

AGENTES ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS DEL VALLE DE ETLA: POTENCIAL PATOGENICO DE *Beauveria* spp. SOBRE LARVAS DE *Phyllophaga* spp

ENTOMOPATHOGENIC AGENTS NATIVE TO THE ETLA VALLEY: PATHOGENIC POTENTIAL OF *Beauveria* spp. ON LARVAE OF *Phyllophaga* spp.

Ruiz Robles, Amairani M.¹, Ramón López, Diego I.², Fuentes García, Javier E.³, García Montalvo, Gildardo O.³, Cortés Martínez, Carlos I.⁴

¹Ingeniera en Desarrollo Comunitario. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle de ETLA, Departamento de Ingenierías. marlene.rr@itvalletla.edu.mx, 951 305 29 27, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca, 68230.

²Ingeniero en Desarrollo Comunitario. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle de ETLA, Departamento de Ingenierías. diegoivanra19@gmail.com, 951 305 29 27, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca, 68230.

³Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca, 951 305 29 27, Av. Víctor Bravo Ahuja No. 125, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, C.P. 68030.

⁴Doctor en ciencias en conservación y aprovechamiento de recursos naturales. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle de ETLA, Departamento de Ingenierías. carlos.cm@itvalletla.edu.mx, 951 305 29 27, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca, 68230.

Resumen -- El objetivo de este estudio fue caracterizar y evaluar el potencial patogénico de un hongo entomopatígeno (HEP) nativo del Valle de ETLA sobre larvas de gallina ciega *Phyllophaga* spp. El aislamiento de HEP se realizó en el paraje Ángel de Oro del Valle de ETLA, Oaxaca, México. Se determinaron las características de las estructuras macroscópicas y microscópicas sobre los medios de cultivo PDA y MALTA. Luego, se determinó el porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp. por efecto de la aplicación del HEP. El crecimiento de la colonia fúngica sobre PDA y MALTA no mostró una diferencia estadística significativa (Tukey, $\alpha=0.01$). Las características macro y micro morfológicas del aislamiento indican que se trata de *Beauveria* spp. De acuerdo con los resultados de la evaluación de infectividad, la mortalidad provocada por *Beauveria* spp. fue menor del 45 % en los tres tratamientos y la prueba estadística Tukey ($\alpha =0.05$) mostró que no existe diferencia estadística significativa entre los distintos tratamientos.

Palabras Clave -- *Beauveria*, Control biológico, mortalidad, *Phyllophaga*.

Abstract -- The objective of this study was to characterize and evaluate the pathogenic potential of an entomopathogenic fungus (EPF) native of Oaxaca, México, on larvae of the white grub *Phyllophaga* spp. The isolation of EPF was carried out in the nature site Ángel de Oro of the Valle de ETLA, Oaxaca, Mexico. The characteristics of the macroscopic and microscopic structures on the PDA and MALTA culture media were determined. Then, the percentage of mortality of *Phyllophaga* spp.

larvae due to the application of the HEP, was determined. The growth of the fungal colony on PDA and MALTA did not show a statistically significant difference (Tukey, $\alpha=0.01$). The macro and micro morphological characteristics of the isolate indicate that it is *Beauveria* spp. According to the results of the infectivity evaluation, the mortality caused by this EPF was less than 45 % in the three treatments and the Tukey statistical test ($\alpha =0.05$) showed that there is no significant statistical difference between the different treatments.

Key words -- *Beauveria*, Biological control, mortality, *Phyllophaga*.

INTRODUCCIÓN

Los HEP son microorganismos cuyo hábitat natural es el suelo y los rastrojos de los cultivos y pueden parasitar e inducir la muerte a insectos plaga como: el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), el gusano barrenador (*Diatrea magnifactella*) y la broca del café (*Hypothenemus hampei*), entre otros. Los géneros más importantes de HEP son: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Beauveria bassiana*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Rhizopus* [1,2,3].

