

## Nota Técnica

# ESTUDIOS DE LABORATORIO PARA EL CONTROL DE *Ceratitis capitata* (WIEDMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) (MOSCA DEL MEDITERRÁNEO) CON *Beauveria bassiana*<sup>1</sup>

Luis Porras<sup>2</sup>, Roberto Lecuona\*

**Palabras clave:** Control microbiano, hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana*, *Ceratitis capitata*, Dimetoato, Mercaptotión.

**Keywords:** Biological control, entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Ceratitis capitata*, Dimetoato, Mercaptotión.

Recibido: 02/04/08

Aceptado: 27/06/08

## RESUMEN

Con el objetivo de seleccionar cepas promisorias de *Beauveria bassiana* para el control de *Ceratitis capitata*, se realizó, en condiciones de laboratorio, una serie de ensayos empleando la mosca adulta como estado vulnerable al parasitismo por el hongo entomopatógeno. Para la selección se utilizó una concentración de  $5 \times 10^9$  CV.m<sup>-2</sup> del hongo. Se determinó la CL<sub>90</sub>, la sobrevivencia media (SM), la compatibilidad con insecticidas, además de ensayos de producción con el hongo. Así como la compatibilidad de los insecticidas Mercaptotión 100% CE (Lupara®) y Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona) con las cepas seleccionadas. Se cuantificó la viabilidad de los conidios en platos de Petri pos-tratamiento, a 50, 100 y 200% de la dosis comercial del insecticida. A partir de 7 cepas evaluadas (mortalidad 97-14%) fueron seleccionadas la Bb 26, la Bb 259, la Bb 132, y la Bb 238. Los valores de CL<sub>90</sub> estuvieron entre  $1 \times 10^9$  y  $3,8 \times 10^{11}$  CV.m<sup>-2</sup> (Bb 238 y Bb 26, respectivamente). La SM de las cepas varió de 7-12 días (Bb 238 y Bb 26, respectivamente). La mayor producción fue de  $7 \times 10^9$  UFC.mg<sup>-1</sup> y 20,7 g.conidios.kg<sup>-1</sup> de arroz (Bb 26). Todas las cepas fueron compatibles con Mercaptotión y la Bb 132 presentó la mayor compatibilidad con el Dimetoato. En conclusión, los ensayos en el laboratorio permitieron seleccionar cepas de *B. bassiana* con potencial para controlar *C. capitata*.

## ABSTRACT

**Laboratory studies to control *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae) (Mediterranean fly) with *Beauveria bassiana*.** With the objective of selecting promissory isolates of *Beauveria bassiana* for the control of *Ceratitis capitata*, several bioassays were carried out, in laboratory conditions, using the adult as the vulnerable stage for the parasitic infection with the entomopathogenic fungus. For the isolate screening, a concentration of  $5 \times 10^9$  VC.m<sup>-2</sup> of the fungus was used. The LC<sub>90</sub>, media survival rate (MS), and insecticides compatibility were evaluated; besides, fungus production assays were done. Insecticides Mercaptotión 100% CE (Lupara®), and Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona) were evaluated for compatibility with the selected isolates. This was done by quantification of the conidia's viability in Petri dishes after treatments with 50, 100 and 200% of insecticides commercial doses. From 7 isolates evaluated (mortality 97-14%), Bb 26, Bb 259, Bb 132, and Bb 238 were selected. CL<sub>90</sub> values ranged from  $1 \times 10^9$  to  $3,8 \times 10^{11}$  VC.m<sup>-2</sup> (Bb 238 and Bb 26, respectively). The MS of the isolates ranged between 7-12 days (Bb 238 y Bb 26, respectively). The highest yields in production were  $7 \times 10^9$  CFU.mg<sup>-1</sup> and 20,7 g.conidia.kg<sup>-1</sup> of rice (Bb 26). All isolates were compatible to Mercaptotión. Bb 132 was the most compatible isolate to Dimetoato. In conclusion, laboratory assays allowed the selection of potencial *B. bassiana* isolates to control *C. capitata*.

1 Practica de Graduación, Bachillerato en Biotecnología. ITCR. Cartago, Costa Rica.

2 Autor para correspondencia. Correo electrónico: zanetti17@gmail.com

\* Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. INTA-Castelar. Buenos Aires, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

La mosca *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) conocida como mosca del Mediterráneo” es originaria de la región Sub-Sahara en África y con una distribución muy amplia en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Dentro de la familia Tephritidae se ha descrito alrededor de 4.000 especies en todo el mundo (Zumbado 2006) contempladas en 500 géneros (González 2003). Sus múltiples hospederos comprenden más de 260 diferentes tipos frutas (Thomas et al. 2005), además de plantas silvestres, flores y vegetales. Algunos ejemplos son el durazno, la ciruela, la pera, la manzana, el aguacate, el mango, los cítricos, la papaya, el café, la guayaba, y el níspero, entre otros (Lanzavecchia 2004, Ekesi et al. 2005, Herrera 2005).

