

Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*

Manuel Antonio García García*
Silvia Cappello García**
Julia María Leshner Gordillo**
René Fernando Molina Martínez**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

ENSAYO

Fecha de recibido:
24 de junio de 2011.
Fecha de Aceptación:
14 de julio de 2011.

DIRECCIÓN PARA RECIBIR CORRESPONDENCIA

Silvia Cappello. División de Ciencias Biológicas,
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Correo
electrónico: cappellogs@hotmail.com

* **Manuel A. García.** Licenciado en Biología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) y estudiante de Maestría en Ciencias Ambientales. Laboratorio de Micología de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiol), UJAT. Manuelito22_77@hotmail.com

** **Silvia Cappello.** Doctora en Ciencias por la Universidad de Córdoba, España, Profesor-Investigador, Encargada del Herbario UJAT y Laboratorio de Micología, DACBiol. UJAT. cappellogs@hotmail.com

****Julia M. Leshner.** Doctora en Ciencias por la Universidad de Córdoba, España Profesora-Investigadora, Laboratorio de Biología Molecular, DACBiol, UJAT.

****René F. Molina.** Maestro en Ciencias y Profesor-Investigador, UJAT. Laboratorio de Biología Molecular, DACBiol, UJAT.

Salud Pública

Manuel Antonio García-García*,
Silvia Cappello García**,
Julia María Leshner Gordillo y
René Fernando Molina Martínez
HORIZONTE SANITARIO

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos constituyen uno de los grupos de gran importancia en el control biológico de insectos plagas y vectores de enfermedades. Los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* aislados a partir de insectos, por lo cual se hicieron 4 colectas de insectos cubiertos por hongos externamente en un parche de vegetación secundaria ubicado en el Poblado Límbano Blandín, municipio de Macuspana Tabasco. Se obtuvieron las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para *B. bassiana* se aislaron un total de 4 cepas y para *M. anisopliae* 8 cepas. Las cepas de *B. bassiana* fueron obtenidas de hemípteros y coleópteros adultos. *M. anisopliae* de larvas de coleópteros, himenópteros y coleópteros adultos. Para la caracterización de las cepas fue necesario tomar en cuenta las características macroscópicas de la colonia y microscópicas (conidióforo, conidio, célula conidiogena).

Palabras clave • control biológico, patogenicidad, insectos, Tabasco.

SUMMARY

Entomopathogenic fungi are an important group for the biological control of insect pests and disease vectors. Some insects are susceptible to certain diseases caused by fungi. The aim of this research was isolate and characterizes the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from insects; we did 4 collects looking for insects covered externally by fungi in a secondary vegetation patch located in the Poblado Limbano Blandin at Macuspana, Tabasco. We isolate *B.bassiana* and *M. anisopliae*. For *B. bassiana* we got a total of 4 strains and for *M. anisopliae* 8 strains. The *B. bassiana* strains were obtained from adult of Hemiptera and Coleopteran. *M. anisopliae* was isolated from coleopteran larvae. We got also some strains of *M.anisopliae* from Hymenoptera and Coleopteran adults. The macroscopic characteristic of the colony has well the microscopic characteristic like conidiophores, conidia and cell conidiogenic. Were taken account for the characterization of the strains.

Keywords • biological control, pathogens, insects, Tabasco.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades humanas transmitidas por insectos vectores constituyen una parte substancial de la agenda de trabajo del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud TDR/WHO (por sus siglas en inglés). De las diez enfermedades consideradas en la agenda de TDR, seis de ellas son transmitidas por insectos vectores, como el Dengue.

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*, la cual es la más importante a nivel mundial (Gubler, 1998). Las estimaciones actuales predicen que alrededor de unos 2,500 millones de personas a nivel mundial están en riesgo de contraer la enfermedad, aunque muchas son consideradas como infecciones asintomáticas (Guha-Sapir & Schimmer, 2005). Aproximadamente unos 100 millones de infecciones se presentan por año y de esas, unas 250,000 a 500,000 pacientes desarrollan la forma grave de la enfermedad (Deen et al., 2006). Se reconocen varias manifestaciones clínicas del Dengue como son la fiebre por Dengue (FD), la Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y el Síndrome de SOC por Dengue (SSD), no obstante, en la actualidad se ha cuestionado la validez de tales divisiones, ya que no son tan discretas y más bien se trataría de un continuo de enfermedad (Deen et al., 2006).

