

EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

Netzahualcóyotl Barrón-Valle¹, Miguel B. Nájera-Rincón^{2*} y John Larsen³. ¹Universidad Tecnológica de Morelia, Av. Vicepresidente Pino Suárez 750 Col. Industrial Morelia, Michoacán, México C.P 58200. ²Campo Experimental Uruapan (INIFAP). Av. Latinoamericana 1101 Col. Revolución Uruapan, Michoacán, México. C.P 60150. ³Laboratorio de Agroecología. Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco-UNAM). Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex Hacienda de San José de La Huerta. C.P. 58190, Morelia, Michoacán. ¹natzabar91@gmail.com. ^{2*} Autor por correspondencia: minaj47@hotmail.com

RESUMEN: Se presentan resultados de la evaluación del potencial como agentes de control biológico de 31 aislados de *Beauveria bassiana* obtenidos en medio de cultivo semi-selectivo a partir de muestras de suelos agrícolas procedentes de diversas localidades del Estado de México y Guanajuato. Para su evaluación se utilizaron larvas de último estadio de *Galleria mellonella* y dosis bajas de los entomopatógenos (10^4) con el objeto de seleccionar aquellos aislamientos que en baja densidad ocasionaran mortalidad alta (\geq al 70%). Ocho aislados fueron seleccionados los cuales tienen potencial como agentes de control biológico y serán evaluados en bioensayos contra insectos plaga edafícolas de importancia en agroecosistemas de maíz.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, control biológico, evaluación

Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents

ABSTRACT: Results from an evaluation of the biological control potential of 31 isolates of *Beauveria bassiana* are presented. Isolates of *B. bassiana* were obtained from agricultural soil samples from several locations in the State of Mexico and Guanajuato using semi-selective culture medium. Last instar larvae of *Galleria mellonella* and low dose (10^4) of *B. bassiana* were employed in the evaluation in order to select isolates of *B. bassiana* that can cause high mortality rates (\geq 70%) at low inoculum density. Eight isolates with strong potential as biological control agents were selected and these isolates will be tested in bioassays against soil dwelling insect pest in corn agroecosystems.

Key words: *Beauveria bassiana*, biological control, evaluation

Introducción

Los hongos entomopatógenos pueden aislarse con base en su crecimiento sobre cadáveres de insectos o mediante el uso de medios de cultivo selectivo a partir de muestras de suelo. La mayoría de la investigación sobre los hongos entomopatógenos se ha dirigido a su desarrollo como agentes de control biológico de insectos y ácaros (Butt *et al.*, 2001; Goettel *et al.*, 2005). Esto se consigue normalmente a través de una estrategia en la que el control de plagas se basa en la acción del agente liberado, pero no en las generaciones sucesivas del hongo.

Se ha estimado que existen alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos agrupadas en aproximadamente 90 géneros. *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria* son los géneros más fáciles de producir masivamente y comercializarlos para control biológico de insectos. Sin embargo, el grado de patogenicidad está en función de diversos factores como la densidad, persistencia y susceptibilidad (Vega *et al.*, 2009).

Los hongos entomopatógenos se distribuyen en una amplia variedad de hábitats incluyendo bosques, terrenos agrícolas, pastizales, desiertos, y hábitats urbanos (Sánchez -Peña., 1990; Lacey *et al.*, 1996; Chandler *et al.*, 1997).

Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) es un insecto que se utiliza ampliamente para el aislamiento de hongos entomopatógenos (Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Klingen *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2003; Meyling *et al.*, 2006). El método de cebo con *G. mellonella* es el más recomendado, por su alto nivel de susceptibilidad y por su facilidad de crianza (Zimmermann, 1986).

La selección de aislados virulentos, adaptados a las condiciones bióticas y abióticas de los agroecosistemas, es uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de micoinsecticidas (Cortez-Madrigal, *et al.*, 2003; Keller y Zimmermann, 1989). El aislamiento de hongos entomopatógenos implica el muestreo de suelos, ya que es su hábitat natural (Asensio *et al.*, 2003). También es interesante comparar la diversidad de hongos entomopatógenos en diferentes ambientes del ecosistema para obtener una mayor variedad de microorganismos (Cross *et al.*, 1999; Bidochka *et al.*, 1998; Asensio *et al.*, 2003).

