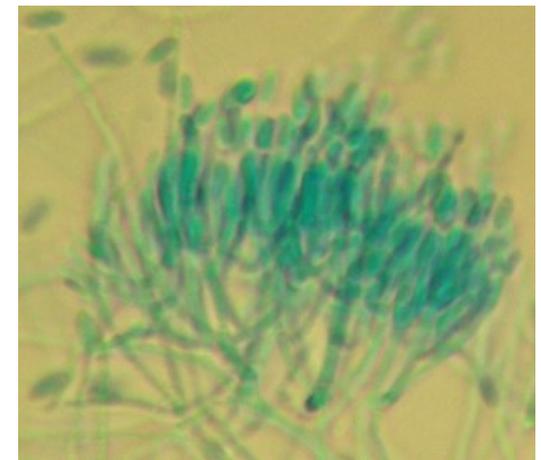
Nº de colección	Especie	Hospedero
2411	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Eugenia uruguayensis</i>
2067	<i>Beauveria bassiana</i>	Scolytidae
2121	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Acromyrmex</i> sp.



Conidióforo de
B. bassiana

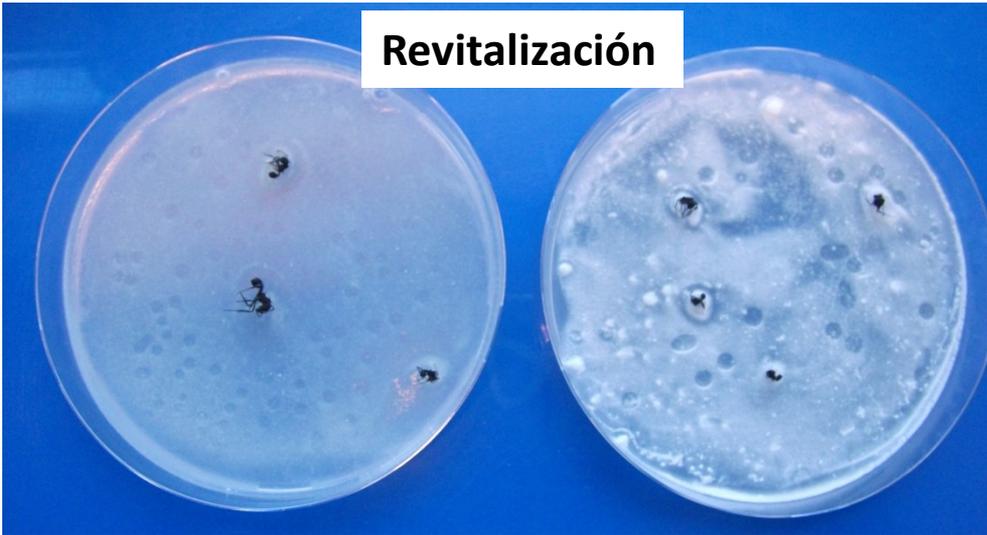


Cultivo de
B. bassiana



Conidióforo de
M. anisopliae

Revitalización



Se inoculó una suspensión de esporas de *B. bassiana* o *M. anisopliae* sobre medio de cultivo con hormigas esterilizadas. Luego de 5 días se obtuvo un cultivo puro de cada hongo

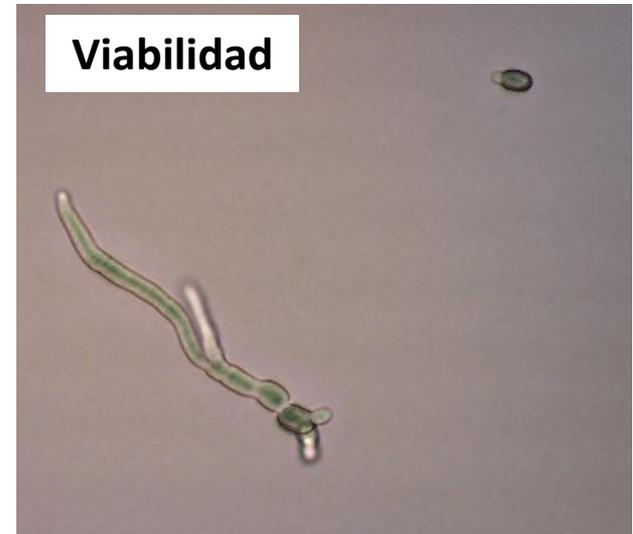
Preparación de inóculo

Se colectaron las esporas y se resuspendieron en agua con Tween20 (0,02%). La concentración de la suspensión de esporas se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer.