Una de las mayores problemáticas asociadas con la epidemiología de la enfermedad es la re-emergencia de la enfermedad en las últimas décadas; por ejemplo, tan solo de 1990 a 1999 se registraron 514,139 casos, que contrastan mucho con los 908 registrados en el periodo de 1950 a 1959 (Guha-Sapir & Schimmer, 2005). En Latinoamérica y países del Caribe, el riesgo de transmisión se ha incrementado notablemente por

el aumento de los serotipos circulantes del virus Dengue.

Esta enfermedad ha ido en aumento, no sólo para el Estado, se ha incrementado a nivel mundial en los países de bajos recursos, como en Centro y Suramérica y en Asia (Hernández-Martínez, et al., 2006).

Los diferentes métodos de combate a esta enfermedad se han encausado al control del vector, pero no siempre han sido exitosos, sobre todo pensando en los insecticidas químicos, que lejos de combatir, afectan más al humano que al mosquito; los métodos de prevención resultan poco efectivos, por la falta de voluntad de las personas, por lo que se han realizado varios estudios encaminados a la obtención de hongos entomopatógenos.

El término hongo entomopatógeno se aplica aquellos microorganismos capaces de atacar insectos (Devotto et al, 2000), o son un medio de control en la reducción de poblaciones de insectos vectores de enfermedades a humanos o causan daño a cultivos (Scholte et al, 2004; Tanzini et al, 2001). También se les define como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación y sobrevivencia; sus mayores ventajas están en la manipulación y adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento (Allendes, 2007). El desarrollo y aplicabilidad de la patología de insectos, se inició en 1879 con Hagen quien estudió el posible uso de hongos para el control de insectos (Vergara, 2004).

La especificidad de los hongos entomopatógenos varía considerablemente, algunos infectan un amplio rango de hospederos y otros están restringidos a una sola especie de insecto. B.

bassiana y *M. anisopliae*, infectan cerca de 100 especies diferentes de insectos en varios órdenes, (Coleóptera, Lepidóptera, Hemíptera, Homóptera, Himenóptera etc.) de modo que estos hongos tienen un alto grado de efectividad (Alean, 2003). Además *Beauveria* y *Metarhizium* han mostrado buenos resultados en el control de plagas tropicales, como los mosquitos vectores del dengue (Lucero et al, 2004).

Un aspecto importante a considerar para lograr buenos resultados en el uso de hongos entomopatógenos, es la obtención de cepas nativas para asegurar una mayor efectividad, si bien las especies han evolucionado a las condiciones ambientales de la zona por lo cual no necesitan una etapa de adaptabilidad como en el caso de cepas exportadas, que incluso con éstas se corre el riesgo de no adaptabilidad y/o en su caso de no resultar tan efectivas en el momento de ejercer su patogenicidad. El objetivo del presente estudio fue realizar el aislamiento y caracterización morfológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* aisladas de insectos nativos en el estado de Tabasco para posteriormente usarlas como control de los mosquitos vectores del dengue (*Aedes aegypti* y *A. albopictus*).

MATERIAL Y MÉTODOS

La colecta de los insectos se realizó en un parche de vegetación secundaria en el Poblado Límbano Blandín perteneciente al municipio de Macuspana, Tabasco, que se localiza en las coordenadas; 92°23'27" longitud Oeste; 17°44'59.6" latitud Norte y una altitud de 9 msnm.

Para la obtención de los hongos planteados se llevó a cabo cuatro colectas aleatorias de insectos silvestres muertos, cubiertos de hongos externamente. Las colectas se efectuaron desde el mes de Marzo hasta el mes de Noviembre del 2009. Dos colectas fueron hechas en temporadas

de seca donde hubo poca presencia de lluvias de Marzo a Junio y dos en temporadas con meses más lluviosos de Julio a Noviembre.

