



Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mosca *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio

Effect of *Beauveria bassiana* on the fly *Anastrepha* sp. and larvae of the armyworm *Spodoptera frugiperda* under laboratory conditions.

Pamela Arias López¹, Brenda Banda Banda¹, Renzo Bejarano de la Cruz¹, Diana Benites Salcedo¹ y Julio Arellano Barragán²

¹Estudiantes del tercer ciclo de la escuela Académico-Profesional de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. ²Docente principal del Departamento Académico de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto entomopatógeno de *Beauveria bassiana* sobre la mosca de fruta *Anastrepha* sp. recolectada de huertos del Distrito de Simbal y sobre el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* extraído del campo de cultivo de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se preparó PDA (Agar Papa Dextrosa) como medio de cultivo para el crecimiento de *Beauveria bassiana*. Para comprobar la patogenicidad de este hongo sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda* se utilizaron seis placas de Petri con PDA colocándose una larva en cada una y posteriormente se inocularon las esporas del hongo sobre la superficie de éstas, observándose, luego de un proceso de incubación bajo condiciones de temperatura y humedad controlada, la formación de micelio blanco, comprobándose de esta manera el efecto insecticida de *Beauveria bassiana*; el mismo procedimiento se llevó a cabo para la evaluación de la patogenicidad en la mosca de la fruta *Anastrepha* sp. Se demostró que *Beauveria bassiana* es una alternativa clave para el manejo integrado de plagas, siendo de gran ayuda para reducir las pérdidas de los cultivos y por lo tanto puede ser utilizado para amortiguar el efecto de insecticidas químicos en el medio ambiente.

Palabras clave: Maíz, *B. bassiana*, *S. frugiperda*, *Anastrepha* sp., entomopatógeno.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the entomopathogenic effect of *Beauveria bassiana* on fruit fly *Anastrepha* sp. from orchards of Simbal district and on the corn armyworm *Spodoptera frugiperda* extracted from the field of the Biological Sciences Faculty. It prepared PDA (potato dextrose Agar) which served as culture medium for the growth of *Beauveria bassiana*. To evaluate the pathogenicity of the fungus on the larvae of *Spodoptera frugiperda* used six Petri plates with PDA by placing a larva in each and it were subsequently inoculated spores of the fungus on the surface. After a process of incubation under conditions of temperature and humidity-controlled, the formation of white mycelium, proving thus the insecticidal effect of *Beauveria bassiana*; the same procedure was carried out for the evaluation of the pathogenicity in fruit fly *Anastrepha* sp. It was demonstrated that *Beauveria bassiana* is a key alternative to the integrated pest management, being of great help to reduce the loss of crops and can therefore be used to cushion the impact of chemical insecticides in the environment.

Keywords: Corn, *B. bassiana*, *S. frugiperda*, *Anastrepha* sp., entomopathogen.

INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas contempla el fortalecimiento del control natural, la introducción de especies no-nativas de controladores y el uso de plaguicidas derivados de animales, plantas, hongos, bacterias, virus y minerales para prevenir, repeler, eliminar o bien reducir el daño causado por las plagas. Estos bioplaguicidas no pretenden sustituir los plaguicidas químicos, sino buscar métodos más amigables con el ambiente, como un componente del manejo integrado de plagas ¹.

Los bioplaguicidas constituyen un importante medio de control biológico de plagas en la agricultura, de comprobada efectividad en muchos países. El grupo más importante de hongos entomopatógenos son los deuteromicetos u hongos imperfectos, en los cuales se desconoce la fase sexual. Los géneros más importantes son *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarhizium*, entre otros ².

El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) se ha estudiado como agente de control de insectos plagas pertenecientes a diferentes órdenes. En cultivos de la agricultura urbana lo recomendaron para el control de varias especies que afectan a muchos cultivos hortícolas ².

Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan a diversas frutas; destacan las plagas, presentándose gran cantidad de insectos con hábitos alimenticios diversos y cuya presencia en sí no determina que dañe al fruto. Las plagas más importantes por los daños directos al fruto, o indirectos (follaje y ramas) que causan son: mosca de la fruta, trips, hormigas entre otros ³.

Las moscas de la fruta están consideradas como una de las 10 plagas agrícolas de mayor importancia económica en el mundo. El género *Anastrepha* (Diptera: tephritidae) es endémico del nuevo mundo y está restringido a ambientes tropicales y subtropicales; se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina ³.

El maíz es afectado por un conjunto de especies que son consideradas plagas de mayor o menor importancia ocasionando un elevado porcentaje de daño a la producción de esta planta siendo uno de las más comunes las larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* ⁴.

