

# Caracterización patogénica del hifomiceto entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

## Pathogenic characterization of entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

\*María Estrada Martínez<sup>1</sup>; Rafael Ojeda Suárez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Metropolitana del Ecuador

\*mestradam1659@gmail.com

### RESUMEN

*Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) constituye la plaga más dañina del cultivo de la caña de azúcar. Para el control de esta especie se utiliza la lucha biológica mediante insectos entomófagos, sin embargo, en el agroecosistema cañero ha sido detectada la presencia natural de otros enemigos naturales. El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización patogénica de 21 aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin mediante bioensayo comparativo en huevos, larvas y crisálidas de *D. saccharalis* (Fabricius). Se evaluaron diferentes concentraciones del hifomiceto entomopatógeno  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  conidiosporas/ml, se determinó el porcentaje de mortalidad por micosis y se calcularon el TL50 y la CL50. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de Newman - Keuls ( $p < 0.05$ ). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar los aislamientos más agresivos de *B. bassiana* para las larvas y crisálidas de *D. saccharalis*. Se demuestran las potencialidades del hifomiceto para su uso en el programa de lucha biológica contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana*, *Diatraea saccharalis*, caña de azúcar.

## ABSTRACT

*Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) is the most harmful pest in sugarcane cultivation. Biological control using entomophagous insects is required to control this species. However, in the sugarcane agroecosystem, it has been detected the presence of other natural enemies. This study aimed to determine the pathogenic characterization of 21 isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin by comparative bioassay in eggs larvae and pupae of *saccharalis* (Fabricius) D. Different concentrations of  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidiospores/ml of entomopathogenic hyphomycete were evaluated. The percent mycoses mortality was determined. TL50 and CL50 were also calculated. An analysis of variance of simple classification was performed, and means were compared by using the test of Newman - Keuls ( $p < 0.05$ ). The results allowed to select the most aggressive isolates of *B. bassiana* for larvae and *D. saccharalis* pupae. They also showed the potential of hyphomycete for the biological control program against the borer of sugarcane.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*, *Diatraea saccharalis*, sugarcane.

## INTRODUCCIÓN

En Cuba *Diatraea saccharalis* (Fabricius), constituye la principal plaga de la caña de azúcar por los daños agrícolas y pérdidas económicas que provoca en el cultivo. Para disminuir los niveles poblacionales del barrenador, se utiliza el método de lucha biológica mediante insectos entomófagos, sin embargo, existen pocos resultados sobre el uso de los hifomicetos entomopatógenos para el control de esta plaga (Alves et al., 2002)

*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ha sido una de las especies de hifomicetos entomopatógenos más estudiadas para su empleo en la lucha biológica contra los insectos plagas de los cultivos. La mayoría de los estudios han estado encaminados a la obtención y producción de formulaciones comerciales (Baluso y Fadamiro, 2013; Perfetti y Moreno, 2016), así como a su evaluación en condiciones naturales (Huerta et al, 2014; Wraight y Ramos, 2017).

La caracterización patogénica de *B. bassiana* ha estado basada en el estudio comparativo de los porcentajes de mortalidad por micosis provocados por el hifomiceto en función de las concentraciones y tiempos letales. Esta caracterización ha sido empleada para seleccionar los aislamien-

tos de *B. bassiana* contra *Ostrinia nubilalis* Hübner (Abdel Rahman et al, 2010) *Dione juno* (Cramer), (Zevallos et al, 2013) y *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Cardona y Grialdo, 2015).

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización patogénica de *B. bassiana* en huevos, larvas y crisálidas de *D. saccharalis* para la selección del hifomiceto como agente potencial para el control biológico del barrenador de la caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Todos los estadios de desarrollo utilizados en los experimentos fueron obtenidos a partir de la cría masiva de *D. saccharalis* en maíz (*Zea mays*, L.)

### Experimento en larvas:

Larvas del segundo y tercer estadio fueron sumergidas durante 10 segundos en suspensiones de concentración  $10^7$  conidios/ml de 21 aislamientos de *B. bassiana*. Posteriormente, las larvas fueron colocadas en viales estériles, mantenidas a 25°C, alimentadas con hojas de maíz tierno. Las

larvas testigos se sumergieron durante el mismo tiempo en agua destilada estéril y fueron mantenidas bajo las mismas condiciones. Se utilizaron 20 larvas por tratamiento y estos se repitieron cuatro veces.

