

AVANCES DE LA EVALUACION EXPERIMENTAL DE *BEAUVERIA BASSIANA* COMO CONTROL BIOLÓGICO DE LA CHICHARRITA (*Circulifer tenellus*) PRESENTE EN ZACATECAS

Urtuzuastegui-Peña, R.¹, Velásquez-Valle, R.¹, Salas-Muñoz, S.¹, Mauricio-Castillo, A.² y Reveles-Torres, L.R.^{1*}

¹ Campo Experimental Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
Apdo. Postal # 18, Calera de V. R., Zacatecas, México. C.P.98500

² Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zac., México. CP. 98000

*Autor de correspondencia: L.R. Reveles-Torres reveles.roberto@inifap.gob.mx

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 *Circulifer tenellus* 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 Estado. 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 *Circulifer 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 *Circulifer 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 *B. bassiana* solo alcanzo un porcentaje del 20% de efectividad realizada en una sola repetición con 60 individuos expuestos a tres diferentes concentraciones de tres cepas, el cual la cepa que logro hacer presencia y reducir la población de *C. tenellus* fue CPM-143 en sus concentraciones de 8.12×10^7 y 7.5×10^7 .

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

ABSTRACT

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 *Circulifer tenellus* phytoplasma vector; they cause damage to

crops like symptoms called "yellows Chili", which causes the plant to reduce its production of fruit and death ends the same cases and thus generates significant losses to producers in this State. 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 *Circulifer 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 *Circulifer 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 on *B. bassiana* alone reached a rate of 20% effectiveness on a single repetition with 60 individuals exposed to three different concentrations of three strains, the strain which make achievement presence and reduce the population of *C. tenellus* was CPM-143 at concentrations of 8.12×10^7 y 7.5×10^7 .

Keywords: 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 51.16% 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 han 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 desbastadores 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 que pertenecen al orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha: (familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae) como vectores (Bové *et al.*, 2003; Markham, 1983; Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007).

Uno de los daños más importantes que se le atribuye a *Circulifer tenellus* es el amarillamiento viral del chile Beet mild curly top virus (BMCTV) y se encuentra ampliamente diseminada en la región de Zacatecas y Aguascalientes. El BMCTV afecta a todas las variedades de chile que se cultivan en la región produciendo un gran número de síntomas en las plantas infectadas siendo algunos de estos como: amarillamiento de la planta, achaparramiento (enanismo), deformación de hojas, plantas con poca carga de frutos lo que conlleva a una gran pérdida de producción del cultivo (Velásquez *et al.*, 2012).

El manejo para el control esta plaga es necesario el monitoreo de la población de las chicharritas 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 la plaga (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 *Beauveria bassiana* sea utilizado como control biológico sobre *Circulifer tenellus*. El término entomopatógeno se ha definido por varios autores de distintas maneras; algunos lo definen como a 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 plagas en niveles que no causan daño económico a los cultivos (Tanzini *et al.*, 2001).

Dentro de los hongos entomopatógenos mas importantes para la reducción de mosquitos se encuentran *Beauveria*, *Metarhizum*, *Entomophthora*, *Lagenidum*, *Colelonomyces* y *Culicinomyces*, (Scholte *et al.*, 2004). A nivel mundial, una de las especies más frecuentes y estudiadas de hongos entomopatógenos es *Beauveria 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, el control de la broca del café en frutos infestados.

Ibarra-Aparicio y colaboradores (2005), utilizaron *Beauveria bassiana* en el control de la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) bajo condiciones de laboratorio, y reportan resultados significativos en la reducción de la población e incidencia de infección sobre plántulas de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Colecta de Insectos e Identificación: Se efectuaron colectas de insectos durante los meses de Mayo y Junio del 2014 en el Campo Experimental Zacatecas del INIFAP, por redeo con red entomológica. En laboratorio se identificaron y separaron individuos de la especie de *Circulifer tenellus*. Estos insectos fueron puestos en plantas de chile en una jaula malla.