El hongo *Beauveria bassiana* está ampliamente distribuido en todas las regiones del mundo y puede ser aislado de insectos, ácaros y suelo, donde el hongo es parte normal de la flora microbiana y otros sustratos [4]. Además, presenta un gran potencial como agente de control microbiano debido a su facilidad de producción masiva, mejor formulación,

y su especificidad sobre ciertos organismos blanco [5,6].

El empleo de HEP es una alternativa amigable y sustentable para el control biológico de insectos plaga en cultivos de importancia socioeconómica [3]. El Valle de Etla, en el estado de Oaxaca, México, es de vocación agrícola, principalmente de cultivos como el maíz, frijol, alfalfa, entre otros. En Mesoamérica, la gallina ciega *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabeidae) es la principal plaga edafícola en el cultivo de maíz (*Zea mays*) debido a las pérdidas que producen en la calidad del grano y la disminución del rendimiento [7].

Beauveria spp. es probablemente el HEP con más potencial para el control biológico de gallina ciega [3]. Sin embargo, no existen estudios previos que documenten el uso de cepas nativas de HEP del estado de Oaxaca y, particularmente, aisladas en el Valle de Etla.

El objetivo de este estudio fue identificar un HEP aislado en el paraje Ángel de Oro de la localidad de San Gabriel, Etla, Oaxaca, México y evaluar su capacidad patogénica sobre larvas de *Phyllophaga* spp.

DESARROLLO

Colecta de suelo

El sitio de colecta Ángel de Oro está ubicado en las coordenadas 17°12'57"N - 96°46'0"O. Se obtuvieron 8 muestras de 500 g de suelo de cuatro puntos seleccionados complementemente al azar, cada punto se ubicó a una distancia de dos metros a una profundidad de 15-20 cm. Las bolsas con muestras de suelo fueron transportadas al Laboratorio de Química del Instituto Tecnológico del Valle de Etla y preservadas a temperatura ambiente 25 ± 3 °C.

Aislamiento

150 g de la muestra de suelo se transfirió a un frasco plástico con tapa, se colocaron 5 larvas de *Phyllophaga* spp. y se resguardaron a temperatura ambiente. Después de 7 días, las larvas muertas con signos de micosis fueron separadas. Con un asa de siembra, se tomó una muestra de micelio del hongo del insecto infectado y se estrió en los medios de cultivo ADP (Bioxon) y MALTA (Bioxon). Las cajas se incubaron en oscuridad a 24.5 °C y humedad relativa del 70 % durante 15 días.

Macromorfología y crecimiento

Las características macromorfológicas de los aislados en medios de cultivo ADP y MALTA citadas por Domsch et al. [8], fueron determinadas.

Quince días después del inicio de la incubación, se registró el color, aspecto de la colonia, producción y difusión del pigmento. El crecimiento del HEP fue estimado a partir del diámetro de la colonia fúngica, a intervalos de 24-48 h, tomando como intersección el centro del inóculo. El diámetro medio (D) del micelio corresponde al valor promedio del total de las mediciones a los ocho días de la inoculación sobre el medio de agar.

Propagación

Se utilizaron 350 g de arroz como sustrato contenido en un recipiente plástico de 1 litro, al cual se agregó agua purificada para enjuagar el sustrato. Luego, 50 g del sustrato se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, se agregó 100 mL de agua destilada y se esterilizó a 15 psi y 120 °C por 20 min. Un trozo del agar con crecimiento del HEP de interés se transfirió a cada uno de los matraces y se incubaron a 25 °C y 80% HR por 7 días. El desarrollo del HEP en el sustrato se observa en la Figura 1.

Cosecha de conidios

Para la preparación del HEP en medio acuoso, se agregó 10 mL de aceite vegetal a cada matraz y una vez disuelto uniformemente, se agregó 100 mL de AD estéril. Luego, con una espátula se disolvió el aceite y el AD hasta formar una mezcla homogénea. Con la ayuda de un colador estéril se maceró el sustrato para obtener únicamente el medio acuoso y se mantuvo en un vaso de precipitados hasta el establecimiento de los tratamientos.



Figura 1. Envés del matraz, mostrando el desarrollo de *Beauveria* spp. en el sustrato arroz.

Desinfección de larvas de *Phyllophaga* spp.

