

DETECCIÓN Y MONITOREO. INVESTIGACIÓN Y APLICACIÓN SOBRE LAS ESTRATEGIAS Y TÉCNICAS PARA EL CONTROL DE *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS*

## Potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico contra el Picudo Rojo de las Palmeras

**Cándido Santiago-Álvarez, Enrique Quesada-Moraga** (Universidad de Córdoba, Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, ETSIAM, Córdoba).

**Óscar Dembilio** (Unidad Asociada de Entomología IVIA-UJI-CIB/CSIC. Moncada).

**Josep A. Jacas** (Universitat Jaume I; Unitat Associada d'Entomologia UJI-IVIA; Campus del Riu Sec; Castelló de la Plana)

Se ha evaluado el potencial insecticida de una cepa del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) obtenida de una pupa de *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) infectada en estado natural. En condiciones de laboratorio, esta cepa presenta patogenicidad para todos los estados del desarrollo del picudo rojo, la virulencia en términos de  $CL_{50}$  es diferente para cada uno de los estados, sigue la cadencia: larvas de 4º estadio, huevos, adultos de cría y adultos de campo; los adultos tratados con conidios, fueron capaces de transmitir la enfermedad al sexo contrario, muestran disminución, al propio tiempo, de la fecundidad de hembras y la viabilidad de huevos. En ensayos de semicampo, utilizando *Phoenix canariensis*, se obtuvieron altas eficacias, tanto en pulverización como por pintado, que confirman el potencial de esta cepa para el control de *R. ferrugineus*.

### INTRODUCCIÓN

El picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae), se ha convertido, de un modo progresivo desde mediados de los 90, en el mayor enemigo de esta planta en la Cuenca Mediterránea y demás lugares del mundo por donde se halla extendida (EPPO, 2010). Las hembras del picudo rojo realizan la puesta de sus huevos en la base de las palmas, en orificios practicados con su rostro. La eclosión de los huevos tiene lugar poco después, enseguida las larvas neonatas comienzan a barrenar el tronco de la palmera, se alimentan de tejido blando y a medida que progresa su desarrollo, las galerías que perforan hacia el interior se ensanchan con la consiguiente destrucción tisular. Las larvas de última edad vuelven a la base de las palmas, ahí normalmente pupan en el interior de una cámara que fabrican con fibras de la propia palmera. Transcurrido un tiempo no demasiado prolongado aparecen los adultos de la nueva generación que pueden permanecer en el mismo hospedante para reproducirse o bien, dependiendo del grado de deterioro en el que se encuentre, desplazarse por el vuelo a otras palmeras y así extender la plaga en el espacio.

Las medidas de control utilizadas contra este curculiónido están basadas en el uso de productos químicos, en una gran proporción, bien de manera preventiva bien curativa, con el consiguiente impacto tanto sobre el medio ambiente como sobre las personas, al ser comunes las palmeras en los espacios públicos donde se utilizan con fines ornamentales. Una alternativa aceptable para adecuar el control de *R. ferrugineus* a las exigencias medioambientales y de salud pública se encuentra en el empleo de enemigos naturales: parasitoides, depredadores y microorganismos entomopatógenos.

Los enemigos naturales del picudo rojo de la palmera están muy poco estudiados por el momento. Sin embargo es hospedante fisiológico del nematodo entomopatógeno (NEP), *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae), el cual ha mostrado efectividad para el control del picudo, en condiciones de semicampo y campo, tanto aplicado de manera preventiva como curativa (ver artículo sobre NEP en este mismo número de PHYTOMA). Por otro lado, algunas cepas de los hongos ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (HE), *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sokorin (Ascomycota: Clavicipitaceae) y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Clavicipitaceae) han mostrado patogenicidad para el picudo, aunque en su mayoría, no fueron aisladas de individuos infectados de manera natural (GINDIN *et al.*, 2006).

Estos dos tipos de agentes microbianos de control de plagas presentan un elevado interés para el control del picudo rojo porque invaden al

# El Picudo Rojo de las Palmeras

UNA PLAGA DE ALTO RIESGO Y URGENTE CONTROL

insecto por vía tegumentaria, sin necesidad de ser ingeridos. El estado infectivo de los NEP hace su entrada en el homecele a través de las aperturas naturales, ano, boca, y espiráculos respiratorios; por el contrario, los propágulos infectivos de los HE, los conidios, se adhieren a la cutícula, germinan y por una serie de procesos bioquímicos y mecánicos atraviesan el tegumento para crecer en el interior del insecto con consecuencia de muerte. Este modo de acción nos ha llevado a investigar la posibilidad de emplear HE para el control del picudo rojo, en la consideración de que podemos llegar fácilmente al adulto, el estado de vida libre, sin descartar el entorpecimiento del ciclo vital, en el interior de la palmera, habida cuenta del carácter endófito que muestran algunas cepas de *B. bassiana* (QUESADA-MORAGA et al., 2006)

