

BOTANIGARD® SC (*Beauveria bassiana* cepa GHA): bioinsecticida comercial. Aplicaciones para el control del Picudo Rojo

Thomas Martínez y Carolina Fernández (Futureco Bioscience S.L., Barcelona. www.futurecobioscience.com).

Desde marzo del 2005, Futureco Bioscience S.L. tiene los derechos de distribución BOTANIGARD® SC en diversos países de la Cuenca Mediterránea, entre los que destacan España, Italia, Grecia, Marruecos y Egipto. Diferentes especies de palmáceas distribuidas en dichos países están amenazadas gravemente por la presencia del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) (OEPP/EPPO, 2008).

El ingrediente activo de este biopesticida (*Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin cepa GHA 1991,) está incluido en el Anejo I de la Directiva Europea 91/414 desde julio del 2008 (Dir. 2008/113/CE), por lo que su uso con fines fitosanitarios está plenamente autorizado y regulado. En España BOTANIGARD® SC está registrado (Nº 22.648) para el control de mosca blanca en tomate, pimiento, cucurbitáceas y algodón, mientras que en los EEUU, está autorizado desde 1999 para su aplicación sobre moscas blancas, áfidos, trips, cochinillas, psilas, piojos y picudos, entre otras plagas.

Dado los antecedentes de control de la cepa GHA sobre un amplio rango de insectos plaga, entre los que destacan especies de la misma familia que el picudo de la palmera (Curculionidae) y de la existencia de referencias en la literatura donde se citan otras cepas de *B. bassiana* capaces de controlar en diferentes grados a *R. ferrugineus* (DEMBILO *et al.*, 2010; EL-SUFTY *et al.*, 2009; SEWEFY *et al.*, 2009), el Departamento de I+D de Futureco Bioscience ha iniciado recientemente un proyecto de investigación con el fin de evaluar la eficacia de BOTANIGARD® SC sobre esta nueva plaga. Los resultados alcanzados a través de bioensayos preliminares con *B. bassiana* cepa GHA sobre larvas y adultos de picudo rojo, abren la posibilidad de solicitar al MARM una ampliación de registro de BOTANIGARD® SC para el control de picudo rojo de la palmera. De todos modos, todavía es necesario validar los resultados obtenidos en el laboratorio mediante ensayos de semi-campo y campo. Si se verifica la eficacia de BOTANIGARD® SC sobre *R. ferrugineus* en condiciones de campo, se dispondrá de una herramienta real y a corto plazo para su control, ya que la cepa GHA 1991 de *B. bassiana* se encuentra ya registrada a nivel europeo.

INTRODUCCIÓN

El aumento progresivo en los últimos años de las superficies agrícolas gestionadas mediante Manejo Integrado de Plagas es un el claro ejemplo del uso cada vez más racional de los productos fitosanitarios. Las áreas verdes de las ciudades no se quedan atrás en este proceso de cambio y tanto sus condiciones particulares de funcionalidad - áreas recreativas y de esparcimiento - cómo su situación - zonas urbanas habitadas - hacen de éstas un claro objetivo para el diseño de programas que minimicen el uso de productos nocivos para la salud pública. Un programa de control en áreas de uso público debe emplear sustancias inocuas para la salud, al menos en las partes más accesibles de la vegetación, evitando riesgos y permitiendo su uso y disfrute de manera segura por parte de la ciudadanía. Por tanto, los tratamientos fitosanitarios con productos biopesticidas basados en microorganismos autorizados, eficaces y seguros para el medio ambiente y la salud de las personas, son un claro objetivo que se enmarca dentro de la política medioambiental europea. En el caso concreto del picudo de la palmera, que amenaza gravemente el entorno mediterráneo, resulta especialmente interesante la aplicación de soluciones biológicas como las que podrían aportar ciertos biopesticidas.

El Picudo Rojo de las Palmeras

UNA PLAGA DE ALTO RIESGO Y URGENTE CONTROL

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*: modo de acción

Existen numerosos microorganismos (hongos, bacterias, virus...) susceptibles de formularse como ingrediente activo de un biopesticida con acción insecticida. Actualmente en Europa están registrados como ingredientes activos de distintas formulaciones bioinsecticidas:

- los hongos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Lecanicillium muscarium* y *Metarhizium anisopliae*,
- las diferentes subespecies de bacteria *B. thuringensis*
- y el virus de la Granulosis de *Cydia pomonella* (CpGV).