Se realizaron observaciones diarias durante 10 días y se registró el número de larvas muertas, las que se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1%. Posteriormente, las larvas fueron situadas en cámara húmeda (placa de Petri con papel de filtro esterilizado y humedecido con agua destilada estéril glicerizada al 1%) e incubadas a 25°C (incubadora convencional marca Memmert con un rango de temperatura de -10°C a 75°C) hasta la aparición del microorganismo inoculado. El criterio de evaluación fue la determinación del porcentaje de mortalidad por micosis según Abbott (1925). Para normalizar la distribución de los datos, se utilizó la transformación  $\arcsen \sqrt{\%}$ . Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de Newman - Keuls ( $p < 0.05$ ) (STATITCF, 1988).

#### **Cálculo del TL50:**

El TL50 fue calculado solamente para los aislamientos que provocaron un porcentaje de mortalidad por micosis igual o mayor al 90% durante las observaciones del experimento. El TL50 se calculó a partir de las ecuaciones de regresión que expresan la relación entre el probit de la mortalidad y el logaritmo del tiempo. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de Newman - Keuls ( $p < 0.05$ ) (STATITCF, 1988).

#### **Cálculo de la CL50:**

Los aislamientos que provocaron valores igual o superior al 90% de porcentajes de mortalidad por micosis durante los 4 primeros días de observación, fueron sometidos a los ensayos de concentraciones crecientes del hifomiceto. Para ello las larvas del segundo y tercer estadio fueron sumergidas durante 10 segundos en suspensiones de concentración  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  conidios/ml. Posteriormente fueron colocadas en viales estériles, alimentadas con hojas de mazorca de maíz tierno e incubadas a 25°C. Las larvas testigos fueron sumergidas durante el mismo tiempo

en agua destilada estéril y mantenidas bajo las mismas condiciones experimentales.

Se realizaron observaciones diarias durante 10 días y se registró el número de larvas muertas, las que fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1% e incubadas a 25°C hasta la aparición del hongo inoculado. Se utilizaron 20 larvas por tratamientos y éstos se repitieron cuatro veces. La CL50 se calculó a partir de las ecuaciones de regresión que expresan la relación entre el probit de la mortalidad y el logaritmo de la concentración. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de Newman - Keuls ( $p < 0.05$ ) (STATITCF, 1988).

Atendiendo al porcentaje de mortalidad por micosis obtenido en los cálculos de la TL50 y de la CL50 se seleccionó un aislamiento de *B. bassiana* para ser evaluado en los huevos y crisálidas de *D. saccharalis*.

#### **Experimento en huevos:**

Puestas de *D. saccharalis* de 24, 48 y 72 horas de edad, fueron sumergidas durante 20 segundos en suspensiones de concentración  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  conidios/ml del aislamiento de *B. bassiana* seleccionado. Posteriormente, las puestas fueron colocadas en viales estériles (2,5 x 7,5 cm) con tapones, los cuales contenían en el fondo algodón con agua glicerizada al 1% para garantizar una higrometría saturada. Las puestas testigos se sumergieron durante el mismo tiempo en agua destilada estéril y se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales. En ambos casos las puestas tratadas y las testigos fueron incubadas a 25°C durante 7 días. Se realizaron observaciones diarias y se registró el número de embriones desarrollados (cabezas negras), el número de larvas eclosionadas y no eclosionadas por tratamientos.

Debido a la imposibilidad de separar los huevos de las puestas de *D. saccharalis*, se utilizó un número diferente de huevos por puesta que varió entre 43 y 54. Se empleó una puesta por tratamiento y estos se repitieron cuatro veces. Se calculó la viabilidad de los huevos mediante la fórmula de Scheider y Orelli modificada, citada por Almeida et al, (1984) donde:

$$\%V = 100 - \frac{V_{te} - V_{tr}}{V_{te}} \times 100$$

### Crisálidas:

Crisálidas de 24 horas de formadas fueron sumergidas durante 10 segundos en suspensiones de concentración de  $10^7$  conidios/ml del aislamiento 3 de *B. bassiana* seleccionado. Posteriormente éstas se colocaron en viales estériles con tapones que contenían en el fondo algodón con agua glicerada al 1% para garantizar una higrometría saturada. Las crisálidas testigos fueron sumergidas durante el mismo tiempo en agua destilada estéril. En ambos casos las crisálidas tratadas y las testigos se incubaron a 25°C durante 10 días. Se utilizaron 20 crisálidas por tratamiento y estos se repitieron cuatro veces.