La búsqueda de insectos cubiertos por hongos se efectuó sobre el mantillo del área de estudio donde la hojarasca fue removida y en ocasiones se requirió una lupa que ayudó a la localización de los insectos. Para su procesado, los insectos fueron examinados bajo un estereoscopio para corroborar la presencia de los hongos y posteriormente fueron aislados y se inocularon en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) enriquecido con Extracto de Levadura (EL), para su desarrollo e identificación. La incubación se realizó a temperatura de 20°C a 25°C ± 2°C. La identificación de las especies como objeto de estudio fue mediante claves taxonómicas como la propuesta por Domsch et al, (1993); Humber (1998); Guerrero et al, (1999). Para la caracterización macroscópica y microscópica de las especies en medio de cultivo se consideró los criterios propuestos por Mier et al, (2002), donde incluye color de la colonia, aspecto, consistencia, superficie, velocidad de crecimiento, tamaño, hifas, conidios y células conidiógenas.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Obtención de Cepas

De la colecta de insectos cubiertos por hongos externamente se logró obtener las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para *B. bassiana* se obtuvo 4 cepas y para *M. anisopliae* 8 cepas. Las cepas de *B. bassiana* fueron obtenidas de hemípteros y coleópteros adultos y *M. anisopliae* de larvas de coleópteros, himenóptero y coleópteros adultos. Lo anterior demuestra que el orden coleóptera es más susceptible a ser parasitado por los hongos (Fig.1), y en menor

grado el hemíptero e himenóptero. Pucheta (2006); Ibarra *et al*, (2005) y Lucero *et al*, (2004), refirieron el aislamiento de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a partir de los ordenes Hemíptera, coleóptero y homóptero, dado que estas especies son comunes atacando diversos ordenes de insectos, además de ser eficientes en el control de los mismos, Allendes (2007); Rodríguez *et al*, (2006); Alean (2003) y Scholte *et al*, (2004).

Obtención de Especies por Temporada

Respecto a las cepas obtenidas en temporada de seca y lluvia, *M. anisopliae* fue mejor representado en ambas temporadas mientras que para *B. bassiana* se logró obtener mejores resultados en meses más lluviosos. Esto indica que a *B. bassiana* en los meses donde existe mayor humedad y la temperatura tiende a bajar en la zona de 20-30°C, le es más favorable completar su ciclo y lograr una mejor dispersión, Guerrero *et al*, (1999) y Domsch *et al*, (1993), hicieron referencia que *B. bassiana* y *M. anisopliae* crecen favorablemente a temperaturas entre los 20 a 25 °C± 2°C, sin embargo los resultados en este estudio muestran que *M. anisopliae* soporta temperaturas de 20-40°C prevalecientes en la zona, pues en ambas temporadas fue registrado como patógeno de insectos y además se denota que esta especie puede desarrollarse y completar su ciclo a pesar de existir poca humedad. Para posibles estudios de patogenicidad *M. anisopliae* puede ser una alternativa manejable al tolerar las condiciones ambientales de la zona.

Caracterización de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana se caracterizó por presentar un crecimiento lento, circular, llegando alcanzar 20 mm de diámetro en 10 días, lo que coincide con lo establecido por Domsch *et al*, (1993) para la

colonia de *B. bassiana* en un rango de 0.6 a 2.3 cm de diámetro. El aspecto de la colonia es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana (Fig.2).

Esta especie posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fialides se encuentran hinchadas en la base que asemeja la estructura de un frasco sub-globoso y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag. El tamaño de las células conidiógenas es de 3.8-7 x 1.3-1.8 µm, el raquis de 2.2-4.2 x 1 µm. Los conidios de *B. bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2-3 µm de diámetro, estos resultados coincidieron con la descripción hecha por Alean (2003) y Domsch *et al*, (1993), para la especie *B. bassiana*.

Caracterización de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae presentó un crecimiento de manera circular, lenta, con colonias de 25 mm de diámetro alcanzado en 10 días; este último dato no coincide con lo registrado por Domsch *et al*, (1993) debido a que ellos reportaron para el tamaño de la colonia 20 mm de diámetro en 10 días a 20°C, esto se debe a factores como la temperatura, la cual no fue constante durante el desarrollo del hongo, variando de 20 a 25°C ± 2°C. La coloración de la colonia va desde el verde oliva hasta el verde oscuro debido a la maduración de los conidios, con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana (Fig.3), estos datos son semejantes a los reportes hechos por Guerrero *et al*, (1999), para la especie *M. anisopliae*.

Las cepas presentaron hifas cenocíticas, lisas, con conidios de diferentes matices de colores desde el verde oliva hasta verde oscuro, aunque en un principio predomina el verde oliva, tornándose después a verde oscuro. Los conidios poseen extremos redondeados, lisos y agrupados en cadenas regulares debido a la agregación por elongación de los conidios. Conidios de 5.2-7.7 x 1.4-3.1 μm . Estos datos coincidieron con los rangos descritos por Guerrero *et al*, (1999); Domsch *et al*, (1993), y Humber (1998), para la *M. anisopliae* con conidios de 3.5 a 9 μm .

