

EL ENTOMOPATOGENO *Beauveria bassiana* COMO POTENCIAL AGENTE BIOCONTROLADOR DEL COLEOPTERO *Xanthogaleruca luteola* (Müller)

*The entomopathogenous Beauveria bassiana as a potential biocontrol agent of
Coleoptera Xanthogaleruca luteola (Müller)*

Aracelli L. Vasicek¹, G.M. dal Bello², N.A. Battaglini¹.

¹Laboratorio de Zoología Agrícola,

²Laboratorio de Fitopatología.

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata
Universidad Nacional de La Plata 60 y 119, La Plata (1900)
Buenos Aires - Argentina

Palabras Clave: *Beauveria bassiana*; *Xanthogaleruca luteola*; control biológico.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Xanthogaleruca luteola*; biological control.

RESUMEN

Se aisló al entomopatógeno *Beauveria bassiana*, desde poblaciones de *Xanthogaleruca luteola*, recolectadas en olmos de la provincia de Buenos Aires. In vitro se evaluaron 2 métodos de inoculación sobre desoves y larvas: mediante espolvoreo e inmersión en suspensión acuosa de los conidios del hongo. Ambos resultaron efectivos (principalmente el primero), para el biocontrol de la vaquita del olmo.

SUMMARY

From adults of *Xanthogaleruca luteola* collected in elm trees of the Buenos Aires province (Argentina) the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, was isolated. Two inoculation methods in spawns and larvae were evaluated in vitro: through powdering and submersion in aqueous suspension of the conidia. Both methods were effective (specially the former) for the biocontrol of "elm leaf beetle".

INTRODUCCION

El género *Ulmus* se encuentra difundido principalmente en Europa, Estados Unidos y América del Sur, siendo introducido en Argentina a fines del siglo pasado. No obstante la relativa calidad de la madera de sus ejemplares, por su gran aporte y volumen foliar, éstos se emplean mayoritariamente con fines ornamentales, de protección y sombra. Debido a ello y a su gran adaptabilidad al medio, los olmos fueron progresivamente utilizados en el arbolado urbano y rural de casi todas las regiones del país.

En Argentina se citaron ocho especies, que en la actualidad se le han agregado numerosos híbridos no identificados (1). Las de distribución más frecuente son: *U. americana* L. (Olmo Americano), *U. procera* Salisb. (Olmo Europeo) y *U. pumila* L. (Olmo del Turquestán). Desde 1966, en estos árboles comenzó a observarse el ataque gradual y

continuado de las larvas y adultos de *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (*Coleoptera, Chrysomelidae*), los cuales se alimentan del parénquima foliáceo y causan un nivel de defoliación próximo al 90% (2). La reiteración de los daños ocasionados por esta plaga endémica, provoca la pérdida de antiguas plantas de gran valor para los espacios verdes.

La bioecología y el control químico del insecto fueron ampliamente estudiados (3,4,5,6,7,8). No obstante haberse logrado en nuestro país buenos resultados mediante la aplicación de insecticidas clorados y fosforados, debido a restricciones en el uso de los mismos por sus efectos contaminantes y a las dificultades operativas propias de la voluminosa masa vegetal tratada y los altos costos que ello implica, comenzaron a investigarse las posibilidades de algunos enemigos naturales de *X. luteola* como agentes de biocontrol. En ese sentido pueden mencionarse a *Tetrastichus gallerucae* (9), *Erynnia nitida*, *Lebia* spp. (5) y a *Stiretrus decastigma*, *Oplomus cruentus*, *Podisus nigrolimbatus*,

P. nigrispinus (10) y al hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, en Italia (11) y en Argentina (12). Este último ha sido utilizado experimentalmente y en gran escala, con o sin el agregado de insecticidas, sobre un amplio rango de insectos plaga, de una gran variedad de especies vegetales cultivadas (13). La penetración de las hifas infectivas, se produce principalmente por los espacios intersegmentales (14, 15) donde actúan enzimas proteolíticas, lipolíticas, amilasas y quitinasas de origen fúngico, capaces de hidrolizar el complejo proteína-quitina de los tegumentos (16).

En este trabajo se aisló a *B. bassiana* desde muestras de poblaciones invernantes de *X. luteola*, parasitadas y provenientes de olmos de la Provincia de Buenos Aires. Posteriormente se evaluó mediante dos métodos de inoculación, el potencial del endomopatógeno para el control biológico de *X. luteola*.

