

## CARACTERIZACIÓN Y EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. SOBRE INSECTOS DESCORTEZADORES DE PINO

✉ Adriana Rosalía Gijón-Hernández<sup>1</sup>, Zitlalli Trejo-Sandoval<sup>1</sup>, Cindy Manuela López<sup>1</sup>- Guzmán, Lidia Ramírez-Huerta<sup>1</sup>, Victor Javier Arriola- Padilla<sup>1</sup>, Iris Marley Pérez-Gálvez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CENID-COMEF- INIFAP. Avenida Progreso 5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Del. Coyoacán, C.P. 04010, D.F. México.

✉ Correo: gijon.adriana@inifap.gob.mx

**RESUMEN.** Los insectos descortezadores son la principal plaga de los bosques de coníferas, provocando mayor daño especialmente al género *Pinus*. El objetivo de esta investigación fue comenzar la caracterización taxonómica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y determinar su efectividad para el control de descortezadores en condiciones de laboratorio. Se realizaron recorridos en la Sierra Gorda de Querétaro, en Pinalito de la Cruz. Recolectó corteza con insectos atacados por hongos, la identificación de hongos se realizó con claves taxonómicas y técnicas moleculares. Se estableció un experimento con cinco tratamientos (Cepa T01, T02, T03, T04 y agua), la efectividad de las cepas fue evaluada mediante el porcentaje de insectos muertos. Se realizaron comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey. Los aislamientos fueron caracterizados dentro del género *Trichoderma*. El análisis estadístico mostró que la cepa T01 fue el mejor tratamiento, ya que causó el 100% de mortalidad de los insectos.

**Palabras clave:** Escarabajo, Pino, cepas, Coníferas, entomopatógeno.

### Characterization and effectiveness of *Trichoderma* spp. on pine bark beetles

**ABSTRACT.** The bark beetles are a major pest of conifers forests, causing major damage especially to the genus *Pinus*. The objective of this research was to begin taxonomic and molecular characterization of native strains of *Trichoderma* and determine their effectiveness for controlling bark beetles in laboratory conditions. Field work was conducted in Queretaro in the municipality of Pinalito de la Cruz. Bark with fungal attacked insects was collected, the fungi identification was performed using molecular techniques and taxonomic keys. An experiment with 5 treatments (T01-t04 and water) was established. the effectiveness of the strains was assessed by the percentage of dead insects. multiple comparisons of means with Tukey's test were performed. The isolates were characterized in the genus *Trichoderma*. Statistical analysis showed that the best treatment was the T01 strain, because it caused 100% mortality of insects.

**Keywords:** Beetle, Pine, strains, Conifer, entomopathogenic.

## INTRODUCCIÓN

Los bosques de pino en México son atacados por un grupo de insectos plaga llamados descortezadores entre los que destaca el género *Dendroctonus* spp. que son pequeños escarabajos que habitan el interior de la corteza de ciertas especies de árboles donde se alimentan del floema y del cambium vascular al mismo tiempo que se reproducen (Pérez-Vera *et al.*, 2009). Estos insectos han evolucionado principalmente en los bosques de coníferas de México y Norteamérica donde cada una de las especies es hospedero de por lo menos una especie, a pesar de su tamaño son capaces de matar a sus hospedantes (Sturgeon y Mitton, 1982, Wood; 1982; Wood, 1985). Durante 2012 y 2013 la actividad de insectos descortezadores se ha incrementado en varios estados de la República Mexicana, entre ellos Querétaro en donde las especies con mayor

actividad son *D. mexicanus* y *D. frontalis*. En México, el control de estos insectos está regulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-019-SEMARNAT-2006, que establece medidas de control mecánico y químico (SEMARNAT, 2008). Sin embargo, el uso de insecticidas en los bosques causa controversia y la sociedad civil demanda medidas alternativas de control que sean amigables con el ambiente, sobre todo para áreas cuyo objetivo es la conservación de la biodiversidad, por lo que se ha implementado el control biológico, que en la práctica busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga mediante el uso de sus enemigos naturales (Téllez-Jurado, *et al* 2009).