Numerosos estudios demuestran que los aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son potenciales agentes de control biológico en diversos cultivos y productos almacenados (Tanya y Doberski *et al.*, 1984; Adane *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1998; Dal Bello *et al.*, 2001; Ekesi *et al.*, 2001; Padin *et al.*, 2002; Khashaveh *et al.*, 2008).

El objetivo del presente estudio fue evaluar y seleccionar aislados de hongos entomopatógenos, obtenidos a partir de muestras de suelo en dos sistemas de producción de maíz, como potenciales agentes de control biológico de insectos plaga.

Materiales y Método

El material utilizado para realizar la evaluación de hongos entomopatógenos consistió en obtener triplicados de 31 aislados de *B. bassiana* obtenidos de muestras de suelo procedentes de dos sistemas de producción de maíz en localidades del estado de Guanajuato (La Charca, San Cristóbal y Gpe. Paso Blanco) y Estado de México (San Pablo Ixayoc). Los triplicados fueron sembrados en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados durante 7 días a 26° C. La cosecha de esporas se realizó con asa bacteriológica, agua destilada estéril y dispersante (Tween 0.01%). De cada aislado se efectuaron cinco diluciones (1×10^8 - 1×10^4) y un control con agua destilada estéril y dispersante. Para la evaluación se tomó la mayor dilución con el objeto de seleccionar aquellos aislados que a una baja densidad de esporas mostraran porcentajes de infección y mortalidad igual o mayor al 70%. Las diluciones 1×10^8 y 1×10^5 se utilizaron para reactivar en insecto el hongo entomopatógeno obtenido del suelo y monitoreo de la infección respectivamente. La densidad de esporas se determinó en cámara de Neubauer. La aplicación del tratamiento fue por contacto (5 minutos) de larvas de último estadio *G. mellonella* en una suspensión de 2 mL del aislado (Fig. 1). Para cada evaluación se seleccionaron 10 larvas. Una vez sometidas al tratamiento, las larvas se depositaron en forma individual en cámara húmeda y se incubaron durante 6 días a 26° C. Los recipientes se revisaron cada 48 horas para observar los síntomas de infección y mortalidad de larvas. Una vez transcurridos los 6 días de evaluación, las larvas que presentaron infección fúngica, se conservaron en refrigeración a 3°C en un banco de aislados de hongos entomopatógenos reactivados en insectos.

Resultados y Discusión

De un total de 31 aislados (20 del Estado de México y 11 de Guanajuato), ocho registraron porcentajes de infección y mortalidad igual o mayor al 70%. De éstos, siete fueron del Estado de México y uno de Guanajuato (Fig.3). El tiempo de infección y mortalidad fue diferente en cada aislado. El mayor porcentaje de mortalidad fue de 90% en los aislados 14BbSEM y 17BbSEM originarios del Edo. De México, mientras que en los de Guanajuato, el aislado 24BbSG presentó una mortalidad del

70%. Los aislados que registraron porcentajes de infección y mortalidad igual o mayor a 70%, tienen potencial para el control biológico de insectos plaga. Los síntomas de infección en larvas de último estadio de *G. mellonella* se muestran en la figura. 2.