El daño causado por esta mosca ocurre cuando la hembra adulta, a través de su ovipositor, penetra y deposita sus huevos dentro del fruto. Las larvas excavan galerías dentro de este, con lo que el fruto queda expuesto a la penetración de hongos y bacterias que deterioran su calidad (Ekesi et al. 2003, Lanzavecchia 2004, Herrera 2005). De igual manera, puede ocasionar una maduración a destiempo del fruto, o bien, si el ataque ocurre en estadíos tempranos, los frutos no logran alcanzar un desarrollo adecuado. Además, las medidas cuarentenarias impuestas por países importadores para evitar la entrada y el establecimiento de esta mosca, incrementan las pérdidas económicas de los países productores (Ekesi et al. 2003, Quesada-Moraga et al. 2006).

En África, por ejemplo, la producción y exportación de frutas es uno de los sectores agrícolas de gran crecimiento. Mangos, cítricos, papaya, aguacates, café y manzanas son productos que se exportan a Europa y Medio Oriente. Sin embargo, evaluaciones realizadas en diferentes países africanos y algunas islas en el océano Índico, revelaron que de los 1,9 millones de toneladas de mango producidos anualmente el 40% se perdió debido a daños causados por varias especies de moscas de la fruta, entre ellas *C. capitata* (Ekesi et al. 2005). Por lo tanto, la mosca del Mediterráneo, junto con otros miembros de

la familia Tephritidae, constituyen el grupo de dípteros fitófagos con mayor impacto económico en el mundo (De La Rosa et al. 2002).

En Costa Rica se ha determinado que aquellas plantaciones que están en asocio con café, principal hospedero de *C. capitata* en el país, serían las más vulnerables ante un ataque de este insecto, el cual eventualmente se puede encontrar atacando cultivos como la guayaba, el jocote y el mango (Herrera 2005).

Los hongos entomopatógenos (HE) constituyen agentes promisorios para el control de la mosca del Mediterráneo. Existen más de 800 especies identificadas (Thacker 2002), dentro de las cuales *Metarhizium anisopliae* Metsch. (Sorokin) y *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin constituyen la base de la mayoría de los productos comerciales disponibles con HE (Leite et al. 2003).

La susceptibilidad de adultos y pupas de *C. capitata* a hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, en condiciones de laboratorio, ha sido reportada en algunas investigaciones. Cuando la larva de la mosca deja el fruto y cae al suelo, esta se torna vulnerable a la acción de estos microorganismos, tal como se ha observado en otros insectos (Mochi et al. 2006, Quesada-Moraga et al. 2006). Por lo tanto, el control microbiano con hongos entomopatógenos debe estar dirigido a adultos, larvas próximas a pupar o pupas en el suelo.

En Costa Rica diferentes instituciones como el CATIE, INA, UCR, DIECA, han trabajado con hongos entomopatógenos, principalmente con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. para el control de múltiples plagas. Se ha hecho evaluaciones en laboratorio con *Beauveria* sp., *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *M. flavoviridae* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra *Bemisia tabaci* (Herrera et al. 1999), con *B. bassiana* sobre *Ecdytoplopha torticornis* (González et al. 1996), *Plutella xylostella* (Fuentes et al. 1995) y *Cosmopolites sordidus* (Brenes et al. 1994). DIECA cuenta con 2 micoinsecticidas a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control de insectos del orden Coleoptera (Curculionidae) y Hemiptera (Cercopidae), respectivamente (Faria et al. 2007). Para el caso de

*C. capitata*, se encontró solamente un trabajo, en donde se ha empleado los hongos entomopatógenos bajo condiciones de laboratorio para su control (Herrera 2005).

Aún cuando existen otras formas de control para la mosca del Mediterráneo, se hace necesario buscar nuevas alternativas, que se puedan utilizar en conjunto con las existentes, dentro de un marco de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El uso de los hongos entomopatógenos para combatir *C. capitata*, en el caso de que se convierta en plaga, traería como ventajas al país, su bajo impacto a la salud humana, accesibilidad al productor y disminución en el consumo de agroquímicos. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas promisorias de *B. bassiana* para el control de *C. capitata* en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de hongos entomopatógenos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), del INTA-Castelar, Buenos Aires, Argentina.