Conclusiones

Las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, quedaron resguardadas en el laboratorio de Micología de la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT, las cuales fueron obtenidas con el propósito de probar su efectividad como biocontroladores de los mosquitos vectores del dengue *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en el estado de Tabasco.

El uso de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* como entomopatógenos puede ser una alternativa en el manejo de los vectores del dengue y control de plagas, sin embargo se debe considerar que previo a la utilización de los hongos se deben realizar múltiples pruebas de patogenicidad que garanticen la efectividad de las cepas y se debe tener presente que la especificidad juega un papel importante en su aplicación, al igual que las condiciones ambientales que prevalezcan en la zona. Con base en los resultados de estudio, se conjetura que *M. anisopliae* garantizaría ser efectivo, debido a que sin importar las condiciones del medio, se hace presente. En el caso de *B. bassiana* su uso estaría restringido a ciertas épocas donde existe una mayor presencia de humedad y la temperatura no sobrepasa los 30°C. Sin embargo la obtención de *B. bassiana* coincide

con la época donde se presenta una mayor abundancia de los mosquitos vectores del dengue por lo cual no se descarta su utilización y efectividad en el control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Referencias

- Alean IC (2003) Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia.
- Allendes GL (2007) Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (Metsch.) sorokin., para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad Agrónoma.
- Deen, J. L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S. N., Rocha, C., Minh Dung, N., Thanh Hung, N., Tinh Hien, T. & Farrar, J. J. (2006). The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *The Lancet*, 368, 170-173.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1993) Compendium of soil fungi. Institute of Soil Biology. Federal Agricultural Research Centre. 845pp.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 480-496.
- Guerrero CJ, Carrillo LIR, Aguilera PA (1999) Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. *Agro sur*. (27): 2 Valdivia.
- Guha-Sapir, D. & Schimmer, B. (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing

epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*, doi:10.1186/1742-7622-2-1

Hernández-Martínez, E., J. M. y T. Suárez, M.F. H. García, J.E. Gil y A.A.V. Lladó. 2006 Panorama Epidemiológico del dengue en Tabasco, México; Años 2005. Salud en Tabasco. Sep.-dic. 12(003):514-522.

Humber RA (1998) Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Workshop. Las Vegas.

Ibarra AG, Moya RG, Berlanga PA (2005) Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemíptera: Cicadellidae). Folia Entomol. México., 44(1): 1-6.

Lucero MAM, Peña VLA, Bacca IT (2004) Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleóptera: Scarabaeidae). Revista Corpoica. 5(1).

Mier T, Toriello C, Ulloa M (2002) Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 90pp.

Pucheta DM (2006) Evaluación del el efecto insecticida de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Paecilomyces fumosoroseous* sobre mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Universidad Autónoma Metropolitana.

Rodríguez MS, Gerding M, France A (2006) Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (LEPIDÓPTERA: GELECHIIDAE). Agricultura técnica (Chile) 66(2):151-158.

Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. Journal of insect Science, 4:19, 24pp.

Vergara RR (2004) Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 34p.

Figuras

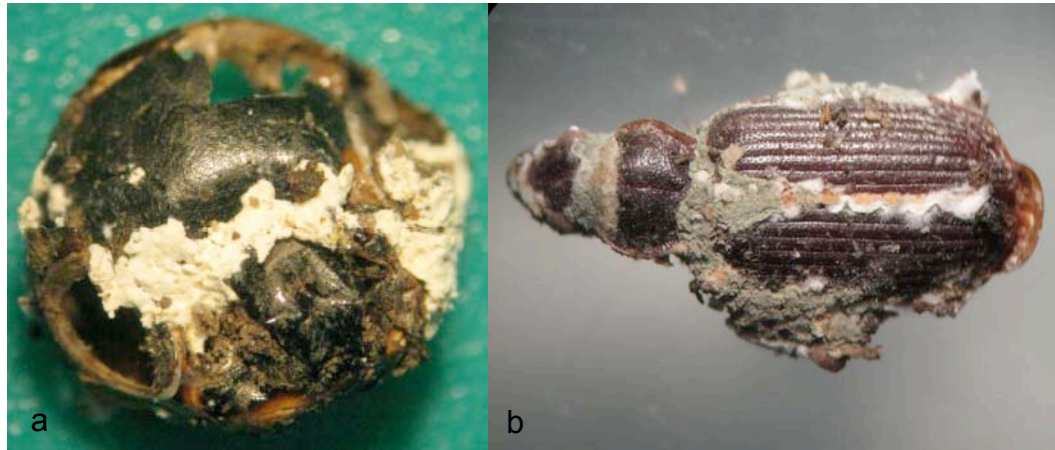


Fig.1. Coleópteros colonizados por a: *Beauveria*, b: *Metarhizium*.

