

**Exposición de dos especies de escarabajos
ambrosía (Coleoptera: Curculionidae:
Scolytinae) a tres hongos entomopatógenos**

Verónica Cristina Bojorque Fuentes

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA EN AMBIENTE Y DESARROLLO

Exposición de dos especies de escarabajos ambrosía (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) a tres hongos entomopatógenos

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Ambiente y Desarrollo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Verónica Cristina Bojorque Fuentes

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Exposición de dos especies de escarabajos ambrosía (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) a tres hongos entomopatógenos

Presentado por:

Verónica Cristina Bojorque Fuentes

Aprobado:

Ronald D. Cave, Ph.D.
Asesor Principal

Laura E. Suazo, Ph.D.
Directora
Departamento de Ambiente y
Desarrollo

Pasco B. Avery, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Oliver Komar, Ph.D.
Asesor

Exposición de dos especies de escarabajos ambrosía (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) a tres hongos entomopatógenos

Verónica Cristina Bojorque Fuentes

Resumen: Dada la importancia biológica, ecológica y económica de los escarabajos ambrosía, en los últimos 10 años se han convertido en el centro de atención de decenas de investigadores. *Xylosandrus crassiusculus* y *Xyleborus volvulus*, provenientes de Asia, han sido catalogadas como plagas devastadoras que atacan árboles de laurel rojo (*Persea borbonia* (L.) Spreng.) y aguacate (*Persea americana* Miller) en los Estados Unidos de Norte América. Estos escarabajos ambrosía mantienen una relación simbiótica con un hongo patógeno llamado *Raffaelea lauricola*, el cual causa una enfermedad denominada “la marchitez del laurel”. En este estudio se evaluó el potencial de tres hongos entomopatógenos (*Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*) comercialmente disponibles como potenciales agentes controladores biológicos sobre *X. crassiusculus* y *X. volvulus*. El mejor método para inocular los insectos en laboratorio es alimentarlos con papel filtro contaminado con la solución fúngica en vez de sumergirlos en dicha solución. Para *X. crassiusculus* expuestos al hongo *B. bassiana*, su tiempo letal (TL₅₀) cuando fueron sumergidos fue 144 horas, mientras cuando fueron alimentados con papel contaminado, fue solo 106 horas, una reducción de 26%. Con *M. brunneum*, la reducción fue 37% y con *I. fumosorosea*, fue 72%. El TL₅₀ de *X. volvulus* con *B. bassiana* fue 132 horas, con *M. brunneum* fue 141 horas y con *I. fumosorosea* fue 190 horas. Las dos especies de escarabajos expuestas a los diferentes hongos presentaron TL₅₀ significativamente menores al control, con excepción de *X. crassiusculus* expuesto a *I. fumosorosea*.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, control biológico, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium brunneum*, *Xyleborus volvulus*, *Xylosandrus crassiusculus*.

Abstract: Ambrosia beetles have symbiotic relationships with fungi; these associations with fungi contribute to their ecological, biological, and economic importance. *Xylosandrus crassiusculus* and *Xyleborus volvulus* have a symbiotic relationship with a fungal pathogen called *Raffaelea lauricola*, which causes a disease called "laurel wilt". Entomopathogenic fungi have shown potential to regulate other pests as natural enemies of insects, and they could also play relevant roles in the management of ambrosia beetles. In the laboratory, the best method to inoculate entomopathogenic fungi is to feed the insect with filter paper contaminated with fungal solution instead of immersing them in this solution. LT₅₀ for *X. crassiusculus* deeped in *B. bassiana* was 144 hours, whereas when beetle was feeding with filter paper the LT₅₀ was only 106 hours, a reduction of 26%. The reduction for *M. brunneum* was 37% and for *I. fumosorosea* was 72%. The LT₅₀ of *X. volvulus* was 132 hours for *B. bassiana*, 141 hours for *M. brunneum* and 190 hours for *I. fumosorosea*. Both species of beetles exposed to the three fungi showed significantly lower LT₅₀ compared with the control, except *X. crassiusculus* exposed to *I. fumosorosea*.

Keywords: *Beauveria bassiana*, biological control, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium brunneum*, *Xyleborus volvulus*, *Xylosandrus crassiusculus*.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES.....	14
5. RECOMENDACIONES.....	15
6. LITERATURA CITADA	16

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Densidad de esporas en las suspensiones de hongos entomopatógenos.....	7
2. Comparación entre tratamientos y entre métodos para determinar la adhesión de esporas en <i>X. crassiusculus</i> después de haber sido sumergidos en suspensiones de hongos.	8
3. Comparación entre tratamientos y entre métodos para determinar la adhesión de esporas en <i>X. volvulus</i> después de haber sido sumergidos en suspensiones de hongos.	9
4. LT_{50} de las dos especies de escarabajos expuestas a los diferentes hongos entomopatógenos.....	11
5. Porcentaje de micosis en escarabajos ambrosía expuestos a tres hongos entomopatógenos luego de 7 a 10 días <i>post-mortem</i>	12

Figuras	Página
1. Placa clúster con 0.5 de suspensión fúngica y un escarabajo por hoyo	4
2. Bioensayo utilizado por insecto.....	5
3. Curvas de supervivencia de <i>X. crassiusculus</i> alimentado con papel filtro contaminado con tres suspensiones de hongos entomopatógenos.	10
4. Curvas de supervivencia de <i>X. volvulus</i> sumergido en las tres suspensiones de hongos entomopatógenos.....	10
5. Curvas de supervivencia de <i>X. crassiusculus</i> sumergido en las tres suspensiones de hongos entomopatógenos.....	11
6. Fenotipo del hongo observado en <i>X. crassiusculus</i> bajo estereoscopio	13

1. INTRODUCCIÓN

La subfamilia Scolytinae está compuesta por aproximadamente 7,500 especies, de las cuales 3,700 son escarabajos de corteza, 3,400 son escarabajos ambrosía y los restantes, alrededor de 400 escarabajos, tienen otras fuentes alimenticias (Six 2012). Todos los escarabajos ambrosía y de corteza tienen una relación simbiótica con hongos, la cual contribuye a su gran importancia ecológica, biológica y económica (Rudinsky 1962).