Se realizaron observaciones diarias y se registró el número de crisálidas muertas las cuales fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1%, luego se situaron en cámara húmeda e incubaron a 25°C hasta la aparición del microorganismo inoculado. El criterio de evaluación utilizado fue el porcentaje de mortalidad por micosis según Abbott (1925). Para normalizar la distribución de los datos en porcentaje, se utilizó la transformación  $\arcsen \sqrt{\%}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimento en larvas:

En la Tabla 1 aparecen los resultados sobre la actividad patogénica de 21 aislamientos de *B. bassiana* en las larvas de *D. saccharalis* y se aprecia que las larvas son susceptibles al hifomiceto, ya que todos los aislamientos provocaron mortalidad por micosis en las larvas tratadas. De los 21 aislamientos ensayados a la concentración de  $10^7$  conidios/ml sólo los aislamientos 3, 4, 6 y 11 lograron valores iguales y superiores al 90% de mortalidad por micosis. Es importante señalar que estos aislamientos han sido obtenidos a partir de las larvas micosadas de *D. saccharalis* colectadas en diferentes áreas cañeras de Cuba al igual que los aislamientos 1, 2, 9, 10, 13, 15, 16, 17 y 19, sin embargo estos últimos no manifestaron valores significativos de mortalidad por micosis. Los resultados obtenidos confirman lo planteado por Muñoz et al., (2009) sobre las relaciones entre la patogenicidad de los aislamientos y su hospedante de origen, los hifomicetos entomopatógenos no aparecen estrechamente ligados a una especie, género o un grupo de hospedantes taxonómicamente homogéneo. El hecho de haber obtenido los aislamientos a partir de larvas con síntomas de micosis de *D. saccharalis* no significa que estos provoquen necesariamente altos valores de mortalidad en el lepidóptero.

Tabla 1. Actividad patogénica de las 21 aislamientos de *B. bassiana* en las larvas de segundo y tercer estadio de *Diatraea saccharalis* (Fabricius).

AISLAMIENTOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR MICOSIS (%)	AISLAMIENTOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR MICOSIS (%)
1	41 (h)	12	47(de)
2	45 (ef)	13	49(d)
3	98 (a)	14	31(j)
4	93 (b)	15	43(fg)
5	41 (h)	16	47(de)
6	91 (c)	17	42(gh)
7	40 (hi)	18	45(ef)
8	41(h)	19	41(h)
9	41(h)	20	31(j)
10	42(gh)	21	31(j)
11	90(c)	Testigo	0

ESx = 0.043

( ) Medias con letras desiguales difieren significativamente para la prueba de Newman - Keuls (p < 0.05).

Cuando se realizó el cálculo del tiempo letal medio (TL50) para los aislamientos 3, 4, 6 y 11, se obtuvo que el aislamiento 3 fue el más agresivo pues a los 2, 9 días provocó un 98 % de mortalidad por micosis en las larvas de *D. saccharalis*. (Tabla 2). El aislamiento 4 no presentó diferencias significativas y se considera también agresivo porque produjo un 91 % de mortalidad por micosis a los 3,5 días de observación del experimento.

La comparación de los tiempos letales (TL50) confirma la variabilidad de la actividad patogénica de los aislamientos de *B. bassiana* estudiados. Esta variabilidad intraespecífica fue observada por Lecuona et al, (1992) al evaluar diferentes aislamientos de *B. bassiana* aislados a partir de larvas *D. saccharalis*, colectadas en el mismo lugar y momento. Según estos autores son numerosos los factores que intervienen en la relación hospedante - patógeno, como por ejemplo la germinación rápida, la velocidad de reproducción y la producción de toxinas de los diferentes aislamientos de *B. bassiana*.

Al calcular las CL50 para los aislamientos 3 y 4 se observa que este valor está en el orden de  $10^6$  conidios/ml (Tabla 3). El aislamiento 3 presentó una CL50 de  $1,3 \times 10^6$  conidios/ml y aun-

que este valor no difirió estadísticamente de la concentración del aislamiento 4, a esa CL50 produjo un porcentaje de mortalidad por micosis de un 72,5 %.