Cultivo de *Beauveria bassiana*. Para la producción del hongo se basó en el procedimiento de Jaramillo (2012), donde se tomaron esporas del aislamiento CPM-143, C1 Y C2. Se sembraron en PDA en cajas de Petri incubadas por 15 días a 28°C hasta obtener conidias a partir de las cuales se multiplicaron masivamente las cepas en medio de cultivo solido a base de arroz. Para la multiplicación masiva se preparó un medio líquido compuesto por soya (15gr/L), azúcar (10 gr/L), sal (5 gr/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 a las Plantas: Se aplicó 5 ml de la solución a cada una de las plantas establecidas en las jaulas malla por medio de aspersion 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 *Beauveria bassiana*, las concentraciones de las soluciones aplicadas fueron para las cepas 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 aplico H_2O esteril.

Infestación a la Planta con el Insecto Plaga: La infestación consistió en la liberación de los insectos dentro de las jaulas malla, tomando un margen de 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 *Beauveria bassiana* hacia el Insecto Plaga: En esta última etapa se realizaron las evaluaciones de los efectos causados por *Beauveria bassiana* sobre *Circulifer tenellus*, tomando como medición de acción la cantidad de insectos infectados o muertos a partir de las 24 horas después de la infestación a la planta.

Después de la infesta, los individuos muertos se colocaron en medios de cultivo de PDA y se almacenaron a una temperatura de 28°C para conservarlos hasta la esporulación del hongo. Se monitoreo cada 24 horas los medios de cultivo y se observaron en el estereoscopio para verificar y determinar la esporulación del hongo. Para certificar que el hongo en acción se trataba de *Beauveria bassiana* se realizó un montado, tomando una pequeña muestra por medio de una haza y frotado sobre el hongo en desarrollo en el individuo. Se observó en un microscopio a 40x de profundidad y se tomaron en cuenta las características de *B. bassiana* comparándolas con el hongo del individuo. Se observó y determino si la muerte fue producida por este hongo entomopatogeno, 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 sobre estos con la cepa madre, para determinar si fue por la invasión del hongo la causa de muerte. Los resultados se muestran en la figura 1.

Beauveria Bassiana observada en microscopio a 40x

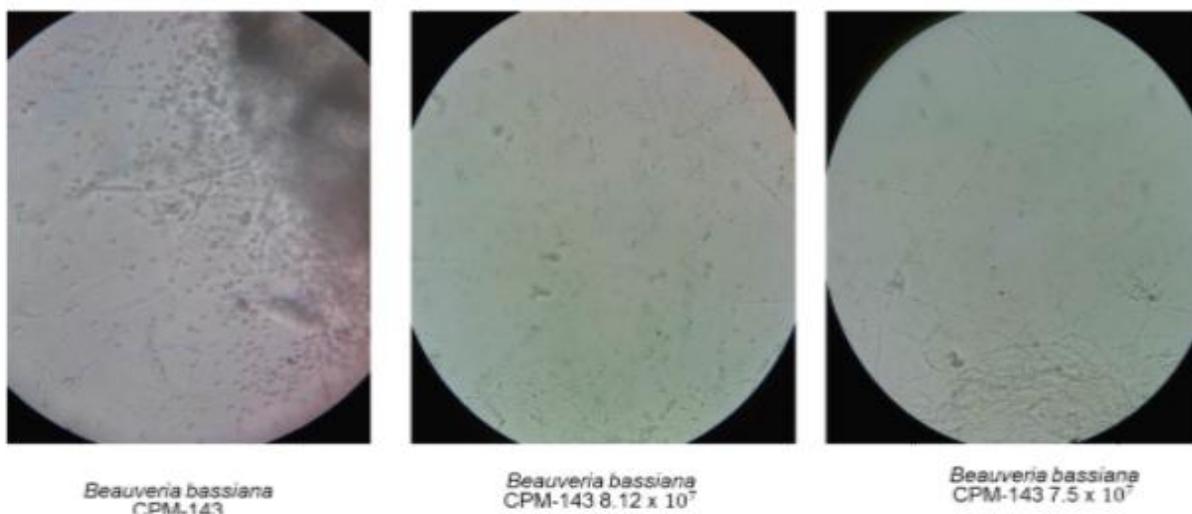


Figura 1. Comparación de la forma y agrupación de conidios aislados de insectos infectados mostrando semejanza con la cepa madre de *Beauveria bassiana*.

