

COMUNICACIÓN CORTA

Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris)

Erika Chávez Ibañez^I, Silvia Rodríguez Navarro^I, Lluvia de Carolina Sánchez Pérez^I, Aida Hamdan Partida^{III}, Juan Esteban Barranco Florido^{II}

^IDepartamento de Producción Agrícola y Animal. ^{II}Departamento de Sistemas Biológicos. ^{III}Departamento de Atención a la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán. C.P. 04960 México, D.F. Correo electrónico: srodnararro@gmail.com.

RESUMEN: Este ensayo tuvo como objetivo determinar el efecto insecticida de los extractos crudos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) (Harris). Los extractos se obtuvieron a partir de un medio de fermentación sólida del hongo entomopatógeno y las larvas del insecto (*Phyllophaga* spp.) se recolectaron en zonas del municipio de Zacatepec, Morelos, México. Se diseñó un experimento con dos criterios: A. con sustrato: T1 Agua destilada (control), T2.- Extracto crudo de *B. bassiana*. B. sin sustrato: T3.- Agua destilada y T4.- Extracto crudo de *B. bassiana*; se utilizaron 8 larvas por tratamiento. A cada larva se le inyectó 10 µl y se observaron cada 48 horas por 10 días. Los datos se sometieron a un análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis). Con respecto al T1 no hubo mortalidad (0%) durante todo el experimento. T2 la mortalidad se presentó a las 72 horas (12.5%); T3, se registró el 12.5% de mortalidad a las 48Hrs.; para el T4 la mortalidad fue de 37.5% en el mismo periodo de tiempo. Al octavo día, los tratamientos 2, 3 y 4 se registró 62.5% de mortalidad. Los resultados obtenidos permiten demostrar la potencialidad insecticida del extracto crudo de *B. bassiana*.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Phyllophaga* spp., caña de azúcar.

Insecticide *in vitro* activity of crude extract of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on larvae of *Phyllophaga* spp. (Harris)

ABSTRACT: The objective of this test was to evaluate the insecticidal effect of the crude extracts of *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin on larvae of white grubs (*Phyllophaga* spp.) (Harris). The extracts were obtained from a solid fermentation medium of the entomopathogenic fungus, and the insect larvae (*Phyllophaga* spp.) were collected in areas of the municipality of Zacatepec, Morelos, Mexico. An experiment was designed with two criteria: A. with substrate: T1 distilled water (control), T2- crude extract of *B. bassiana* and B. without substrate: T3- distilled water and T4- crude extract of *B. bassiana*; eight larvae per treatment were used. Each larva was injected with 10 µl of the treatment and observed every 48 hours for 10 days. The data were submitted to a non-parametric analysis (Kruskal-Wallis). With respect to T1, there was no mortality (0 %) during the entire experiment. In T2, mortality was observed at the 72 hours (12.5 %); in T3, 12.5% mortality was recorded at 48hrs; for T4, mortality was 37.5 % in the same period of time. On the eighth day, treatments 2, 3 and 4, 62.5 % mortality was recorded. The results obtained allowed to show the insecticide potential of the crude extract of *B. bassiana*.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Phyllophaga* spp., sugar cane.

En México, la producción de caña de azúcar es de 50 946 483 toneladas, y constituye uno de los productos más importantes del país (1); genera 440 mil empleos directos y 2,5 millones de empleos indirectos (2).

Uno de los factores limitantes de este cultivo son las plagas, como las larvas de «gallina ciega» (Coleóptera: Melolonthidae), ya que generan daños y una disminución del rendimiento entre 20 y 40%; en

diversas regiones agrícolas de México; al causar daño en caña de azúcar y otros cultivos como maíz, tomate, frutales y pastizales. Las larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris) consumen las raíces de las plantas, desde las etapas tempranas del cultivo. Debido a que las raíces primarias están completamente podridas y carcomidas por las larvas, y no existe presencia de raíces secundarias, el daño es en forma de manchones, las plantas presentan coloraciones violetas a causa de la deficiencia de fósforo y debido al daño radicular, se produce marchitez y muerte de la planta (3,4).

