

PATOGENICIDAD IN VITRO DE *Beauveria bassiana* SOBRE *Hypsipyla grandella* Zeller (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) BARRENADOR DEL CEDRO ROJO

Benjamín Barrios-Díaz¹✉, Sonia Reyes-Simón¹, Gloria Vázquez-Huerta¹, Juan Manuel Barrios-Díaz², Numa Pompilio Castro-González², Raúl Berdeja-Arbeu¹ y Jesús Mao Estanislao Aguilar-Luna³

¹Programa de Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ingeniería Agrohidráulica-BUAP, Domicilio Conocido, Bo. Benito Juárez, Tetela de Ocampo, Puebla. C. P. 73640.

²Programa de Ingeniería Agrohidráulica, Facultad de Ingeniería Agrohidráulica-BUAP, Domicilio Conocido, San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla. C. P. 73800.

³Ingeniería Agroforestal, Complejo Regional Norte-BUAP.

✉ Autor de correspondencia: benjamín.barrios@correo.buap.mx

RESUMEN. El barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* es considerada como una plaga muy importante en maderas preciosas debido al ataque que sufren en los primeros años, provocando disminución de calidad y rendimiento de la madera. *Beauveria bassiana* ha demostrado su efectividad para el control de lepidópteros, es por ello que el objetivo del presente estudio es evaluar *in vitro* la patogenicidad de dos aislamientos nativos de *B. bassiana* (BbPL01 y BbPL02), ambas a una concentración 1×10^8 conidias ml^{-1} sobre larvas de tercer instar *H. grandella*. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Usos Múltiples de la Unidad Regional Tetela-BUAP. Se utilizaron larvas procedentes de plantaciones comerciales de cedro de Hueytamalco, Pue. Se evaluó el porcentaje de mortalidad y el tiempo para alcanzar la máxima mortalidad. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de T de Student para comparar las cepas. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre las cepas y presentaron mortalidades del 92 y 84 % a los cinco días en promedio. Los resultados obtenidos indican que los dos aislamientos de *Beauveria bassiana* son patógenos a *H. grandella* y podría representar una alternativa para el manejo integrado del barrenador de las meliáceas.

Palabras clave: Manejo integrado, hongo entomopatógeno, meliáceas.

Pathogenicity in vitro of *Beauveria bassiana* about *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) red cedar shoot borer

ABSTRACT. The borer of the meliaceous *Hypsipyla grandella* is considered a very important pest in precious woods due to the attack that they suffer in the first years, causing decrease of quality and yield of the wood. *Beauveria bassiana* has demonstrated its effectiveness for the control of Lepidoptera, which is why the objective of the present study is to evaluate *in vitro* the pathogenicity of two native *B. bassiana* isolates (BbPL01 and BbPL02), both at a concentration of 1×10^8 conidia ml^{-1} on larvae of third instar *H. grandella*. The test was carried out in the Laboratory of Multiple Uses of the Unidad Regional Tetela-BUAP. Larvae were obtained from commercial cedar plantations of Hueytamalco, Pue. The mortality rate and the time to reach the maximum mortality were evaluated. A variance analysis and a Student's T test were performed to compare the strains. Statistical analysis did not show significant differences between strains and presented mortality rates of 92% and 84% at five days on average. The results indicate that the two *Beauveria bassiana* isolates are pathogenic to *H. grandella* and could represent an alternative for the integrated management of the shoot borer.

Keyword: Integrated management, entomopathogenic fungi, meliaceae.

INTRODUCCIÓN

Cedrela odorata L. es una de las especies nativas de mayor importancia forestal en México que sirve de base para la industria forestal nacional de maderas preciosas; sin embargo, el establecimiento y la productividad de plantaciones forestales con esta especie ha sido limitadas, debido a la falta de información silvícola, y, por la alta incidencia de plagas, tales como minadores de hojas, piojos harinosos, chicharritas y escamas (Calixto *et al.*, 2015).

Desde hace varias tres décadas y en zonas tropicales del mundo, incluyendo las de Latinoamérica, las plantaciones de meliáceas se han abandonado o bien se han interrumpido en su totalidad, debido al ataque de *H. grandella* (Zeller) y *H. robusta* (Moore). En México, como en el resto del trópico americano, *H. grandella* ha sido documentada como una plaga crónica que limita el establecimiento exitoso de plantaciones de cedro y caoba (*Swietenia macrophylla* King), en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Cibrián *et al.*, 1995).