Los escarabajos ambrosía suelen tener asociaciones con hongos patógenos como *Raffaelea lauricola* TC Harr, Fraedrich y Aghayeva, *Ambrosiozyma* sp. y *Ambrosiella xylebori* (Hulcr *et al.* 2011) que causan enfermedades en los árboles, lo cual les convierte en plagas importantes para el sector agrícola y forestal. Por ejemplo, los escarabajos ambrosía son un vector del hongo *R. lauricola* el cual causa “la marchitez del laurel”, una enfermedad que afecta a los árboles de aguacate (*Persea americana* Miller) y laurel rojo (*Persea borbonia* (L.) Spreng.) (Fraedrich *et al.* 2007). Los árboles enfermos presentan decoloración vascular, rápida marchitez, defoliación, necrosis del follaje y a veces disfunción del xilema. En muchos casos dicha enfermedad es tan devastadora que termina por matar a las especies arbóreas atacadas (Inch y Ploetz 2012).

Xylosandrus crassiusculus (Motschulsky) y *Xyleborus volvulus* (Fabricius) son escarabajos nativos de Asia y se han dispersado por todo el mundo (FAO/IUFRO 1965). Ellos habitan en la albura, corteza o ramas de árboles jóvenes (menores de 10 años) (Beaver 1989). La gran mayoría de los escarabajos ambrosía tiene un ciclo de vida en común. Las hembras excavan túneles y hacen galerías adentro de los árboles para ovipositar. Simultáneamente ellas introducen en sus mandíbulas las esporas del hongo simbiótico que posteriormente lo cultivan para alimentar a larvas y adultos que viven dentro de las galerías (Atkinson *et al.* 1988).

La habilidad de estos escarabajos de actuar como vectores de hongos causantes de enfermedades ha captado la atención de muchos investigadores y científicos para encontrar metodologías amigables con el ambiente que podrían reducir el impacto de estos insectos. El control biológico ha sido usado para controlar plagas de gran importancia económica en todo el mundo de forma exitosa. Los hongos entomopatógenos han mostrado un alto potencial para regular otras plagas como enemigos naturales de insectos por lo que también juegan un rol muy importante en el manejo del escarabajo ambrosía (Herrera *et al.* 1999).

Es por ello que este estudio se enfocó en evaluar tres formulaciones de hongos entomopatógenos comercialmente disponibles como potenciales agentes controladores de *X. crassiusculus* y *X. volvulus*. Los objetivos específicos del estudio incluyen:

- Determinar el tiempo letal (TL₅₀) de adultos de *X. crassiusculus* y *X. volvulus* después de haber sido sumergidos en cada una de tres suspensiones de cepas de hongos entomopatógenos disponibles comercialmente [*Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith, *Metarhizium brunneum* Petch o *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin].
- Determinar el TL₅₀ de adultos de *X. crassiusculus* después de haber sido alimentados con papel filtro tratado con cada una de tres suspensiones de cepas de *I. fumosorosea*, *M. brunneum* o *B. bassiana*.
- Determinar el número de esporas adheridas por insecto después de haber sido sumergido en cada una de tres suspensiones de *I. fumosorosea*, *M. brunneum* o *B. bassiana*.
- Comparar dos métodos para determinar la adhesión de esporas por insecto después de ser sumergidos en una de tres suspensiones de *I. fumosorosea*, *M. brunneum* o *B. bassiana*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de escarabajos. En un área natural del condado de Miami-Dade (Florida, USA) se cortaron y midieron árboles de aguacate infestados con escarabajos ambrosía. La madera con un diámetro mayor a 10 cm fue almacenada dentro de trampas (0.17 m³, Brute container 2643-60, Rubbermaid®, las cuales tenían un agujero a un costado donde se colocaron jarras para coleccionar los insectos que emergieran) y posteriormente fue transportada a las instalaciones de contención del Tropical Research and Education Center, Universidad de Florida, Homestead, Florida. La madera se guardó en la incubadora (14 horas luz y 10 horas de oscuridad, humedad relativa de 80% y 25°C). Cuando las hembras de los escarabajos ambrosía emergieron fueron colectadas diariamente y colocadas en platos Petri (5 cm de diámetro) con papel filtro húmedo en su interior. Luego fueron transportadas a Indian River Research and Education Center, Fort Pierce, Florida. Antes de llevar a cabo el bioensayo los insectos se guardaron en el refrigerador a 4°C. Todos los escarabajos usados no tenían más de dos días de edad (D. Carrillo, comunicación personal).