Durante una de nuestras prospecciones de campo localizamos en una palmera datilera cerca de Catral (Alicante), en de mayo 2007, una pupa de *R. ferrugineus* micosada de la que se aisló una cepa de *B. bassiana* que con el código, EAbb 07/06-Rf, está registrada en la colección de hongos entomopatógenos del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba. La cepa cumple los principios de Koch, presenta virulencia para todos y cada uno de los estados del desarrollo del insecto a la vez que reduce la capacidad reproductora de los adultos tratados con ella. Esta cepa se depositó el 13 de Mayo de 2009 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número 20752.

En este artículo se resume el trabajo llevado a cabo conjuntamente por la Unidad Asociada de Entomología UJI-IVIA-CIB/CSIC y el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba para demostrar el valor de la cepa EAbb 07/06-Rf de *B. bassiana* en el control del picudo rojo.

## Ensayos de laboratorio y semicampo

### Bioensayos

#### Virulencia en diferentes estados de *R. ferrugineus*

En estos bioensayos de laboratorio se evaluó la virulencia de la cepa EAbb 07/06-Rf de *B. bassiana*, para huevos, larvas neonatas, larvas de 4º estadio y adultos de *R. ferrugineus*. Los individuos de todos los estados del desarrollo del picudo rojo de la palmera utilizados en estos ensayos procedían de la cría que se mantiene en la Unidad de Entomología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias no obstante, con idéntico fin, se hizo un bioensayo con adultos recogidos en campo. El tratamiento de los individuos de todos los estados se realizó por inmersión, durante un tiempo determinado, en una suspensión de conidios de *B. bassiana* a diferentes concentraciones (DEMBILIO et al., 2010). En estos ensayos se prueba la patogenicidad de la cepa de *B. bassiana* para todos los estados del desarrollo de *R. ferrugineus* al mismo tiempo se determina la virulencia para cada uno de ellos con el cálculo de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) mediante análisis probit a lo que se añade otro parámetro: el Tiempo Medio de Supervivencia (TMS) por aplicación del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Los resultados muestran que la cepa de *B. bassiana*, aislada por nosotros de una pupa infectada en campo de modo natural, presenta patogenicidad para todos los estados/ios de *R. ferrugineus*. La virulencia, en términos de  $CL_{50}$ , difiere para cada uno de los estados/ios, la más elevada la presentan las larvas de cuarta edad ( $6,3 \cdot 10^7$  conidios/ml) seguida del estado de huevo ( $1,5 \cdot 10^8$  conidios/ml), larva neonata ( $3,7 \cdot 10^8$  conidios/ml), adulto de cría ( $7,2 \cdot 10^8$  conidios/ml) y la más baja el adulto de campo ( $3,0 \cdot 10^9$  conidios/ml). Los valores de los TMS, en general, guardan relación inversa con los de las concentraciones (Tabla 1) y las diferencias presentan significación, por otro lado las larvas respondieron más rápido a la infección que los adultos, y fueron los provenientes de laboratorio más sensibles a ella que los capturados en campo.

#### Transmisión horizontal entre adultos y efectos subletales en la reproducción

Este ensayo consistió en tratar por el mismo método de inmersión en una suspensión de conidios individuos adultos de ambos sexos del picudo rojo. Se realizaron las 4 combinaciones de apareamiento posibles: (1) Machos no tratados × Hembras no tratadas, (2) Machos tratados × Hembras no tratadas, (3)

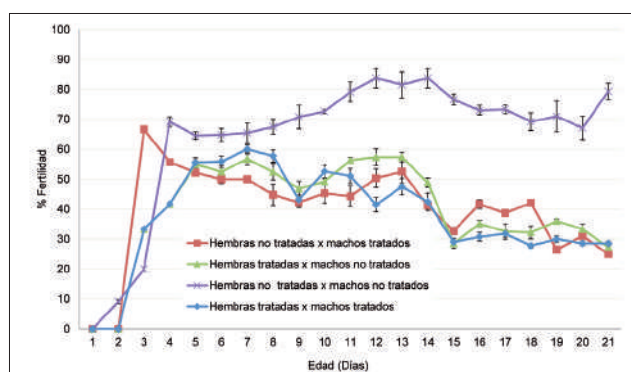


Figura 1. Fertilidad (media de huevos eclosionados por hembra y día) de hembras de *R. ferrugineus* en 4 combinaciones de apareamiento: (1) Machos tratados × Hembras no tratadas, (2) Machos no tratados × Hembras tratadas, (3) Machos no tratados × Hembras no tratadas, (4) Machos tratados × Hembras tratadas.

