

PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* CONTRA *Rhyssomatus nigerrimus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Sergio Alberto Mejía-Ortiz^{1,2}, Jaime Gómez-Ruiz¹, Guillermo López-Guillén², Leopoldo Cruz-López¹. ¹Departamento de Entomología Tropical, El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, CP 30700, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, CP 30870, México. lopez.guillermo@inifap.gob.mx.

RESUMEN: El picudo de la vaina de soya, *Rhyssomatus nigerrimus* es una plaga que causa pérdidas económicas importantes al cultivo de soya debido a los daños directos e indirectos que ocasiona; por lo que es importante desarrollar métodos de control para disminuir las pérdidas en la producción. El objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* contra adultos de *R. nigerrimus* en laboratorio. Los resultados de los bioensayos mostraron que todos los picudos tratados con las cepas de *B. bassiana* evaluadas presentaron mayores porcentajes de mortalidad que el testigo. La cepa Bb-13, fue la que presentó la TL₅₀ más baja con 7.5 días a una concentración de 1x10⁸ conidios/mL. La cepa Bb-Hy presentó la menor concentración letal. Los resultados muestran que el hongo entomopatógeno *B. bassiana* puede ser usado para el control biológico de *R. nigerrimus*.

Palabras clave: *Rhyssomatus nigerrimus*, *Beauveria bassiana*, soya.

Virulence of *Beauveria bassiana* against *Rhyssomatus nigerrimus* (Coleoptera: Curculionidae) in laboratory conditions

ABSTRACT: The weevil pod soybean, *Rhyssomatus nigerrimus*, is a pest that causes economic losses in soybean. To develop methods of control to diminish the damage caused for *R. nigerrimus* is necessary. The aim of this work was to evaluate different strains of *Beauveria bassiana* against *R. nigerrimus* adults in laboratory. The strains of *B. bassiana* caused more mortality than the control. The Bb-13 strain was the most virulent with TL₅₀ of 7.5 days to concentration of 1x10⁸ conidia/mL. The Bb-Hy strain presented the better median lethal concentration. The results show that the entomopathogenic *B. bassiana* may be used for the biological control of *R. nigerrimus*.

Key words: *Rhyssomatus nigerrimus*, *Beauveria bassiana*, soybean.

Introducción

El picudo de la vaina de la soya *Rhyssomatus nigerrimus* Fahraeus (Coleoptera: Curculionidae), es un insecto plaga que daña tanto los estados reproductivos como vegetativos del cultivo de soya en los estados de Chiapas, Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz (López-Guillén *et al.*, 2012; Terán-Vargas, 2013 comentario personal). Los machos y hembras adultos se alimentan de las partes vegetativas de las plantas de soya, y las hembras además depositan sus huevecillos dentro de las vainas con granos verdes de soya. En el interior de las vainas se desarrollan las larvas, las cuales se alimentan parcial o totalmente de los granos, y después se dejan caer al suelo para pupar y desarrollarse hasta convertirse en adultos (López-Guillén *et al.*, 2012). Cuando se presentan poblaciones altas del picudo, el rendimiento de los cultivos de soya disminuye significativamente.

Actualmente, El picudo de la soya se combate por medio de productos químicos, tales como endosulfan, clorpirifos, fipronil, tiametoxam, etc. Algunos de los productos anteriores están restringidos a ciertos cultivos, por ejemplo, el endosulfan, sólo está autorizado para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Por lo que el uso indiscriminado de insecticidas para controlar a *R. nigerrimus* puede afectar el medio ambiente, la salud de los trabajadores de las parcelas de soya y

eventualmente, el picudo puede desarrollar resistencia a alguno de los insecticidas antes mencionados, por lo que es importante buscar nuevas alternativas de control de esta plaga. Una de las alternativas para el combate del picudo es el control biológico por medio de hongos entomopatógenos, específicamente a través del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, el cual se ha encontrado en forma natural en aproximadamente unas 700 especies de hospederos de ordenes diferentes (Meyling y Eilenberg, 2007; Zimmermann, 2007.). Y además, se ha colectado infectando a adultos de *R. nigerrimus* en forma natural en algunas parcelas de soya del Soconusco, Chiapas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad de diferentes cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *R. nigerrimus* en laboratorio.