El hongo entomopatógeno y cosmopolita *Beauveria bassiana* (clase Hyphomycetes: subclase Deuteromycotina), ejerce su acción insecticida a través de un proceso infeccioso que consta de las siguientes etapas:

- Las conidias se adhieren a la cutícula del insecto mediante una interacción hidrofóbica entre la pared de la espora y los lípidos de la epicutícula.
- El hongo genera un tubo germinativo que penetra en la cutícula por la acción de enzimas.
- Una vez en el hemocelo, el hongo se multiplica, dando lugar a blastosporas.
- Finalmente, las enzimas del hongo destruyen las estructuras internas del insecto causando su muerte.
- En ocasiones se producen epizootias: el micelio emerge del cadáver del insecto, y en condiciones ambientales favorables, produce esporas inefectivas que se dispersan.

Tras la infección, se observa una reducción de la alimentación y la movilidad del insecto. El tiempo que tarda en morir depende entre otros factores, de la dosis aplicada y del estadio del insecto.

Antecedentes de uso de *Beauveria bassiana* para el control del picudo rojo

Distintos investigadores han aislado e identificado diferentes cepas de *B. bassiana* a partir de larvas o adultos de *R. ferrugineus*. Algunas de estas cepas han sido estudiadas durante estos últimos años como posibles antagonistas del picudo rojo de la palmera en ensayos de laboratorio, semicampo y campo en diferentes zonas geográficas, dando resultados de eficacia variables entre sí, pero manifestando en general una buena efectividad de control frente a los diferentes estadios del picudo rojo.

La patogenicidad de una cepa (UAE-B2) de *B. bassiana* originaria de los Emiratos Árabes Unidos, fue evaluada en condiciones de laboratorio sobre adultos y larvas de picudo rojo (EL-SUFTY *et al.*, 2009). Los autores observaron que esta cepa era capaz de infectar adultos y completar su fase parasítica en 9.6 días de promedio, al tratar los insectos por inmersión durante 10 segundos con una suspensión de 10^8 conidias/mL. La mortalidad de las larvas, dependía de la fase en que se aplicaba la suspensión, logrando mortalidades que oscilaban entre 45 y 100%. Aplicaciones de la cepa UAE-B2 en palmera datilera en campo, alcanzaron mortalidades dispares (12.8 - 47.1%) en dos años consecutivos.

En ensayos de campo realizados en Egipto, Sewify y colaboradores (2009), se compararon diferentes tipos de aplicaciones de *B. bassiana* sobre palmeras datileras infectadas: inyectado, espolvoreado y mediante la suelta de machos



Las conidias se adhieren a la cutícula del insecto mediante una interacción hidrofóbica entre la pared de la espora y los lípidos de la epicutícula.

estériles inoculados con cepas de *B. bassiana*. En este estudio se observó una reducción de las poblaciones plaga por encima del 87% en el segundo año. Los autores sugerían, al igual que en estudios anteriores (EL-SUFTY *et al.*, 2009) que dicha mejora de la eficacia en el segundo año de aplicación podía atribuirse al establecimiento del hongo en las áreas tratadas.

En España, diversos autores (DEMBILLO *et al.*, 2010) publicaron recientemente un exhaustivo estudio con otra cepa autóctona de *B. bassiana* (EABb 07/96-Rf) donde reportaron que tratamientos de *B. bassiana* en suspensión acuosa reducían las poblaciones de *R. ferrugineus* tanto por mortalidad primaria (directa) como por los efectos subletales que el hongo producía en la reproducción y descendencia de los adultos infectados. Es decir, que los adultos infectados eran capaces de transmitir el hongo entomopatógeno a otros individuos de la misma población e incluso a individuos de la próxima generación. En un primer ensayo preventivo en condiciones de semi-campo, no se observaron diferencias significativas entre eficacia y el número de tratamientos aplicados (de 1 a 4, con cadencia de 15 días), oscilando la eficacia del tratamiento por pulverización entre 74.6 y 85.7%. En un segundo ensayo, sólo se realizó una aplicación de *B. bassiana*, efectuándose sueltas de adultos cada 15 días. Las eficacias de control sobre la población alcanzaron un máximo (88.7%) a los 45 días de la aplicación del hongo entomopatógeno, demostrando al menos la persistencia de éste durante un mes y medio desde el tratamiento.