Se tomó una alícuota del inóculo, se colocó en una placa con PDA y se incubó a 25°C durante 24hs.

Viabilidad: (esporas viables/total de esporas) x 100.

Viabilidad



Inoculación de los hongos entomopatógenos sobre ninfas de *D. citri*



Se aplicaron 30mL de una suspensión de 1×10^7 esporas viables/mL agua-Tween (0,02%) de cada hongo sobre plantines de cítricos infestados con *D. citri*
Testigo: agua-Tween (0,02%)



Las macetas se colocaron en una cámara cerrada a 25°C durante 5 días



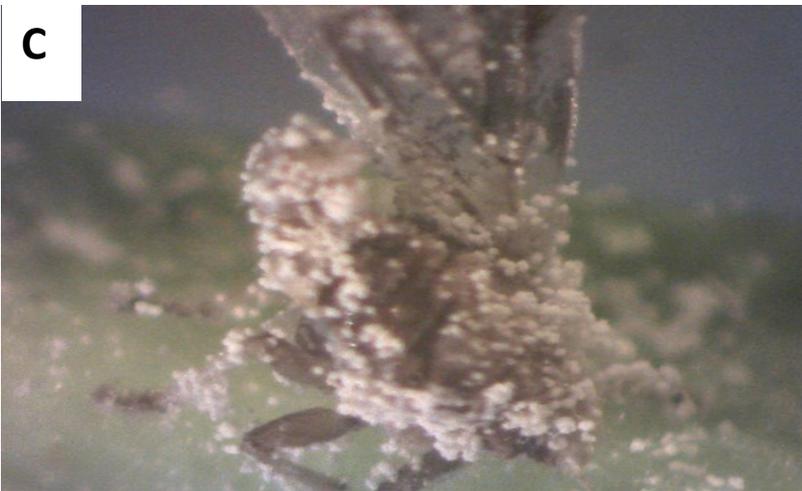
Se contaron bajo lupa todos los individuos vivos y muertos
Se colocaron en cámara húmeda para verificar la infección por hongos

Resultados

- El total de insectos evaluados en el ensayo fue de 2132
- Se observó al momento de la evaluación desarrollo fúngico sobre los individuos adultos y ninfas
- El porcentaje de mortalidad de insectos producido por una sola aplicación de los hongos entomopatógenos, evaluado a los 5 días, fue alto (>80%)
- Los tratamientos con las distintas cepas mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la mortalidad de los insectos respecto al control

Porcentaje de mortalidad de *D. citri* en los distintos tratamientos

Tratamiento	Mortalidad producida por entomopatógenos (%)		Mortalidad total en la población (%)	
	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío
Testigo	-	-	20,8 a	8,7
<i>M. anisopliae</i> 2411	82,8	10	96,1 b	7,1
<i>B. bassiana</i> 2067	85,9	3,8	98,7 b	1,7
<i>B. bassiana</i> 2121	84,8	5,2	98,7 b	1,3



A: ninfa de *D. citri* testigo, B: ninfa con *M. anisopliae* 2411, C: adulto con *B. bassiana* 2067 y D: ninfa con *B. bassiana* 2121

2. Efecto de los hongos entomopatógenos sobre enemigos naturales de *D. citri*

2.1 Coccinélidos

- Se colectaron ejemplares adultos y larvas de *Cycloneda sanguinea* y *Harmonia axyridis*, presentes en plantaciones de cítricos
- Se transportaron al laboratorio y se colocaron en jaulas (5 individuos por jaula)
- Cada jaula contenía un algodón húmedo y papeles amarillos con huevos de *Ephestia kuehniella* como alimento