### Insectos

Los insectos utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Mosca de la Fruta del Instituto de Genética "Ewald Alfredo Favret", perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar, Buenos Aires, Argentina). Las larvas fueron mantenidas a 25°C, 80% de humedad relativa (HR) con una dieta a base de zanahoria (cocida y cruda), harina de maíz, azúcar y levadura en polvo. Los adultos se mantuvieron con una dieta a base de levadura hidrolizada y azúcar (3:1).

### Cepas

Las cepas de *Beauveria bassiana* fueron obtenidas tras 22 días de cultivo en condiciones controladas de 26±2°C y en oscuridad. El medio de cultivo empleado fue un medio completo, con fosfato monopotásico 0,4 g.l<sup>-1</sup>, fosfato disódico

2,1 g.l<sup>-1</sup>, sulfato de magnesio 0,6 g.l<sup>-1</sup>, cloruro de potasio 1 g.l<sup>-1</sup>, nitrato de amonio 0,7 g.l<sup>-1</sup>, glucosa 10 g.l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g.l<sup>-1</sup>, agar 15 g.l<sup>-1</sup>, cloranfenicol 0,5 g.l<sup>-1</sup> y agua destilada.

### Selección de las cepas

Para extraer los conidios se colectó el hongo deslizando una espátula sobre el medio a partir de los cultivos en las cajas de Petri y se colocó en un tamizador, el cual se agitó por 5 min para obtener el inóculo. La concentración de conidios que se estableció para los ensayos fue de 5x10<sup>9</sup> conidios viables.m<sup>-2</sup>, aplicados como una dosis de inóculo (mg) y no como una suspensión.

Con la cámara de Neubauer fue posible cuantificar la concentración de conidios en el inóculo. Para esto se pesó 1 mg de inóculo y se mezcló en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,05%. Después, se determinó la viabilidad de las cepas, mediante diluciones seriadas decimales, en tubos de ensayo con 9 ml de Tween 80 al 0,05% y agua destilada, hasta llegar al tubo con el orden de 10<sup>2</sup>. Las diluciones seleccionadas fueron cultivadas por duplicado adicionando 0,1 ml en platos de Petri con el medio completo + cloranfenicol 0,5 g.l<sup>-1</sup>. Los platos de Petri fueron incubados a 26°C en oscuridad. A los 3 días poscultivo se verificó el conteo de conidios germinados y el dato se expresó en unidades formadoras de colonias (UFC.mg<sup>-1</sup>).

El resto de inóculo fue almacenado en refrigeración, hasta el conteo de los conidios germinados.

Cada cepa fue considerada un tratamiento y constó de 4 repeticiones y 1 testigo. El testigo consistió de 30 pupas, cuya alimentación incluía agua y una dieta sin inóculo. Cada repetición constó de 30 pupas próximas a emerger, las cuales fueron mantenidas en un recipiente plástico cilíndrico de 2 cm (d) x 0,5 cm (a). La dieta se puso dentro de un plato Petri (63,3 cm<sup>2</sup>) y la cantidad de inóculo suministrada fue de 5x10<sup>9</sup> conidios viables.m<sup>-2</sup>, que se colocó uniformemente sobre la dieta de cada repetición. Cada plato Petri fue introducido dentro de jaulas cilíndricas de 13,5 cm (d) x 23 cm (a), cuya temperatura fue

de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  y la HR de 40-60%. Diariamente se suministró agua al sistema mediante un algodón humedecido. De igual forma se procedió con cada cepa que se evaluó.

A partir del momento en que emergió el primer adulto, cada 2 días y por un total de 17 días se evaluó la mortalidad de las moscas. Para confirmar la micosis en los adultos muertos, estos fueron colocados en cámaras húmedas en condiciones favorables para el crecimiento y esporulación del hongo ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  y oscuridad). En casos de duda, se tomó muestras directamente del insecto, que fueron colocadas en un portaobjetos, con 1 gota de azul de algodón en ácido láctico y 1 gota de alcohol al 70%, y se observaron con ayuda de un estereoscopio.

### **Concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) y sobrevivencia media**

Una vez que las cepas fueron seleccionadas, se repitió el procedimiento anterior, con la variante de que se trabajó con diferentes concentraciones de conidios del hongo:  $1 \times 10^{10}$ ;  $5 \times 10^9$ ;  $1 \times 10^9$ ; y  $5 \times 10^8$  conidios viables.m<sup>-2</sup>, para cada cepa seleccionada. Se empleó diferentes cantidades de inóculo.m<sup>-2</sup> según la viabilidad de los conidios obtenidos con cada cepa. Se trabajó con 3 repeticiones y 1 testigo. Al igual que en la etapa anterior, el número de pupas fue 30 y el testigo constó de dieta sin inóculo mas agua. Cada plato Petri con la dieta y el inóculo se colocó dentro de las jaulas, donde las condiciones ambientales fueron las mismas que en la etapa anterior.