MATERIALES Y METODOS

1.- Aislamiento del entomopatógeno

Los insectos se recolectaron entre principios de junio y fines de septiembre de 1993, desde las cortezas de 30 olmos elegidos al azar en las siguientes localidades bonaerenses: Berazategui, Parque Pereyra Iraola, Lavallol, La Plata, Bahía Blanca y Punta Alta. Considerando que la plaga también puede invernar en otros árboles forestales, en la búsqueda, se incluyeron ejemplares de *Eucalyptus spp.*, *Acer spp.*, *Fraxinus spp.* y *Tilia spp.*, que se encontraban próximos a los olmos examinados. Las muestras consistieron en todos aquellos adultos muertos con o sin síntomas del patógeno. En el laboratorio el material fue procesado para determinar el número de individuos parasitados en forma natural por *B. bassiana*.

El hongo se obtuvo mediante aislamiento directo, a partir del micelio desarrollado sobre los cadáveres previamente colocados en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 72 horas.

El cultivo de *B. bassiana* se realizó en el medio Agar Papa Glucosado (APG) al 2%, acidificado con 0,1% de ácido láctico, para impedir el desarrollo de bacterias. La incubación del microorganismo se realizó en estufa a 25°C durante 15 días. Para la identificación se recurrió a observaciones macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras fúngicas, además de mediciones micrométricas de 100 conidios y al empleo de claves micológicas (13, 16).

2.- Prueba de patogenicidad

Transcurrido el período de incubación, donde el hongo esporuló abundantemente, se extrajeron las masas conidiales para luego inocularlas sobre huevos y larvas, según dos metodologías de aplicación: a) depósito de conidios con pincel, b) inmersión en suspensión acuosa de conidios.

En ambos casos se emplearon 5 repeticiones y 3

testigos. Cada uno de ellos constaba de 5 larvas del último estadio y un desove (25-30) de 3 días, dispuestas individualmente en 6 hojas frescas de *U. procera* sobre papel filtro y un trozo de algodón húmedo, contenidas en sus respectivas cajas de Petri.

La incubación se realizó a temperatura ambiente (22-26° C) durante una semana, efectuándose las observaciones a las 24 horas, 3, 5 y 7 días. El material que se inoculó fue incubado en cámara climatizada a 25° C +/- 1°C; 70-80% HR y 16 horas de fotoperíodo. Las larvas se alimentaron con brotes de olmo.

En el primer método de aplicación, la transferencia de los propágulos fúngicos, se efectuó mediante 2 pasajes del pincel, cargado con una cantidad más o menos uniforme de conidios, sobre los desoves y larvas.

Para la inmersión se empleó una suspensión de conidios en agua destilada estéril, ajustada a $2,3 \times 10^6$ esporas/ml, con el agregado de 0.1% de carboximetilcelulosa como adhesivo. Las hojas fueron sumergidas durante 5 segundos en el medio líquido.

Los testigos del primer método de inoculación, no recibieron tratamiento alguno, mientras que los de los del segundo se sumergieron por el mismo lapso en una solución solo del adhesivo en agua destilada estéril.

RESULTADOS Y DISCUSION

Únicamente sobre los troncos de *Ulmus spp.* se encontraron adultos invernantes muertos de *X. luteola* distribuidos entre junio y agosto. Del total de insectos, 114 estaban efectivamente parasitados por *B. bassiana*.

Luego de 72 horas de cámara húmeda, la gran mayoría de los insectos recolectados presentaban signos de infección fúngica, o sea un micelio blanco-algodonoso emergiendo a través de las membranas intersegmentales y de los élitros. Transcurridos 6-7 días se observó una masa compacta de hifas cubriendo totalmente la superficie corporal de cada insecto parasitado (Figura 1)

En las pruebas de patogenicidad se observó que de algunos desoves no nacieron larvas. En los testigos los huevos fueron deshidratándose paulatinamente tomando color castaño claro, a diferencia de los colonizados por *B. bassiana* que presentaban consistencia blanda, coloración castaño oscuro y una cubierta de micelio blanco-algodonoso, luego de 72 horas (Figura 2).

Del resto de los desoves nacieron larvas que cuando provenían del material inoculado murieron luego de pocas horas o bien a los 2-3 días, por los métodos de pincelado e inmersión respectivamente.