Dentro del contexto del manejo integrado de plagas (MIP), una de las alternativas es usar insecticidas de naturaleza biológica. Existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos, como son los hongos que tienen un gran potencial como agentes controladores, porque son capaces de producir enfermedad y muerte de los insectos (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011). Tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007).

En la actualidad ya existe un avance notable en el conocimiento del efecto y el uso de entomopatógenos, incluso existen productos comerciales formulados para algunas de las principales plagas agrícolas (Faria y Wraight, 2007); sin embargo, para insectos descortezadores esta línea de investigación ha sido poco estudiada. Por lo anterior, la finalidad de la presente investigación fue comenzar la caracterización taxonómica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. y determinar su efectividad para el control de descortezadores en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Identificación y caracterización de *Trichoderma* spp.** Con el propósito de detectar árboles de pino (*Pinus greggii* Englem) atacados por descortezadores, se realizaron recorridos en el 2014 en la Sierra Gorda de Querétaro, en el ejido Pinalito de la Cruz perteneciente al municipio de Landa de Matamoros. Se recolectó corteza con insectos atacados por hongos. El material se trasladó al Laboratorio de Sanidad Forestal del CENID-COMEF- INIFAP para su procesamiento. Los insectos con presencia de micelio se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%, lavados con agua destilada estéril y sembrados en medio de cultivo PDA e incubados a 28 °C. La identificación morfológica de hongos se realizó con claves taxonómicas (Humber, 1997, Barnett y Hunter, 1999).

La caracterización molecular se llevó a cabo usando el par de primers BR1 y BR2 que es específico para el género *Trichoderma* (Rubio *et al.* (2005). La amplificación se realizó con un termociclador T100 con las condiciones reportadas por Rubio *et al.* (2005).

**Evaluación de la efectividad de *Trichoderma* spp sobre descortezador.** Se evaluó la mortalidad de los descortezadores, para lo cual estableció un experimento en condiciones de laboratorio, el cual constó de los siguientes tratamientos: Cepa T01, T02, T03, T04 y el testigo (agua destilada estéril), cuatro trozas por tratamiento (cada troza correspondió a una repetición). La efectividad de las cepas se estimó mediante el porcentaje de insectos muertos.

Para comparar las medias de los tratamientos se utilizó un ANOVA de una sola vía (STATISTICA ver. 8). La ANOVA fue significativa, por lo tanto se realizó comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey.

Se realizó la producción de conidias de las cepas antes mencionadas. Se utilizaron trozas de 18 cm de diámetro y 50 cm de longitud infestadas por descortezadores. El inoculo se preparó disolviendo las esporas del hongo en 500 ml de agua destilada estéril y se agregó como coadyuvante 10 ml de aceite mineral, cada cepa se preparó a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml; la aplicación se realizó con un aspersor manual, posteriormente las trozas fueron colocadas en bolsas de Polietileno de baja densidad color negro e incubados a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $33 \pm 1$  % y un fotoperiodo 12:12 h. El testigo fue asperjado con agua destilada estéril. Los escarabajos se recolectaron cada semana de las trozas tratadas durante un mes, se sembraron en medio PDA para confirmar que la causa de su mortalidad fue por los hongos aplicados y de esta forma cumplir con los postulados de Koch (Volsy, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación y caracterización de *Trichoderma* spp.** Se obtuvieron cuatro aislamientos de hongos a partir de los cuerpos de los descortezadores y mediante características morfológicas las cuatro cepas fueron caracterizadas dentro del género *Trichoderma* Persoon; por presentar conidióforos hialinos, blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos,