La mortalidad fue cuantificada diariamente durante 17 días a partir de la emergencia del primer adulto. Es importante aclarar que las pupas venían de una cría del mismo día, por lo que sus nacimientos eran muy semejantes entre tratamientos. La micosis se confirmó de la misma manera que en la etapa anterior.

### **Ensayos de compatibilidad con insecticidas**

A las cepas seleccionadas se les realizó ensayos de compatibilidad con los insecticidas Mercaptotion 100% CE (CE=concentrado

emulsificante) (Lupara®) y Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona), ambos avalados por la Secretaria Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), ente oficial de Argentina. Las concentraciones aplicadas del insecticida fueron 50, 100 y 200% de la dosis recomendada por el fabricante.

Se preparó 8 erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de medio completo líquido + Cloranfenicol 0,5 g.l<sup>-1</sup>. Estos fueron autoclavados durante 20 min a 121°C. Los erlenmeyers fueron distribuidos de la siguiente manera: 2 erlenmeyers para la concentración de 50%, 2 para la de 100%, 2 para la de 200% y 2 como testigos, que tenían el hongo en el medio de cultivo pero sin el insecticida.

En forma paralela se preparó una suspensión de conidios con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios.ml<sup>-1</sup>, en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,05%. A partir de esta suspensión, se inoculó con 200  $\mu\text{l}$  cada uno de los 8 erlenmeyers. Además, se adicionó el insecticida según las concentraciones y la distribución anteriormente descrita. Esto se realizó en condiciones estériles.

La mezcla de *B. bassiana*-insecticida se mantuvo en un agitador a 200 rpm y 26°C, por 20 h. Terminado este tiempo, se procedió a determinar la viabilidad de los conidios en la mezcla y el testigo. Para esto se diluyó 10.000 veces a partir de la solución madre y posteriormente se inoculó y esparció 0,1 ml en platos Petri con el medio completo y cloranfenicol (0,5 g.l<sup>-1</sup>). Los platos fueron incubados a 26°C, en la oscuridad, y evaluados a los 3 días posinoculación, donde se determinó las UFC. De cada concentración de insecticida se hicieron diluciones seriadas hasta obtener  $10^4$ ,  $10^3$ , y  $10^2$ , de las que se cultivó 2 placas. Además, de la concentración original ( $10^5$ ), se cultivó otras 2 placas. Todo el trabajo se realizó por duplicado.

### **Producción de conidios de las cepas seleccionadas**

Para determinar la producción de conidios de cada una de las cepas, se uso matrices de arroz. Bajo condiciones estériles, se colectó

conidios directamente de los platos Petri, con el objetivo de preparar una suspensión con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios. $\text{ml}^{-1}$  en tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada + Tween 80 al 0,05%.

Se pesó 90 g de arroz y se colocó en bolsas plásticas estériles para autoclavar. A cada bolsa plástica se le adicionó 40 ml de agua destilada y se dejó aproximadamente 15 min, hasta que el arroz absorbió el agua. Las bolsas (3 repeticiones.cepta<sup>-1</sup>) fueron colocadas sobre una superficie plana y se esparció el arroz dentro de ellas, hasta que quedara una lámina de 1 grano de espesor. Esta se cerró con una banda elástica y se autoclavó durante 20 min a 121°C. Después, se dejó enfriar el arroz y se inoculó 1 ml de la suspensión de conidios en cada una de las bolsas. Luego, se hizo una cámara de aire en el interior de las bolsas, esta fue cerrada e incubó a 26°C en oscuridad durante 15 días. Las bolsas fueron agitadas diariamente para evitar la formación de agrupaciones con los granos de arroz.

Después de la incubación, las bolsas fueron trasladadas a la sala de secado, donde se les eliminó el plástico de uno de los costados, con el objetivo de promover el secado del arroz inoculado. El secado ocurrió a una temperatura de 18°C durante 15 días (HR  $\pm$  20%). Después del secado se procedió a tamizar por 5 min a 460 rpm. Al finalizar el tamizado, el polvo de conidios de cada repetición, fue colocado en sobres de papel aluminio pesados previamente.