Larvas de *Phyllophaga* spp. de diferentes estadios y sin síntomas de infección fueron seleccionadas. El exceso de suelo sobre el cuerpo de las larvas fue removido mediante enjuague durante 30 seg en solución de etanol (C₂H₆O) al 95% en agua destilada, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) disuelto al 95%, después en agua purificada y

finalmente en agua destilada estéril, el exceso de agua fue absorbido con papel filtro estéril.

Bioensayo de patogenicidad

Se establecieron tres tratamientos de aplicación por sumergimiento de *Phyllophaga* en suspensión de esporas de *Beauveria* spp. en las concentraciones 25 %, 50% y 75% (en relación a 100 mL de suspensión acuosa) más un Control (agua destilada estéril sin HEP) para fines de comparación. El número de larvas muertas se registró cada 24 h hasta registrar la muerte de todos los insectos. La mortalidad corregida se calculó mediante la Ecuación de Abbott [9].

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la evaluación del porcentaje de mortalidad corregida se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). De la misma manera, los datos del crecimiento radial del micelio se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.01$). Todos los análisis se realizaron con el programa SAS (Statistical Analysis System).

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron diez (10) cepas de *Beauveria* spp, de las cuales, sólo el 10 % presentó problemas de infección o contaminación por otro microorganismo. Sobre PDA, las cepas R2, R3, R4, R5, R6 presentaron multicolonias de aspecto circular, de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana, lo cual coincide con lo reportado en [9].

Las cepas R1, R7 Y R9 presentaron un aspecto irregular de color grisáceo y crecimiento limitado (Figura 2). Moore et al. [10] reportan que los hongos pueden diferir en su capacidad de crecimiento, por el hecho de utilizar diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno para su reproducción, ya que el crecimiento del micelio y la producción de conidios puede ser favorecida por monosacáridos, tales como la glucosa o fructosa.

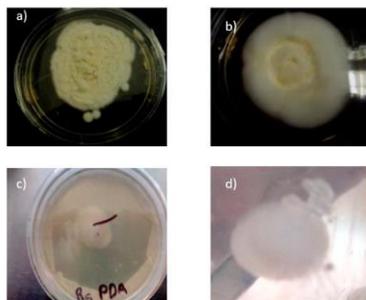


Figura 2. Crecimiento de micelio de *Beauveria* spp. sobre medio ADP. a) aparición de multicolonias, b) observación de color, aspecto de la colonia, producción y difusión de pigmento, c) colonia aislada y, d) envés de la colonia.

Wrona y Gleason [11] señalan que una fuente de nitrógeno es esencial para el crecimiento de las hifas, sin embargo, las fuentes de nitrógeno no siempre permiten un buen crecimiento del micelio, debido a la acumulación de amoníaco durante el crecimiento somático, por la alcalinización del medio, lo cual inhibe este proceso. James [12] afirma que los eventos del crecimiento micelial y su variación genética molecular son directamente proporcionales a la regulación de la humedad y la temperatura.

Las características observadas en los HEP de la presente investigación, fueron similares a las obtenidas por Brady [13] y Ou [14], en la evaluación del crecimiento de las cepas en medio de cultivo MALTA (Figura 3). Estas son las siguientes: las colonias presentaron una textura algodonosa, aunque un poco más ralas en el crecimiento. La coloración por arriba fue de color blanco sucio casi amarillo y en la parte del envés presentó un color crema. Los bordes fueron ligeramente irregulares.

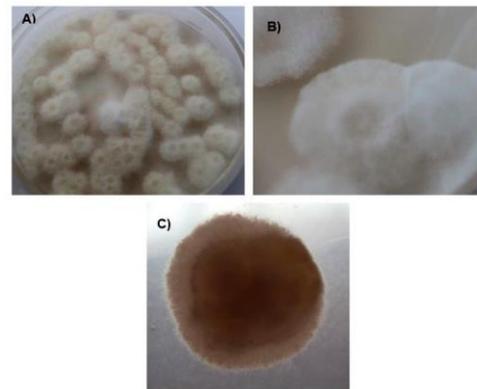


Figura 3. Crecimiento de *Beauveria* spp. en medio de cultivo MALTA. A) aparición de multicolonias, B) observación de color, aspecto de la colonia, producción y difusión de pigmento y, C) envés de la colonia.