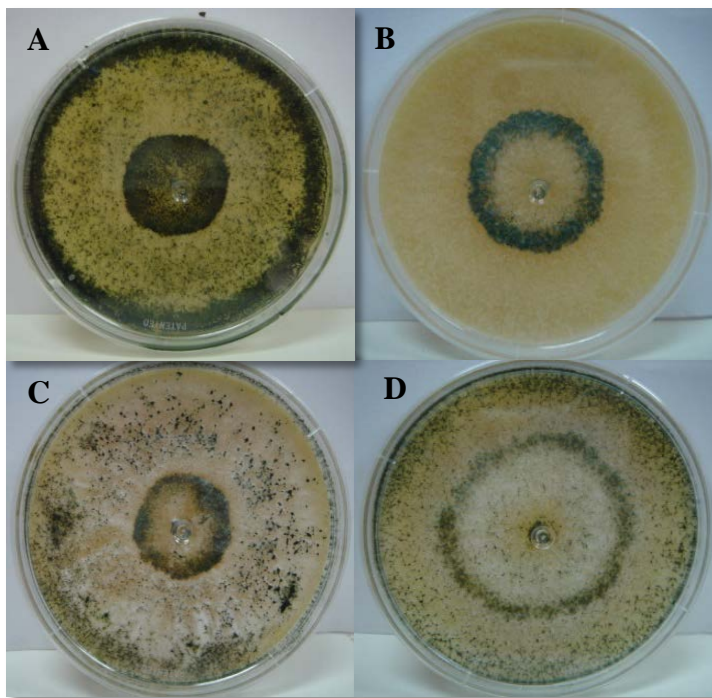
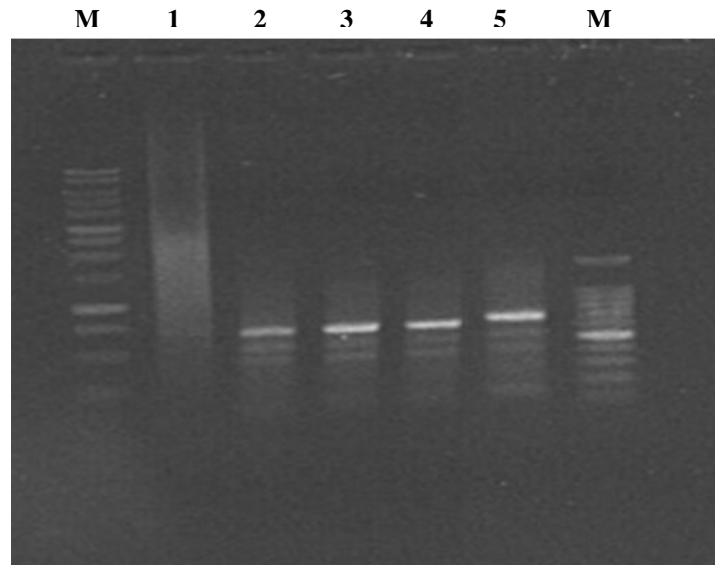


Figura 1. Cepas de *Trichoderma* spp en medio PDA. A. T01, B. T02, C. T03, D. T04

conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, estos resultados concuerdan con lo descrito por Chávez (2006), Humber (1997) y Barnett y Hunter (1999). Las cepas presentaron diferencias en crecimiento y color en medio PDA (Fig. 1 A, B, C, D).

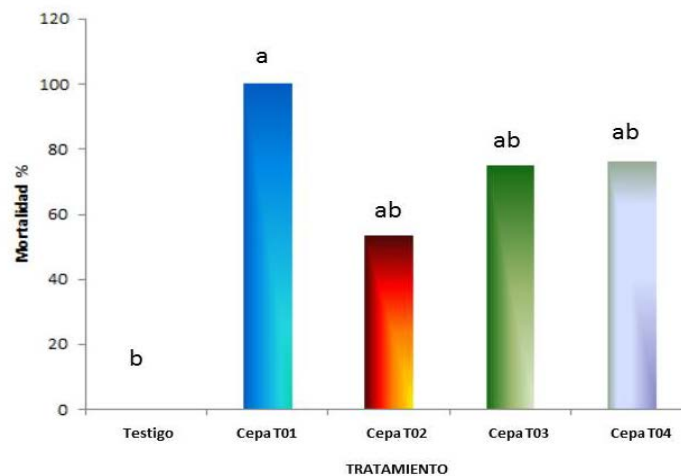
Los estudios moleculares indicaron que la banda del producto de PCR de los cuatro aislados fue de un peso aproximado de 832 Pb con los primers BR1 y BR2, lo cual coincide con lo reportado por Rubio *et al.* (2005) (Fig. 2), confirmando que las cuatro cepas aisladas a partir de los cuerpos de descortezadores correspondieron al género *Trichoderma* Persoon.