Briceño (1997) reporta que la fase más susceptible de las plantaciones de *C. odorata* al ataque del barrenador, abarca los primeros tres y hasta seis años de edad. Si durante ese periodo no son atacados, es posible que la plaga ya no represente un problema para la plantación, a menos que el desempeño de los individuos sea pobre en términos de crecimiento y continúen siendo vulnerables.

Es posible controlar químicamente al barrenador, pero los costos son altos, sin considerar el riesgo ecológico por contaminación, es por ello que se promueve el uso de organismos benéficos como una alternativa sostenible de control de insectos, recomendable dentro de un programa de manejo integrado de plagas, ya que no tiene efectos nocivos para el medio ambiente, la salud del hombre y los animales. Las enfermedades causadas por hongos en los insectos comúnmente reducen significativamente las poblaciones, demostrando así que los bioinsecticidas pueden ser una alternativa viable para resolver los problemas de plagas en la agricultura. Investigaciones en este campo se están llevando a cabo en muchos países, y México no es la excepción (Jiménez, 1998; Alatorre, 2000).

El hongo de *Beauveria bassiana* infecta larvas de *H. grandella* por contacto con las esporas, las cuales germinan y penetran en el cuerpo de las primeras reduciendo su actividad y provocándoles la muerte alrededor de dos o tres días después de la aplicación (Sánchez y Velázquez, 1998).

Beauveria bassiana se ha aplicado para el control de *H. grandella* en Costa Rica, a una concentración de 1.4×10^6 esporas viables ml^{-1} (Hidalgo-Salvatierra y Berrios, 1973). Sánchez y Velázquez (1998) evaluaron el efecto de *B. bassiana*, donde se probaron tres frecuencias de aplicación de los patógenos y un testigo y se encontró que si es patogénico ya que reduce el número de daños causados por la plaga.

Hypsipyla grandella (Zeller) ha sido un gran problema en plantaciones de caobas (*Swietenia* spp.) y cedros (*Cedrela* spp.), establecidas en los municipios de Acateno, Tenampulco, Hueytamalco, Ayotoxco de Guerrero, Cuetzalan, Puebla (CONAFOR, 2011), por lo que en la presente investigación se promueve el uso de microorganismos como una alternativa para el control de *H. grandella*.

MATERIALES Y MÉTODO

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples de la carrera de Ingeniería Agroforestal, Unidad Regional Tetela de Ocampo de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde se evaluaron dos aislamientos de *B. bassiana* para determinar la patogenicidad sobre larvas de *H. grandella*. Se utilizaron dos aislamientos monospóricos de *B. bassiana* nativos de hospederos de Tetela de Ocampo, previamente aislados y caracterizados, con codificación (BbPL01 y BbPL02) los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Usos Múltiples de la carrera de Ingeniería Agroforestal.

Se visitaron predios de productores de la comunidad de San Antonio del Sol, Hueytamalco, Puebla que cuentan con árboles de cedro (*C. odorata*) de tres años de edad dentro de sus parcelas para colectar larvas de *H. grandella*, las cuales fueron seleccionadas con base a su instar, posteriormente se colocaron individualmente en frascos con tapa de malla.

Se recolectaron hojas frescas completamente desarrolladas de cedro para favorecer la

supervivencia de *H. grandella* (Vargas *et al.*, 2001). Las hojas se colocaron dentro de un frasco transparente con tapa de malla. El peciolo de las hojas se cubrió con algodón humedecido y se reemplazaron cada 2-3 días. Las larvas se colocaron en forma individual, debido a su fuerte tendencia al canibalismo.

Para el crecimiento del hongo se utilizó el medio papa dextrosa agar (PDA), de acuerdo al CATIE (2003), al medio de cultivo se le agregó 0.5 g del antibiótico cloranfenicol (Lezama *et al.*, 2014).