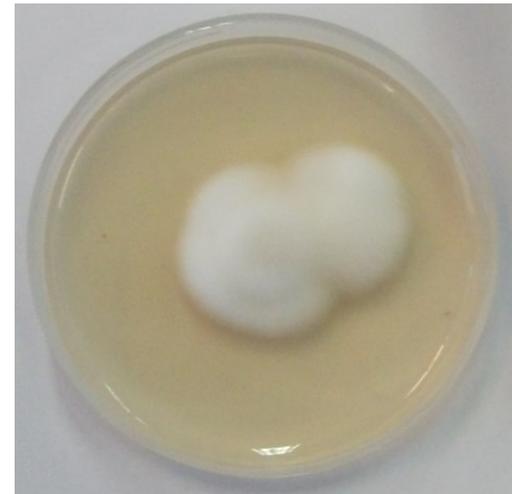


Larva de coccinélido alimentándose de un individuo adulto de *D. citri*



Jaulas conteniendo adultos de *H. axyridis*

- Se aplicó hasta punto de goteo una suspensión de 1×10^7 esporas viables/mL agua-Tween (0,02%) de cada hongo sobre los individuos de ambas especies de coccinélidos
- Testigo: agua-Tween (0,02%)
- Las jaulas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 7 días y se contabilizaron diariamente los individuos muertos



Los individuos muertos se colocaron en cámara húmeda hasta observar desarrollo fúngico

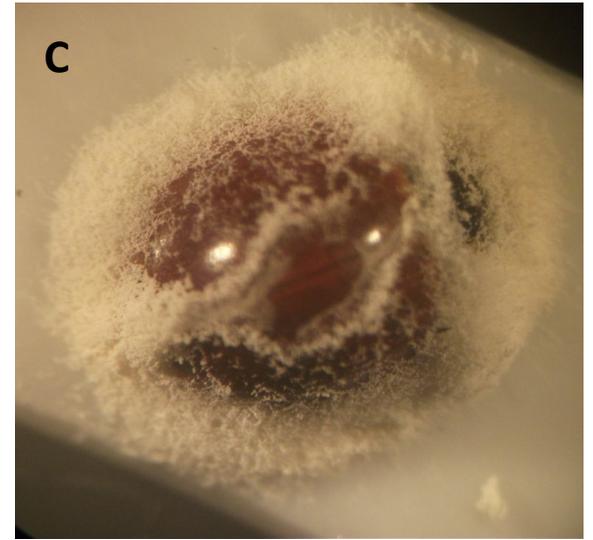
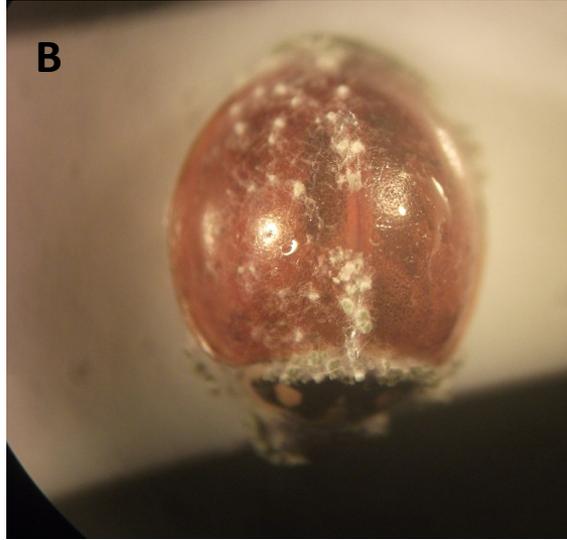
Se realizó la observación microscópica para confirmar la presencia de *Beauveria* o *Metarhizium*

Resultados

- No se observó un efecto importante de los hongos entomopatógenos sobre los individuos adultos de las especies *Cycloneda sanguinea* y *Harmonia axyridis*

Tratamiento	Vivos (%)	Muertos (%)	Muertos por hongos(%)
Testigo	79	21	0
<i>Beauveria bassiana</i>	80	20	2
<i>Metarhizium anisopliae</i>	84	16	7

- Tampoco se observó un efecto de los hongos sobre las larvas de coccinélidos al ser inoculadas con *B. bassiana* y con *M. anisopliae*.
- El número de larvas evaluado fue muy bajo para sacar conclusiones, pero se observó que no morían e incluso completaban su ciclo de vida llegando al estado adulto

