

UTILIZACIÓN EXPERIMENTAL DE *Beauveria bassiana* COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Circulifer tenellus*: VECTOR DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE CHILE

Experimental Use of *Beauveria bassiana* as Biological Control of *Circulifer tenellus*: Vector of Phytoplasmas in the Pepper Crop

Ricardo Urtuzuastegui-Peña¹; Luis Roberto Reveles-Torres¹;
Rodolfo Velásquez-Valle¹; José Ángel Cid-Ríos¹ y Manuel Reveles-Hernández¹

¹ Campo Experimental Zacatecas – INIFAP, Km. 24.5, Carr. Zacatecas – Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, México. CP 98500
e-mail: rurtuzuastegui7@gmail.com

RESUMEN

La producción de chile para secado es uno de los principales cultivos en la región del estado de Zacatecas, donde los últimos años se ha visto afectado por la presencia de la chicharrita *Circulifer tenellus*, un vector de fitoplasmas; éstos ocasionan daños a los cultivos como la sintomatología denominada “Amarillamientos del chile”, la cual provoca que la planta reduzca su producción de fruto y en casos extremos la muerte de la misma y con ello genera pérdidas significativas a los productores de este cultivo. Como una solución a esta problemática dentro del manejo del cultivo, se optó por la investigación y evaluación de hongos entomopatógenos que coadyuvaran a reducir la presencia de la plaga. Por lo que el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la efectividad de *Beauveria bassiana* sobre *C. tenellus* como mecanismo de control biológico. La efectividad de *B. bassiana* para clasificarla como un agente biológico eficaz en el manejo y control de la población de *C. tenellus* se delimita a que solo se realizaron pruebas de laboratorio y no de campo. Las pruebas de laboratorio se realizaron en instalaciones del INIFAP, Campo Experimental Zacatecas. En las pruebas realizadas en laboratorio, las tres cepas de *B. bassiana* solo alcanzaron un porcentaje del 20% de efectividad realizada en una sola repetición con 60 adultos de *C. tenellus*, independientemente de la concentración de esporas.

Palabras Clave: entomopatógeno, efectividad, manejo agronómico, control poblacional.

SUMMARY

The production of dried chile is one of the main crops in the region of the state of Zacatecas, where the last years has been affected by the leafhopper *Circulifer tenellus*, a phytoplasma

vector; they cause damage to crops like symptoms called “yellowing of pepper”, which causes the plant to reduce its pod production and in some extreme cases it provokes the plant death and thus generates significant losses to growers of this crop. As a solution to this problem within the crop management, it was decided by the research and evaluation of entomopathogenic fungi that party plaintiffs to reduce this disease. So the main objective of this study was to evaluate the effectiveness of *Beauveria bassiana* on *C. tenellus* as biological control mechanism. The effectiveness of *B. bassiana* to classify it as an effective biological agent in the management and control of the population of *C. tenellus* is delimited to only laboratory tests and field is not performed. Laboratory tests were conducted in facilities INIFAP, Campo Experimental Zacatecas. In laboratory tests the three strains of *B. bassiana* just reached a rate of 20% effectiveness on a single repetition with 60 individuals, regardless the spore concentration.

Key words: entomopathogenic, effectiveness, agronomic management, population control.

INTRODUCCIÓN

Desde los años ochenta el estado de Zacatecas es el principal productor de chile seco (*Capsicum annum L.*). De 1991 a 1996, aportó 29 032 t año⁻¹ de chile mirasol/guajillo y ancho, principalmente, lo que representó 51.2% de la oferta nacional. Esto significó una derrama para el Estado de 342 657 000 pesos por año (Rivas *et al.*, 2001).

Las regiones productoras de esta hortaliza en Zacatecas se ven afectadas por problemas fitosanitarios, en particular por insectos vectores de patógenos. Entre los fitopatógenos se encuentran los fitoplasmas, que en los últimos años han adquirido importancia debido a que se ha reconocido que múltiples

enfermedades vegetales son causadas por ellos. Estos son parásitos estrictos del hábitat intracelular de plantas e insectos vectores; son bacterias carentes de pared celular que viven en el floema de las plantas infectadas y que requieren para su diseminación de un agente vector que debe alimentarse de la savia contenida en el floema (Alfaro-Fernández *et al.*, 2011). Estos microorganismos causan daños devastadores a más de 700 especies de plantas en todo el mundo (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2000). Las plantas infectadas por estos microorganismos muestran una amplia variedad de síntomas, como las deformaciones conocidas como “escobas de brujas”, retraso en el crecimiento y el amarillamiento generalizado. Sobre todo en los órganos florales, la infección por fitoplasmas a menudo induce cambios morfológicos únicos, como filodia (metamorfosis de los órganos florales en estructuras semejantes a hojas), virescencia (coloración verde de los pétalos) o la proliferación (crecimiento vegetativo en los órganos florales), produciendo con ello, daños devastadores tanto en cultivos agrícolas de importancia económica así como en plantas nativas que sirven de reservorios invernales.