El extracto de MALTA ha demostrado ser una fuente nutricional eficaz en la promoción del crecimiento micelial y la esporulación, sin embargo, también se ha reportado como un factor limitante para el crecimiento y la esporulación dependiendo de la concentración utilizada. La cepa R3 sobre medio de cultivo PDA presentó un micelio blanco, las colonias presentaron un aspecto aterciopelado a polvoriento; blancas en los bordes y en el reverso amarillo-pálido.

En la observación microscópica (Figura 4) se pudo apreciar grupos de conidióforos demostrando su arreglo típico, conidióforo con esporas en la parte superior, y conidios, como los presentados por Barnett y Hunter [15].

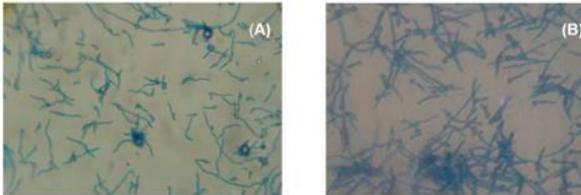


Figura 4. Características microscópicas de los aislamientos de *Beauveria* spp.

La curva de crecimiento de cepas de *Beauveria* spp. inoculadas en medio de cultivo ADP, presentó un crecimiento promedio de 2.6 cm. El análisis gráfico de los valores (Figura 5) mostró diferencias entre las cepas de *Beauveria* spp., inoculadas en medio de cultivo ADP, siendo la cepa C4 la que presentó un mejor desarrollo, por otro lado, la cepa C2 presentó un crecimiento inferior frente a las demás cepas.

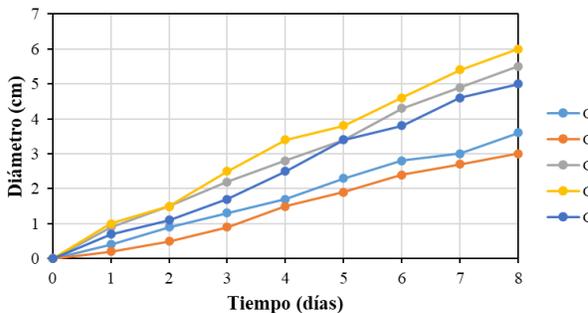


Figura 5. Curvas de crecimiento de 5 cepas de *Beauveria* spp., inoculadas en medio de cultivo PDA.

La curva de crecimiento de cepas de *Beauveria* spp., inoculadas en medio de cultivo extracto de MALTA, presentó un crecimiento promedio de 2.3 cm. Donde la cepa C3 presentó el mayor crecimiento, por el lado contrario la cepa C2 fue la que presentó valores inferiores en su crecimiento, frente a las demás cepas (Figura 6).

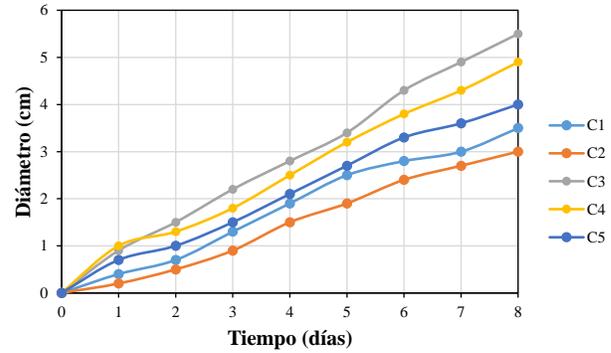


Figura 6. Curvas de crecimiento de cinco cepas de *Beauveria* spp., inoculadas sobre medio de cultivo extracto de MALTA.

De acuerdo con los datos de los bioensayos de patogenicidad de la Tabla 1, al cuarto día, la mortalidad de *Phyllophaga* spp. provocada por *Beauveria* spp. fue del 100 % en los diferentes tratamientos, por lo tanto, la actividad insecticida se considera alta [16].