Algunos autores sugieren que las cepas aisladas de forma natural de individuos de *R. ferrugineus* presentan una mayor efectividad a la hora de infectar diferentes estadios del insecto que las cepas inespecíficas aisladas sobre otras especies, en términos de agresividad, tiempo de infección y porcentaje de mortalidad. Sin embargo, teniendo en cuenta la multitud de factores que intervienen en la efectividad de un tratamiento fitosanitario en general (condiciones ambientales, materiales y métodos empleados para la aplicación, interacción con ecosistemas, etc.), la efectividad de una herramienta biológica para el control del picudo rojo de la palmera basada en el hongo entomopatógeno *B. bassiana* no debería basarse única y exclusivamente en la patogenicidad de una cepa. El análisis de los aspectos prácticos de un producto, como por ejemplo, la posibilidad de escalar la producción de una cepa a nivel industrial, el lograr un producto estable a temperatura ambiente durante al menos 1 año, la disponibilidad de estudios toxicológicos y ecotoxicológicos que demuestren que una cepa no es peligrosa, y su compatibilidad con otros productos de uso agrícola, deberían

El Picudo Rojo de las Palmeras

UNA PLAGA DE ALTO RIESGO Y URGENTE CONTROL

tenerse en cuenta a la hora de considerar una cepa como candidata para formular un producto comercial.

Botanigard® SC: bioinsecticida formulado a partir de *Beauveria bassiana* GHA

La cepa GHA 1991 fue aislada del gusano del maíz *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae) cerca de Corvallis (Oregón, EEUU) por el ARS (Agricultura Research Service) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Esta cepa de *B. bassiana* demostró eficacia sobre otras familias del mismo orden e incluso sobre insectos de distinto orden taxonómico, por lo que el producto formulado (BOTANIGARD® SC) se registró y se aplica a nivel comercial en los EEUU para el control de gorgojos (Coleoptera: Curculionidae), moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), trips (Hemiptera: Thripidae), chinches (Hemiptera: distintas familias), áfidos (Homoptera: Aphidae), y cochinillas (Homoptera: distintas familias), entre otros insectos plaga.

BOTANIGARD® SC contiene un mínimo de 2.11×10^{10} conidias por mL de suspensión concentrada. El proceso actual de fermentación permite obtener un producto 10 veces más concentrado que otros productos similares del mercado. Todos los ingredientes incorporados en la formulación de BOTANIGARD® SC disponen del estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) de la Agencia Americana FDA.

Este insecticida biológico está basado en una Solución Concentrada (SC) de esporas vivas formuladas en un exclusivo Sistema de Transporte Coloidal (STC) que le otorga unas propiedades únicas de eficacia, persistencia y estabilidad. El STC con el que se formula BOTANIGARD® SC hace que el producto comercial, a diferencia de otros biopesticidas no requiera refrigeración, ni mezclas con coadyuvantes. Además el STC protege el ingrediente activo (las esporas de *B. bassiana*) de factores ambientales desfavorables (temperaturas y pH extremos, baja HR, alta salinidad). El resultado es un producto estable a temperatura ambiente cuyas esporas son viables durante un mínimo de 3 años (TROVATIÑO *et al.*, 2007). BOTANIGARD® SC es compatible con numerosos insecticidas y fungicidas comerciales (TROVATIÑO *et al.* 2008) resultando de fácil aplicación en campo para el control de distintas plagas en Programas de Manejo Integrado y como insumo apto para Agricultura Ecológica (certificado CERTICAEE nº FI/001/0017). Además, los estudios toxicológicos y ecotoxicológicos necesarios para el registro de este microorganismo (*B. bassiana* cepa GHA) demostraron que la cepa estudiada es inocua para aves, peces, insectos benéficos y mamíferos.

BOTANIGARD® SC: aplicaciones para el picudo rojo de la palmera

Anteriormente, se ha descrito la actividad entomopatógena que diferentes cepas de *B. bassiana* han demostrado sobre *R. ferrugineus* en experimentos llevados a cabo en distintas condiciones y regiones donde actúa la plaga. Por otro lado, existen referencias de la eficacia de BOTANIGARD® SC sobre otras especies plagas de Curculiónidos en distintos cultivos como el picudo negro de la platanera *Cosmopolites sordidus* (PADILLA-CUBAS *et al.*, 2008), el picudo negro de la viña *Otiorynchus sulcatus* o el picudo del chile *Anthonomus eugenii* (ANÓNIMO, 2006).

La capacidad bioinsecticida de BOTANIGARD® SC sobre adultos y larvas de *R. ferrugineus* se evaluó en bioensayos preliminares en condiciones de laboratorio (Futureco Bioscience), con adultos y larvas recolectados en Vilassar de Mar (Barcelona) procedentes de Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*). La cepa GHA de *Beauveria bassiana* aplicada a dosis comercialmente aceptables

(0.25%), causó mortalidades del 93% sobre larvas a los 14 días y del 86% de los adultos a los 17 días del inicio del tratamiento. Al igual que otras cepas de *B. bassiana*, la cepa GHA se mostró más patógena sobre el estadio de larva, resultando ésta más susceptible que el adulto.