Para la suspensión de esporas se siguió la metodología de Torres *et al.* (2014), donde se utilizaron los cultivos de los aislamientos de BbPL01 y BbPL02 cuando mostraron esporulación, posteriormente los conidios se cosecharon de la superficie del cultivo bajo condiciones asépticas, raspando las colonias con un bisturí. Para preparar la solución madre se tomó 0.1 g de esporas y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua destilada más una gota de Tween al 0.1 % como agente dispersante, la suspensión obtenida se filtró con una gasa clínica estéril para separar el micelio, y los conidios se agitaron durante 10 minutos en un agitador magnético.

A partir de la solución madre obtenida de BbP01 y BbPL02 se preparó la concentración 1×10^8 , que consistió en tomar 1 ml de la solución madre y colocarlo en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, quedando a una dilución de 10^{-1} respectivamente (García *et al.*, 2011). De las diluciones preparadas, se tomó una muestra y se procedió a realizar el conteo de esporas en una cámara de Neubauer en un microscopio compuesto (Gilchrist *et al.*, 2005).

De acuerdo a la metodología de Del Pozo (1973), se tomaron 150 larvas seleccionadas de acuerdo al tercer instar larval y se dividieron en grupos de 10 larvas cada uno y se utilizó un diseño experimental completamente al azar, empleando 50 larvas por tratamiento (BbPL01, BbPL02 y el testigo) con cinco repeticiones y 10 larvas de *H. grandella* (Malpartida *et al.*, 2013).

Se siguió la metodología descrita por González *et al.* (1993), la concentración de esporas que se empleo es de 1×10^8 conidios ml^{-1} que consiste en inocular las larvas por inmersión durante dos minutos en 10 ml de cada una de las concentraciones preparadas (BbPL01 y BbPL02). Para el tratamiento testigo se siguió la metodología de García *et al.* (2011) que consistió en sumergir las larvas en agua destilada. Luego las larvas fueron colocadas sobre papel toalla, para eliminar el exceso de humedad y transferidas individualmente en frascos acondicionados e identificadas con el código de concentración y repetición correspondiente.

Se evaluó el porcentaje de mortalidad de cada aislamiento y el tiempo en horas a la muerte de los insectos; el análisis de las variables se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente al azar (DCA) con el paquete estadístico de computo Statistical Analysis System (SAS) y la comparación de los aislamientos mediante la prueba de T de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambos aislamientos evaluados de *B. bassiana* fueron patogénicos a larvas de tercer instar de *H. grandella* a la concentración de 1×10^8 conidios ml^{-1} , sin que existieran diferencias significativas entre ambas cepas. La cepa BbPL01 tuvo una mortalidad promedio de 92 % y la BbPL02 de 84 %, lo cual se observa en la figura 1.

Con relación los insectos que sirvieron como tratamiento testigo, éstos no mostraron mortalidad en ninguna de las fechas de evaluación.

Los resultados coinciden con los reportado por diversos autores quienes señalan que tanto a nivel de laboratorio, campo e invernadero, este hongo entomopatógeno muestra efectividad para el manejo de la plaga, así como también se han utilizado otros tales como *Metarhizium anisopliae*, tal como menciona Balachander *et al.* (2012), quienes evaluaron seis aislamientos nativos y dos cepas y encontraron que ocasionaron mortalidad de *H. robusta* a las 24 horas de aplicados los

tratamientos. Del mismo modo Hidalgo-Salvatierra y Berrios (1973) evaluaron esporas de *B. bassiana*, *B. brongniartii* (*B. tenella*) y *M. anisopliae* contra larvas de *H. grandella* y mostraron una mortalidad de 13.9 % con *B. bassiana* a una concentración de 1.4×10^6 esporas viables ml^{-1} , 12.7 % de mortalidad con *B. brongniartii* en el 2.9×10^6 viable esporas ml^{-1} , y 50 % de mortalidad en 1.2×10^7 esporas ml^{-1} con *M. anisopliae* en el quinto instar larval. La mayoría larvas murieron a los ocho días después de la infección con *B. bassiana*, diez días con *B. brongniartii* y seis con *M. anisopliae*.