Hongos. Se probaron tres cepas de hongos entomopatógenos comercialmente disponibles: *Metarhizium brunneum* (Met52 ES), *Isaria fumosorosea* (PFR 97 20% WDG) y *Beauveria bassiana* (BotaniGard ES). La presentación disponible de los productos *M. brunneum* y *B. bassiana* es solución emulsificable (ES) y la presentación disponible para *I. fumosorosea* es gránulos disecados (WDG). Existe ya en el mercado una presentación de suspensión concentrada (EC) para *M. brunneum*, pero la presentación ES de este hongo está siendo probada antes de ser puesta a la venta. Todos los productos fueron refrigerados a 4°C antes de ser usados.

Suspensión fúngica y viabilidad de las esporas. Los conteos de conidias y blastosporas se realizaron con cámaras de Neubauer bajo un lente de 400x. Las suspensiones a utilizar fueron diluidas con agua destilada a $\sim 2.4 \times 10^6$ conidias o blastosporas/mL.

La viabilidad de las esporas se determinó usando el porcentaje de germinación. Para ello se colocaron 100 µL de cada suspensión en tres platos Petri separados que contenían una capa de agar de papa y dextrosa. Los platos fueron transferidos a la incubadora. La germinación se determinó mediante el conteo de 200 esporas/plato bajo un lente de 400x. Se consideraron esporas germinadas a las que tenían un tubo de germinación de al menos la mitad del largo de la blastospora o conidia, 18 a 24 horas después de haber sido inoculada.

Bioensayo de tiempo letal (TL₅₀). El bioensayo TL₅₀ consiste en determinar el tiempo en que muere el 50% de la población de los escarabajos utilizados. Se probaron dos métodos de inoculación del hongo.

Método 1: Se utilizaron 30 escarabajos de cada especie por cada solución de hongos ($\sim 2.4 \times 10^6$ esporas/mL). En cada hoyo de las placas clúster (placas con 12 hoyos cada una) se colocaron 0.5 mL de solución fúngica y un escarabajo (Figura 1).

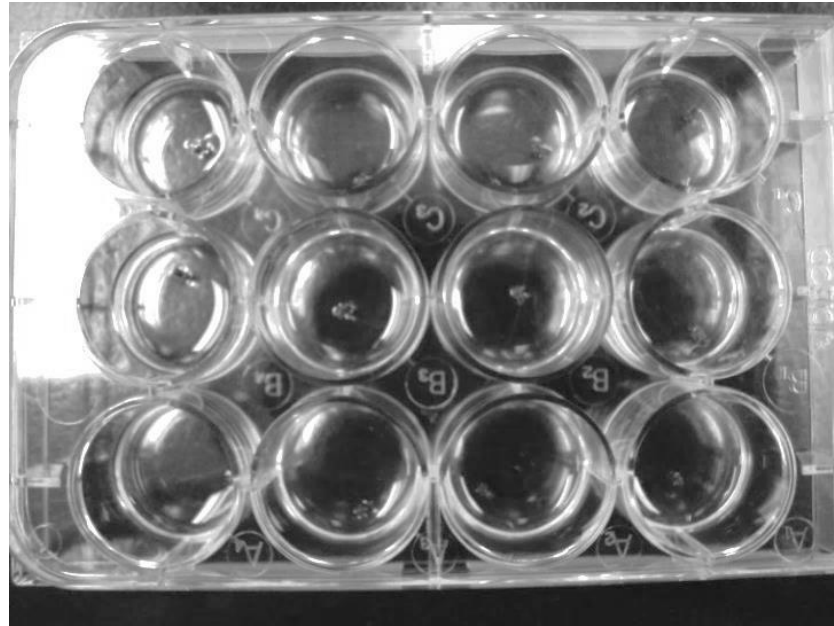


Figura 1. Placa clúster con 0.5 de suspensión fúngica y un escarabajo por hoyo.

Se agitaron las placas suavemente por 1 minuto para que los escarabajos estén completamente contaminados. Como control se utilizaron 30 escarabajos y se los sumergió únicamente en agua destilada.

Los insectos tratados fueron puestos individualmente en frascos plásticos (3 cm de diámetro, 6 cm alto). En cada frasco había un disco de papel filtro (3 cm de diámetro) humedecido para que se pueda alimentar el insecto. En la tapa se cortó un agujero (1 cm de diámetro) y se insertó un pedazo de algodón húmedo (1.2 cm de diámetro, 5 cm de largo) para la ventilación y mantener un ambiente con una humedad relativa mayor a 85% (Figura 2).



Figura 2. Bioensayo utilizado por insecto.

Método 2: Se utilizaron 30 escarabajos *X. crassiusculus* por cada solución de hongos ($\sim 2.4 \times 10^6$ esporas/mL). El método para este experimento fue el mismo que se describió anteriormente, pero en esta ocasión los insectos fueron puestos en frascos individuales con discos de papel filtro contaminados con 200 μ L de solución fúngica mediante una aplicación tópica (con pipeta automática). Como control se utilizaron 30 escarabajos y el disco fue humedecido con 200 μ L de agua destilada.

Luego de esto todos los frascos de los bioensayos se mantuvieron en la incubadora y se examinaban los insectos cada 12 horas. Diariamente se humedecía el algodón (hasta la saturación) y el papel filtro (30 μ L) con agua destilada.

Los escarabajos muertos eran removidos diariamente y esterilizados. Para la esterilización de la superficie de los insectos se siguió el siguiente procedimiento: sumergir los insectos en etanol al 70% (5 a 10 segundos), enjuagarlos rápidamente en agua destilada, luego sumergirlos en una solución de hipoclorito al 1% (1 minuto), enjuagarlos 3 veces en agua destilada y secarlos con papel filtro estéril (Lacey 1997).