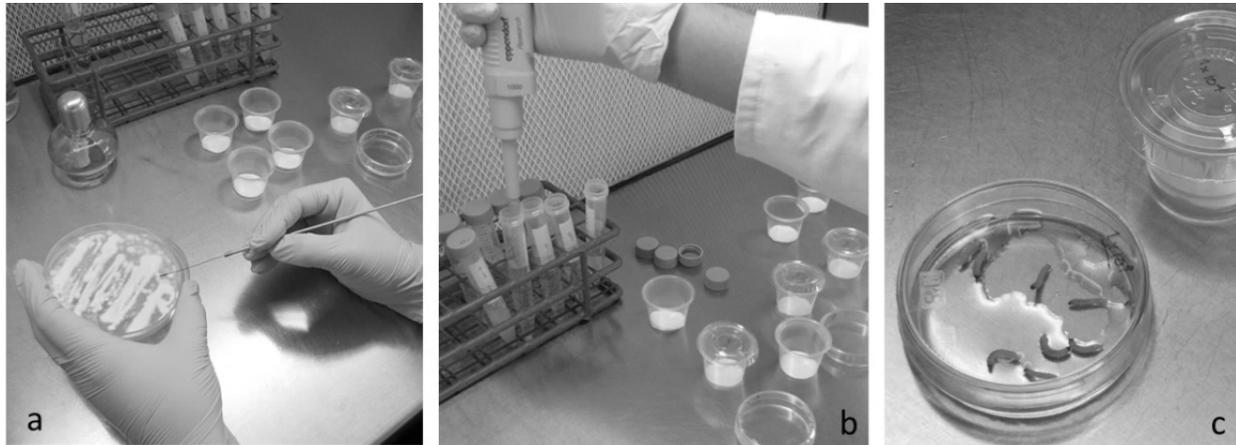


Figura 1. Aspectos del proceso de evaluación. a) Cosecha de esporas. b) Preparación de diluciones. c) Aplicación del tratamiento por contacto.

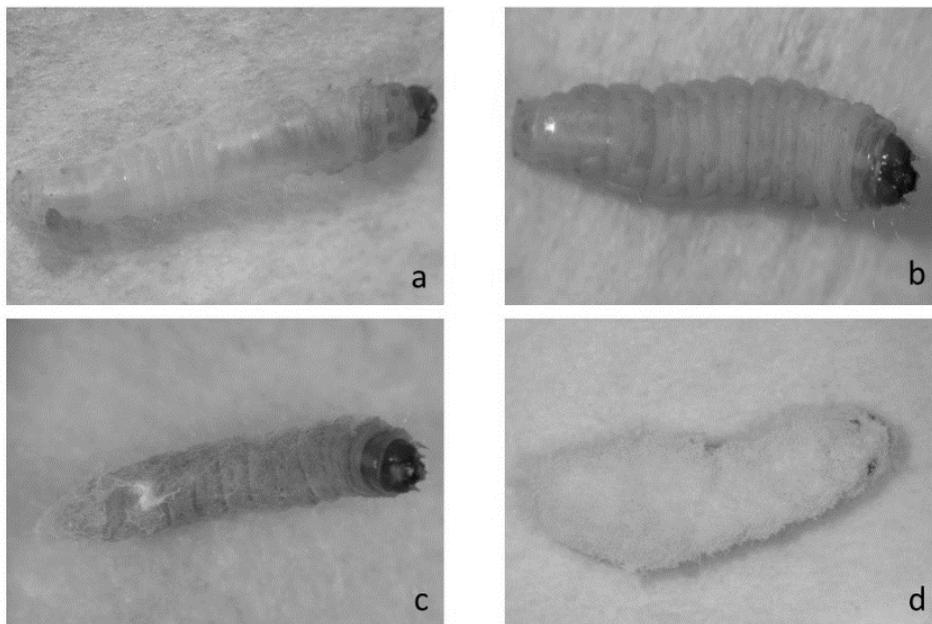


Figura 2. Síntomas de infección en *G. mellonella* ocasionados por *B. bassiana*: a) Día de la aplicación b) Segundo día después de la aplicación c) Cuarto día después de la aplicación d) Sexto día después de la aplicación.

La infección y mortalidad en larvas de último estadio de *G. mellonella* ocasionada por *B. bassiana* se presentó dos tipos de comportamiento, el primero presenta mortalidad a partir del segundo día de la infección, aumentando gradualmente al cuarto y sexto día, el segundo presenta mortalidad a partir del cuarto día y registra un aumento máximo el sexto día, ambas tendencias muestran que cada aislado tiene diferente grado de virulencia (Fig. 4).