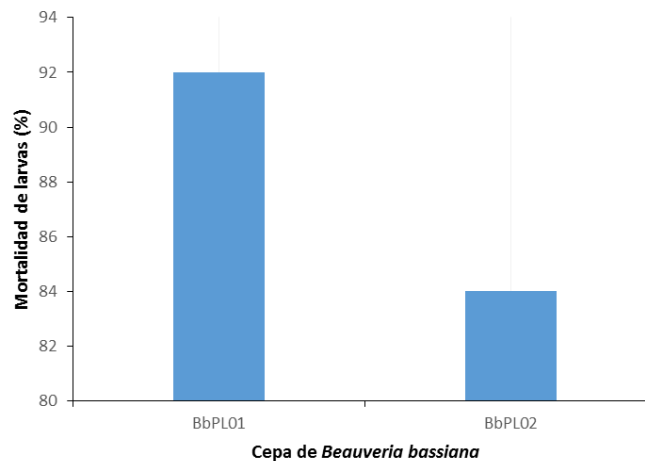


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de dos aislamientos de *Beuveria bassiana* sobre larvas de tercer instar de *Hypsipylla grandella* en condiciones de laboratorio.

A nivel del campo *Beuveria bassiana* se ha aplicado para el control de *Hypsipylla grandella* en Costa Rica, a una concentración de 1.4×10^6 esporas viables ml^{-1} (Hidalgo-Salvatierra y Berrios, 1973) y Sánchez y Velázquez (1998), también evaluaron el efecto de *Beuveria bassiana*, donde se probaron tres frecuencias de aplicación de los patógenos y un testigo y se encontró que si es patógeno ya que reduce el número de daños causados por *H. grandella*. Con relación al tiempo en horas para el inicio de la mortalidad los resultados se muestran en la figura 2.

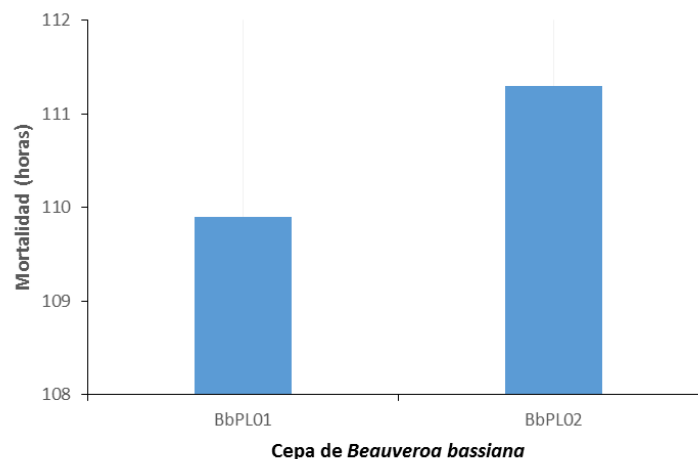


Figura 2. Mortalidad en horas de dos aislamientos de *Beuveria bassiana* sobre larvas de tercer instar de *Hypsipylla grandella* en condiciones de laboratorio.

En dicha figura se observa que la máxima mortalidad se alcanzó a las 109.9 y 111.3 horas para las cepas BbPL01 y BbPL02, respectivamente.

De acuerdo a Balachander *et al.* (2012), reportaron que *Metarhizium anisopliae* causó mortalidad a concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 conidios ml^{-1} sobre *Hypsipyla robusta* con un intervalo de 24 horas hasta por 10 días. En comparación con nuestro estudio usando *Beauveria bassiana* a una concentración de 1×10^8 se observa que BbPL01 y BbPL02 mostraron inicios de mortalidad a las 24 horas y la mortalidad máxima se alcanzó aproximadamente a los cinco días en promedio, en ambas cepas.

Cardona y Soto (2015), aplicaron *Beauveria bassiana* a una concentración de 1×10^9 sobre larvas de *Diatraea saccharalis* y obtuvieron mortalidad a los 11 días después de la aplicación. Así mismo, Soto (2008) aplicó *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* a una concentración de 1.2×10^5 conidias ml^{-1} causando una mortalidad a los seis días después de la aplicación.

CONCLUSIÓN

La evaluación de patogenicidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* demostró que provoca mortalidad sobre larvas de tercer instar de *H. grandella* Zeller a una dosis de concentración de 1×10^8 . En esta investigación se seleccionaron dos cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para ser utilizados en el control de *Hypsipyla grandella* Zeller. Dichas cepas podrían tener un alto potencial para ser empleadas a nivel de vivero o campo para el manejo integrado del barrenador.