Con la idea de ampliar el registro actual del producto, Futureco Bioscience SL ha puesto en marcha un proyecto de investigación en el que participa la Estación Phoenix (Elche, España) cuyo objetivo principal es evaluar la capacidad bioinsecticida de BOTANIGARD® SC sobre el picudo rojo. Este grupo de investigación determinará la DL50 del producto comercial BOTANIGARD® SC sobre larvas y adultos, con lo que permitirá ajustar las dosis a ensayar en condiciones de campo. Además se determinará la persistencia del producto una vez aplicado en planta en condiciones de semi-campo.

Se ha descrito en numerosos trabajos de investigación la capacidad endofítica de diferentes aislados de *B. bassiana* sobre una gran variedad de especies vegetales (VEGA *et al.*, 2008). Considerando la capacidad endofita que *B. bassiana* ha demostrado en *Phoenix dactylifera* L. (GÓMEZ-VIDAL *et al.*, 2006) y suponiéndola parecida en otras especies de palmáceas como *P. canariensis*, se pondrá también en marcha un estudio de la actividad endofítica de la cepa GHA que debería permitir entender y ajustar mejor los métodos de aplicación del producto. Posteriormente, se ensayarán diferentes tipos de aplicaciones que podrían resultar adecuadas para el control del picudo rojo de la palmera con BOTANIGARD® SC, tanto de forma preventiva (en el caso que se evidenciara su capacidad endofita) como curativa. De este modo se evaluarán:

a) Tratamientos directos: dirigidos a las zonas principales donde se produce el ataque del insecto (yema apical, heridas de poda e hijuelos). Teniendo en cuenta el ciclo del insecto y las características del producto formulado (insecticida de contacto), el objetivo inicial será alcanzar los adultos que se encuentren en la corona de la palmera durante la aplicación, así como las larvas ocultas en orificios accesibles al producto. La formulación de BOTANIGARD® SC, que incluye el STC, protege especialmente la espora de *B. bassiana* cepa GHA, con lo cual ésta permanece viable sobre el tejido vegetal durante un cierto periodo de tiempo, dando la oportunidad de infectar al insecto por contacto, a pesar de que no sea en el momento justo del tratamiento con el producto.

b) Combinado con métodos de trapeo: trampas sintéticas (con feromonas de agregación o atrayentes) o trampas construidas a partir de material vegetal junto con restos de dátiles o caña de azúcar, son una buena herramienta para el monitoreo y la captura masiva de individuos adultos. Se evaluará la combinación de dichas trampas con BOTANIGARD® SC en el mismo recipiente, con la intención de atraer al insecto asegurando su infección y posterior dispersión del producto de forma vertical e horizontal.

Conclusiones

Hasta la fecha, ninguna de las cepas de *B. bassiana* que se han ensayado sobre picudo rojo en laboratorio o en condiciones de campo corresponden a un producto formulado y registrado, sino que son suspensiones acuosas del hongo entomopatógeno tal cual o bien producto técnico, todavía sin formular. Es importante tener en cuenta que para disponer de un producto biopesticida autorizado son necesarios cuantiosos estudios relacionados tanto con la cepa que constituye el ingrediente activo como con el producto formulado. Dichos estudios (de toxicidad, ecotoxicidad, caracterización del microorganismo y del

El Picudo Rojo de las Palmeras

UNA PLAGA DE ALTO RIESGO Y URGENTE CONTROL

formulado, evaluación de metabolitos y toxinas, estudios oficiales de eficacia, etc) son largos y costosos. Una vez realizados, es necesaria la elaboración de un Dossier a fin de solicitar la inclusión en el Anejo I de la sustancia activa, lo que permite posteriormente pedir autorizaciones nacionales para la comercialización del producto biopesticida en cuestión. Las tasas para la evaluación de la información presentada para el registro son variables según el país evaluador (RMS), oscilando entre 30.000 y 220.000 euros. El hecho de que actualmente no existan muchos biopesticidas registrados es debido a la complejidad del registro y su elevado coste económico, además del tiempo que las autoridades europeas se demoran en la evaluación y aprobación de estos productos (de media más de 7 años).

Por todo ello, resulta especialmente interesante una posible ampliación de registro para BOTANIGARD® SC como herramienta para el control biológico del picudo de la palmera, ya que éste supondría una solución sostenible, eficaz y disponible a corto plazo para el control de esta grave plaga, antes de que otras opciones lleguen demasiado tarde.