Con respecto a las larvas inoculadas por depósito directo del hongo, el 100% de ellas murieron a los 3 días del tratamiento y por inmersión se produjo en el mismo plazo el deceso del 92% (Cuadro 1). A partir de las 72 horas *post-mortem* de las larvas, se observó la emergencia de micelio desde la superficie del cuerpo, hasta recubrirlo totalmente

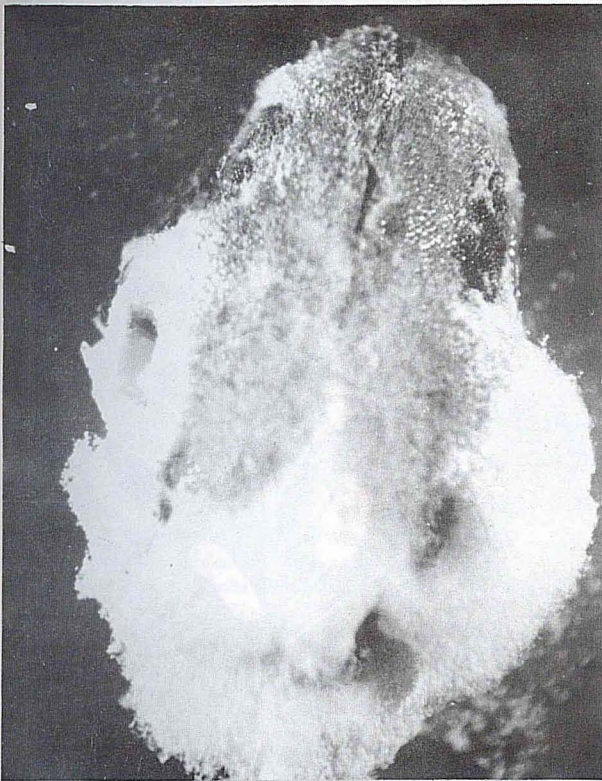


Figura 1. Adulto de *X. luteola* recolectado a campo y colonizado por *B. Bassiana* luego del período de cámara húmeda.

(Figuras 3 y 4). Los testigos evolucionaron normalmente.

La búsqueda de adultos de *X.luteola*, realizada sobre especies diferentes a las de *Ulmus*, resultó infructuosa; mientras que se observó gran cantidad de infectados por *B. bassiana* en cortezas de *Eucaliptus spp.* y vides, próximas a los olmos (11). En ambos casos los cadáveres parasitados por el hongo correspondían a poblaciones invernantes de la plaga.

En todas las localidades de la Provincia de Buenos Aires donde se efectuó la recolección, sólo se hallaron ejemplares en junio, julio y agosto pero no en septiembre, coincidiendo con la época en que los adultos abandonan sus refugios y alcanzan el follaje tierno donde se alimentan y aparean. Es probable que en esta etapa fenológica, continúe e incluso se incremente la propagación del hongo entre los insectos debido a las condiciones estacionales de temperatura y humedad (13, 16), muy favorables para el crecimiento y esporulación del entomopatógeno. La llegada de la primavera y con ello la dispersión de las vaquitas que finalizaron su diapausa sexual, no permitirían encontrar a las que posiblemente pudieran ir muriendo con posterioridad al período otoño-invierno. La infección de las mismas pudo haber ocurrido en el mismo año o en el anterior, pues la viabilidad y virulencia de los conidios de *B.bassiana* se mantienen con algunas variaciones, entre 0-30°C y 0-98% de HR, durante más de 24 meses (17).

Con respecto a los métodos de inoculación, aunque fue más eficiente el pincelado sobre los desoves, no hubo diferencias en el control de las larvas. Maniania (18), al comparar una formulación seca de *B.bassiana* con otra acuosa, aplicadas a larvas de un lepidóptero, observó resultados similares en los índices de mortalidad.

CONCLUSIONES

Se citan por primera vez poblaciones de *X.luteola* parasitadas por el entomopatógeno *B.bassiana* en olmos de la Provincia de Buenos Aires (Argentina).

Las pruebas de patogenicidad demostraron la alta capacidad infectiva del hongo al inocularlo sobre huevos y larvas.

De los dos métodos de inoculación ensayados, ambos resultaron efectivos, aunque fue algo superior el espolvoreo porque produjo más rápidamente la colonización y muerte de los tejidos del hospedante.

Los estudios realizados, permiten considerar a *B.bassiana* como un promisorio agente biocontrolador de la vaquita del olmo.