Por lo expuesto en los antecedentes, el presente trabajo de investigación formativa (TIF) tuvo como objetivos, determinar el efecto biocida de *Beauveria bassiana* contra *Anastrepha sp.* y *Spodoptera frugiperda*, en condiciones de laboratorio, la adquisición de destrezas y habilidades en el manejo de técnicas y uso de materiales de laboratorio, así como el conocimiento de los procesos bioquímicos involucrados en la actividad entomopatógena de *Beauveria bassiana* sobre *Anastrepha sp.* y *Spodoptera frugiperda*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

- Cepa de *Beauveria bassiana*, obtenida del laboratorio de Tecnología Enzimática, Entomopatógenos y Productos Naturales. Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Larvas y moscas de *Anastrepha sp.*, obtenidas de frutos (mangos y guayabas) en estado de descomposición de huertos del distrito de Simbal.
- Larvas de *Spodoptera frugiperda*, obtenidas de cultivos de maíz en la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación y esterilización de material

Los materiales de laboratorio tales como placas de Petri, matraces y tubos de ensayo, fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C y a 1 atm de presión por 15 minutos. Para preparar el agar-papa-dextrosa (APD) se utilizó 20 g de papa blanca sin cascara cortada en trozos pequeños, 2 g de glucosa, 1.5 g de agar y 100mL de agua destilada, se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave, se enfrió aproximadamente a 50°C y se le añadió el antibiótico Cloranfenicol 30mg/100mL y se dispensó en placas de Petri estériles para solidificar.

Colecta y crianza de moscas de *Anastrepha sp.*

Se obtuvieron los frutos en huertos del distrito de Simbal que mostraron señales de haber sido atacadas por el insecto, a partir de ellos se recolectaron las larvas de *Anastrepha sp.* para luego ser distribuidas en frascos en ausencia de luz para que éstas cambien de larva a pupa. Luego de dos semanas aproximadamente, las pupas evolucionaron a su fase adulta.

Colecta de las larvas de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas fueron colectadas del cogollo de las plantas de maíz las cuales mostraron señales de haber sido afectadas por la larva del cogollero (perforaciones en las hojas).

Reactivación y propagación de *B. bassiana*:

A partir de la cepa de *B. bassiana*, conservada en frascos con soluciones a distintos valores de pH, se realizaron subcultivos en placas de Petri con medio Agar papa dextrosa, después se realizó la respectiva siembra del hongo en tubos de ensayo, asegurando así la reactivación de *B. bassiana*.

Evaluación del efecto entomopatógeno de *B. bassiana* sobre moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda*:

Para llevar a cabo la evaluación del efecto entomopatógeno, para cada espécimen, se trabajó con dos grupos: un control y un experimental. El grupo experimental fue inoculado por aspersión con una suspensión de 1×10^9 esporas de *B. bassiana* / mL, mientras que al grupo control negativo se le inoculó por aspersión solución salina fisiológica estéril, los dos grupos se colocaron en una cámara húmeda de incubación que contenía agua destilada estéril para realizar la evaluación.

Aislamiento de *B. bassiana* a partir de moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda*:

Bajo condiciones de asepsia, se tomó una porción del micelio de *B. bassiana* desarrollado tanto en las moscas como en las larvas y se sembró en placas de Petri con Agar papa dextrosa, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 días para la formación del micelio del hongo.

Identificación de *B. bassiana* a partir de moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda* colonizadas:

Al obtener el micelio de *B. bassiana* a partir de las larvas y moscas momificadas, se realizó su aislamiento a través de placas de Petri con PDA y una cámara húmeda, para luego identificar las estructuras de *B. bassiana* colocándolas sobre una lámina portaobjeto donde se le adicionó una gota de colorante de azul de lactofenol e inmediatamente se cubrió con una laminilla y se observó al microscopio.

RESULTADOS

En las Tablas 1 y 2, se observan los síntomas de *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda* como consecuencia de su exposición a las esporas de *B. bassiana*, resaltando que fue la parálisis y pérdida de apetito, respectivamente, los que se observaron con mayor intensidad.

En las Figs. 1 y 2, se observa el porcentaje de colonización por *B. bassiana* sobre *Anastrepha* sp. y *Spodoptera frugiperda*, respectivamente. Se determinó que en el grupo experimental la colonización fue del 100%, comparado con el grupo control que representó el 0 % de colonización.

Tabla 1. Síntomas observados en adultos de la mosca de fruta *Anastrepha* sp. inoculados con *Beauveria bassiana*, en condiciones de laboratorio.