Se transfirieron los escarabajos a platos Petri que contenían papel filtro húmedo. Todos los platos Petri eran sellados e incubados. Entre 7 y 10 días después de muertos se examinaban los insectos para determinar presencia de micosis y verificar el fenotipo (aparición física) del hongo. Lo más probable era que si los insectos hubieran muerto por causa de alguno de los hongos, éste empezaría a colonizar el cuerpo del escarabajo desde su interior. La esterilización de la superficie de los insectos ayudó a remover las esporas adheridas externamente al cuerpo de ellos para evitar diagnósticos erróneos.

Esporas viables por escarabajo. Método 1: Los escarabajos fueron sumergidos en la solución fúngica como se indicó en el procedimiento para el bioensayo de tiempo letal. Luego grupos de cinco de estos escarabajos fueron sumergidos en un tubo Eppendorf (1.5

mL) previamente preparado con 1000 μ L de Tritón X-100 al 1%. Se pusieron los tubos en un agitador tipo vórtex por 15 segundos y se tomó una alícuota (10 μ L) de cada tubo para iniciar con el conteo de esporas. Para el conteo se usó una cámara de Neubauer bajo un lente de 400X; el resultado obtenido correspondía a el número de esporas viables / mL de cinco escarabajos. Se hicieron cinco réplicas de este procedimiento por cada cepa de hongos y para el control también.

Método 2: Los escarabajos fueron sumergidos en la solución fúngica como se indicó en el procedimiento para el bioensayo de tiempo letal. Cada escarabajo fue colocado individualmente en un tubo Eppendorf (1.5 mL) con 200 μ L de Tritón X-100 al 1%. Luego se agitó la muestra, se tomó una alícuota (10 μ L) de cada suspensión y se contaron las esporas usando una cámara de Neubauer; así se determinó el número de esporas viables/mL de cada escarabajo. Se hicieron cinco réplicas de este procedimiento por cada cepa de hongos y para el control también.

Análisis estadístico. Los resultados del bioensayo del TL_{50} fueron analizados con el programa estadístico JMP para calcular la pendiente del TL_{50} . Se hizo un análisis de supervivencia Kaplan-Meier Probit para conocer la conducta de cada biopesticida con un intervalo de confiabilidad (IC) del 95%. Valores de P menores a 0.05 quieren decir que no existe una diferencia significativa.

El número de esporas viables adheridas a los escarabajos fueron analizadas a través de un análisis de varianza (ANOVA). La diferencia entre los tratamientos fue detectada a través de la prueba T. El mismo análisis se empleó para comparar los dos métodos utilizados para determinar la adhesión de esporas/escarabajo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de esporas viables por escarabajo. Las densidades de esporas en las suspensiones de hongos en el bioensayo del TL₅₀ fueron similares, variándose de 2.7 a 2.9 ×10⁶/mL. El porcentaje de germinación de las esporas oscilaba entre 85 y 89% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Densidad de esporas en las suspensiones de hongos entomopatógenos.

Tratamiento	No. esporas/mL de suspensión (× 10 ⁶)	% de germinación de esporas	No. esporas viables/mL de suspensión (× 10 ⁶)
<i>I. fumosorosea</i>	2.9 ± 0.42	85	2.4 ± 0.36
<i>M. brunneum</i>	2.8 ± 0.27	85	2.4 ± 0.23
<i>B. bassiana</i>	2.7 ± 0.37	89	2.4 ± 0.33
Control	0	0	0

Las hembras de *X. crassiusculus* sumergidas en una suspensión de *B. bassiana* tuvieron significativamente ($P < 0.05$) mayor número de esporas viables adheridas a sus cuerpos en comparación con los otros tratamientos (Cuadro 2). Las hembras sumergidas en *M. brunneum* e *I. fumosorosea* tuvieron aproximadamente la mitad de esporas adheridas que *B. bassiana* con el método de un escarabajo/tubo Eppendorf. Sin embargo, con el método de cinco escarabajos/tubo Eppendorf las hembras en *M. brunneum* tuvieron un tercio el número de esporas y las hembras en *I. fumosorosea* tuvieron menos de 20% del número de esporas en comparación con *B. bassiana*. Los dos métodos usados para determinar la adhesión de esporas viables por escarabajo no son diferentes para las cepas *M. brunneum* y *B. bassiana*. Para la cepa de *I. fumosorosea* se registró que si había diferencia entre los métodos, siendo mejor el de un escarabajo/tubo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación entre tratamientos y entre métodos para determinar la adhesión de esporas en *X. crassiusculus* después de haber sido sumergidos en suspensiones fúngicas.

Tratamiento	No. esporas viables/mL de suspensión ($\times 10^5$) ^a		Prueba T ^b
	1 escarabajo/tubo Eppendorf	5 escarabajos/tubo Eppendorf	
<i>I. fumosorosea</i>	4.5 \pm 0.4 B	2.9 \pm 2.0 B	$P = 0.0162$
<i>M. brunneum</i>	4.0 \pm 0.4 B	5.3 \pm 2.0 B	$P = 0.1104$
<i>B. bassiana</i>	8.2 \pm 1.0 A	16 \pm 2.0 A	$P = 0.0669$
Control	0	0	
	F = 11.27	F = 11.51	
ANOVA	df = 2, 14	df = 2, 12	
	$P = 0.0018$	$P = 0.0016$	

^aTratamientos cuyos valores no tengan la misma letra en la misma columna son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

^bLa prueba T compara los métodos de conteos de adhesión de esporas para cada tratamiento ($P < 0.05$).