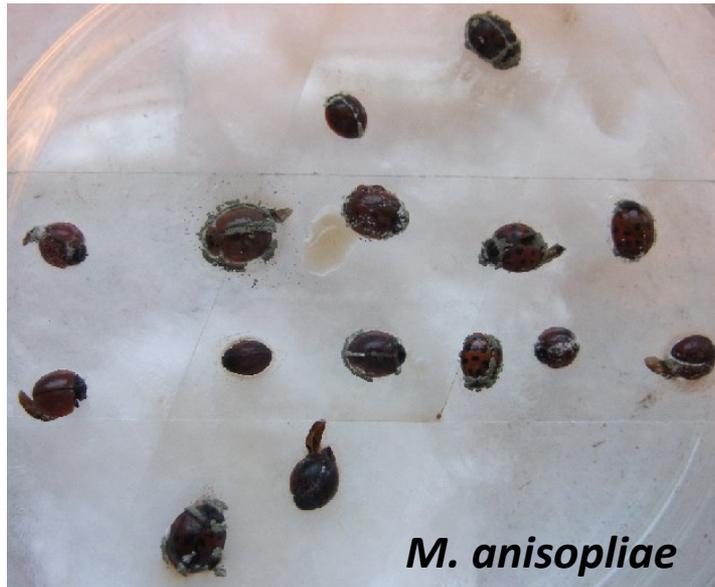


Individuo adulto de *C. sanguinea* A: sin hongos entomopatógenos (Testigo),
B: con *M. anisopliae* y C: con *B. bassiana*

Inoculación de coccinélidos muertos

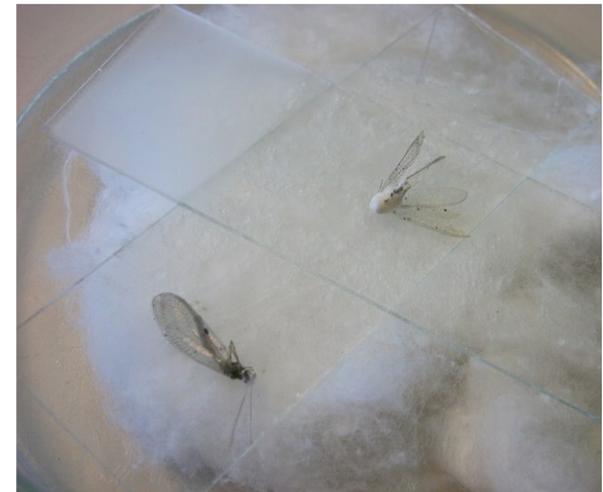
- Se les aplicó una suspensión de esporas con 1×10^7 conidios/mL de *B. bassiana* o *M. anisopliae* y agua-Tween (0,02%).
- Se colocaron los insectos en cámara húmeda hasta observar el desarrollo de micelio
- Se reaislaron los hongos entomopatógenos inoculados

Tratamiento	Colonización (%)	
	Cycloneda sanguinea	Harmonia axyridis
<i>Beauveria bassiana</i>	69	56
<i>Metarhizium anisopliae</i>	69	89



2.2 Crisopas

- Se aplicó una suspensión de 1×10^7 esporas viables/mL agua-Tween (0,02%) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre larvas y adultos de *Chrysoperla externa*
- Testigo: agua-Tween (0,02%)
- Las jaulas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 7 días y se contabilizaron diariamente los individuos muertos
- Se colocaron en cámara húmeda para la corroboración de la infección