Machos no tratados × Hembras tratadas, (4) Machos tratados × Hembras tratadas. Estas parejas se individualizaron en cajas de plástico donde se contabilizó diariamente la mortalidad y la fecundidad de las hembras. La puesta se transfirió a placas Petri donde se observó su evolución. Se utilizaron 4 repeticiones de 10 parejas por cada combinación establecida. Se observó que 21 días después del tratamiento la mortalidad del control fue inferior al 5%, mientras que en los individuos tratados con *B. bassiana* alcanzó valores de entre el 55% y el 90% (Tabla 2). Tanto el factor sexo como el tratamiento afectaron significativamente el resultado del ensayo y la interacción entre esos dos factores fue también significativa. La supervivencia de los adultos no tratados fue significativamente superior que la de los adultos tratados. La fecundidad y viabilidad de huevos fueron significativamente inferiores respecto al testigo en las combinaciones de apareamiento con individuos tratados, entre estas, los valores más bajos se alcanzaron en las repeticiones con ambos sexos tratados (Figura 1). En condiciones de laboratorio, quedó pues probado que la cepa de *B. bassiana* podía reducir las poblaciones de *R. ferrugineus* por efecto directo sobre adultos, por su efecto subletal en la descendencia y por transmisión horizontal de la infección entre individuos.

# El Picudo Rojo de las Palmeras

UNA PLAGA DE ALTO RIESGO Y URGENTE CONTROL

Ocupación (condición)	Tratamiento de huevos		Tiempo Medio de Supervivencia, TMS			
	TMS para larvas		Cuarto estadio		Adultos	
	huevo <sup>a</sup>	neonatas	huevo <sup>a</sup>	larvas	de laboratorio	de campo
Control	72.2 ± 9.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
X = 10 <sup>b</sup>	58.3 ± 5.9 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.16 <sup>c</sup>	5.83 ± 0.20 <sup>d</sup>	8.61 ± 0.67 <sup>e</sup>	11 <sup>f</sup>	14 <sup>g</sup>
X = 13 <sup>b</sup>	38.9 ± 6.8 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.13 <sup>c</sup>	4.59 ± 0.12 <sup>d</sup>	4.56 ± 0.36 <sup>d</sup>	10 <sup>f</sup>	12 <sup>g</sup>
X = 13 <sup>b</sup>	50.5 ± 3.4 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.11 <sup>c</sup>	5.44 ± 0.27 <sup>d</sup>	1.52 ± 0.29 <sup>d</sup>	21.17 ± 0.54 <sup>h</sup>	22.53 ± 2.04 <sup>h</sup>
X = 13 <sup>b</sup>	5.9 ± 3.4 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.09 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>d</sup>	19.83 ± 0.20 <sup>h</sup>	16.00 ± 3.08 <sup>h</sup>
ANCOVA	29.78 ± 4.14;	26.19 ± 3.11;	20.75 ± 3.11;	171.85 ± 3.11;	84.50 ± 1.5;	4.43 ± 1.5
DF: q 1, 71	< 0.0001	0.0001	0.0001	< 0.0001	0.0001	0.039

En la misma columna, las medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan's test al P = 0.05).  
<sup>a</sup>X = 6.73, 3.14, 4.5, 5.16 y 2.73 para huevos, larvas recriadas, larvas de cuarto estadio, adultos de laboratorio y salvajes, respectivamente.  
<sup>b</sup>Los datos están sujetos a una transformación angular previa al análisis.  
<sup>c</sup>Los TMS no se pudieron calcular porque la mortalidad observada fue inferior al 50%.

**Tabla 1. Eclósión de huevos a los 4 días y Tiempo medio de supervivencia (TMS, días después del tratamiento) en diferentes estados/ios de *R. ferrugineus* tratados con *B. bassiana* en el laboratorio. Se utilizó el método de análisis de supervivencia Kaplan-Meier para calcular los TMS.**

## Ensayos de semicampo

La eficacia de la cepa de *B. bassiana* se evaluó en palmera canaria como preventiva. El producto utilizado (una suspensión acuosa de conidios de *B. bassiana*) se aplicó (1) con brocha homogéneamente a la corona de la palmera o (2) directamente pulverizado hasta goteo.

El primer ensayo se aplicó a 45 palmeras sanas, divididas en 9 grupos de 5. Un grupo fue el control y no recibió tratamiento alguno. Los otros 8 grupos se dividieron en dos, uno se trató con brocha y el otro por pulverización. Dos horas después de la aplicación, todas las palmeras, en grupos de 5, se enjaularon juntas y se liberaron 3 hembras y 2 machos de *R. ferrugineus* por palmera. Estos grupos de palmeras recibieron de entre 0 y 3 tratamientos adicionales cada 15 días, de manera que para cada tipo de tratamiento hubo entre 1 y 4 tratamientos en el tiempo. Un mes después del último tratamiento, las palmeras se diseccionaron y se contabilizaron todas las formas de su interior.