En el estado de Morelos se aplican insecticidas para reducir las poblaciones de «gallina ciega» (4), los cuales ocasionan daños al ambiente y a la salud, debido al mal uso de los insecticidas sintéticos (5).

Por tal motivo, es necesario proponer nuevas alternativas de control, como es el uso de hongos entomopatógenos (HP), los cuales reducen las poblaciones de plagas (6). El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin produce metabolitos secundarios (7) que, generalmente, son depsipéptidos cíclicos complejos de bajo peso molecular como: beauvericina, beauverólidos y basianólido, que tienen actividades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicos e insecticidas, poseen baja toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo (7, 8, 9). Estos metabolitos se obtienen a partir de un sistema de Fermentación Sólida (FS), que utiliza bagazo de caña como soporte para el crecimiento miceliar del hongo y caparazón de camarón, cuya estructura es similar a la cutícula del insecto (10).

El objetivo de este trabajo fue determinar la potencialidad del uso de extractos crudos de *B. bassiana*, para el manejo del tercer instar de gallina ciega (*Phyllophaga* spp) bajo condiciones de laboratorio.

Para colectar las larvas de *Phyllophaga* spp, se realizó un muestreo en cinco de oros en dos campos cañeros: Puente Ixtla y Xoxocotla; de cada campo se tomaron 5 cepellones de 40x40x40 cm y se removieron la raíz y el suelo. Dicha actividad fue desarrollada en colaboración con el personal técnico de la junta local CESVMOR (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Morelos), en el mes de noviembre de 2012.

Para el estudio se utilizaron 32 larvas del tercer instar de gallina ciega, colectadas en la zona cañera, localizada en el Municipio de Zacatepec, Morelos, México. Sus coordenadas geográficas son: al norte 18°41' y al oeste 99°11'. Las larvas se colocaron en recipientes de plástico de un litro de capacidad, con suelo de la zona de colecta.

Se evaluaron las larvas en función de su estado físico y movilidad (11). Posteriormente, se separaron, de manera individual, las larvas sanas en vasos de plástico con 30g de suelo estéril húmedo y se mantuvieron con dieta de trozos de zanahoria de 5g en una cámara bioclimática Lumistel® a 25°C y 50% de humedad (12).

Como biorregulador, se empleó el aislado 11 de *B. bassiana* proveniente del estado de Veracruz, México; proporcionado por la Dra. Raquel Alatorre Rosas del Colegio de Postgraduados. La cepa se activó en Agar Dextrosa Saboraud (SDA) por 10 días a 25°C; transcurrido el tiempo se colectaron las esporas y se conservaron a 4°C (10).

El cultivo sólido se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml, utilizando como soporte bagazo de caña, un medio cuya composición química fue: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g l⁻¹; MgSO_4 , 1.2 g l⁻¹; NaCl, 1 g l⁻¹; KH_2PO_4 , 15 g l⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g l⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.028 g l⁻¹ y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.032 g l⁻¹ y caparazón de camarón (60 g l⁻¹). El contenido de los matraces fue de 35g de materia húmeda, las condiciones del cultivo sólido fueron: humedad inicial 65%, pH 5 y temperatura de 25°C. Se inocularon con 10⁷ esporas (g Peso húmedo)⁻¹ (10).

Transcurrida la fermentación de 10 días, se pesó el contenido de los Erlenmeyer y se agregó agua destilada en una proporción 1:1 (p/v), se homogeneizó y con una gasa estéril se filtró y se colectó en un vaso de precipitado. El extracto crudo se centrifugó por 15 minutos a 5000 rpm a 4°C, se decantó para separar los sólidos suspendidos y, por último, se volvió a filtrar a través de una membrana Millipore de 0.45 µm y se conservó a 4°C (10).