En condiciones naturales los principales responsables de la transmisión de los fitoplasmas son insectos picadores-chupadores que se alimentan de la savia del floema y que pertenecen al orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha: dentro del cual se ubican las familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae: todas ellas alojan insectos considerados como vectores (Bové *et al.*, 2003; Markham, 1983; Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007).

En Zacatecas se ha reportado la presencia de la chicharrita del betabel (Cicadellidae); vector de Curtovirus y fitoplasmas en diversos cultivos. Uno de los daños más importantes que se le atribuyen a *C. tenellus* es la transmisión del amarillamiento viral del chile causado por el curtovirus denominado *Beet mild curly top virus* (BMCTV), el cual se encuentra ampliamente diseminado en la región de Zacatecas y Aguascalientes. El BMCTV afecta a todas las variedades de chile que se cultivan en la región produciendo síntomas en las plantas infectadas como: amarillamiento de la planta, achaparramiento (enanismo), deformación de hojas, plantas con poca carga de frutos lo que conlleva a una pérdida de producción del cultivo (Velásquez *et al.*, 2012).

Para el manejo de esta plaga es necesario el monitoreo de su población mediante el empleo de trampas pegajosas y la eliminación de la maleza dentro y fuera de la parcela de chile ya que es ahí donde se hospeda (Velásquez *et al.*, 2012).

El control biológico con hongos entomopatógenos es una herramienta apropiada dado que las esporas pueden permanecer viables sobre la superficie de los granos o del suelo e infectar a los insectos una vez que estos emergen. En la actualidad no existe algún reporte donde *B. bassiana* sea utilizado como agente de control biológico sobre *C. tenellus*. El término

entomopatógeno se ha definido por varios autores de distintas maneras; algunos lo definen como aquellos microorganismo (bacterias, hongos, nematodos y virus) que son capaces de atacar insectos (Devotto *et al.*, 2000) o como los que reducen las poblaciones de insectos plaga en niveles que no causan daño económico a los cultivos (Tanzini *et al.*, 2001).

Dentro de los hongos entomopatógenos más importantes para la reducción de mosquitos se encuentran *Beauveria* spp, *Metarhizium* spp, *Entomophthora* spp, *Lagenidium* spp, *Coelomomyces* spp. y *Culicinomyces* spp. (Scholte *et al.*, 2004). A nivel mundial, una de las especies más frecuentes y estudiadas de hongos entomopatógenos es *B. bassiana*, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, (Allendes, 2007; Rodríguez *et al.*, 2006). Este hongo se ha implementado para el control de plagas de saltamontes en cultivos de frijol y el control de la broca del café en frutos infestados.

Ibarra-Aparicio *et al.* (2005) utilizaron *B. bassiana* para el control de la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis* Delong & Wolcott) bajo condiciones de laboratorio y reportan resultados significativos en la reducción de la población e incidencia de infección del virus del rayado fino sobre plántulas de maíz. *B. bassiana* posee hifas cenocíticas, lisas con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fialides se encuentran hinchadas en la base y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag. Los conidios de este hongo son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal (García *et al.*, 2011)

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Insectos e Identificación: Se efectuaron colectas de chicharritas durante los meses de Mayo y Junio del 2014 en el Campo Experimental Zacatecas del INIFAP, empleando una red entomológica. En laboratorio se identificaron y separaron individuos de la especie de *C. tenellus*. Los insectos pertenecientes a esa especie fueron puestos en plantas de chile dentro de una jaula cubierta con tela de organza para evitar la salida de los adultos de *C. tenellus* o la entrada de otros vectores.