**Figura 2.** Amplificación del producto de aproximadamente 832 Pb de *Trichoderma*. Línea 1, testigo negativo (agua libre de nucleasas), Línea 2 a la 5, cuatro cepas de *Trichoderma* aisladas de descortezadores., M, Marcador molecular (Izquierda 1 Kb y derecha 100 Pb).

### Evaluación de la efectividad de *Trichoderma* spp sobre descortezadores

Con respecto al análisis estadístico se observó que la mortalidad causada por la cepa T01 fue significativamente mayor al tratamiento control, mientras que no se observaron diferencias entre las medias de las cepa T02, T03 y T04, con base en los resultados de la prueba de Tukey (Fig. 3).



**Figura 3.** Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp sobre la mortalidad promedio de insectos descortezadores bajo cinco tratamientos. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con base la prueba de Tukey

Por otra parte los escarabajos que fueron extraídos de las trozas y sembrados en PDA, mostraron crecimiento fúngico y se corroboró que la causa de la muerte fue por la acción de *Trichoderma*, ya que se obtuvo el aislado original de las cepas aplicadas. Se observó que la mortalidad de los adultos se presentó a partir de los ocho días después de la aplicación de los tratamientos (Fig. 2 A y B). En la figura 2 se aprecian estructuras fúngicas en los escarabajos tratados con las cepas T01 y T04, debido a que los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la

infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos (Pucheta *et al.*, 2006). Hussein *et al.* (2008) mencionan que las esporas de los hongos germinan en la cutícula del hospedante, penetran y se propagan a través del cuerpo. Después de que el hongo mata al insecto, puede crecer fuera del cadáver y producir más esporas, aumentando la posibilidad para que otros puedan ser invadidos, resultados similares fueron observados en este estudio.

*Trichoderma* se ha utilizado para la producción de enzimas líticas y para controlar una amplia gama de hongos patógenos de plantas. Se ha reportado *Trichoderma chilonis* que se alimenta internamente o exteriormente de su hospedante, *Trichoderma viridae* como hongo entomopatógeno para controlar insectos, malas hierbas y para controlar otros hongos (Pabal *et al.*, 2013). Hussein *et al.* (2008), reportaron que *Trichoderma álbum* causó 20% de mortalidad de los adultos de *Rhyzopertha dominica* a concentración baja de esporas y mortalidad del 100% a concentración alta después de siete días de tratamiento.

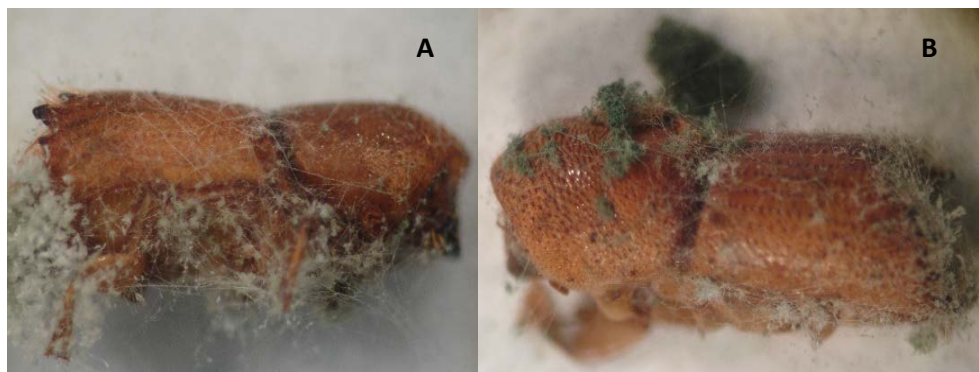


Figura 2. Descortezadores del género *Ips*, atacados por *Trichoderma*. A. Cepa T01. B. Cepa T04.