Para determinar la actividad insecticida del filtrado de *B. bassiana* en larvas *Phyllophaga* spp. y tomando en cuenta los hábitos rizófagos de las larvas, se estableció un experimento con dos criterios: A. larvas sobre suelo como sustrato y B. larvas sin sustrato; con 4 tratamientos; ocho repeticiones y cada repetición con una larva; a cada insecto se inyectaron 10µl de cada tratamiento (12) (Tabla).

Los tratamientos se revisaron cada 48 horas por 10 días (13). Los datos a los ocho días fueron comparados en cuanto a porcentaje de mortalidad, mediante el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis; con el programa JMP 8.0.

El extracto crudo de *B. bassiana*, producido por fermentación sólida, tiene actividad insecticida sobre las larvas del tercer instar de *Phyllophaga* spp., produciendo el 100 % de mortalidad a los ocho días para los criterios A y B. Mientras que en el criterio A en el T1, la mortalidad fue del 0%, mostrando que el método de

TABLA. Tratamientos aplicados a *Phyllophaga* spp./
Treatments applied to Phyllophaga spp.

Organismo	Criterio	Sustrato	Tratamiento
Larvas	A	Con suelo	T1= agua destilada
			T2= Extracto crudo de <i>B. bassiana</i>
	B	Sin suelo	T3= Extracto crudo de <i>B. bassiana</i>
			T4= agua destilada

inyección no provocó la muerte de las larvas; sin embargo, el criterio B, T4 se presentó una mortalidad del 50%, posiblemente como respuesta a la eliminación de su hábitat (Fig. 1). Los resultados muestran una diferencia significativa ($P < 0.0420$) con la prueba de Kruskal-Wallis.

El efecto insecticida de los filtrados de *B. bassiana* podría estar relacionado con la presencia de diferentes metabolitos como enzimas o metabolitos que en una fermentación sólida pueden ser producidos rutinariamente (10, 14). Se conoce la acción insectici-

da de los metabolitos de *B. bassiana* contenidos en los filtrados obtenidos a partir de diferentes sistemas de cultivo del hongo y ha sido reportado por diversos autores sobre diferentes insectos. Ortiz-Urquiza *et al.* (15); mostraron que los extractos crudos obtenidos de cuatro cepas de *B. bassiana* presentaron alta toxicidad sobre *Galleria mellonella* (Lineus). De la misma manera, Abd El-Ghany *et al.* (16) aplicaron extracto crudo de *B. bassiana* en larvas de *G. mellonella* y la muerte fue del 55% después de las 96 horas. Una de las fracciones con actividad insecticida fue identificada como beauvericina. Arboleda *et al.* (17) evaluaron la acción de este metabolito sobre larvas y adultos de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y la actividad fue mayor en larvas que en adultos, alcanzando una mortalidad del 50% al octavo día.

Por otra parte, Yousef *et al.* (18) mostraron que los extractos crudos de *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) tienen actividad insecticida sobre *Bactrocera olea* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) y causan mortalidades de 60% en adultos, mientras que en larvas fue de 82,3%.

El efecto de la actividad insecticida del extracto de *B. bassiana* fue evidenciado por el cambio de coloración de las larvas de *Phyllophaga* spp. En el caso de los controles de agua destilada con larvas colocadas en los recipientes con suelo (Fig. 2A) y colocadas en recipientes sin suelo (Fig. 2C), las larvas conservaron