Cultivo de *B. bassiana*. Para la producción del hongo se basó en el procedimiento de Jaramillo (2012), donde se tomaron esporas de los aislamientos CPM-143, C1 y C2. Las esporas se sembraron en medio de cultivo PDA en cajas de Petri e incubadas por 15 días a 28 °C hasta obtener conidias a partir de las cuales se multiplicaron masivamente en medio de cultivo sólido a base de arroz. Para la multiplicación masiva se preparó un medio líquido compuesto por soya (15 g/L), azúcar (10 g/L), sal (5 g/L), mezclados homogéneamente en agua destilada. Posteriormente se distribuyó de manera uniforme el medio líquido sobre 350 gramos de arroz estéril en frascos de vidrio de 750 mL, estos se sellaron y se dejaron en incubación a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/día durante 15 días. Se colectaron las esporas, las cuales se almacenaron en 100 mL de agua estéril por un tiempo máximo de 15 días a una

temperatura de 4° C hasta su uso, con las cuales se realizaron aspersiones en las plantas de Chile.

Aplicación de la solución de esporas a las plantas: Se aplicaron cinco mL de la solución a cada una de las plantas establecidas en las jaulas malla por medio de aspersión con la ayuda de un atomizador, desde la parte aérea de la planta hasta el suelo cubriendo a toda la planta con la solución de *B. bassiana*. Las concentraciones de las soluciones aplicadas para cada cepa fueron: CPM-143 8.12×10^7 , 7.5×10^7 , 4×10^7 , Cepa C1 6.87×10^7 , 6.25×10^7 , 5.62×10^7 y Cepa C2 6.25×10^7 , 5.62×10^7 , 4.62×10^7 y como testigo se aplicaron cinco mL de agua estéril.

Infestación a la planta con el insecto plaga: La infestación consistió en la liberación de los insectos dentro de las jaulas malla, colocando cinco individuos por jaula en el cual se utilizaron un total de 60 de ellos por prueba de ensayo (repetición).

Monitoreo de la acción de *B. bassiana* sobre el vector: En esta última etapa se realizaron las evaluaciones de los efectos causados por *B. bassiana* sobre adultos de *C. tenellus*, tomando como variable la cantidad de insectos infectados o muertos a partir de las 24 horas después de la infestación a la planta.

Después de la infestación, los individuos muertos recupe-

rados de las jaulas, se colocaron en medio de cultivo PDA y se mantuvieron a una temperatura de 28 °C para conservar los hasta registrar la esporulación del hongo. Se monitorearon cada 24 horas los medios de cultivo y se observaron en el microscopio estereoscópico para registrar la esporulación del hongo. Para confirmar que el hongo observado se trataba de *B. bassiana* se realizó una preparación en un portaobjetos, tomando una pequeña muestra por medio de una asa bacteriana y frotando sobre el hongo en desarrollo en el individuo. La preparación se observó en un microscopio compuesto a 40 x de aumento y se tomaron en cuenta las características morfológicas de *B. bassiana* comparándolas con el hongo recuperado de los adultos presumiblemente infectados. Se observó y determinó si la muerte fue producida por este hongo entomopatógeno, y de no ser esta la causa de muerte no se contó en la evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se empezaron a obtener individuos muertos a partir del cuarto día de infestación. Se comparó el micelio recuperado de los insectos con el de la cepa madre y con las características morfológicas mencionadas por García *et al.* (2011) para determinar si la causa de muerte de las chicharritas fue por la infección del hongo. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Beauveria Bassiana observada en microscopio a 40x