A partir del polvo de conidios obtenido en cada repetición, se procedió a determinar su viabilidad. Para esto se utilizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas decimales, empleada en etapas anteriores, donde se introduce 10 mg de polvo en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada + Tween 80 al 0,05%. Las diluciones seleccionadas fueron cultivadas por duplicado, adicionando 0,1 ml en platos Petri con el medio completo + cloranfenicol 0,5 g.l<sup>-1</sup>. Los resultados fueron evaluados a los 3 días de incubación. Se determinó las UFC.g<sup>-1</sup> de polvo y los g.conidios.kg<sup>-1</sup> de arroz.

### Análisis estadístico

Para corregir el porcentaje de mortalidad en la selección de cepas, se utilizó la fórmula de Abbott. La CL<sub>90</sub> se calculó por medio del análisis estadístico de Probit (G.A. Milliken, Universidad del Estado de Kansas). Para determinar la sobrevivencia media se empleó el programa Statistica (1999, Kernel release 5.5).

El análisis de varianza, en la etapa de compatibilidad con insecticidas, se realizó con el programa Infostat (2001) Versión 1.0. La comparación entre las medias se hizo por medio del método Di Rienzo-Guzmán-Casanoves (DGC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de las cepas

Para la selección de cepas se utilizó una concentración de  $5 \times 10^9$  conidios viables. $\text{m}^{-2}$ , tomando como base la concentración aplicada en campo de  $5 \times 10^8$  conidios. $\text{m}^{-2}$  ( $5 \times 10^{12}$  conidios. $\text{ha}^{-1}$ ), según lo recomendado por Lecuona (1996) y Jenkins et al. (1998). Esto permitió seleccionar 6 cepas cuyo efecto en la mortalidad de adultos de *C.capitata* fue superior al 75% (Cuadro 1). De las cepas seleccionadas, se escogió, en orden decreciente de porcentaje de mortalidad, las cepas Bb 26, Bb 259, Bb 132 y Bb 238 para determinarles otros parámetros en el laboratorio. Evidentemente, si en condiciones de laboratorio una cepa, en concentraciones elevadas de inóculo, no causa una mortalidad alta de adultos de *C. capitata*, esta no será considerada en pruebas posteriores.

### Concentración letal CL<sub>90</sub>, sobrevivencia media y producción de conidios

La cepa Bb 238 presentó la CL<sub>90</sub> más baja y la sobrevivencia media menor, lo cual la hace la cepa más virulenta y que requiere de menos cantidad de conidios viables. $\text{m}^{-2}$  para eliminar el 90% de las moscas (Cuadro 2). Si bien no es la cepa que presenta la mejor producción de polvo, en términos de conidios viables.g<sup>-1</sup> es buena, al igual que su alta producción de g.conidios.kg<sup>-1</sup> de arroz (Cuadro 3). En términos de CL<sub>90</sub>, la Bb

Cuadro 1. Efecto de las cepas de *B. bassiana* en la mortalidad de adultos de *C. capitata*.

Cepa	Origen de la cepa	Mortalidad <sup>a</sup> (%)
Bb 26	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	97,3
Bb 259	Suelo	92,9
Bb 132	<i>DeuteroCampta quadrijuga</i> (Col: Crisomelidae)	86,3
Bb 238	Suelo	82,7
Bb 2	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	80,3
Bb 61	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	78,1
Bb 65	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	14,0

<sup>a</sup> Corregido con la fórmula de Abbott.

Cuadro 2. Concentración letal 90 (CL<sub>90</sub>) y sobrevivencia media (SM) de las cepas de *B. bassiana* en adultos de *C. capitata*.

Cepa	CL <sub>90</sub> <sup>a</sup> 10 <sup>11</sup> CV <sup>b</sup> .m <sup>-2</sup>	Chi cuadrado <sup>c</sup>	SM (días)
Bb 26	3,8 [9,2-1,2]	2,87	12
Bb 259	0,032 [0,02-0,07]	0,46	9
Bb 132	0,12 [0,073-0,24]	2,17	10
Bb 238	0,011 [0,0066-0,019]	3,16	7

<sup>a</sup> Límites de confianza del 95%. <sup>b</sup> Conidios viables. <sup>c</sup> 2 grados de libertad.

259 presenta un comportamiento similar a la cepa Bb 238, ya que las cantidades de conidios viables para causar la mortalidad del 90% de insectos, se encuentran dentro del mismo orden, no obstante, se requiere de 2 días más para eliminar el 50% de las moscas. La producción de Bb 259 no pudo llevarse a cabo, debido a la alta humedad que afectó el desarrollo de esta cepa durante su incubación.