Materiales y Método

Material biológico. Para asegurar que los adultos de *Rhyssomatus nigerrimus* tuvieran edades similares, dada la estrecha sincronización que existe entre la emergencia de los adultos con el desarrollo del cultivo, fueron colectados en la misma etapa fenológica de la soya en estado de plántula durante la primer emergencia de adultos en un cultivo de soya localizado en el municipio de Tapachula, Chiapas. En laboratorio los insectos se alimentaron con vainas de soya, las cuales se cambiaron diariamente. Los picudos se mantuvieron a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, humedad relativa de $70\% \pm 5$, y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

En el caso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, las ocho cepas usadas fueron obtenidas de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Procedencia de las cepas de *B. bassiana*, utilizados en este estudio.

Cepas de <i>B. bassiana</i>	Hospedero de precedencia	Lugar de asilamiento
Bb-4	<i>Hypotenemus hampei</i>	Ecuador
Bb-8	<i>Leptinotarsa sp.</i>	Texcoco, México
Bb-13	Aislada de una formulación preparada	Rusia
Bb-15	<i>Chalcodermus aeneus</i>	Goias, Brasil
Bb-18	Lava de Lepidóptero	Papantla, Veracruz, México.
Bb-19	Larva de Lepidóptero	Gregorio Méndez, Tabasco, México
Bb-Rhy	<i>Rhyssomatus nigerrimus</i>	Tapachula, Chiapas, México
Bb-Hy	<i>Hypotenemus hampei</i>	Finca Alianza, Municipio de Cacahoatán, Chiapas, México

Pruebas de patogenicidad y TL₅₀. De una suspensión homogenizada, la cual se hizo con 20 mL de agua destilada estéril, más una gota de Tween 80 al 0.1 % y esporas cosechadas de medios de cultivo sólido de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), se preparó mediante la cámara de Neubauer una solución del hongo entomopatógeno a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, utilizando un microscopio compuesto. Posteriormente los adultos de *R. nigerrimus* fueron sumergidos en la solución fúngica durante 20 segundos, luego fueron colocados en papel filtro para eliminar el exceso de solución e inmediatamente se depositaron en frascos de 1.5 L de volumen. Todos los picudos tratados y el control fueron alimentados de acuerdo a lo mencionado anteriormente, se mantuvieron en un cuarto experimental a una temperatura de $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad. Se utilizaron 50 adultos por tratamiento, 10 adultos por repetición y cinco

repeticiones para cada una de las cepas, más un control consistente de 50 adultos. Se hizo una revisión cada 24 horas durante 20 días, contabilizando el número diario de insectos muertos, los cuales fueron retirados de los frascos y colocados en cámaras húmedas para observar el crecimiento micelial. La mortalidad obtenida a los 20 días de observación sirvió para determinar la patogenicidad, mientras que las observaciones diarias fueron utilizadas para determinar la TL₅₀.

Determinación de CL₅₀. Para esta prueba, se utilizaron las cepas que presentaron menores tiempos letales medios, las cuales fueron Bb-Hy, Bb-Rhy y Bb-13. Se prepararon soluciones fúngicas de 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 conidios/mL, para cada una de las tres cepas. Se procedió a inocular los adultos de *R. nigerrimus*, sumergiéndolos durante 20 segundos en la solución de *B. bassiana*, luego fueron colocados en frascos de plástico con alimento y agua. Se mantuvieron en condiciones controladas antes mencionadas. Se utilizaron 10 adultos con cinco repeticiones para cada concentración para cada una de las tres cepas más un control. Se hizo una revisión cada 24 horas durante 20 días y los adultos muertos se colocaron en cámaras húmedas.

Análisis estadístico de datos. Para determinar la TL₅₀ se realizó un análisis de sobrevivencia utilizando el modelo proporcional de Cox (Zwiener *et al.*, 2011) y posteriormente se determinaron los límites fiduciales para cada cepa evaluada. Para la CL₅₀ se realizó un análisis Probit de las tres cepas evaluadas. Para determinar los porcentajes de mortalidad se realizó un ANOVA y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Los análisis se hicieron con el software R.