Conclusiones

De un total de 31 aislados evaluados, el 25% fue seleccionado como agente con potencial para el control biológico de insectos. Los resultados son preliminares, cada aislado seleccionado deberá evaluarse en insectos plaga, en principio, con hábitos edafícolas como la “gallina ciega” y “diabrotica” que con frecuencia ocasionan daños considerables en agroecosistemas maíz en Guanajuato y Estado de México.

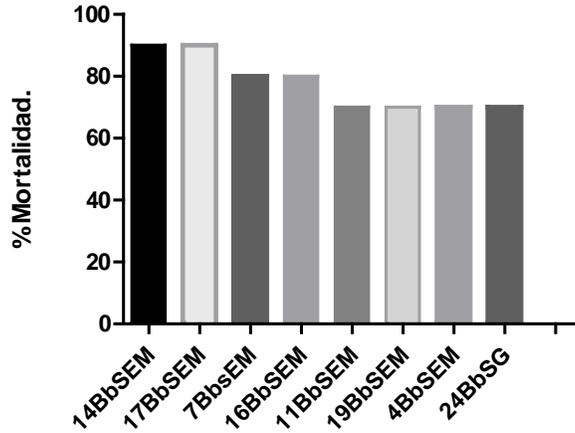


Figura. 3. Aislados de *B. bassiana*, con porcentaje de infección y mortalidad igual o mayor al 70% (EM=Estado de México y G=Guanajuato).

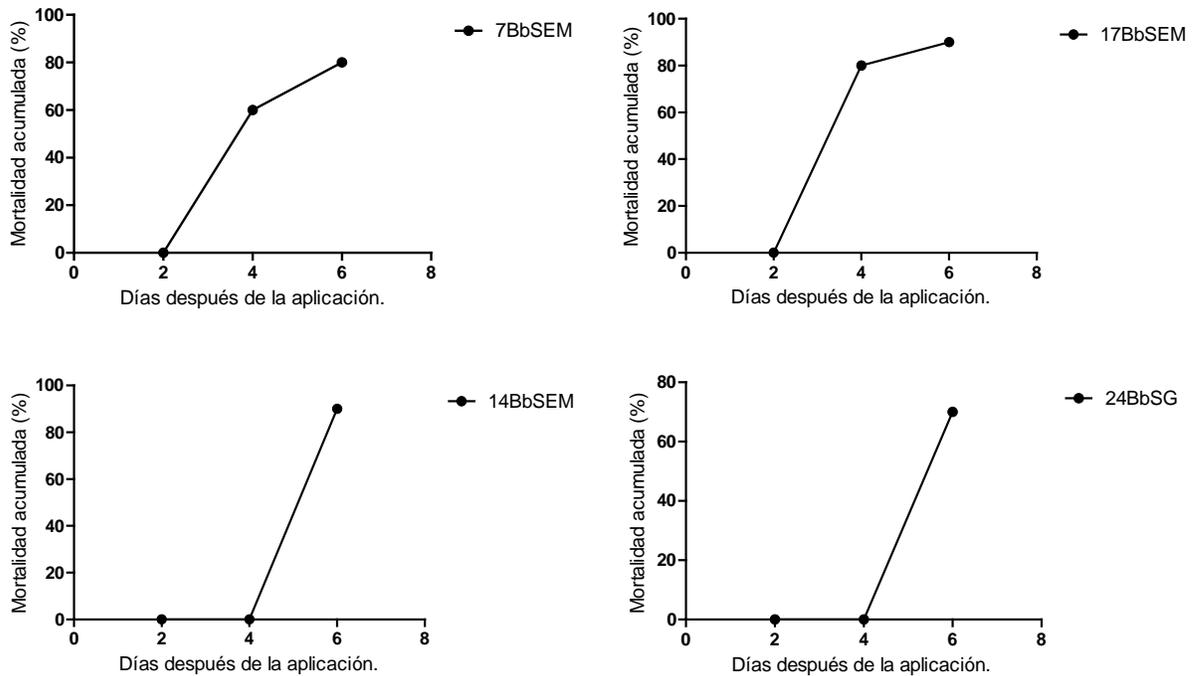


Figura. 4 Comportamiento de infección y mortalidad de aislados de *B. bassiana* de Guanajuato (24BbSG) y Estado de México (7BbSEM, 17BbSEM, 14BbSEM).