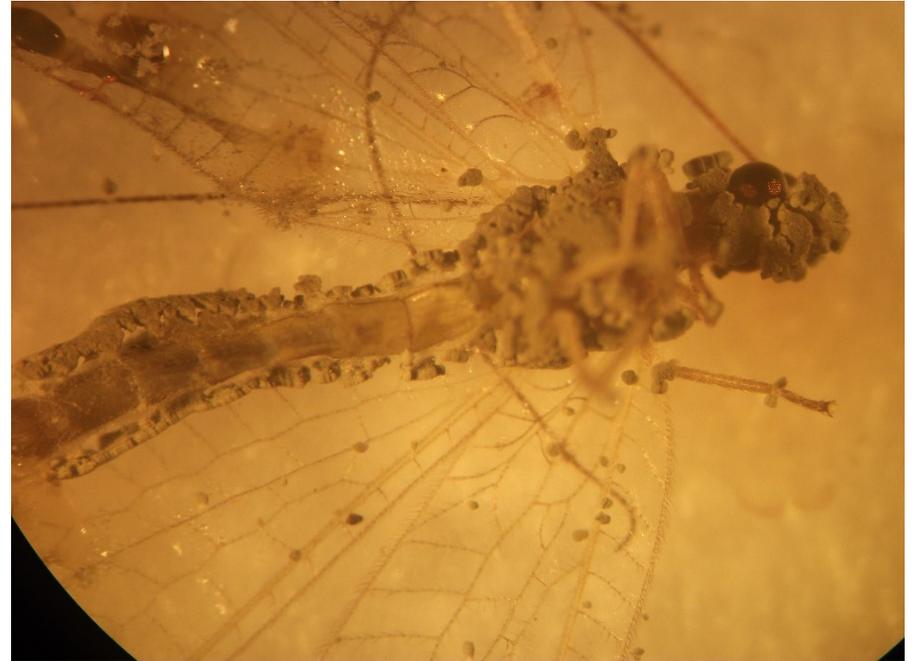


- Los individuos fueron suministrados por la cría del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía

Resultados

- *B. bassiana* no fue capaz de infectar larvas de *C. externa*
- *M. anisopliae* produjo una mortalidad muy reducida de las larvas
- Los adultos fueron más susceptibles a la infección por hongos
- *M. anisopliae* fue más virulento que *B. bassiana*

Estadío	Mortalidad producida por entomopatógenos (%)		Mortalidad total en la población (%)	
	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos
<i>B. bassiana</i>	0	17	0	17
<i>M. anisopliae</i>	6	38	6	54
Testigo	-	-	0	0



Individuo adulto de *C. externa*. Izquierda: con *B. bassiana* y derecha: con *M. anisopliae*

3. Efecto de los principales plaguicidas sobre los hongos seleccionados para el control de *D. citri*

- Se evaluaron los pesticidas más frecuentemente usados en plantaciones de cítricos
- Se utilizó la concentración habitual de aplicación de cada producto a campo (2) y además, una concentración un 30% mayor (3) y un 30% menor (1)

Concentración	1	2	3
Oxicloruro de cobre	105µL/300mL	150µL/300mL	195µL/300mL
Abamectina	0.52g/300mL	0.75g/300mL	0.98g/300mL
Aceite mineral	3.68mL/300mL	5.25mL/300mL	6.83mL/300mL