Abstract: Since March 2005, Futureco Bioscience S.L. holds BOTANIGARD® SC distribution rights in different countries of the Mediterranean Basin (Spain, Italy, Greece, Morocco and Egypt). Several species of Palm trees distributed in these countries are seriously threatened by the presence of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) (OEPP/EPPO, 2008). The active ingredient of this biopesticide (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuil-

lem strain GHA 1991.) is included in the Annex I of the European Directive 91/414 since July 2008 (Dir. 2008/113/EC); therefore its use with phytosanitary purposes is fully authorized and regulated. BOTANIGARD® SC is registered in Spain (Nº22648) for the control of whitefly on tomato, pepper, cucurbits and cotton, while in the USA, where is allowed since 1999, the product is authorized for the control of whiteflies, aphids, thrips, mealybugs, psyllas and weevils, and others pests.

There is evidence of controlling a wide range of insect pests by *B. bassiana* strain GHA, among which are species of the same family as the palm weevil (Curculionidae). There are also bibliographic references about other strains of *B. bassiana* which are able to reduce *R. ferrugineus* populations by different degrees (Dembilo *et al.*, 2010, El-Sufty *et al.*, 2009; Sewefy *et al.*, 2009). For these reasons, the Department of R+D of FuturEco Bioscience has recently initiated a research project with the aim to assessing the effectiveness of BOTANIGARD® SC on this new pest. The results obtained through preliminary bioassays with *B. bassiana* strain GHA on larvae and adults raise the possibility to request to the Spanish Authorities (MARM) for an extension of BOTANIGARD® SC registration, which will include the red palm weevil as a pest control target. However, it should be noted that semi-field and field trials are needed to validate the results obtained in the laboratory. If the execution of the project confirms the effectiveness of BOTANIGARD® SC on *R. ferrugineus* in field conditions, there will be a short-term real tool to control of this pest, since *B. bassiana* strain GHA is already registered in Europe.

BIBLIOGRAFÍA

- ANÓNIMO. 2006. *Picudo del Chile*, Boletín de Manejo. Boletín Técnico 98S0730B, Laverlam Internacional.
- DEMBILIO O., QUESADA-MORAGA E., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., JACAS J.A. 2010. *Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as a biological control agent against the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Invertebrate Pathology 104: 214-221
- EL-SUFTY R., AL-AWASH S.A., AL BGHAM S., SHAHDAD A.S., AL BATHRA A.H. 2009. *Pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill to the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) (Col.: Curculionidae) under laboratory and field conditions*. Egyptian J. Biol. Pest Control 19: 81-85.
- FERNÁNDEZ C., LARA J.M., TROYTIÑO I. & LOUIS M. 2005. *BOTANIGARD® SC, bioinsecticida de última generación para el control de mosca blanca y otros insectos*. Phytoma 173: 47-50.
- GÓMEZ-VIDAL S., LÓPEZ-LLORCA L.V., JANSSON H.-B. & SALINAS J. 2006. *Endophytic colonization of the date palm (Phoenix dactylifera L.) leaves by entomopathogenic fungi*. Micron 37: 624-632
- OEPP/EPPO. 2008. *Data sheets on quarantine pests*. Rhynchophorus ferrugineus. Bulletin 38, 55-59.
- PADILLA CUBAS A., CARNERO HERNÁNDEZ A., MOLINA SUÁREZ D., LARA J.M., FERNÁNDEZ C. 2008. *Semi-field trial with Metharizium anisopliae (Metschn.) strain to control Cosmopolites sordidus (Germar, 1924) (Coleoptera: Dryothotidae)*. International Congress of Entomology. Durban, South Africa, 6-12 July
- SEWIFY G.H., BELAL M.H., AL-AWASH S.A. 2009. *Use of the Entomopathogenic Fungus, Beauveria bassiana for the Biological Control of the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus Olivier*. Egyptian J. Biol. Pest Control 19, 157-163.
- TROYTIÑO I., FERNÁNDEZ C., LOUIS M. & LARA J.M. 2007. *Ensayos de estabilidad de BOTANIGARD® SC, biopesticida a base de esporas de un hongo entomopatógeno*. Phytoma 188: 61-64.
- TROYTIÑO I., FERNÁNDEZ C. & LARA J.M. 2008. *Compatibilidad de BOTANIGARD® SC con algunos insecticidas y fungicidas comerciales*. PHYTOMA 198: 58-60.
- VEGA F.E., POSADA F., CATHERINE AIME M., PAVA-RIPOLL M., INFANTE F. & REHNER S.A. 2008. *Entomopathogenic fungal endophytes*. Biological Control 46: 72-82.