Con el método de conteo de esporas de un escarabajo/tubo Eppendorf, *X. volvulus* expuestos a *I. fumosorosea* presentaba mayor número de esporas viables adheridas, seguidos de *M. brunneum* y después por *B. bassiana* (Cuadro 3). Con el método de conteo de esporas de cinco escarabajos por tubo Eppendorf los resultados indicaron que no existía ninguna diferencia significativa del número de esporas viables encontradas de las 3 cepas de hongos utilizadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación entre tratamientos y entre métodos para determinar la adhesión de esporas en *X. volvulus* después de haber sido sumergidos en suspensiones de hongos.

Tratamiento	No. esporas viables/mL de suspensión ($\times 10^5$) ^a		Prueba T ^b
	1 escarabajo/tubo Eppendorf ¹	5 escarabajos/tubo Eppendorf ²	
<i>I. fumosorosea</i>	4.5 \pm 0.4 A	5.4 \pm 1.1 A	$P = 0.4941$
<i>M. brunneum</i>	2.9 \pm 0.3 B	5.3 \pm 0.8 A	$P = 0.0272$
<i>B. bassiana</i>	1.1 \pm 0.2 C	7.8 \pm 0.6 A	$P = < 0.0001$
Control	0	0	
	F = 26.23	F = 2.68	
ANOVA	df = 2, 14	df = 2, 14	
	$P = < 0.0001$	$P = 0.109$	

^aTratamientos cuyos valores no tengan la misma letra en la misma columna son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

^bLa prueba T compara los métodos de conteos de adhesión de esporas para cada tratamiento ($P < 0.05$).

La formulación emulsificante de las suspensiones de *B. bassiana* y *M. brunneum* pudieron influir en que exista mayor facilidad de adhesión de esporas (conidias hidrofílicas) por parte de estos hongos en comparación con las esporas (blastosporas hidrofóbicas) de *I. fumosorosea* cuya formulación era en gránulos. *X. crassiusculus* presentaba mayor cantidad de vellosidades en su cuerpo que *X. volvulus* (observación personal). Esto coincide con que *X. crassiusculus* ha presentado mayor cantidad de esporas adheridas que *X. volvulus*.

En *X. volvulus* no hubo diferencia significativa entre los métodos usados para la cepa de *I. fumosorosea*. Para las cepas de *M. brunneum* y *B. bassiana* existieron diferencias entre los métodos, siendo mejor el método de cinco escarabajos/tubo (Cuadro 3).

Bioensayo del tiempo letal. Las hembras de *X. crassiusculus* cuando fueron sumergidas en una suspensión de *B. bassiana* presentaron un TL_{50} de 144 horas, mientras cuando fueron alimentadas con papel contaminado, era solo 106 horas, una reducción de 26%. Con *M. brunneum*, la reducción fue 37% y con *I. fumosorosea* fue 72% (Figuras 3 y 4). El TL_{50} de *X. volvulus* con *B. bassiana* fue 132 horas, con *M. brunneum* fue 141 horas y con *I. fumosorosea* fue 190 horas (Figura 5).

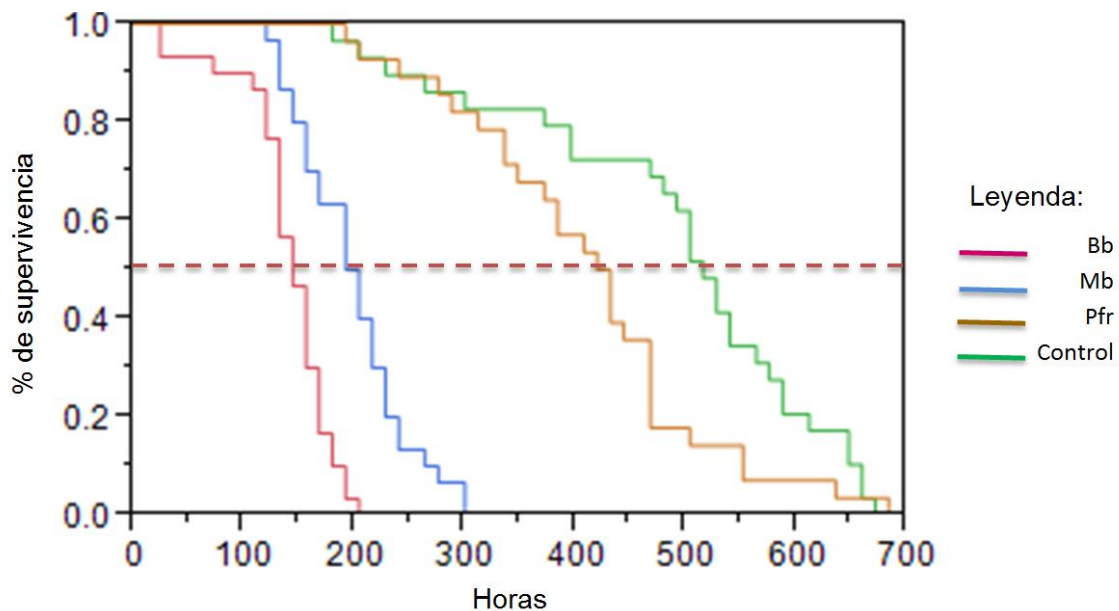


Figura 3. Curvas de supervivencia de *X. crassiusculus* sumergido en las tres suspensiones de hongos entomopatógenos.