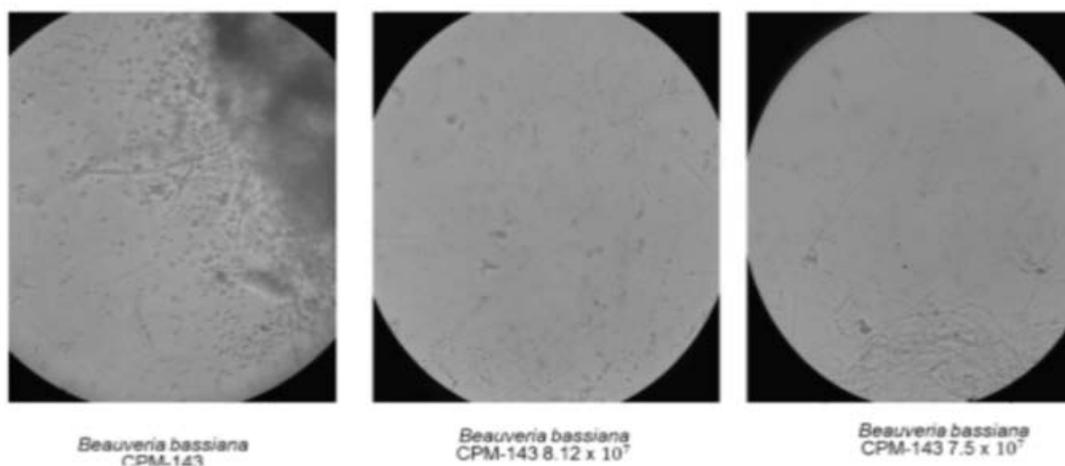


Figura 1. Comparación de la forma y agrupación de conidios aislados de insectos infectados mostrando semejanza con la cepa madre de *B. bassiana*.

La muerte de las chicharritas empezó a manifestarse a partir del cuarto día después de la infestación y aplicación de las tres cepas manejadas de *B. bassiana* en sus tres concentraciones. La muerte de individuos continuó hasta el octavo día, cuando se recolectaron los últimos individuos muertos de todos los tratamientos.

La presencia y primeras manifestaciones de *B. bassiana* sobre el individuo se hizo presente al tercer día al ser colocados los individuos en medio de cultivo de PDA para su re aislamiento.

Algunos adultos testigos desarrollaron un hongo diferente a *B. bassiana*, aún se desconoce la causa del desarrollo del mismo y se continúa trabajando en el proceso de identificación aunque es probable que se trate de un agente contaminante.

De acuerdo con el cuadro 1, las cepas evaluadas de *B. bassiana* presentaron igual efectividad con un 20% de mortalidad, lo cual representa la infección de un individuo por cada cinco expuestos, sin que se observe una tendencia clara respecto al efecto de la concentración de inóculo

Cuadro 1. Efectividad de tres diferentes concentraciones de *B. bassiana* sobre adultos de *C. tenellus*.

Cepa <i>Beauveria bassiana</i>	Pre formulado	Concentración (esporas/ml)	Total Insectos	Numero Insectos Infectados	Mortalidad de adultos (%) ¹
CPM-143	1	8.12 x 10 ⁷	5	1	20
CPM-143	2	7.5 x 10 ⁷	5	1	20
CPM-143	3	4 x 10 ⁷	5	0	0
Testigo	1	Agua estéril	5	2	0
C1	4	6.87 x 10 ⁷	5	1	20
C1	5	6.25 x 10 ⁷	5	1	20
C1	6	5.62 x 10 ⁷	5	0	0
Testigo	2	Agua estéril	5	3 ²	0
C2	7	6.25 x 10 ⁷	5	1	20
C2	8	5.62 x 10 ⁷	5	0	0
C2	9	4.62 x 10 ⁷	5	1	20
Testigo	3	Agua estéril	5	2	0

¹Adultos con micelio de *B. bassiana*.; ²Hongo en proceso de identificación.

En el cuadro 2 se registra la curva de mortalidad de adultos de *C. tenellus* en las jaulas donde recibieron la aspersion de *B. bassiana*; los datos de mortalidad (eficiencia) de las chicharritas se reportan al cuarto día ya que si bien todos los 60 adultos se sembraron en medio de cultivo solamente se recuperó al entomopatógeno en las chicharritas recolectadas el cuarto día; la muerte de los adultos en los tratamientos testigo podría de-

berse a la curva de mortalidad natural del insecto; también es necesario revisar el protocolo para mantener activas las chicharritas por periodos más prolongados. Los resultados anteriores podrían indicar la necesidad de realizar más de una aplicación del hongo para alcanzar una eficiencia por lo menos mayor a 50%.

Cuadro 2. Mortalidad de adultos de *C. tenellus* por la infección de *B. bassiana*.

<i>B. bassiana</i>	Pre formulado	Concentración (esporas/ml)	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Total Individuos
CPM-143	1	8.12 x 10 ⁷	1	2	1	1	0	5
CPM-143	2	7.5 x 10 ⁷	1	1	1	1	1	5
CPM-143	3	4 x 10 ⁷	0	1	2	1	1	5
Testigo	1	Agua estéril	0	1	1	1	2	5
C1	4	6.87 x 10 ⁷	1	1	3	0	0	5
C1	5	6.25 x 10 ⁷	1	2	1	0	1	5
C1	6	5.62 x 10 ⁷	0	3	1	1	0	5
Testigo	2	Agua estéril	0	0	2	1	2	5
C2	7	6.25 x 10 ⁷	1	0	3	0	1	5
C2	8	5.62 x 10 ⁷	0	2	1	2	0	5
C2	9	4.62 x 10 ⁷	1	1	2	1	0	5
Testigo	3	Agua estéril	0	1	2	1	1	5
Total individuos por prueba								60