Agradecimientos

El presente trabajo es una contribución al proyecto "Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz" financiado por el CONACYT, a través de la propuesta de Investigación Básica (SEP-CONACYT 2012-179319). A la empresa Agrobiológicos del Noroeste (AGROBIONSA) colaboradores del proyecto, por facilitar el material biológico (*G. mellonella*), en particular al Ing. Enrique Garza González y Quím. Emilia Cárdenas.

Literatura Citada

- Adane K, Moore D, Archer SA. 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *J Stored Prod Res* 32:105–113.
- Asensio L, Carbonell T, López-Jiménez JA, López-Llorca LV. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Span J Agric Res* 3:37–45.
- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can J Bot* 76:1198–1204.
- Butt T. M. C; Jackson y N. Magan. 2001. Introduction–Fungal Biological Control Agents. EN: Fungi as Biocontrol Agents. Progress, problems and potential. Edit. Cabi Publishing is a division of CAB International. Pag. 1-8.
- Chandler D, Hay D, Reid AP. 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Appl Soil Ecol* 5:133–141.
- Cortez-Madrighal H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo- Mojica H, Ortíz-García CF, Aceves-Navarro LA. 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *Biocontrol* 48:321–334
- Cross JV, Solomon MG, Chandler D, Jarrett P, Richardson PN, Winstanley D, Bathon H, Huber J, Keller B, Langenbruch GA, Zimmermann G. 1999. Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe. Microbial agents and nematodes. *Biocontrol Sci Technol* 9:125–149.
- Dal Bello G, Padin S, Lopez Lastra C, Fabrizio M. 2001. Laboratory evaluation of chemical biological control of rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. in store grain. *J Stored Prod Res* 37:77–84.
- Ekesi S, Egwurube EA, Akpa AD, Onu I. 2001. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the control of the groundnut bruchid, *Caryedon serratus* on groundnut. *J Stored Prod Res* 37:313–321.
- Goettel MS, Eilenberg J, Glare TR. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. EN: Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 6. Elsevier, Boston, pp. 361–406
- Hidalgo E, Moore D, Le Patourel G. 1998. The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *J Stored Prod Res* 34:171–179
- Keller S., Zimmermann G. 1989. Mycopathogens of soil insects. EN: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF (eds) *Insect–fungus interactions*. Academic press, New York, pp 239–270.
- Keller, S., Kessler, P. and Schweizer, C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48, 307-319.

- Khashaveh A, Safaralizade MH, Ghosta Y. 2008. Pathogenicity of three Iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against Granary Weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). *J Biol Sci* 8:804–808.
- Klingen, I., Eilenberg, J. and Meadow, R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 91, 191-198.
- Lacey LA, Fransen JJ, Carruthers R. 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. EN: Gerling D, Mayer R (eds) *Taxonomy, biology, damage, control and management*. Intercept, Andover, pp 401–433.
- Meyling, N.V., Pell, J.K. and Eilenberg, J. 2006. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 121-126.
- Padin S, Bello GD, Fabrizio M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *J Stored Prod Res* 38:69–74.
- Sánchez-Peña SR. 1990. Some insect-and spider-pathogenic fungi from Mexico with data on their host range. *Fla Entomol* 73: 517–522.
- Tanya S, Doberski J. 1984. An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *J Stored Prod Res* 20:17–23.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwellc, M., Chandlerd, D., Jacksone, M.A., Kellerf, S., Koikeg M., Manianiah, N.K., Monzóni, A., Ownleyj, B.H., Pellk, J.K., Roy, H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. University of Warwick institutional repository
- Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102, 213-215.