Literatura Citada

- Alatorre, R. R. 2000. Hongos entomopatógenos. Pp. 123–134. In: Memorias de artículos en resumen y en extenso, XI Curso Nacional, Control Biológico 2000. Guanajuato, México.
- Balachander, M., Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O. and B. N. Sapna. 2012. Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer, *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Forestry Research*, 23(4): 651–659.
- Briceño, V. A. 1997. Aproximación hacia un manejo integrado del barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (ZELLER). *Revista Forestal Venezolana*, 41(1): 23–28.
- Calixto, C. G., López, M. A., Equihua, A., Libra, D. E y V. M. Cetina. 2015. Crecimiento de *Cedrela odorata* e incidencia de *Hypsipyla grandella* en respuesta al manejo nutricional. *Bosque*, 36(2): 265–273.
- Cardona, L. F. y G. A. Soto. 2015. Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (F) lepidoptera: Crambidae) a diferentes hongos entomopatógenos en caña panelera. *Boletín Científico del Museo de Historia Natural Universidad de Caldas*, 19(2): 95–103.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2003. Producción y uso de hongos entomopatógenos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 63 pp.
- Cibrian-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Campos-Bolaños, R. Yates III, H. O. y J. Elores-Lara. 1995. Insectos forestales de México I Forest Insects of Mexico. Univ. Auto. Chapingo, SARH, USDA-FS, Com. Forestal. Amer. Norte, FAO. Pub. no. 6. 453 pp.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2011. Estudio regional Forestal de la unidad de manejo Forestal Teziutlán, Puebla. Asociación Regional de Silvicultores de Teziutlán A.C. Comisión Nacional Forestal. 155 pp.
- Del Pozo, V. J. 1973. Efecto de la radiación ultravioleta y determinación de la patogenicidad para larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) en mutantes de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Tesis de Maestría. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Turrialba, Costa Rica. 19 pp.

- García, G. C., González, M. M. B. y M. N. Bautista. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2): 217–222.
- Gilchrist, S. L., Fuentes, D. G., Martínez, C. C., López, A. R. M., Duveiller, E., Singh, P. R., Henry, M., y A. I. García. 2005. Pp. 10–15. *In*: Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Segunda edición. México, DF.
- González, G. M. T., Posadas, F. F. J. y P. A. E. Bustillos. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé*, 44(3): 93–102.
- Hidalgo-Salvatierra, O. and F. Berrios. 1973. Growth of larvae reared on a synthetic diet. Pp. 77–80. *In*: P. Grijpma. (Ed). Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. San José, Costa Rica. IICA Miscellaneous Publication. No. 101. V.1.
- Jiménez, Z. J. 1998. Control de calidad en hongos entomopatógenos. Pp. 113–114. *In*: Memoria de artículos en resumen y en extenso, XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Río Bravo, Tamaulipas, México.
- Lezama, G. R., Ramírez, M. A. Castrejón, A. H. Peralta, M y D. O. Rebolledo. 2014. Uso de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Acomycetes) para el control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psylliidae) en limón mexicano. *Entomología mexicana*, 1: 219–224.
- Malpartida, Z. J., Narrea, C. M. y L. W. Dale. 2013. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en Laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2): 75–81.
- Sánchez, M. V. y E. C. Velázquez. 1998. Evaluación de dos insecticidas biológicos en el control de *Hypsipyla grandella* (Zeller), barrenador de brotes de las meliáceas. *Revista Científica Forestal en México*, 23(83): 33–39.
- Soto, A. J. 2008. *Caracterización molecular de aislamientos de Beauveria bassiana y Mearhizium anisopliae y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda (J. E. Smith)*. Tesis maestría. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.
- Torres-de la Cruz, M., Cortez, M. H., Ortiz, G. C. F., Capello, G. S. y M. Pérez-de la Cruz. 2014. Cepas monospóricas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad sobre *Galleria mellonella* en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(2): 171–180.
- Vargas, C. Shannon, J. P. Taveras, R. Soto, F y L. Hilje. 2001. Un método para la cría masiva de *Hypsipyla grandella*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 62: 1–5.