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad acumulada de *Phyllophaga* spp. por la inoculación de *Beauveria* spp.

mL Se/100 mL Sa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
25	16	61	72	100
50	83	100	-	-
75	38	94	100	-
Control	0	0	0	16

Se: suspensión de esporas; Sa: suspensión acuosa.

Además, de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.01$), no existe diferencia estadística significativa entre los distintos tratamientos. La Figura 7 muestra larvas con signos de crecimiento de micelio en el cadáver de las larvas de gallina ciega.



Figura 7. Larvas de *Phyllophaga* spp. con signos de infección por *Beauveria* spp.

CONCLUSIONES

El rango de temperatura favorable para el desarrollo micelial en ambos medios de cultivo PDA y MALTA, fue de 24.5-25 °C, con un 70% de humedad relativa y en oscuridad. El medio de cultivo ADP aporta mejores condiciones nutricionales para el efectivo crecimiento de *Beauveria* spp. La actividad patogénica se considera alta, bajo condiciones experimentales de laboratorio de este experimento, por lo tanto, el potencial del hongo estudiado para el combate de *Phyllophaga* spp. debe ser mayormente explorado.

AGRADECIMIENTOS

Al TecNM campus Valle de Etna por las facilidades otorgadas para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] López-Llorca, L.V. & Hans-Börje, J. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuadernos de Biodiversidad, 6, 12–15.
- [2] Nari, A. (2005). Estado actual de la resistencia de *Boophilus microplus* en América Latina y el Caribe. Perspectivas de aplicación del control integrado. Reunión anual del Grupo de Trabajo sobre Resistencia Parasitaria (FAO), Cuernavaca, México.
- [3] Deans, C. & Krischik, V. (2023). The Current State and Future Potential of Microbial Control of Scarab Pests. Applied Sciences, 13(2), 766.
- [4] Alves, R.T., Bateman R.P., Gun, J., Prior, CH. & Leather S.R. (2002). Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. Neotropical Entomology 31(1): 091-099.
- [5] Crawford, P.J., Brooks, W.M. & Arends, J.J. (1998). Efficacy of Field-isolated strains of *Beauveria bassiana*. Journal of Economic Entomology 91, 1295-1301.
- [6] Haraprasad, N., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., Shetty H. S. and Wahab, Seema. (2001). *Beauveria bassiana* - A Potential Mycopesticide for the Efficient Control of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. Biocontrol Science and Technology 11. 251-260.
- [7] Jackson, T.A. & Klein, M.G. (2006). Scarabs as pests: A continuing problem. The Coleopterists Bulletin, 60(sp5), 102–119.
- [8] Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. (1993). Compendium of Soil Fungi. Institute of Soil Biology, Federal Agricultural Research Centre, 845 pp.

- [9] Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.
- [10] Moore, D., Bridge, P.D., Higgins, P.M., Bateman, R.P. & Prior, C. (1993). Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviridae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Annals of Applied Biology, 122, 605-616.
- [11] Wrona, B. & Gleason, M. (2005). Effect of surface amino acids on the growth of *Peltaster fruticola*-fungus associated with sooty blotch complex. Journal of Plant Protection Research, 45(4).
- [12] James, R. (2001). Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. Journal of Invertebrate Pathology. 77:99-107.
- [13] Brady, B.L.K. (1980). «*Sarocladium oryzae*», CMI Descriptions No. 673.
- [14] Ou, S.R. (1985). Rice Disease, CAB. International Mycological Institute, Kew Surrey, UK, 1985.
- [15] Barnett, H. & Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect Fungi. Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents, 9–29.
- [16] Marín-Cruz, V.H., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Florido, J.E. & Cibrián-Tovar, D. (2017). Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 23(3), 329-340.

ROL DE CONTRIBUCIÓN

Rol	Autor (es)
Supervisión	Ruiz-Robles, Amairani M.
Validación	Ramón-López, Diego I.
Curación de datos	Fuentes-García, Javier E.
Recursos	García-Montalvo, Gildardo O.
Redacción	Cortés-Martínez, Carlos I.



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.