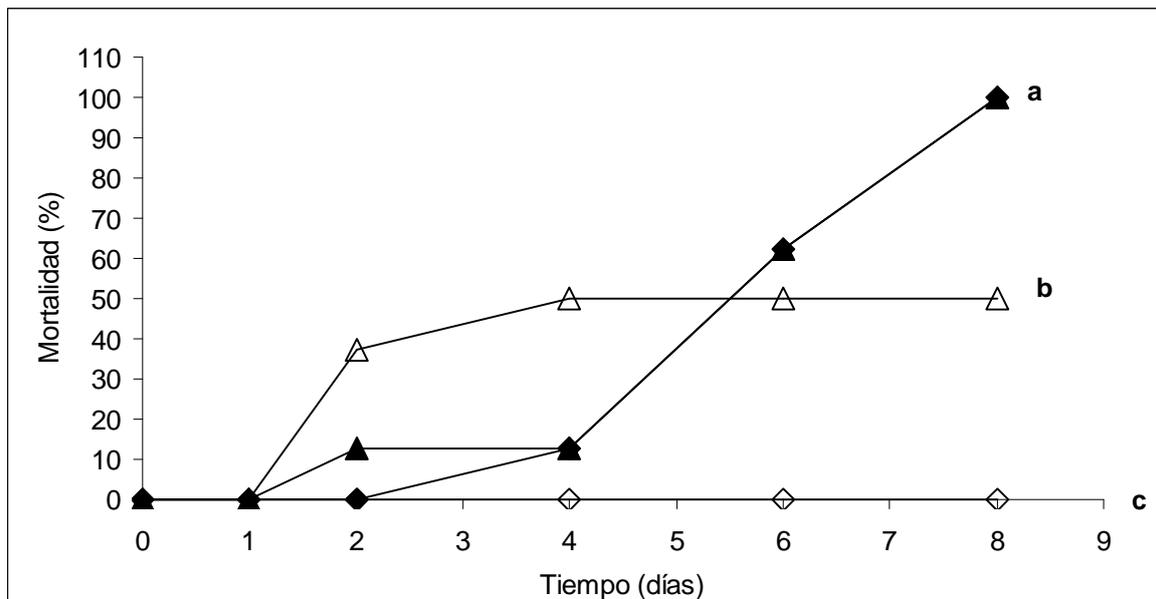


FIGURA 1. Mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp del tercer instar. Criterio A T1 agua destilada (◇); T2 extracto crudo (◆); Criterio B T3 extracto crudo (▲); T4 agua destilada (△)./ *Mortality of third larval instar Phyllophaga* spp. Criterion A T1 distilled water (◇); T2 crude extract (◆); Criterion B T3 crude extract (▲); T4 distilled water (△).



FIGURA 2. Larvas de *Phyllophaga* spp. del tercer instar, colectadas en la zona cañera, después de la aplicación de los tratamientos: **A.** Criterio AT1 larva sana, **B** Criterio A T2 cadáver de la larva. Criterio B: **C** cadáver de larva del T3 y **D** cadáver del T4./ *Phyllophaga* spp. larvae of the third instar, collected in sugarcane area, after application of the treatments: **A:** Criterion A healthy larva; **B:** Criterion A T2 larva corpse; **C:** Criterion B T3 larva, and **D:** Criterion B T4 larva corpse.

la coloración característica blanco-cremosa. Al aplicarse el extracto crudo de *B. bassiana* a larvas colocadas en recipientes con suelo (Fig. 2B) y recipientes sin suelo (Fig. 2D), los cadáveres de las larvas presentaron un cambio de coloración, debido a la melanización. Este proceso de respuesta del sistema inmune humoral de los insectos, a la aparición de algún agente externo, es conocido como el sistema profenoloxidasas (19,20). En el caso de la muerte de las larvas se sugiere que fue provocada por la inyección del extracto crudo dentro del hemocele de la larva; donde las proteasas PR1 activaron la cascada, la profenoloxidasas a fenoloxidasas desregulando el proceso de manera descontrolada, provocando la muerte del insecto (21).

Los resultados obtenidos en este estudio, a nivel de laboratorio, evidenciaron la existencia de un efecto detrimental del extracto crudo de *B. bassiana*, obtenido por fermentación sólida sobre larvas de *Phyllophaga* spp., sugiriendo que pudieran ser empleados como bioinsecticida para el manejo de esta plaga. Aunque para la aplicación en campo se necesitaría estudios posteriores para establecer, entre otros elementos, la dosis específica y el método de aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la beca 466930 del CONACYT. Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Al Mtro. Reyes López Ordaz por el apoyo en el análisis estadístico y por las acertadas críticas y sugerencias para este manuscrito de igual manera al Dr. Jesús Rodríguez Diego.