El segundo ensayo tuvo como objetivo evaluar la persistencia del producto aplicando un solo tratamiento y realizando sucesivas infestaciones desde el día 15 hasta el día 45 en intervalos de 15 días y en grupos de 5 palmeras. Se trataron 30 palmeras (15 con brocha y 15 por pulverización). Las 15 restantes formaron el grupo control. El método de infestación y aplicación del producto, así como la evaluación de los resultados, fue el mismo que se ha descrito anteriormente. Los resultados mostraron que las palmeras que se trataron con el producto contenían significativamente menor cantidad de formas vivas que el grupo control. En ambos ensayos la eficacia del tratamiento dependió del método de aplicación

Tratamiento		Mortalidad		TMS	
No tratado	No tratado	5.0 ± 2.8	2.5 ± 2.5	-	-
No tratado	Tratado	55.0 ± 2.8	85.3 ± 2.9	19.6 ± 0.4	18.2 ± 0.2
Tratado	No tratado	79.0 ± 4.0	90.3 ± 4.0	17.2 ± 0.7	19.2 ± 0.2
Tratado	Tratado	75.0 ± 2.8	90.3 ± 4.1	17.0 ± 0.4	18.1 ± 0.6
ANCOVA de los factores (paros y tratamiento): F, g, P		Suen: 118, 1.31, 0.0022		Suen: 3.1, 1.73, 0.2637	
		Tratamiento: 226.7, 3.31, < 0.0001		Tratamiento: 6.4, 2.73, 0.0079	
		Interacción: 14.4, 3.31, < 0.0001		Interacción: 14.5, 2.73, 0.0007	

Los TMS limitan la duración de ensayo.  
 En las parejas tratadas se observaron crecimientos fungicos de *B. bassiana* anidado por completo a todos los especímenes.

**Tabla 2. Mortalidad (%) 21 días después del tratamiento y Tiempo Medio de Supervivencia (TMS, días después del tratamiento), para diferentes combinaciones de tratamientos a parejas de *R. ferrugineus* tratadas o no en condiciones de laboratorio. Se utilizó el método de análisis de supervivencia Kaplan-Meier para calcular los TMS. Cada valor es la media de 4 repeticiones de 10 parejas cada una.**

siendo la pulverización más efectiva que la pintura.

Por lo tanto nuestros resultados demuestran que la cepa de *B. bassiana* puede infectar todos los estados vivos de *R. ferrugineus* siendo los adultos el único estado que se puede encontrar en el exterior de la palmera. Así pues los adultos se deberían considerar como objetivo en cuanto a tratamientos con hongos entomopatógenos se refiere, ya que *B. bassiana* puede completar su ciclo sobre ellos, y éstos pueden transmitir el patógeno a otros individuos de la misma población, e incluso a la siguiente generación. Por lo tanto, estrategias basadas en la atracción e infección de adultos podrían resultar las más adecuadas para el control de este fitófago mediante hongos entomopatógenos (DEMBILIO *et al.*, 2010).

**Abstract:** The insecticidal potential of a strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) obtained from a naturally infected pupa of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) has been evaluated. Under laboratory conditions, this strain was highly pathogenic against all stages of *R. ferrugineus*. Its virulence, measured as LC<sub>50</sub>, followed this trend: fourth instar larvae, eggs, laboratory-reared adults and field-collected adults. Adults exposed to conidia satisfactorily transmitted the disease to the opposite sex and females showed reduced fecundity and egg hatching. Under semi-field conditions with *Phoenix canariensis*, high efficacies were obtained using two different formulations of this fungus (paint and spray). Our results confirm the potential of this strain against *R. ferrugineus*.

## BIBLIOGRAFÍA

- DEMBILIO, Ó., LLÁCER, E., MARTÍNEZ DE ALTUBE, M. M. Y JACAS, J. A. (2010) Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis. Pest Management Science, 66, 365-370.
- DEMBILIO, Ó., QUESADA-MORAGA, E., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Y JACAS, J. A. (2010) Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Invertebrate Pathology, 104, 214-221.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2010). EPPO Reporting Service.
- GINDIN, G., LEVSKI, S., SOROKER, V. (2006) Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. Phytoparasitica 34, 370-379.
- LLÁCER, E., MARTÍNEZ, J., JACAS, J. A. (2009) Evaluation of the efficacy of *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Phoenix canariensis. BioControl, 54, 559-565.
- QUESADA-MORAGA, E., LANDA, B. B., MUÑOZ-LEDESMA, F. J., JIMENEZ-DÍAZ, R. M. Y SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. (2006) Endophytic colonization of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia 161:323-329