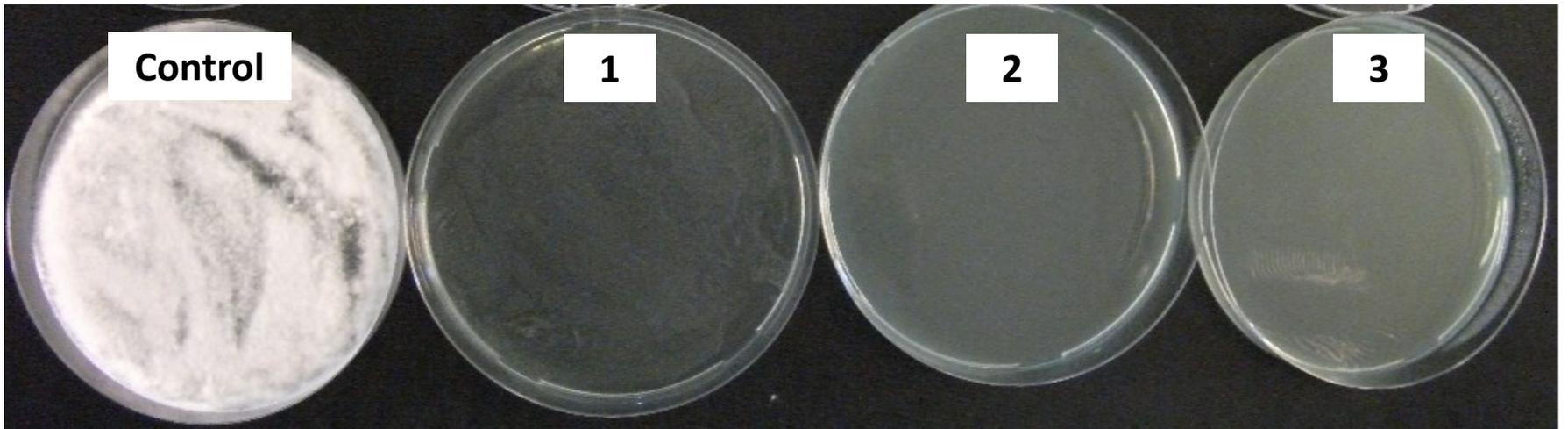
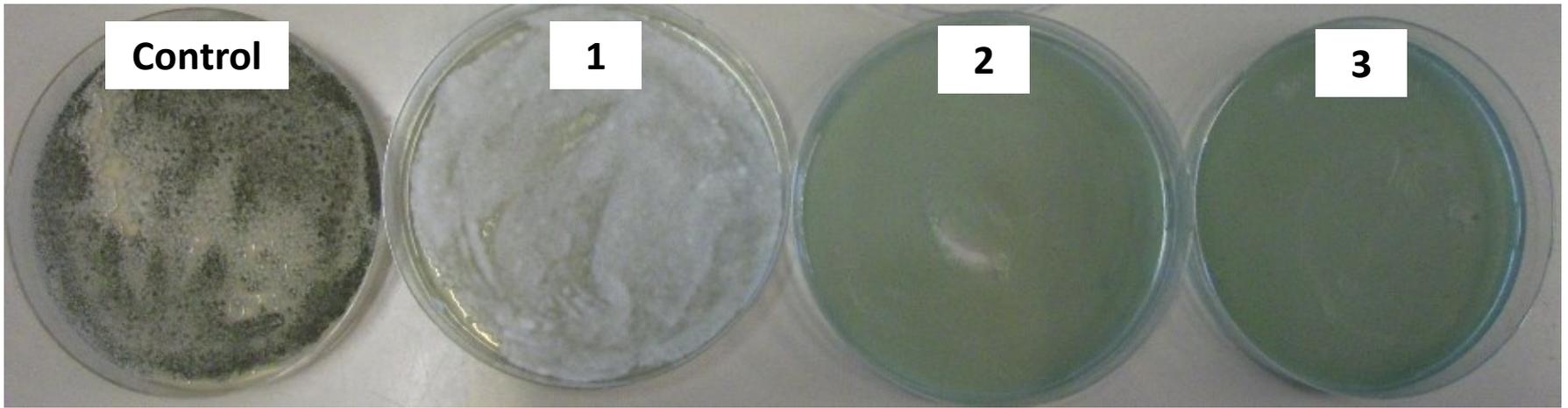
- Cada producto se incorporó al medio de cultivo PDA donde se inocularon las esporas de los hongos
- Se evaluó la germinación de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en los medios con oxicloruro de cobre y abamectina
- En el medio con aceite mineral se cuantificaron colonias
- Se evaluó el crecimiento del micelio y la esporulación luego de 4 días de incubación

Resultados

- El tratamiento con oxiclóruo de cobre y abamectina afectó la germinación de las esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*
- El tratamiento con aceite mineral no afectó la viabilidad de las esporas

Tratamiento		Viabilidad de las esporas (%)											
		Control	Cu 1	Cu 2	Cu 3	Control	Ab 1	Ab 2	Ab 3	Control	AM 1	AM 2	AM 3
2411 M. anisopliae	Prom.	90,3	88,9	0	0	96,3	64,9	35,0	23,8	142	143	138	136
	Desvío	2,2	4,8	0	0	0,6	6,5	5,7	3,3	16	16	17	23
2067 B. bassiana	Prom.	99,3	98,8	0	0	99,2	97,6	96,9	91,5	227	236	239	217
	Desvío	0,6	1,1	0	0	1,2	0,4	1,4	1,6	10	10	11	16

Cu: Oxiclóruo de cobre, Ab: Abamectina y AM: Aceite mineral. 1,2 y 3: diferentes concentraciones



La mayoría de los productos afectaron el crecimiento y/o la esporulación de los hongos evaluados

CONCLUSIONES

- Las tres cepas de hongos entomopatógenos evaluadas fueron eficientes en el control de *D. citri*
- El método de inoculación por aspersión fue adecuado
- *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron baja virulencia frente a las especies de coccinélidos y crisópidos estudiadas
- Los pesticidas utilizados afectaron la germinación, el crecimiento o la esporulación de los hongos