

EVALUACIÓN DE CONIDIOS Y LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE *Beauveria bassiana*, SOBRE LARVAS DE *Cyclocephala lunulata* BURMEISTER (COLEOPTERA: MELONLONTHIDAE), BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Lluvia de Carolina Sánchez-Pérez¹; Silvia Rodríguez-Navarro¹; Juan Esteban Barranco-Florado²; Miguel Ángel Ramos-López³; Reyes López-Ordáz¹ y Antonio Flores-Macias¹. Departamento de Producción Agrícola y Animal¹; Departamento de Sistemas Biológicos²; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso #1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán. México 04960. Facultad de Química³, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro. México. ¹llullina@hotmail.com; ¹srodnavarro@gmail.com; ²barranco@correo.xoc.uam.mx; ³agromyke@yahoo.com. ¹aflores981@gmail.com

RESUMEN: Se evaluaron conidios y extractos enzimáticos de *B. bassiana* en larvas de *Cyclocephala lunulata*. Las larvas se colectaron en la UAM- X, se estableció un bioensayo con 6 tratamientos y 10 repeticiones. Hubo 100% de mortalidad en los tratamientos B, C, D. Excepto para los F y G con un 60 y 90% respectivamente, existiendo diferencia significativa. Al evaluar el tiempo de muerte existió diferencia significativa ($p = 0.0120$) que muestra una aceleración de la mortalidad. Las enzimas hidrolíticas degradan el tegumento de los insectos y son tóxicas posiblemente porque desregulan el proceso de melanización, ocasiona la muerte del insecto. Con los resultados obtenidos al aplicar extractos y conidios se observó la reducción del tiempo de muerte de los insectos, ya que aceleran la degradación del tegumento y la penetración del hongo en del insecto.

Palabras clave: *Cyclocephala lunulata*, conidios, extractos enzimáticos, toxicidad, muerte.

Evaluation of conidia and the toxicity of extracts enzymatic of *Beauveria bassiana*, on larvae of *Cyclocephala lunulata* Burmeister (Coleoptera: Melonlonthidae), under laboratory conditions

ABSTRACT: Conidia and enzyme extracts of *Beauveria bassiana* were evaluated in larvae of *Cyclocephala lunulata*. The larvae were collected in the UAM-X and a bioassay was established with 6 treatments and 10 repetitions. There was 100% mortality in treatments B, C, D. There was statistically significant difference for the treatments F and G with a 60 and 90% respectively. There was a significant difference ($p=0.0120$) in the time of death that shows an acceleration of the mortality. The hydrolytic enzymes degrade the integument of the insects and were toxic possibly because of deregulating the process melanization and cause the death of the insect. With the results obtained, it should be noted the reduction in the time of death of insects, caused by the conidia and the toxicity of the enzyme extracts that accelerate the degradation of the integument and the penetration of the fungus in the insect.

Key words: *Cyclocephala lunulata*, conidia, enzyme extracts, toxicity, death.

Introducción

El género *Cyclocephala* Dejean (Coleoptera: Melolonthidae), agrupa cerca de 325 especies, distribuidas desde el sureste de Canadá hasta Argentina y Las Antillas, presentando la mayor diversidad asociada a la región neotropical (Ratcliffe, 2003). De acuerdo con Krajcik (2005) existen 30 géneros y 176 especies de la subfamilia Melolonthidae, Dynastinae en México, sin embargo hasta ahora únicamente se han encontrado 22 especies con cierta frecuencia en áreas agrícolas (Nájera-Rincón *et al.*, 2003; Pérez-Domínguez, 2006). Destacando el género *Cyclocephala* por su diversidad, abundancia y amplia distribución.

Los hábitos alimenticios de *C. lunulata*, no están definidos con claridad; aunque es la especie más frecuente en maíz asociada a raíz y en caña de azúcar es saprófaga (Morón, 2010). Algunos trabajos, reportan a los adultos de *Cyclocephala* como consumidores de polen y néctar de flores (Ratcliffe y Cave, 2006).

El proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos tiene tres fases: adhesión y germinación del conidio, penetración hacia el hemocele, finalmente el desarrollo del hongo. La primera fase se produce con la degradación de la cutícula del insecto, mediante dos mecanismos uno físico, presión que ejerce el tubo germinativo hacia el interior del insecto y otro bioquímico donde segrega enzimas hidrolíticas proteasas, lipasas y quitinasas que además proporcionan nutrientes al hongo (Huang,*et. al.*, 2004; Yang,*et. al.*, 2007). La producción de los extractos enzimáticos se obtiene por medio de un proceso fermentativo similar al infeccioso.