El bioensayo permitió seleccionar el aislamiento 3 de *B. bassiana* como el más agresivo para las larvas del segundo y tercer estadio de *D. saccharalis* ya que manifestó un TL50 igual a 2,9 días (Tabla 2) y una CL 50 igual a  $1,3 \times 10^6$  conidios/ml (Tabla 3).

#### Experimento en huevos:

En la Tabla 4 se aprecian los porcentajes de viabilidad de los huevos de diferentes edades de *D. saccharalis* sometidos a concentraciones crecientes del hifomiceto. Los valores obtenidos resultaron superiores al 95 % de viabilidad, lo que significa que la mayoría de las larvas eclosionó. La resistencia de los huevos de este lepidóptero pudiera estar relacionada con la estructura del corión que varía entre los diferentes insectos en cuanto a la presencia de una endocutícula quitinosa y según Svedese et al. (2013) desencadena en el hifomiceto la inducción de enzimas catabólicas extracelulares (proteasas y quitinasas), las cuáles juegan un papel muy importante de la degradación de los tejidos de los insectos.

Tabla 2. Sensibilidad de las larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) a diferentes aislamientos de *B. bassiana*.

AISLAMIENTOS	TL50 (DÍAS)	INTERVALOS DE CONFIANZA	ECUACIÓN DE REGRESIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R <sup>2</sup> )	PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR MICOSIS (%)
3	2,9 (a)	2,4 - 3,5	$Y = 3,30 + 1,57x$	0,991	98
4	3,5 (b)	3,1 - 3,9	$Y = 3,42 + 1,25x$	0,863	91
6	4,5 (c)	4,3 - 4,7	$Y = 2,60 + 4,46x$	0,713	87
11	5,7 (d)	5,4 - 6,0	$Y = 0,19 + 2,63x$	0,695	85

Tabla 3. Sensibilidad de las larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) a diferentes concentraciones de los aislamientos 3 y 4 de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

AISLAMIENTOS	CL50 (CONIDIOS/ML)	ECUACIÓN DE REGRESIÓN	PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR MICOSIS (%)
3	$1,3 \times 10^6$ (a)	$Y = 4,70 + 5,27x$	72,50
4	$1,4 \times 10^6$ (a)	$Y = 5,75 + 4,34x$	61,66

Tabla 4. Viabilidad de los huevos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) a los 7 días de aplicación de los tratamientos.

CONCENTRACION (CONIDIOS/ML)	EDAD DE LOS HUEVOS (HORAS)	VIABILIDAD DE LOS HUEVOS (%)
0	24	98,57
	48	99,89
	72	95,89
10 <sup>5</sup>	24	96,25
	48	97,75
	72	99,66
10 <sup>6</sup>	24	97,95
	48	99,89
	72	98,65
10 <sup>7</sup>	24	97,95
	48	96,55
	72	99,71

**Experimento en las crisálidas:**

En la Figura 1 se aprecian los valores de los porcentajes de mortalidad por micosis provocados por el aislamiento 3 de *B. bassiana* en las crisálidas de *D. saccharalis*. A los 9 días de observación del experimento, el 100 % de las crisálidas tratadas con el hifomiceto manifestó mortalidad por micosis.

A pesar de que las crisálidas del barrenador se forman y desarrollan en el interior del tallo de la caña de azúcar, resulta importante conocer la susceptibilidad de esta fase del ciclo biológico de la plaga al hifomiceto entomopatógeno y más aún cuando se han colectado en condiciones naturales crisálidas con síntomas de micosis (Estrada et al, 2004).

En general, los hifomicetos entomopatógenos son capaces de infectar todas las fases del ciclo biológico de los insectos (Paes de Oliveira et al., 2008)), no obstante, resulta muy escasa la información que existe sobre la patogenicidad de estos microorganismos en las crisálidas de los lepidópteros plagas de los cultivos.