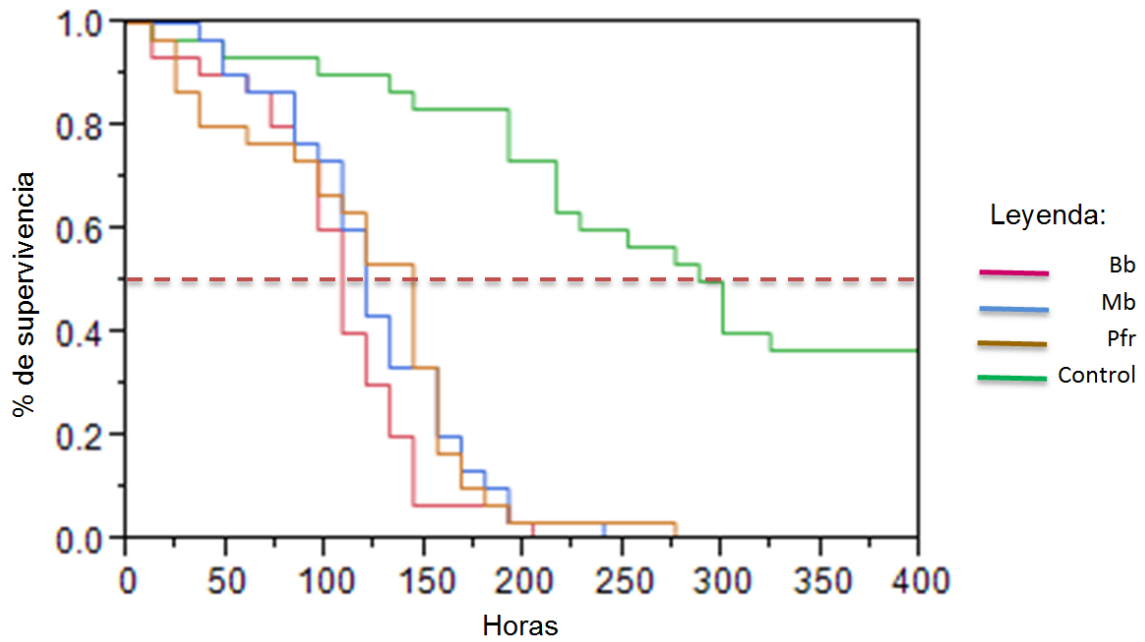


Figura 4. Curvas de supervivencia de *X. crassiusculus* alimentado con papel filtro contaminado con tres suspensiones de hongos entomopatógenos.

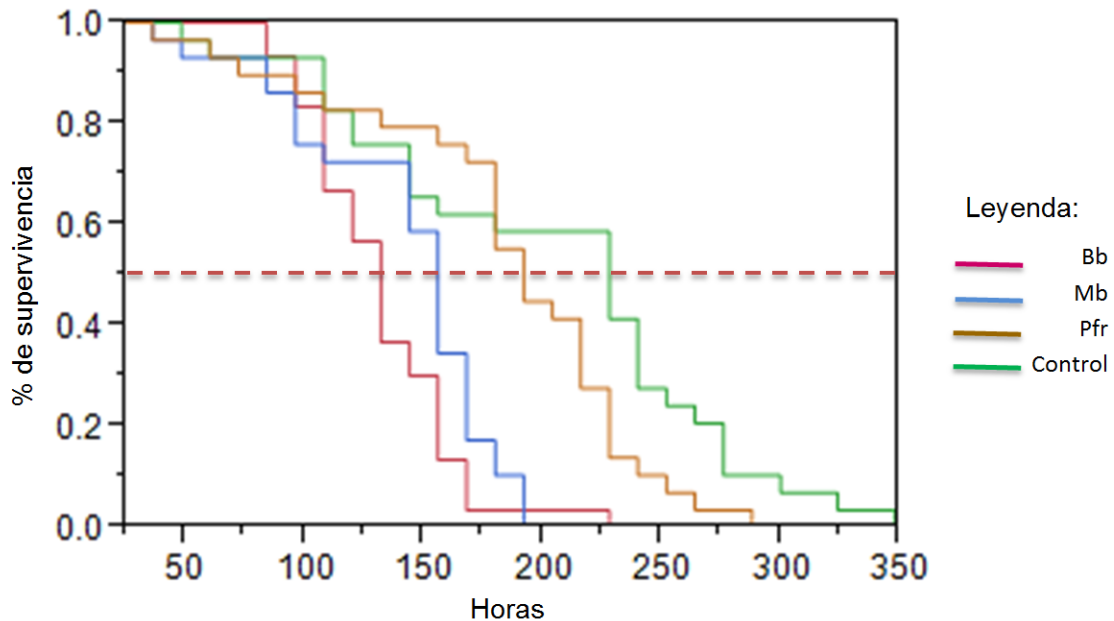


Figura 5. Curvas de supervivencia de *X. volvulus* sumergido en las tres suspensiones de hongos entomopatógenos.