Una de las ventajas de los extractos enzimáticos es la reducción del tiempo en el proceso infeccioso del hongo sobre el insecto y además de alterar la capacidad de alimentación del insecto y por lo tanto la disminución de daños en el nopal (Sánchez *et al.*, 2012).El objetivo de presente trabajo fue evaluar el efecto de conidios y la toxicidad de los extractos enzimáticos de *B. bassiana* inyectados en larvas de *C. lunulata* para acelerar el tiempo de muerte.

Materiales y Método

Hongos entomopatógenos. Se utilizó un aislado de *Beauveria bassiana* donada por la Dra. Raquel Alatorre Rosas; se creció en agar dextrosa sabourand a 25° C durante 15 días.

La producción, y obtención de conidios y extractos enzimáticos de *B. bassiana* se implementó la metodología propuesta por Sánchez, *et. al.*, 2013. Insectos: se recolectaron larvas de gallina ciega en las instalaciones deportivas de la UAM-X, se realizó un muestreo cinco de oros, tomando un área de 50 cm², únicamente se recolectaron las larvas de mayor tamaño se depositaron en una cubeta plástica y se cubrieron con suelo y un poco de pasto tomado de las instalaciones. Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio del insectario de la UAM-X, donde se colocaron individualmente en vasos de plástico transparente con capacidad de ocho onzas, que contenía 200 g de suelo proveniente del lugar de colecta. Todo el material fue rotulado con la fecha de colecta y se conservó en cajas de cartón dentro de la cámara bioclimática LUMISTELL® a 25±1°C y con 50% de HR. Las larvas se mantuvieron sin alimentarse por cuatro días, al quinto día se les ofreció un pequeño cepellón de pasto de jardín como dieta, el cual se cambió de acuerdo al grado de marchitez que cada cepellón mostraba, la humedad del suelo se mantuvo mediante la aspersión de agua corriente. Bioensayo: las larvas fueron inyectadas con 10 µl de cada tratamiento detrás de la capsula cefálica. Posteriormente el material se mantuvo bajo condiciones controladas antes descritas. Se usó un diseño completamente al azar, de 6 tratamientos con diez repeticiones, los cuales fueron: Control negativo (agua inyectable), extractos enzimáticos, conidios + extracto enzimático, conidios 1x10⁸, control positivo (Bea Tron ®) y control positivo + extractos enzimático. Análisis estadístico: Los datos obtenidos fueron analizados con un análisis de varianza de una vía y una prueba de comparación de medias de Tukey, con el paquete estadístico JMP8.

Resultados y Discusión.

Se encontró diferencia significativa al evaluar el porcentaje de mortalidad con una (P<0.05), el tratamiento A (Tween 80 al 0.05%) no provocó la muerte de ninguna larva, los tratamientos B, C y D obtuvieron el 100% de mortalidad, para el caso de los tratamientos E y F la mortalidad fue de 60 y 90 % respectivamente (Cuadro1).

En cuanto a la evaluación de tiempo de muerte se registra diferencia significativa (P < 0.05, donde los tratamientos B y C obtuvieron 1.2 días como tiempo de muerte, el tratamiento F tuvo 1.7 días, mostrando una clara diferencia con respecto a los tratamientos D y E con 2.8 y 8.8 días de muerte (Cuadro 1). El extracto enzimático solo y en conjunto con los conidios redujo el tiempo de muerte, causado probablemente un efecto tóxico de las enzimas contenidas en el extracto, lipasas, proteasas tipo Pr1 y Pr2 y endo y exo quitinasas.

Cuadro 1. Valores del porcentaje de mortalidad y de las medias del días de muerte de larvas de *C. lunulata*^{A, B y C} letras iguales, medias iguales acuerdo a Tukey. N = 10

	Tratamiento	Mortalidad (%)	Mortalidad (días)
A	Control negativo (Tween 80 al .05%)		
B	Extracto enzimático	100 ^A	1.2±0.40 ^{B,C}
C	Extracto enzimático + Conidios 1x10 ⁸	100 ^A	1.2±0.40 ^{B,C}
D	Conidios 1x10 ⁸	100 ^A	2.8±0.40 ^B
F	Control positivo (Bea Tron®) 5x10 ⁸	60 ^B	8.8±0.057 ^A
G	Control positivo + Extracto enzimático	90 ^A	1.7±0.421 ^B

La comparación del testigo, con el tratamiento de extractos enzimáticos (B), las larvas de gallina ciega mostraron un cambio de coloración en la cutícula, de blanco cremoso a café oscuro, con diferentes grados de intensidad de color y de tamaño, el oscurecimiento se localizó principalmente en las divisiones intersegmentales y en el área circundante a los espiráculos (Figuras 1 y 2). Otras presentaron manchas de menor intensidad de color y regiones con la coloración normal. El oscurecimiento de la cutícula probablemente se debe a la respuesta del sistema inmune humoral del insecto, principalmente el sistema de la profenoloxidasa en un intento por eliminar y resistir a la invasión de microorganismos que son melanizados (Waterfield, *et. al.*, 2004).