Síntomas	<i>Anastrepha</i> sp.	
	Experimental	Control
Pérdida de apetito	+	-
Vuelo errático	+	-
Parálisis	++	-
Melanización	+	-
Muerte	+	-
Aparición de micelio sobre las moscas muertas	++	-

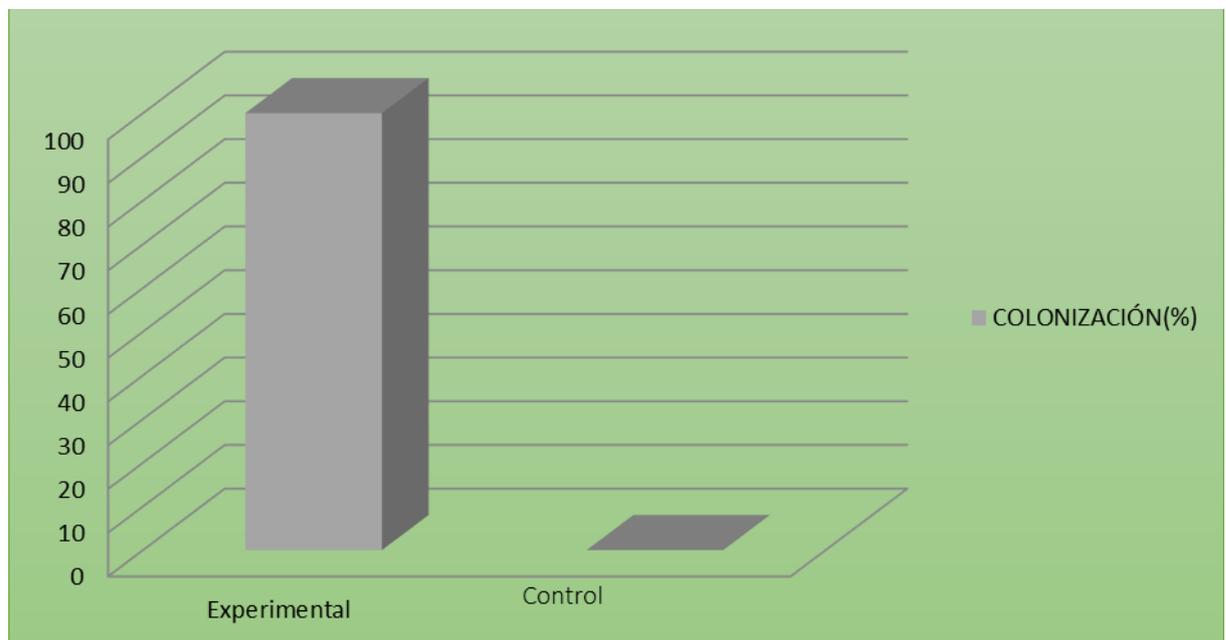
++: mayor incidencia de signos y síntomas, +: menor incidencia de signos y síntomas, -, ausencia de signos y síntomas

Tabla 2. Síntomas observados en las larvas del cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda* inoculadas con *Beauveria bassiana*, en condiciones de laboratorio.

Síntomas	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
	Experimental	Control
Pérdida de apetito	++	-
Vuelo errático	+	-
Parálisis	+	-
Melanización	+	-
Muerte	+	-
Aparición de micelio sobre las moscas muertas	++	-

++: mayor incidencia de signos y síntomas, +: menor incidencia de signos y síntomas, -, ausencia de signos y síntomas

Fig. 1. Porcentaje de colonización por *Beauveria bassiana* sobre moscas de *Anastrepha* sp. del grupo experimental en comparación con el grupo control negativo.