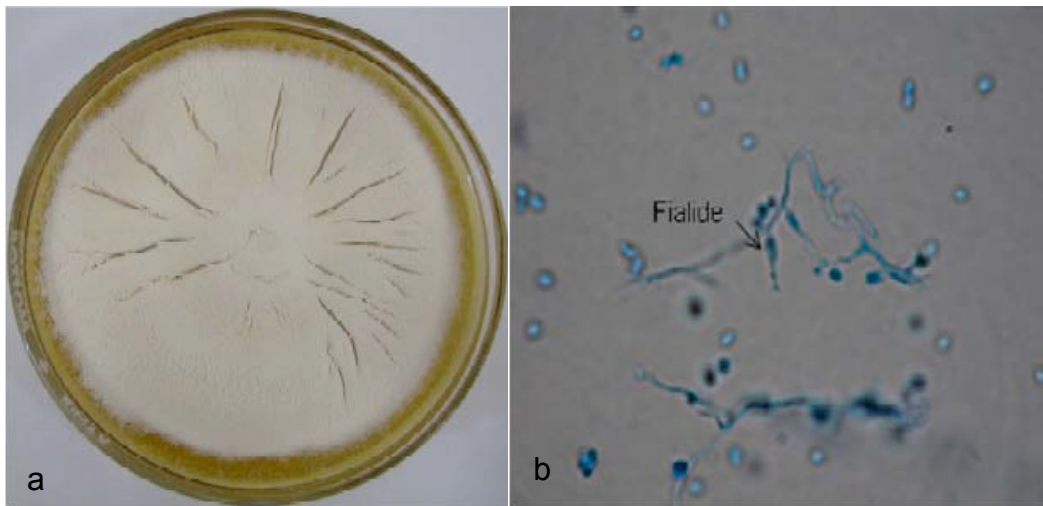


Fig.2. *Beauveria bassiana* a: colonia, b: Fialide y conidios

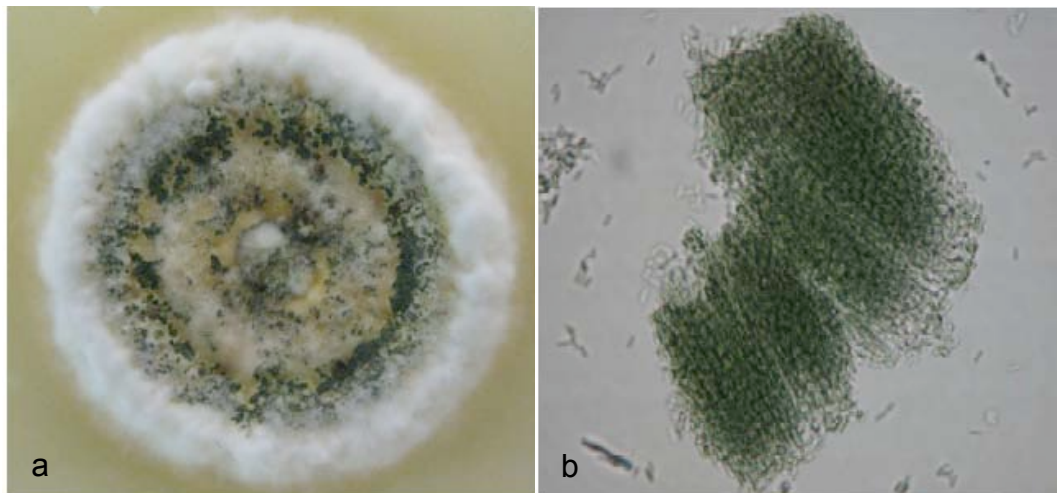


Fig.3. *Metarhizium anisopliae* a: colonia, b: conidios en cadena