La cepa Bb 132 se puede considerar como intermedia, debido a que presenta una sobrevivencia media muy cercana a la de Bb 238, pero con una CL<sub>90</sub> en el orden de 10<sup>10</sup>, lo que la hace la segunda cepa menos efectiva en este rubro. Aún cuando esta cepa presenta muy baja producción de conidios (g.conidios.kg<sup>-1</sup> de arroz), la cantidad de conidios viables que produce, la ubican como la segunda mejor cepa en ese aspecto. Es importante aclarar, que para corroborar la calidad de

esta cepa, habría que observar su comportamiento, tras varios ciclos de producción, tanto en el laboratorio como a gran escala.

La cepa Bb 26 posee la CL<sub>90</sub> y la sobrevivencia media más altas, así como los valores más altos en los 2 parámetros de producción. Esta situación coloca a esta cepa como la última opción de elección, ya que aún cuando da buenos resultados en producción, es la cepa que eventualmente necesitaría más conidios viables.m<sup>-2</sup> para eliminar el 90% de las moscas; además, requiere 12 días para eliminar el 50% de las moscas. En términos prácticos, es más fácil trabajar en la optimización de la producción de conidios viables, que trabajar en la mejora de las variables CL<sub>90</sub> o sobrevivencia media. Esto justifica la categorización de las 4 cepas seleccionadas, según sus resultados en estos 3 aspectos.

Cuadro 3. Producción de g.conidios.kg<sup>-1</sup> arroz y UFC.g<sup>-1</sup> de polvo de las cepas seleccionadas.

Cepa <sup>a</sup>	Producción de conidios	
	Viabilidad UFC.g <sup>-1</sup> de polvo	Cantidad g.conidios.kg <sup>-1</sup> arroz
Bb 26	6,97x10 <sup>9</sup>	20,67
Bb 132	3,99x10 <sup>9</sup>	6,20
Bb 238	9,37x10 <sup>8</sup>	19,78

<sup>a</sup> Recordar que la producción de la Bb 259 no pudo llevarse a cabo, debido a la alta humedad que afectó el desarrollo de esta cepa durante su incubación.

Si bien no hay un valor definido de producción, existen valores reportados que pueden ser útiles. Esto ocurre debido a que cada sistema de producción puede presentar diferentes condiciones (temperatura, humedad, infraestructura, y técnicas, entre otras) que pueden hacer variar los rendimientos. Las cepas seleccionadas están próximas al valor de 4-5x10<sup>10</sup> conidios.g<sup>-1</sup> de polvo (Jenkins et al. 1998), que resulta positivo en términos generales. Sin embargo, los rendimientos en la producción no son constantes e inclusive han sido reportadas variaciones dentro de sistemas de producción que presentan controles estrictos sobre variables como temperatura, humedad y aireación (Jenkins et al. 1998).

**Ensayos de compatibilidad con insecticidas**

Como parte del desarrollo efectivo de un MIP, donde se use los hongos entomopatógenos como una estrategia dentro del control biológico, se debe tener claro el efecto de los insecticidas sobre los hongos que se vaya a utilizar, de manera que exista la posibilidad de aplicarlos en conjunto dentro del sistema (Cuthbertson et al. 2005).

Las cepas Bb 26, Bb 259 y Bb 132 no muestran diferencias significativas (p<0,01) en ninguna de las 3 concentraciones de Mercaptotion utilizadas, con respecto al testigo. En el caso de la cepa Bb 238, las concentraciones de Mercaptotion al 50 y 100% generaron diferencias significativas con respecto al testigo, no así la de 200% (Cuadro 4).

Probablemente, el comportamiento antes mencionado es producido por algún componente tensoactivo, presente en la formulación del insecticida, causante de un mayor desprendimiento de conidios. Esto resulta en un aumento en el número de UFC.ml<sup>-1</sup>, sin que la molécula activa del insecticida, ni componentes del formulado ocasionaran algún efecto negativo sobre esta cepa.

En el caso de la concentración al 200%, la disminución en el número de UFC.ml<sup>-1</sup>, con respecto al 50 y 100%, pero no con el testigo, pudo deberse a que a pesar de una mayor cantidad de agente tensoactivo, también el aumento de principio activo y otros compuestos del formulado causaron un efecto negativo sobre la viabilidad de los conidios. Aun así y de manera general, todas las cepas evaluadas son compatibles con el insecticida Mercaptotion 100% CE (Lupara®).