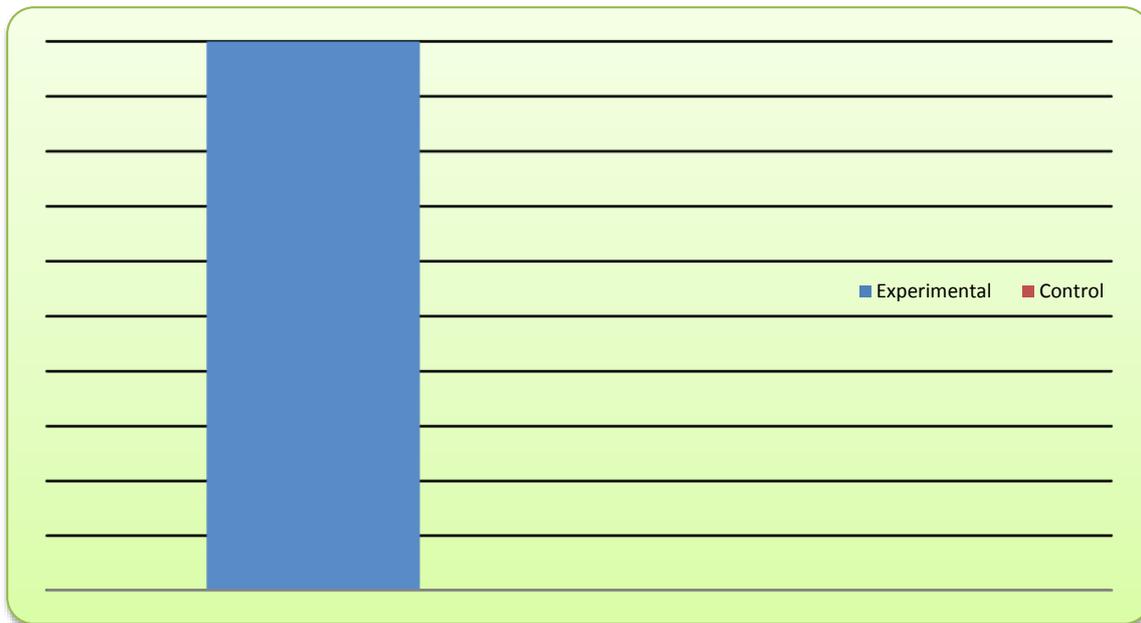


DISCUSIÓN

Los hongos entomopatógenos pueden ocasionar enfermedad y propagarse en la población de artrópodos, dependiendo de las interacciones y factores relacionados con: el patógeno (patogenicidad, virulencia, dispersión, germinación de las conidias y persistencia), el hospedero (susceptibilidad, densidad, distribución y comportamiento) y el medio ambiente (abióticos: temperatura, humedad, viento, lluvias y bióticos: parásitos, depredadores, planta - huésped) ^{5, 6}. Son considerados como los patógenos más promisorios contra insectos, ya que pueden infectarlos directamente a través de la penetración de la cutícula y poseen múltiples mecanismos de acción que les confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia ^{7, 8}.

La evaluación del efecto entomopatógeno de acuerdo a los síntomas que posiblemente presentaron los especímenes adultos de la mosca *Anastrepha* sp. (Tabla 1) y larvas de cogollero *Spodoptera frugiperda* (Tabla 2), luego de ser inoculados con *Beauveria bassiana*; se debería a la acción propia del hongo y por la producción de toxinas en el hemocele, que actúan como inhibidores de las reacciones de defensas del hospedero, destruyen la hemolinfa, núcleos de las células y afectan al sistema nervioso.

Fig. 2. Porcentaje de colonización por *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* del grupo experimental en comparación con el grupo control negativo.



El proceso infectivo de un hongo entomopatógeno ocurre bajo condiciones de humedad y temperatura favorables, pero si éstas no se dan, el hongo producirá estructuras no infectivas llamadas conidias en forma de resistencia y reproducción vegetativa del hongo, con paredes gruesas y abundantes sustancias de reserva, con las que sobrevivirá frente a las condiciones adversas ⁹. Cuando las condiciones climáticas son adecuadas, las conidias germinan y producen conidias infectivas, dando inicio nuevamente al ciclo biológico del hongo ¹⁰.

Las esporas son las que infectan a *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda*; el desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto^{5,10}.

La primera fase de adhesión y germinación empieza depositándose las esporas en la cutícula del insecto. Es con la cutícula con la que tienen el primer contacto las conidias, las características tanto físicas como químicas ayudan en la unión de ambos, algunas glicoproteínas pueden servir como receptor específico para las conidias. Para la germinación, las células del extremo de las hifas son las que permiten adherirse a la superficie cuticular ^{5,10}.

La penetración de la cutícula del insecto por las conidias germinadas se ocasiona como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula (proceso químico) y la presión mecánica por el tubo germinal (proceso físico), se desarrolla el apresorio, una estructura celular que ejerce presión contra las capas cerosas del exoesqueleto, al mismo tiempo que libera varios tipos de enzimas (quitinasas, cutinasas) ¹¹.

Las lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora; tienen un efecto específico sobre la epicutícula (capa externa), las lipasas, desintegran los lípidos que la constituyen y la quitinasa desintegra a la quitina, que le da la resistencia a la cutícula; del mismo modo el resto de proteínas de la cutícula son desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo las cuales producen la histólisis de los tejidos ablandándolos y permitiendo la infección del hongo ⁹.