**CONCLUSIONES**

En un programa de lucha biológica el uso de hifomicetos entomopatógenos requiere del conocimiento previo de la sensibilidad de los diferentes

estadios de desarrollo del insecto plaga que se pretende controlar. En ese sentido, los resultados

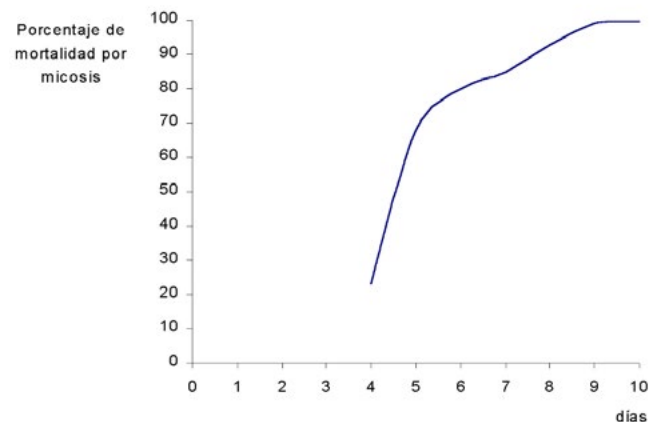


Figura 1. Sensibilidad de las crisálidas de *D. saccharalis* al aislamiento 3 de *B. bassiana*.

obtenidos permitieron conocer la susceptibilidad de las larvas y de las crisálidas de *D. saccharalis* a *B. bassiana*. Además, la variabilidad de la actividad patogénica evidenciada en los diferentes aislamientos de *B. bassiana* en las larvas del barrenador, permitió la selección del aislamiento 3 en función del TL50 y de la CL50.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265 - 269.

Almeida, L. C., S. B. Alves, P. S. M. Botelho, N. Degaspari, J. B. Pinheiro. 1984. Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) de diferentes idades. *Rev. Bras. Açuc.* 102 (2): 20 - 27, 1984.

Abdel, R. K. M., M. Barta, M. Cagáñ. 2010. Effects of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrauta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*. *Cen. Europ. Journ. of Biol.* 5(4): 472- 480.

Alves, S. B., L. S. Rossi, R. B. Lopes, M. A. Tamai, R. M. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:



- Cambridae) and Tetranychidae urticae (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 81:70- 77.
- Baluso, R., H., & Y. Fadamiro. 2013. Susceptibilidad de *Microtheca ochroloma* (Coleoptera: Chrysomelidae) para botánicos y formulación de insecticidas microbianos. *Flor. Entomol.* 96(3): 914- 921.
- Cardona, L. F., & A. S. Grialdo. 2015. Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera: Cambridae) a diferentes hongos entomopatógenos en caña panelera. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.* 19(2): 95- 103.
- Estrada, M. E., M. Romero, M. J. Rivero, F. Barroso. 2004. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido) en Cuba. *Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 42- 43.
- Estrada, Martínez M. E., M. J. Rivero Valido, C. Benito Jiménez. 2010. Molecular characterisation and application of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Diatraea saccharalis* (Fabricius). *Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 27:1-7.
- Huerta, A. J., F. Espinoza, A. T. Jurado, A. P. M. Gálvez, A. Arana Cuenca. 2014. *Biotech.* 8(1): 29 - 49.
- Lecuona, R. E., M. S. Tigano, B. M. Díaz. 1992. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 25 (2): 299 - 307.
- Muñoz, J. A., W. de la Rosa, J. Toledo. 2009. Mortalidad de *ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) por diversas cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin en condiciones de laboratorio. *Acta Zool. Mex.* 25(3): 609- 6224.
- Paes de Oliveira, M. A., E. J. Marquez, V. W. Teixeira, R. Barros. 2008. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Cambridae). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30(2):220-224.
- Perfetti, D. C., P. M. Moreno. 2016. Efecto de formulaciones acuosas y aceitosas de 13 aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae) bajo condiciones experimentales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27(4):771- 782.
- STATITCF, version 4.0, 1988.
- Svedese, V. M., P. V. Tiago, J. D. P. Bezerra, L. M. Paiva, E. A. de Luna, A. L. F. Porto. 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. *Afr. Journ. Biotech.* 12(46): 6491- 6497.
- Wraight, S. P., M. E. Ramos. 2017. Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions. *Biocontrol Science and Technology* 27(3): 348- 363.
- Zevallos, J. M., M. N. Cango, W. D. Larrabure. 2013. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada* 12(2): 75- 81.