Con respecto al insecticida Dimetoato, las cepas Bb 26, Bb 259 y Bb 238 presentan diferencias significativas (p<0,01) entre la concentración al 50% y el testigo. Los valores de UFC.ml<sup>-1</sup> obtenidos por estas 3 cepas, en presencia de Dimetoato al 50%, permitió ordenarlas según su tolerancia o compatibilidad al insecticida en: Bb 238>Bb 26> Bb 259 (Cuadro 4). Además, con las concentraciones de 100 y 200% no hubo crecimiento de conidios. Esto supone una baja compatibilidad de estas cepas con la concentración recomendada por el fabricante (100%) y el doble de esta (200%). Con 50% no es recomendable emplear ninguna de estas cepas, debido a

Cuadro 4. Cantidad de UFC.ml<sup>-1</sup> de 4 cepas de *B. bassiana* a diferentes concentraciones de insecticida.

Cepa	Mercaptotion		Dimetoato
	Concentración <sup>1</sup>	Viabilidad UFC.ml <sup>-1</sup>	Viabilidad UFC.ml <sup>-1</sup>
Bb 26	T	6,54 x 10 <sup>4</sup> a	1,28 x 10 <sup>5</sup> a
	50	8,65 x 10 <sup>4</sup> a	3,63 x 10 <sup>4</sup> b
	100	6,94 x 10 <sup>4</sup> a	0
	200	8,34 x 10 <sup>4</sup> a	0
Bb 259	T	2,55 x 10 <sup>5</sup> a	1,15 x 10 <sup>5</sup> a
	50	2,28 x 10 <sup>5</sup> a	2,78 x 10 <sup>2</sup> b
	100	2,20 x 10 <sup>5</sup> a	0
	200	2,15 x 10 <sup>5</sup> a	0
Bb132	T	2,01 x 10 <sup>5</sup> a	1,52 x 10 <sup>5</sup> a
	50	2,13 x 10 <sup>5</sup> a	1,69 x 10 <sup>5</sup> a
	100	2,07 x 10 <sup>5</sup> a	6,08 x 10 <sup>2</sup> b
	200	2,04 x 10 <sup>5</sup> a	0
Bb 238	T	1,17 x 10 <sup>5</sup> a	1,46 x 10 <sup>5</sup> a
	50	1,84 x 10 <sup>5</sup> b	7,23 x 10 <sup>4</sup> b
	100	1,80 x 10 <sup>5</sup> b	0
	200	1,37 x 10 <sup>5</sup> a	0

Letras distintas por columna indican diferencias significativas por Di Rienzo-Guzmán-Casanoves (DGC) ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup> Dosis recomendada por el fabricante para la aplicación en campo = 4 ml.l<sup>-1</sup> (Mercaptotion) y 110 ml.hl<sup>-1</sup> (Dimetoato).

que dicha concentración mostró un efecto nocivo sobre su viabilidad.

La cepa Bb 132, es la más tolerante al Dimetoato, y no presenta diferencias significativas entre el 50% y el testigo, pero si con el 100%. Esta cepa, a pesar de presentar conidios viables al 100%, no se considera compatible en esta condición debido a su baja viabilidad, pero podría ser utilizada en ensayos posteriores, donde se emplee concentraciones al 50% de Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona).

Mochi et al. (2006), establecieron que los plaguicidas pueden inhibir el crecimiento vegetativo, conidiogénesis, esporulación, causar mutaciones genéticas y afectar el desarrollo de

los hongos entomopatógenos, resultando en una baja viabilidad de los conidios, entre otras cosas. Sin embargo, estas consecuencias pueden variar según la naturaleza y concentración del producto químico, de la especie del hongo y su genética.

Si bien existen varios fabricantes de un mismo producto químico, con igual principio activo, cada uno puede presentar diferente comportamiento en su compatibilidad con un hongo entomopatógeno, principalmente por los componentes del formulado. Así, Tamai et al. (2002), evaluaron diferentes marcas comerciales de un insecticida a base de Dimetoato, en concentrado emulsificante, y encontraron que algunos eran muy tóxicos, mientras que otros eran compati-



bles con *B.bassiana*. Lo anterior sugiere que los resultados obtenidos en este trabajo con estos 2 insecticidas, podría variar al evaluar otras marcas comerciales que presenten el mismo principio activo.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la  $CL_{90}$ , sobrevivencia media, la producción de conidios, y la compatibilidad con insecticidas, las cepas Bb 238, Bb 259 y Bb 132 resultan promisorias para el desarrollo de micoinsecticidas, por lo que podrían ser utilizadas en una primera etapa de ensayos de campo. Aún cuando la cepa Bb 259 presentó dificultades en la producción de conidios, el rendimiento de la producción masiva puede ser mejorado con un control mejor de las condiciones o requerimientos de esta cepa. En general, el desempeño de las cepas podría aumentar durante el proceso de producción industrial.