Las dos especies de escarabajos expuestas a los diferentes biopesticidas presentaron TL₅₀ significativamente menores al control con la excepción de *X. crassiusculus* expuesto a *I. fumosorosea* (Cuadro 4). *B. bassiana* fue el más rápido en matar al 100% de las

poblaciones de *X. crassiusculus* seguido de *M. brunneum* (Figura 3 y 4). Para *X. volvulus* el más rápido en matar fue *M. brunneum* seguido de *B. bassiana*.

Cuadro 4. LT₅₀ de las dos especies de escarabajos expuestas a los diferentes hongos entomopatógenos.

	LT ₅₀ (horas) ^a		
	<i>X. crassiusculus</i> sumergido	<i>X. volvulus</i> sumergido	<i>X. crassiusculus</i> alimentado
<i>I. fumosorosea</i>	184 ± 11 A	120 ± 11 B	411 ± 22 B
<i>M. brunneum</i>	141 ± 8 B	124 ± 9 B	198 ± 9 C
<i>B. bassiana</i>	132 ± 6 B	106 ± 8 B	140 ± 9 C
Control	202 ± 15 A	278 ± 22 A	488 ± 26 A
ANOVA	F = 10.53 df = 3 P = <0.0001	F = 36.23 df = 3 P = <0.0001	F = 86.99 df = 3 P = <0.0001

^aTratamientos cuyos valores no tengan la misma letra en la misma columna son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

Se hizo un estudio parecido con otra especie de escarabajo ambrosía, *Xyleborus glabratus* Eichhoff. El método de inoculación del hongo fue el de sumergirlo en la suspensión fúngica. En este estudio se obtuvo tiempos de mortalidad menores con menos cantidad de esporas adheridas por escarabajo. EL TL₅₀ para *B. bassiana* fue de 73 horas, para *M. brunneum* 96 horas y para *I. fumosorosea* 105 horas (Carrillo *et al.* 2013).

Fenotipo de los hongos entomopatógenos. Con el método de sumergir al escarabajo en las suspensiones se obtuvo que todos los individuos de *X. crassiusculus* expuestos a *B. bassiana* y *M. brunneum* presentaron el fenotipo del hongo al cual correspondían, mientras que para *I. fumosorosea* solo el 64% de los escarabajos sumergidos presentaron el fenotipo esperado. En el control el 52% de los escarabajos presentó un fenotipo de hongos saprófitos y el 28% no mostró ningún fenotipo fúngico.

El 87% de los escarabajos *X. volvulus* correspondientes al tratamiento con *B. bassiana*, 72% del tratamiento con *M. brunneum* y el 67% del tratamiento con *I. fumosorosea*, presentaron el fenotipo fúngico correspondiente. El 93% del control no mostró micosis alguna.

Con el método de alimentar *X. crassiusculus* con papel filtro contaminado, se observó que el 97% de los escarabajos tratados con *B. bassiana*, 80% con *M. brunneum* y el 77% con *I. fumosorosea* indicaban fenotipo delegado a cada hongo utilizado. El 83% de los escarabajos en el control se mostró limpio de hongos (Cuadro 5).

Este método de visualización de fenotipo no es del todo certero. El insecto pudo morir por alguna otra causa que no fuera el hongo inoculado. Lo ideal sería hacer un análisis con técnicas moleculares, pero debido a los altos costos que esto representa no se realizó.

Cuadro 5. Porcentaje de micosis en escarabajos ambrosía expuestos a tres hongos entomopatógenos luego de 7 a 10 días *post-mortem*.

Método	Tratamiento	Visualización de los fenotipos de los hongos (%)				
		Mb	Bb	Ifr	Otros*	Ninguno
<i>X. crassiusculus</i> sumergido	<i>I. fumosorosea</i>	-	14	64	14	7
	<i>M. brunneum</i>	100	-	-	-	-
	<i>B. bassiana</i>	-	100	-	-	-
	Control	-	14	7	52	28
<i>X. volvulus</i> sumergido	<i>I. fumosorosea</i>	-	7	67	-	27
	<i>M. brunneum</i>	72	17	-	3	7
	<i>B. bassiana</i>	-	87	-	7	7
	Control	-	-	-	7	93
<i>X. crassiusculus</i> alimentado	<i>I. fumosorosea</i>	-	10	77	13	-
	<i>M. brunneum</i>	80	20	-	-	-
	<i>B. bassiana</i>	-	97	-	-	3
	Control	-	7	7	3	83

Mb: *Metarhizium brunneum*, Bb: *Beauveria bassiana*, Ifr: *Isaria fumosorosea*, * Hongos saprofitos.

Antes de establecer el bioensayo se observaron tres escarabajos muertos contaminados con *B. bassiana*, lo cual se puede atribuir a que los escarabajos fueron colectados en campo. Probablemente por esta razón algunos insectos que no eran del tratamiento de este hongo presentaron micosis con fenología de éste hongo después de 7 a 10 días de haber montado el bioensayo (Figura 6).