Resultados

Determinación de patogenicidad y TL₅₀. Los bioensayos realizados en esta prueba indicaron que las ocho cepas de *Beauveria bassiana* fueron patogénicas contra los adultos de *Rhyssomatus nigerrimus*, debido a que se obtuvieron mortalidades superiores al 50 % (Fig. 1), causando mortalidades que fluctuaron entre 76% y el 98% a los 20 días de la evaluación. La cepa más virulenta fue la cepa Bb-Hy que causó un 98% de mortalidad, la cual no fue estadísticamente diferente de las cepas Bb-18, Bb-13, Bb-19, Bb-15 y Bb-Rhy, pero sí de las cepas Bb-4 y Bb-8, que presentaron un porcentaje de mortalidad más bajo. Las cepas Bb-4 y Bb-8 tampoco presentaron porcentajes de mortalidad estadísticamente diferentes a las de las cepas Bb-18, Bb-13, Bb-19, Bb-15 y Bb-Rhy. Todas las cepas presentaron porcentajes de mortalidad estadísticamente diferentes al control.

La cepa Bb-13, fue la que presentó la TL₅₀ más baja con 7.5 días a una concentración de 1×10^8 conidios/ml (Cuadro 2), seguido por las cepas Bb-Hy y Bb-Rhy, que presentaron 8.5 días cada una, respectivamente (Cuadro 2, Fig. 2), mientras que las cepas Bb-4 y Bb-8 fueron los que presentaron los TL₅₀ más altas con 14.5 días cada una. Sin embargo, las cepas Bb-13, Bb-Rhy, Bb-Hy y Bb-19 presentan similitudes con respecto a los límites fiduciales, así, también las cepas Bb-15 y Bb-18 son similares, lo mismo sucedió para las cepas Bb-4 y Bb-8. Por lo anterior podemos decir que existen diferencias entre las cepas Bb-Rhy, Bb-Hy, Bb-13 y Bb-19 de las cepas Bb-4 y Bb-8.

Determinación de CL₅₀. Los resultados de la concentración letal de las tres mejores cepas utilizadas en adultos de *R. nigerrimus* fueron 1.07×10^7 , 1.55×10^7 y 1.31×10^{10} conidios/ml obtenidos con las cepas Bb-Hy, Bb-13 y Bb-Rhy, respectivamente, lo que indica que la cepa Bb-Hy presentó la menor concentración letal (Cuadro 3).

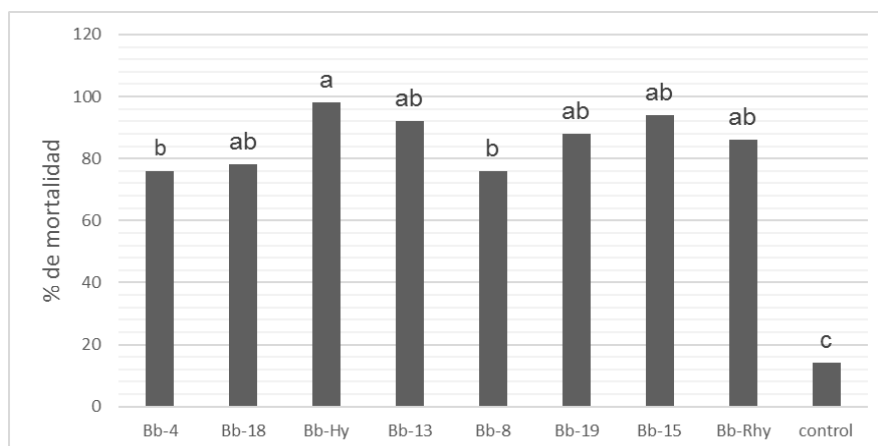


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *R. nigerrimus* a los 20 días de ocho cepas diferentes del hongo entomopatógeno *B. bassiana* a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p \leq 0.05$)

Cuadro 2. Tiempos letales de las cepas del hongo *B. bassiana* más error estándar (EE) que fueron evaluadas contra los adultos de *R. nigerrimus*.