El uso conjunto de las cepas seleccionadas con los insecticidas Mercaptotion 100% CE (Lupara®) y Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona), en los ensayos *in vitro*, indicó que el Mercaptotion puede ser empleado en forma conjunta con las cepas seleccionadas, sin que exista riesgo de incompatibilidad con el entomopatógeno. Mientras que con el Dimetoato, solo se puede emplear la cepa Bb 132, con el 50% de la dosis recomendada por el fabricante. Las restantes cepas no son compatibles con este insecticida.

En un mundo donde cada vez se hace más conciencia para reducir el uso y la dependencia de agroquímicos; y las biotecnologías de bajo impacto a la salud humana y al ambiente tienen mayor aceptación, el uso de hongos entomopatógenos para el control de la mosca del Mediterráneo es otra herramienta, además de las actualmente utilizadas, accesible al productor y que le permitiría combatir a *C. capitata* cuando se encuentre en condición de plaga. Todo con el objetivo final de declarar zonas libres de la misma y finalmente, eliminar las medidas cuarentenarias que restringen el mercado internacional de algunos productos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Comisión de Incentivos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y a la Vicerrectoría de Vida Estudiantil y Servicios Académicos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIESA-TEC) por su ayuda financiera para realizar la presente investigación. Al instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) perteneciente al INTA-Castelar. Buenos Aires, Argentina, donde se realizó el trabajo.

## LITERATURA CITADA

- BRENES S., CARBALLO M. 1994. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) para el control biológico del picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar). Manejo Integrado de Plagas 31:17-21.
- CUTHBERTSON A., WALTERS K., DEPPE C. 2005. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. Mycopathologia 160:35-41.
- DE LA ROSA W., LÓPEZ F.L., LIEDO P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. Journal of Economic Entomology 95(1):36-43.
- EKESI S., MANIANIA N.K., LUX S.A. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. Journal of Invertebrate Pathology 83: 157-167.
- EKESI S., MANIANIA N. K., MOHAMED S., LUX S.A. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. Biological Control 35:83-91.
- FARIA M., WRAIGHT S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43:237-256.
- FUENTES G., CARBALLO M. 1995. Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, para el control de *Plutella xylostella* (L.) Lepidoptera: Iponomeutidae). Manejo Integrado de Plagas 35: 14-18.

- GONZÁLEZ E. 2003. Efecto de la temperatura, humedad relativa y humedad del suelo sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) en larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Tecomán Colima, México. 149 p.
- GONZALEZ H., CARBALLO, M., BLANCO, H. 1996. Efecto de cepas de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad de *ecdytolopha torticornis* en macadamia. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Turrialba, CR. 40:17-23.
- HERRERA J.R. 2005. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de dos especies de mosca de la fruta (*Ceratitidis capitata* y *Anastrepha obliqua*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis Bachillerato. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 90 p.
- HERRERA F., CARBALLO M., SHANNON P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Turrialba, CR. 54: 37-43.
- JENKINS N.E., HEVIEFO G. LANGEWALD J., CHERRY A.J., LOMER C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information 19(1):21-31.
- LANZAVECCHIA S. 2004. *Ceratitidis capitata*: Pest typification in Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 127 p.
- LECUONA R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Roberto E. Lecuona (ed). Buenos Aires, Argentina. 338 p.
- LEITE L., BATISTA A., ALMEIDA J.E., ALVES S. 2003. Produção de fungos entomopatogênicos. Editorial Alexandre de Sene Pinto, 2003. Ribeirão Preto, Brasil. 92 p.
- MOCHI D.A., MONTEIRO A.C., DE BORTOLI S.A., DÓRIA H., BARBOSA J.C. 2006. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with different pesticides. Neotropical Entomology 35(3):382-389.
- QUESADA-MORAGA E., RUIZ-GARCÍA A., SANTIAGO-ÁLVAREZ C. 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology 99(6):1955-1966.
- TAMAI M.A., ALVES S.B., LOPES R.B., FAION M., PADULLA L.F.L. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. Arquivos do Instituto Biológico (Arq. Inst. Biol.) 69:89-96.
- THACKER J.R.M. 2002. An introduction to arthropod pest control.: J.R.M. Thacker (ed). Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. 343 p.
- THOMAS M.C., HEPPNER J.B., WOODDRUFF R.E., WEEMS H.V., STECK G.J., FASULO T.R. 2005. Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae). Universidad de Florida. EE.UU. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN371>. Última revisión: Marzo, 2005
- ZUMBADO A.M. 2006. Dípteros de Costa Rica y la América Tropical. Manuel A. Zumbado (ed), Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio, 2006. 272 p.