La germinación de las conidias sobre la cutícula depende en gran parte de la humedad ambiental, temperatura y en menor grado de las condiciones de luz o de su balance nutricional. El resultado de la germinación da como origen a las hifas, y la penetración de las hifas del hongo no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de su duración, modo, agresividad del hongo, el tipo de conidia y la susceptibilidad del hospedero ⁵. Los estimuladores y los inhibidores

de la germinación se encuentran en la cutícula por lo que el hongo debe estar adaptado a las condiciones de su superficie ¹².

Indudablemente, muchas enzimas patogénicas son importantes al determinar la virulencia debido a que permiten al patógeno coexistir con el proceso de cambios metabólicos asociados al estado de la enfermedad del hospedero ¹³. Sin embargo, las enzimas no son el único factor que influye en el fenómeno de la virulencia, o en el éxito del proceso de la infección. Otros factores pueden ser el éxito de la adhesión de la conidia a la cutícula, presencia de ácidos grasos en la superficie de la cutícula, crecimiento fúngico antes de la penetración, y la producción y regulación de otras toxinas ¹².

Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto, formando cuerpos hifales multiplicándose y dispersándose rápidamente, produciendo mico toxinas ⁵. Las toxinas como beauvericina, beauverolides, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas a, b, c, d, y Cytochalasinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido ^{13,14}.

El crecimiento de un micelio blanco, algodonoso, característico de *B. bassiana*, en la superficie de la mosca y larva del cogollero, confirmó que no hubo contaminación por otros organismos y que el porcentaje de colonización fue del 100% para el grupo experimental (Figuras 01 y 02). Para el caso del control negativo, se trabajó bajo las mismas condiciones, pero con la inoculación de solución salina fisiológica estéril, para comprobar que al no apreciarse crecimiento de micelio ni contaminación, las larvas y las moscas, del grupo experimental murieron a causa la infección por *B. bassiana*.

La identificación del hongo mediante microcultivo, permitió comprobar que el micelio presente sobre *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda*, fue *B. bassiana* ¹⁵.

CONCLUSIONES

- En condiciones de laboratorio la cepa de *Beauveria bassiana* fue patógena para la mosca de fruta *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda*, alcanzando porcentajes de colonización del 100%.
- Se lograron conocer los procesos bioquímicos involucrados en la acción entomopatogena de *B. bassiana* sobre *Anastrepha* sp. y *Spodoptera frugiperda*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carballo M. Control biológico de plagas agrícolas. 1ra ed. Managua: Catie; 2004.
2. González M. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Universidad de Cienfuegos, Cuba; 2011.
3. Munro k. Paquete para el cultivo de mango en el estado de colima. Comité Estatal de Sanidad Vegetal, México; 2005.
4. Soto J. Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa, México; 2008.
5. Tanada Y, Kaya H. Insect Pathology. Academy Press. Mac Graw Hill. New York; 1993.
6. Vargas J. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* y su virulencia en *Phthorimaea operculella*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Agrícola. Perú; 1995.
7. Ferrón P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. Burgess HD, editor. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. 1981; 24: 465-482.
8. Hayek A, Leger R. Interactions between fungal pathogens and insect host. Ann Rev Entomol 1994; (39): 293- 322.
9. Méndez S, Lage A, Donald WR. Detección de hongos Entomophthorales patógenos a insectos fitófagos, al sur de Bahía, Brasil. Entomotropica 2001; 16(3): 203-206.
10. Humber RA. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (zygomycotina). Mycotaxon 1981; (13): 191-240.
11. Gongora BCE, Marin MP, Benavides MP. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Avance técnico 348. Cenicafé; 2009.
12. Romaña CA. Potencial for triatoma biological control. Proc Intern Workshop on Pop Genet and Control of Triatominae. Santo Domingo de los colorados. Ecuador. 1996: 87-88.

13. Champlin FR, Cheung PYK, Pekar S, Smith RJ, et al. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. *J Econ Entomol.* 1981; 74: 617-621.
14. Rosas-Acevedo J, Boucias LDG, Lezama R, Sims K, Pescador A. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutiella thompsonii*, inhibit oviposition by the twospotted spider mites *Tetranychus urticae*. *Appl Experim Acarol* 2003; 39: 213-225.
15. Zarate J. Empleo de microorganismos entomopatógenos para el control biológico de mosca doméstica *Musca domestica*. Tesis. México: Universidad Autónoma de Nueva León. Facultad de Ciencias Biológicas; 1997.