En los últimos años *B. bassiana* ha sido probado contra hemípteros vectores del suborden Auchenorrhyncha, al cual pertenecen el mayor número de especies transmisoras con mecanismo persistente-propagativo como son los miembros de las familias Cicadellidae y Delphacidae; es posible que este sea el primer trabajo empleando *B. bassiana* contra *C. tenellus*.

Por un lado, el porcentaje de mortalidad encontrado en este trabajo (20%) provocado por *B. bassiana* sobre *C. tenellus* es muy similar al encontrado por Ibarra-Aparicio *et al.* (2005), con el mismo hongo entomopatógeno pero sobre *D. maidis*. Sin embargo, existe una diferencia de los días promedio de mortalidad encontrados, ya que mientras en el trabajo de Ibarra-Aparicio *et al.* (2005) varió de 10.3 hasta 12.1 días, en este estudio se encontró el 100% de mortalidad de chicharritas al octavo día.

La implementación del control biológico de *B. bassiana* sobre *C. tenellus* como vector de patógenos, por resultados preliminares, parece ser positivo. Sin embargo, dado que este es un estudio preliminar, es necesario aumentar las concentraciones de los tratamientos para encontrar la curva de la dosis letal en pruebas de laboratorio por una parte; para después, realizar ensayos en campo y determinar si es viable utilizar a *B. bassiana* como agente de control biológico de la chicharrita *C. tenellus* en las parcelas de Chile para secado en Zacatecas.

CONCLUSIONES

Existen resultados preliminares exitosos para la implementación del control biológico con *Beauveria bassiana* sobre *Circulifer tenellus*.

Son necesarias pruebas de campo para utilizar a *Beauveria bassiana* como agente de control biológico en los cultivos de Chile en el estado de Zacatecas.

LITERATURA CITADA

- Alfaro-Fernández, A.; Del Carmen Cebrián, M.; Villaescusa, F.J.; Font-San-Ambrosio, M. 2011. Detection and identification of aster yellows and stolbur phytoplasmas in various crops in Spain, Bulletin of Insectology. Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies, pp. S63-S64.
- Allendes, G. L. 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 Agronomía.
- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Bové, J.M.; Renaudin, J.; Saillard, C.; Foissac, X.; Garnier, M. 2003. Spiroplasma citri, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Annual Review of Phytopathology* 41:483-500.
- Devotto L. M. Gerding y A. France., 2000. Hongos Entomopatógenos: Una Alternativa Para la Obtención de Biopesticidas. *Bioleche*. 23: 60-33.
- García, G. M. A.; Cappello, G. S.; Leshner, G. J. M.; Molina, M. R. F. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario* 10:21-28.
- Ibarra-Aparicio, G.; Moya-Raygoza, G.; Berlanga-Padilla, A. 2005. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana* 44(1).
- Jaramillo, 2012. Evaluación y validación de mezclas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control de la broca del café en frutos infestados caídos al suelo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia.
- Lee, I.-M.; Davis, R.E.; Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology* 54:221-255.
- Markham, P., 1983. Spiroplasmas in leafhoppers: a review. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 56:745.
- Rivas, E. R.; González, H. S.; Lozano, A. G. B.; Bernal, L. E. P. 2001. Tecnología de producción de Chile seco en el Estado de Zacatecas, México. *Terra* 19:83-88.
- Rodríguez M.S.; Gerding M.; France A. 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE). *Agricultura Técnica (Chile)* 66:151-158.
- Scholte E. J, B.G.J. Knols, R. A. Samson, y W. Takken, 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4: 19 24 pp.
- Tanzini M.; Alves, S.; Setten, A.; Augusto, N. 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivadores con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 59:15-18.
- Velásquez-Valle, R.; Reveles-Torres, L.R.; Amador-Ramírez, M.D.; Medina-Aguilar, M.M.; Medina-García, G. 2012. Presencia de *Circulifer tenellus* Baker y Beet mild curly top virus en maleza durante el invierno en el centro norte de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:813-819
- Weintraub, P.G.; Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111.
- Wilson, M.R.; Weintraub, P.G. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60:177.