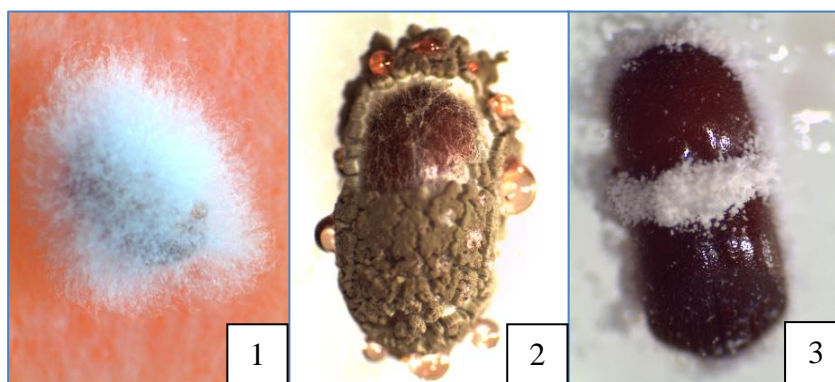


Figura 6. Fenotipo del hongo observado en *X. crassiusculus* bajo estereoscopio.

1) *I. fumosorosea*, 2) *M. brunneum*, 3) *B. bassiana*.

4. CONCLUSIONES

- Los hongos entomopatógenos *I. fumosorosea*, *M. brunneum* y *B. bassiana* presentaron diferentes niveles de potencial para actuar como controladores biológicos de las hembras adultas de los escarabajos ambrosía, *X. crassiusculus* y *X. volvulus*, matándolos en tiempos menores al control. *B. bassiana* y *M. brunneum* en comparación con *I. fumosorosea* presentaron mejor nivel para controlar las dos especies de insectos analizadas.
- Para inocular el hongo de *B. bassiana* en el insecto en laboratorio es mejor método alimentarlo con papel filtro contaminado con la suspensión fúngica que sumergirlo en dicha suspensión. Al ingerir directamente el hongo, éste se desarrolla y alimenta de los tejidos del insecto hasta matarlo. Si las esporas son depositadas sobre la cutícula del escarabajo, lo cual sucede con el método de inmersión, las enzimas que segrega el hongo demoran más tiempo para penetrar la cutícula y matar al escarabajo.
- La adhesión de esporas por escarabajo para los tratamientos de *B. bassiana* fue mayor que para los tratamientos de *M. brunneum* e *I. fumosorosea*. Estas cepas de hongos contienen conidias que son hidrofílicas, lo cual facilita la adhesión a los cuerpos de los insectos.
- No existe diferencia entre los métodos de conteo de esporas de un escarabajo/tubo Eppendorf o de cinco escarabajos/tubo Eppendorf. Esto quiere decir que Tritón X-100 tiene la capacidad de extraer similares cantidades de esporas del cuerpo de los insectos, ya sea que se encuentre uno o cinco escarabajos por tubo Eppendorf.

5. RECOMENDACIONES

- Generalmente la madera infestada con escarabajos ambrosía es quemada para eliminar la plaga y evitar su propagación, por ende las pérdidas son muy altas así como las emisiones de gases de efecto invernadero. Como alternativa se podría sumergir las trozas de árboles en suspensiones fúngicas de *B. bassiana* o *M. brunneum* para matar los insectos y evitar su propagación. Posteriormente se le puede dar algún valor comercial a esta madera tratada.
- Como método preventivo se podrían rociar los troncos de los árboles con las suspensiones fúngicas de *B. bassiana* o *M. brunneum*. De esta forma, una vez que las hembras empiecen a comer la corteza y penetrar al árbol se infestarían y al cabo de algunos días morirían.
- Es necesario estudiar más sobre el efecto de los hongos entomopatógenos sobre la ecología del escarabajo ambrosía, para determinar si la tasa de reproducción y actividad de la hembra se ve afectada. Además se debe determinar si el hongo entomopatógeno puede controlar también el desarrollo de *R. lauricola*, que es quien en realidad afecta la salud de los árboles.

3. LITERATURA CITADA

- Beaver, R.A. 1989. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. *In*: N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond y J.F. Webber (eds). Insect-Fungus Interactions. San Diego, California, Academic Press. p 121-143.
- Carrillo, D., J.H. Crane, y J.E. Peña. 2013. Potential of contact insecticides to control *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae), a vector of laurel wilt disease in Avocados. *Journal of Economic Entomology* 106(6): 2286-2295.
- Carrillo, D., R.E. Duncan, J.N. Ploetz, A.F. Campbell, R.C. Ploetz, y J.E. Peña. 2014. Lateral transfer of a phytopathogenic symbiont among native and exotic ambrosia beetles. *Plant Pathology* 63(1): 54-62.
- FAO/IUFRO. 1965. Symposium on forest diseases and insects. *In*: An international review of forestry and forest products. *Unasylva* 19(3).
- Fraedrich, S.W., T.C. Harrington, y R.J. Rabaglia. 2007. Laurel wilt: a new and devastating disease of redbay caused by a fungal symbiont of the exotic redbay ambrosia beetle. *Newsletter of the Michigan Entomological Society* 52(1-2): 15-16.
- Hulcr, J., R. Mann, y L.L. Stelinski. 2011. The scent of a partner: ambrosia beetles are attracted to volatiles from their fungal symbionts. *Journal of Chemical Ecology* 37(12): 1374-1377.
- Inch, S.A., y R.C. Ploetz, 2012. Impact of laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, on xylem function in avocado, *Persea americana*. *Forest Pathology* 42(3): 239-245.
- Papierok, B. y A.E. Hajek. 1997. Fungi: Entomophthorales. *In*: L.A. Lacey (ed). *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, California, Academic Press. p 187-211.
- Rudinsky, J.A. 1962. Ecology of Scolytidae. *Annual Review of Entomology* 7(1): 327-348.
- Six, D.L. 2012. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle-fungus symbioses. *Insects* 3(1): 339-366.