La fenoloxidasa es la enzima responsable de la oxidación de fenoles en quinonas, que polimerizan en melanina siendo altamente tóxica. La melanina es un pigmento negro-pardo y tiene propiedades fungistáticas porque induce la fagocitosis, la encapsulación y el movimiento de hemocitos para destruir el hongo (Quesada- Moraga y Vey., 2004). Sin embargo las proteasas del extracto enzimático ocasionan una actividad desregulada de la fenoloxidasa, ocasionando la muerte del insecto (Harrison y Bonning, 2010).

Las larvas correspondientes al tratamiento de conidios 1x10⁸ también mostraron un cambio de coloración, sin embargo este fue hacia un tono color marrón (Figura 3), sin la presencia de manchas, el color fue uniforme a lo largo de todo el cuerpo del insecto. Las larvas tratadas con extractos enzimáticos más conidios de *B. bassiana* 1x10⁸ presentaron los dos síntomas (Figura 4). El cambio de coloración a café oscuro a lo largo de todo el cuerpo y con mayor intensidad de color, aunado a la emergencia de micelio principalmente del aparato bucal, el ano y de las articulaciones de las patas.

Existen reportes sobre la melanización y el cambio de coloración en la cutícula de larvas de *Galleria mellonella*, 96 hrs después de haber sido inyectadas con conidios de diferentes aislados de *B. bassiana*, categorizando la intensidad de la melanización en tipo “A”, “B” y “C” (Fuguet y Vey, 2004). Estos resultados difieren con los de esta investigación ya que las larvas de *C. lunulata* presentaron estas manchas después de 24 hrs de haber sido inyectadas, además las larvas inyectadas únicamente con conidios de *B. bassiana* no produjeron la melanización, que da origen a la formación de estas manchas, la aplicación de los extractos enzimáticos ocasionó la presencia de manchas.

Efectos de extracto enzimático y conidios de *B. bassiana* en *Cyclocephala lunulata*.

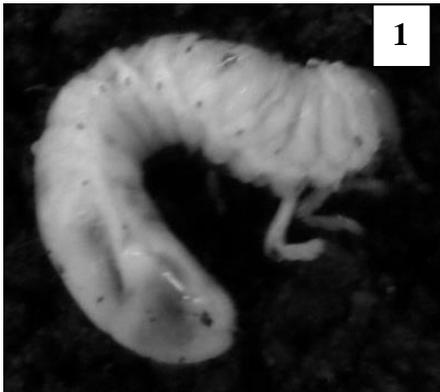


Figura 2. Larva de *C. lunulata* sana (control negativo).

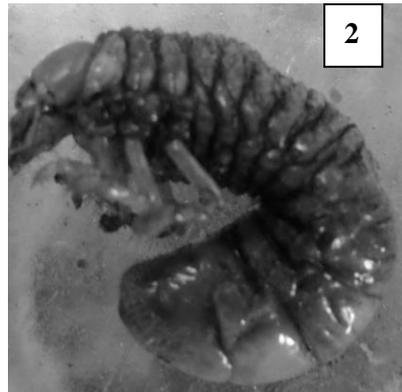


Figura 2. Larva de *C. lunulata* melanizada por la acción tóxica del extracto enzimático

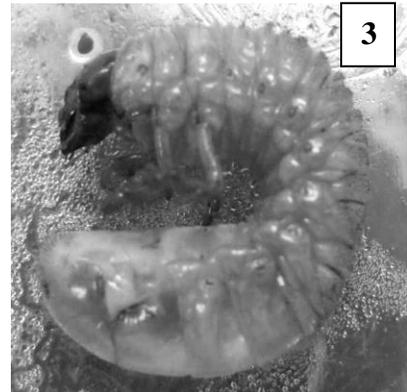


Figura 3. Larva con la coloración modificada: de color blanco cremoso a ocre claro conidios 1×10^8)

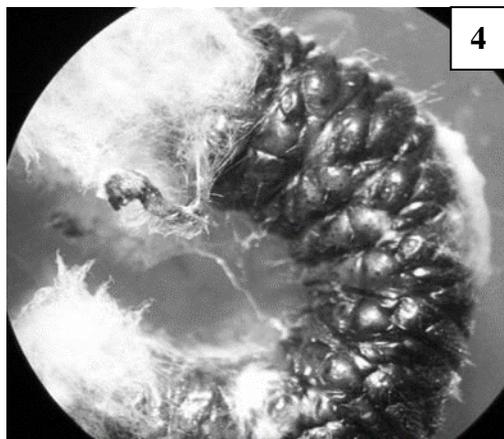


Figura 4. Larva de *C. lunulata* correspondiente al T4, mostrando, oscurecimiento de todo el cuerpo y emergencia de micelio.