Cepa	TL ₅₀ + EE	Límites Fiduciales	
		Inferior	Superior
Bb-Rhy	8.5 ± 1.18	6.19	10.81
Bb-Hy	8.5 ± 0.79	6.96	10.04
Bb-13	7.5 ± 0.64	6.25	8.75
Bb-15	11.5 ± 1.18	9.19	13.81
Bb-18	12.5 ± 1.51	9.54	15.46
Bb-19	9.5 ± 0.71	8.12	10.88
Bb-4	14.5 ± 1.75	11.06	17.94
Bb-8	14.5 ± 1.00	12.53	16.47

Cuadro 3. Concentración letal, obtenidas para las tres mejores cepas de *B. bassiana* evaluadas contra adultos de *R. nigerrimus*.

cepa	CL ₅₀	Límites fiduciales	
		inferior	superior
Bb-Hy	1.07×10^7	5.92×10^5	2.74×10^7
Bb-13	1.55×10^7	8.31×10^5	4.0×10^7
Bb-Rhy	1.31×10^{10}	2.59×10^7	9.84×10^{10}

Discusión

Este es el primer trabajo donde se evalúa la efectividad del hongo *Beauveria bassiana* sobre los adultos del picudo de la vaina de soja, *Rhyssomatus nigerrimus*. Los resultados obtenidos en este estudio bajo condiciones de laboratorio nos indican que todas las cepas evaluadas fueron patogénicas, y

que alguna de ellas con los porcentajes de mortalidad más altos pueden ser utilizadas eventualmente en campo como medida para el control de *R. nigerrimus*. Los porcentajes de mortalidad ocasionadas por las cepas evaluadas sobre los picudos de la soya, entre el 75% y el 98%, fueron superiores a los reportados en otros trabajos donde se evaluaron algunas cepas de *B. bassiana* contra algunas especies de curculionidos, tales como el escarabajo del pino blanco, *Pissodes strobi* (Peck) (Coleoptera: Curculionidae) (Trudel *et al.*, 2007), cuyo porcentaje de mortalidad obtenida con la cepa más patogénica fue de 85.5%. Así mismo, nuestros resultados son similares con los reportados en el picudo rojo de la palma *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.) (Coleoptera: Curculionidae) (El-sufy *et al.*, 2009).

Conclusiones

En conclusión en este trabajo se encontró que al menos dos cepas del hongo *Beauveria bassiana* mostraron resultados promisorios y que pueden ser utilizadas con fines de control biológico contra el picudo de la soya, *Rhyssomatus nigerrimus*, sin embargo, es indispensable realizar evaluaciones en campo para conocer su efectividad biológica. Además, se deben evaluar en campo las formulaciones en las que debe ir el hongo entomopatógeno y el tiempo de aplicación más indicado de acuerdo a la fenología del cultivo de soya.

Agradecimientos

Al CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto: Biología, ecología y comportamiento del picudo negro de la vaina de soya en el trópico húmedo (clave: CB-2010-152846-Z).

Literatura Citada

- El-sufy, R., S.A. Al-Awash, S. Al Bgham, A.S. Shahdad, and A.H. Al Bathra. 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 Journal of Biological Pest Control, 19: 81-85.
- López-Guillén, G., A. P. Terán-Vargas, J. Gómez Ruiz, J. San-Juan Lara, G. H. Rosado-Neto, C. W. O'Brien, L. Cruz-López, L.A. Rodríguez-Del-Bosque, and R. Alatorre-Rosas. 2012. First Record of *Rhyssomatus nigerrimus* (Curculionidae: Molytinae: Cleogonini) Infestations in soybeans in Mexico. Florida Entomologist, 95: 524-528.
- Meyling, N.V., and J. Eilenberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biological Control, 43: 145-155.
- Trudel, R., R. Lavallée, C. Guertin, C. Côté, S. I. Todorova, R. Alfaro, H., and Kope. 2007. Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). Journal of Applied Entomology, 131: 90-97.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocontrol Science and Technology, 17: 553-596.
- Zwiener I., Blettner M., Hommel G. 2011. Survival Analysis. Deutsches Aertzblatt International, 108: 163-169.