REFERENCIAS

1. FAOSTAT. Producción de caña de azúcar en México. 2012. <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/browse/Q/QC/S>. (Acceso 26 septiembre 2013).
2. Mejía SE, Rivera AJC, Oviedo NE, Debernardi DVH, Tiscareño LM. Estudio de caracterización de zonas potenciales de mecanización en las zonas de abasto cañeras. Colegio de Postgraduados-SAGARPA. 2010: 155.
3. Ruiz VJ, Aquino BT, Rivera MES, Girón Pablo S. Control integrado de la gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con agentes entomopatógenos en Oaxaca, México. Revista Científica UDO Agrícola. 2012;12(3):609-616.
4. Rivera-Gasperín SL, Carrillo-Ruiz H, Morón MA, Yanes-Gómez G. Fauna de Coleoptera Melolonthidae (Scarabaeoidea) en el rancho canaletas, paso del macho, Veracruz, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.). 2013;29(1):194-208.
5. Montoro Y, Moreno R, Gomero L, Reyes M. Características de uso de plaguicidas químicos y riesgo para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009;26(4):466-472.
6. Pedrini N, Dal Bello GM, Padin SB, Juárez MP. Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para control de

- coleópteros en granos almacenados. *Agrociencia Uruguay*. 2011;15(1):64-69.
7. Matthes D, Richter L, Müller J, Denisiuk A, Feifel SC, Xu Y, et al. *In vitro* chemoenzymatic and *in vivo* biocatalytic syntheses of new beauvericin analogues. *Chem Commun*. 2012;48:5674-5676.
 8. Ownley BH, Gwinn KD. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*. 2010;55:113-128.
 9. Borges D, Díaz AO, San Juan AN, Gómez E. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de Azúcar Cuba*. 2010;44:49-55.
 10. Barranco FJE, Bustamante CP, Mayorga RL, Gonzalez CR, Martinez CP, Azaola A. β -N Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*. 2009;34(5):356-360.
 11. Nájera-Rincón MB; García Martínez M, Crocker RL, Hernández Velázquez V, Rodríguez del Bosque LA. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*. 2005;9(1):33-36.
 12. Aragón GA. Biología comportamiento e importancia de cinco especies del genero *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en agrosistemas del estado de Puebla, Puebla. [Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 2005; 117p.
 13. Zibae A, Bandani AR, Talaei-Hassanlouei R, Malagoli D. Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*. 2011;11:138.
 14. Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:910-915.
 15. Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E. Insecttoxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010;105:270-278.
 16. Abd El-Ghany TM, El-Sheikh HH, Abd El-Rahman GA, Abd El-Nasser AM. Biodiversity of entomopathogenic fungi in new cultivated soil with their using to control of *Galleria mellonella*. *International Journal of Current Research and Review*. 2012;4(24):17-31.
 17. Arboleda JW, Gaitán-Bustamante AL, Valencia AJ, Grossi de Sá MF. Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: An intraspecific evaluation of Beauvericin production. *Current Microbiology*. 2011;63:306-312.
 18. Yousef M, Lozano-Tovar MD, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and Its Extracts. *Journal of Economic Entomology*, 2013;106(3):1118-1125.
 19. Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M. Purification, characterization and molecular cloning of pro-phenoloxidasas from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry Molecular and Biology*. 2000;30:953-967.
 20. Vargas-Albores F, Ortega-Rubio A. El Sistema immune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y Posgrado*. 1994;4:21-28.
 21. Harrison RL, Bonning BC. Proteases as Insecticidal Agents. *Toxins*. 2010;2:935-953.

Recibido: 17-7-2013.
Aceptado: 8-10-2014.