La incidencia y prolongación de la muerte a los individuos empezó a manifestarse a partir del cuarto día después de la infestación y aplicación de las tres cepas manejadas de *Beauveria bassiana* en sus tres concentraciones. La prolongación de la muerte de los individuos se presentaron hasta el día octavo, donde se recolecto los últimos individuos muertos de todos los tratamientos, pero la presencia y primeras manifestaciones de *Beauveria bassiana* sobre el individuo se hizo presente al tercer día al ser colocados los individuos en medio de cultivo de PDA pasa su aislamiento.

Los testigos presentaron y desarrollaron un hongo diferente a la especie de *Beauveria bassiana*, aún se desconoce la causa del desarrollo del mismo.

De acuerdo con la Tabla 1 la cepa CPM-143 de *Beauveria bassiana* presento mayor efectividad con un 20%, en un rango de infestación de un individuo por cada cinco expuestos en las concentraciones de 8.12×10^7 y 7.12×10^7 esporas/mililitro respectivamente.

Tabla 1. Efectividad de tres diferentes concentraciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre *Circulifer tenelus* infectados.

Cepa <i>Beauveria bassiana</i>	Pre formulado	Concentración (esporas/ml)	Total Insectos	Numero Insectos Infestados	Porcentaje de Efectividad
CPM-143	1	8.12×10^7	5	1	20%
CPM-143	2	7.5×10^7	5	1	20%
CPM-143	3	4×10^7	5	0	0%
Testigo	1	H_2O esteril	5	2	a*
C1	4	6.87×10^7	5	0	20%
C1	5	6.25×10^7	5	0	0%
C1	6	5.62×10^7	5	0	0%
Testigo	2	H_2O esteril	5	3	a*
C2	7	6.25×10^7	5	0	0%
C2	8	5.62×10^7	5	0	0%
C2	9	4.62×10^7	5	0	0%
Testigo	3	H_2O esteril	5	2	a*

Tabla 2. Contabilidad de días a mortandad de *Circulifer tenelus* causados por la infesta de *Beauveria bassiana*.

Cepa <i>Beauveria bassiana</i>	Pre formulado	Concentración (esporas/ml)	Insectos muertos					Total Individuos
			Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	
CPM-143	1	8.12×10^7	1	2	1	1	0	5
CPM-143	2	7.5×10^7	1	1	1	1	1	5
CPM-143	3	4×10^7	0	1	2	1	1	5
Testigo	1	H_2O esteril	0	1	1	1	2	5
C1	4	6.87×10^7	1	1	3	0	0	5
C1	5	6.25×10^7	1	2	1	0	1	5
C1	6	5.62×10^7	0	3	1	1	0	5
Testigo	2	H_2O esteril	0	0	2	1	2	5
C2	7	6.25×10^7	1	0	3	0	1	5
C2	8	5.62×10^7	0	2	1	2	0	5
C2	9	4.62×10^7	1	1	2	1	0	5
Testigo	3	H_2O esteril	0	1	2	1	1	5
Total individuos por prueba							60	

En los últimos años *Beauveria bassiana* está siendo probado contra hemípteros vectores del suborden Auchenorrhyncha, a la cual pertenecen el mayor número de especies transmisoras con mecanismo persistente-propagativo como son miembros de las familias Cicadellidae y Delphacidae; y es posible que este es el primer trabajo probado contra *C. tenelus*.

Por un lado, el porcentaje de mortandad encontrado en este trabajo (20%) provocado por *B. bassiana* sobre *C. tenelus* 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.*, vario de 10.3 hasta 12.1 días, en este estudio se encontró el 100% de mortandad al 8° día.

La implementación del control biológico de *B. bassiana* sobre *C. tenelus* como vectores de patógenos con mecanismo de transmisión persistente-propagativo, 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 *Beauveria*

bassiana es viable utilizarlo como control biológico en los cultivos de chile en el estado de Zacatecas como medio de prevención.

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. Pontifica Universidad Catolica de Valparaiso. Facultad Agronoma.

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 Entomopatogenos: Una Alternativa Para la Obtención de Biopesticidas. Bioleche. 23: 60-33.

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. Medellin, colombia, 2012.

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(1), 83-88.

Rodríguez M.S, Gerding M. y 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 (2): 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., S. Alves, A. Setten y N. Augusto. 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. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 91-111.

Wilson, M.R., Weintraub, P.G., 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60, 177