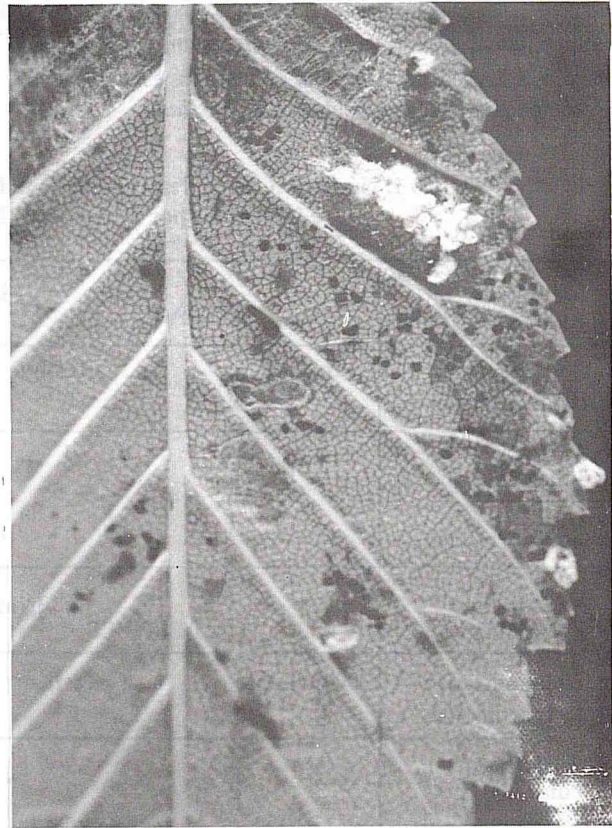


Figura 2. Huevos de *X. luteola* inoculados artificialmente y colonizados por *B. Bassiana*.

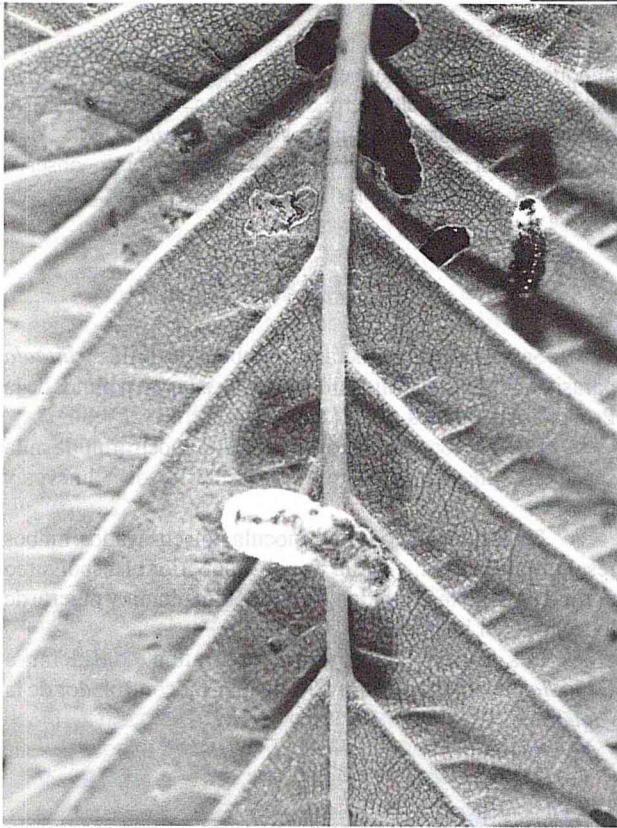


Figura 3. Larvas de *X. luteola* en distintos estadios de la infección artificial producida por *B. bassiana*.

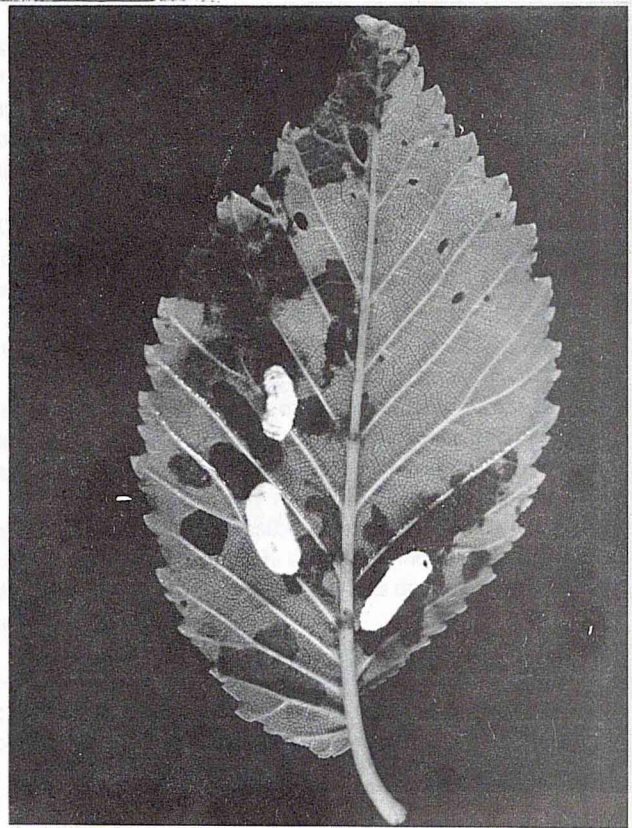


Figura 4. Larvas de *X. luteola* en distintos estadios de la infección artificial producida por *B. bassiana*.