## CONCLUSIONES

En México no hay referencias que indiquen la utilización cepas nativas del género *Trichoderma* como entomopatógeno y por ello la importancia de estos resultados, además que fueron aisladas de insectos descortezadores, lo que favorece aún más el posible éxito en uso extensivo como agentes de control biológico. Estos resultados son importantes, ya que este hongo constituye una medida efectiva para ser integrado en un futuro en programas de manejo de la plaga.

La cepa T01 causó el 100% de mortalidad a los ocho días después de su aplicación.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación con N° de Proyecto SIGI 16433532511. “Generación de nuevas estrategias de monitoreo y control de los insectos descortezadores *Dendroctonus mexicanus*, *Dendroctonus frontalis* e *Ips lecontei*, mediante el uso de semioquímicos y entomopatógenos” (Año 2014-2016).

## LITERATURA CITADA

Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society Press. USA. 218 p.

- Charnley, A.K. y S.A. Collins, 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *In*: Kubicek, C.P. y I.S. Druzhinina (eds.), Environmental and Microbial Relationship. The Mycota IV. Springer-Verlag Belin Heidelberg. Pp. 159-187.
- Chávez, G. M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y Evaluación de su efecto en Cultivo de Crisantemo (*Dentranthema grandiflora*). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Faria, M. R. y S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237–256.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. *In*: Lacey L. (ed.) Manual of Techniques in insect pathology. San Diego, California. Academic Press. Pp. 153-185.
- Hussein, A. Kaoud, Sherein, S., Ahmed R. EL-dahshan., Ahmed M. El-Behary. 2013. New Methods for the Control of Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha Dominica*. *International Journal of Engineering and Innovative Technology*. 3( 4). Pp. 285-289.
- Motta-Delgado, P y B. Murcia-Ordoñez. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6 (2).
- Pabal, A., Priyadarshani, Y., Bhuvu, N., Thangjam E. y U. Longjam. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Trichoderma viridae*, *Pacilomyces liliaceae* and *Verticilium lecani*. *International Journal of Current Research*, 5 (6): 1448-1450.
- Pérez-Vera, O., Alvarado-Rosales, D., Cárdenas-Soriano, E., Equihua-Martínez, A., Cibrián-Tovar, D., y J. Álvarez-Moctezuma. 2009. *Ophiostoma ips* asociado al insecto descortezador (*Dendroctonus adjunctus*) del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*). *Revista mexicana de micología*, 30: 9-18.
- Pucheta, M, Flores, A., Rodríguez, S. y M. de la Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12):856- 860.
- Rubio, M.B., Hermosa, M.R., Keck, E., y E. Monte. 2005. Specific PCR Assays for the Detection and Quantification of DNA from the Biocontrol Strain *Trichoderma harzianum* 2413 in Soil. Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca. Salamanca, España.
- SEMARNAT. 2008. Norma Oficial Mexicana NOM-019-SEMARNAT-2006, que establece los lineamientos técnicos de los métodos para el combate y control de insectos descortezadores. *Diario Oficial*. México, D. F. 23 de Julio de 2008.

- Sturgeon, K. B y J. B. Mitton. 1982. Evolution of bark beetle communities. *In*: Mitton, J. B. y K. B. Sturgeon (eds.). *Bark beetles of North American conifers: A system for the study of evolutionary biology*. Austin, TX: University of Texas Press. Pp 350-384.
- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M., Mercado-Flores, Y., Asaff-Torres, A. y A. Arana-Cuenca. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 73-80.
- Wood, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memories*. Provo, Utah. 1359 p.
- Wood, S. L. 1985. Aspectos taxonómicos de los Scolytidae. *In*: SARH. *Memoria de los Simposia Nacionales de Parasitología Forestal*. México, D. F. Pp. 170-174.