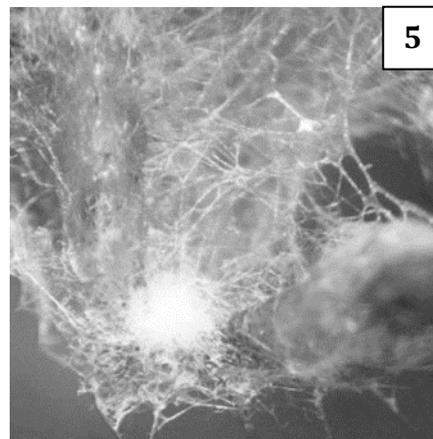


Figura 5. Micelio emergido de la articulación de las patas de *C. lunulata*

También causaron la muerte de las larvas en menor tiempo en comparación con la aplicación de conidios solos. Estos resultados aportan información sobre la actividad de las enzimas fúngicas de *B. bassiana* en el hemocele de *C. lunulata*, demostrando que tienen altos niveles de toxicidad, y podrían ser un potencial agente de control biológico. Es necesario realizar estudios que consideren la observación de los diferentes sistemas y células que pueden ser dañados por la acción de enzimas de hongos entomopatógenos y de los métodos por los cuales las enzimas puedan llegar al hemocele o al sistema digestivo de los insectos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT como becaria de la Maestría de Ciencias Agropecuarias y por la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco con los proyectos divisionales: Insectos y ácaros de importancia Agrícola en México y Evaluación de conidios y

quitinasas de hongos filamentosos producidos en cultivo sólido para su uso potencial en el control biológico y en la industria farmacéutica. Al M. en C. José Gustavo Torres Martínez, del Dpto. de Aves, Roedores y Malezas, CNRF, Dir. Gral. De Sanidad Vegetal, SENASICA y al Dr. José Francisco Cervantes Mayagoitia del Dpto. de Producción Agrícola y Animal, CBS, UAM-X.

Literatura Citada

- Barranco, F. J. E., C. P. Bustamante, R. L. Mayorga, C. P. Marínez y M. A. Azaola. 2009. β -N acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*. 5: 356-360.
- Fuguet, R and A. Vey. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria bassiana* spp.: *in vivo* studies. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 152-167.
- Harrison, R. L. y Bonning, B. C. 2010. Proteases as insecticidal agents. *Toxins*. 2: 935-953.
- Huang, X.W., N. H. Zhao, K.Q. Zhang. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Reserch in Microbiology* 155: 811-816.
- Krajcik, M. 2005. Dynastinae of the world. Checklist. (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *Animma* 10, supplement 2:1-122.
- Najera-Rincón, M. B., T. A. Jackson y J. D. López Mora. 2003. Especies de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas al cultivo de maíz en tres localidades de la Ciénega de Zacapu, Michoacán, México. En A. Aragón, M. Morón y A. Marín (eds). *Estudio sobre Coleópteros del Suelo en América*. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Pp. 215-230.
- Pérez-Domínguez, J. 2006. Importancia del escarabajo rinoceronte, *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera: Scarabeidae) como plaga en el cultivo de agave en Jalisco, México. En: A. E. Castro, M.A. Morón y A. Aragón (eds). *Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas*. ECOSUR. Fundación Produce Chiapas y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Pp. 181-194.
- Quesada-Moraga, E., J. A. C. Díaz and C. S. Álvarez. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Applied Entomology*. 130: 442-452.
- Ratcliffe, B.C. 2003. The Dynastinae scarab beetles of Costa Rica and Panama (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *Bulletin of the University of Nebraska State Museum* 16: 1-506.
- Ratcliffe, B. C. and R. D. Cave. 2006. The Dynastinae scarab beetles of Honduras, Nicaragua and El Salvador (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *Bulletin of the University of Nebraska State Museum* 21: 1-424.
- Yang, J., B. Tian, L. Liang and K.Q. Zhang. 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 21-31.