Cuadro 1. Número total de desoves eclosionados (E) y no eclosionados (N) y de larvas vivas (V) e infectadas por *B. bassiana* (M) en el ensayo de patogenicidad.

Método de Aplicación	PINCELADO							
	DESOVES				LARVAS			
Tiempo desde la Inoculación	Inoculadas		Testigo		Inoculadas		Testigo	
	E	N	E	N	V	M	V	M
24 Horas	5	-	3	-	25	-	15	-
3 días	2	3	2	1	-	25	15	-
5 días	-	3	-	1	-	25	15	-
7 días	-	3	-	1	-	25	15	-
Método de Aplicación	INMERSION							
	DESOVES				LARVAS			
Tiempo desde la Inoculación	Inoculados		Testigo		Inoculadas		Testigo	
	E	N	E	N	V	M	V	M
24 horas	5	-	3	-	25	-	15	-
3 días	3	2	2	1	2	23	15	-
5 días	-	2	-	1	2	23	15	-
7 días	-	2	-	1	2	23	15	-

*huevo en los que se produjo la eclosión larval . c) huevos colonizados.

REFERENCIAS

- 1.-Parodi, L. (1978). Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería. Ed. Acme, T.I., pp. 321-323.
- 2.-Brugnoni, H.C. (1980). Plagas forestales. Ed. Hemisf. Sur.
- 3.-Baranao, J.J. (1973). *Galerucella luteola*, uno de los enemigos más importantes del olmo (*Ulmus* spp.) en la Argentina. Revista For. Arg. 17:37-71.
- 4.-Clair, D.J. (1987). Bionomics of the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (*Pyrrhalta luteola*), in northeastern California. Disert. Inter. Sc. Engineer. 47:27-45. Thesis, Univ. of California, Berkeley, USA.
- 5.-Ferrero, F. (1980). A redoubtable pest of the elm: the galerucine. Phytoma N 394:56.
- 6.-King, J., Price, R.G., Young, J.H., Willson, L.J., Pinkston, K.N. (1985). Influence of temperature on development and survival of the immature stages of the elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (Müller) (Coleoptera: *Chrysomelidae*). Environm. Entomolog. 14:272 -274.
- 7.-King, J.E. & Price, R.G. (1986). Effects of temperature on fecundity and adult longevity of the elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (Müller). South. Entomologist, 11:51-54.
- 8.- Wene, G.P. (1968). Biology of the elm leaf beetle in southern Arizona (*Pyrrhalta luteola*). J. Econ. Entomol. 61:1178-1180.
- 9.-Hamerski, M.R. & Hall, R.W.(1980). Laboratory rearing of *Tetrastichus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*). J. Econ.Entomol. 81:1503-1505.
- 10.- Merluzzi, E. G.(1984). Hemipteros predadores de la vaquita del olmo localizados en Castelar (Prov. de Buenos Aires). IV Congreso Forestal Argentino, Corrientes.
- 11.- Triggiani, O. (1986). Mortality caused by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in overwintering populations of *Xanthogaleruca* (= *Galerucella*) *luteola* Müll. (Coleptera: *Chrysomelidae*). Entomologica Bari 21:13-18.
- 12.-Fresa, R., Lenardon, S., Marinelli, A. (1980). El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Galerucella luteola* Müller, plaga del olmo. RIA 15:227-232.
- 13.-Brady, B.L. (1979). *Beauveria bassiana*. CMI. Descriptions of Pathogenic fungi and Bacteria N602.
- 14.-Bldochka, M.J. & Miranpuri, G.S., Khachatourians, G.G. (1993). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin toward *Lygus* bug (Hem., Miridae). J. Appl. Entomol. 115:313-317
- 15.- Lecuona, R. & Riba, G. (1991). Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos. INTA, Bol. Div. Técn. N 87.
- 16.-Alves, S.B. (1986). Control microbiano de insectos. Ed. Manole, Sao Paulo, Brasil.
- 17.-Shandu, S. S., Rajak, R.C., Agarwal, G.P. (1993). Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: Effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. Biocontrol Science and Technology 3:47-53.
- 18.- Manlania, N.K. (1993). Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for control of the stem borer *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lep., Pyralidae). J. Appl. Ent. 115: 266-272.