

TOXICIDAD DE BLASTOSPORAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* (VUILL) SOBRE *BRACHYSTOLA MAGNA* (GIRARD) (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE)

CIPRIANO GARCÍA-GUTIÉRREZ¹, SAMUEL ÁLVAREZ-AMADOR², HIRAM MEDRANO-ROLDÁN³ Y GERARDO PÉREZ-SANTIAGO¹.

¹CIIDIR COFAA-IPN Unidad Durango. Sigma s/n Fracc. 20 de nov. II. Durango, Dgo. C.P. 34220. Tel y Fax. 01(618) 8142091. <garciacipriano@hotmail.com>

²INIFAP-SAGAR Campo Experimental Valle del Guadiana. A.P. 186, Durango, Dgo.

³INSTITUTO TECNOLÓGICO DE DURANGO (ITD). Blvd. Felipe Pescador No.1830 Ote. C.P. 34080, Durango, Dgo. Tel. 01(618) 8186936.

García-Gutiérrez, C., S. Álvarez-Amador, H. Medrano-Roldán y G. Pérez-Santiago. 2002. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill) sobre *Brachystola magna* (Girard) (Orthoptera: Acrididae). *Folia Entomol. Mex.*, 41(2): 209-214.

RESUMEN. Se evaluó la toxicidad de la cepa BbP1 de *Beauveria bassiana* (Vuill) producida en medio de cultivo líquido a base de melaza como fuente de carbono, las blastosporas producidas se utilizaron para preparar una serie de 6 diluciones a concentraciones de 1.2×10^9 a 8.6×10^5 blastosporas/ml y determinar con ellas la CL_{50} . Se usó un bioensayo por inmersión de círculos de hojas de frijol en las diferentes diluciones, y como control se utilizó agua destilada; las hojas inoculadas se proporcionaron como alimento a 25 ninfas de 5 días de desarrollo por dilución, en repeticiones; se usaron insectos provenientes de una cría de *Brachystola magna* (Girard) establecida en laboratorio a 24°C y 60% HR. Se determinó la mortalidad de las ninfas en cada concentración a las 24, 48 y 72 horas después de su aplicación, y su relación con el tiempo y concentración, así como el número de ninfas micosadas en una cámara climática a 25°C y 70% de HR. La cepa BbP1 causó una mortalidad de ninfas del 100%, a dosis de 1.2×10^9 y una mortalidad mínima de 4% a dosis de 8.6×10^5 blastosporas/ml. La CL_{50} fue de 5.1×10^6 (2.8×10^6 - 8.3×10^6) blastosporas/ml, mientras que el mayor número de ninfas micosadas a las 72 horas se presentó a las concentraciones 7×10^7 y 1.2×10^9 blastosporas/ml. Existió efecto significativo entre dosis y mortalidad ($F=7.614$, $p=0.001$), pero no así entre tiempo y mortalidad ($F=0.544$, $p=0.584$).

PALABRAS CLAVE: Plaga de chapulín, *Brachystola magna*, *Beauveria bassiana*.

García-Gutiérrez, C., S. Álvarez-Amador, H. Medrano-Roldán y G. Pérez-Santiago. 2002. Toxicological effects of *Beauveria bassiana* (Vuill) blastospores over *Brachystola magna* (Girard) (Orthoptera: Acrididae). *Folia Entomol. Mex.*, 41(2): 209-214.

ABSTRACT. The toxicological effects of *Beauveria bassiana* (Vuill) strain code BbP1, produced in a liquid medium culture using molasses as carbon source, was assessment on 5 days old nymphs of *Brachystola magna* (Girard) colony reared in laboratory at 24°C and 60% HR; blastospores produced were used to make a serial dilution at rate of 1.2×10^9 to 8.6×10^5 blastospores/ml to calculate from them the LC_{50} , distilled water was used as a control. A dipped leave bioassay was utilized, bean's leaves were inoculate with each dilution, and 25 nymphs were used per each dose with three replicates. Nymphs mortalities were recorded in each concentration at 24, 48 and 72h after dilutions were applied; LC_{50} was determined, and fungi infection time, using a climate chamber (25°C and 70% HR). The blastospores production using molasses was 1.2×10^9 blastospores/ml. The strain BbP1 caused 100% of mortality of *B. magna* nymphs at dose of 1.2×10^9 and minimum mortality

of 4% at dose of 8.6×10^5 . The LC_{50} was 5.1×10^6 , with fiducial limits of 2.8×10^6 - 8.3×10^6 blastospores/ml, while the highest number of the nymphs infected with fungi 72h after it was applied, was obtained at concentrations of 7×10^7 and 1.2×10^9 blastospores/ml. There was statistical effect between dose-mortality ($F=7.614$, $p=0.001$), but there wasn't occurred between time infection and mortality ($F=0.544$, $p=0.584$).

KEY WORDS: Grasshopper pest, *Brachystola magna*, *Beauveria bassiana*.

En la región norte-centro de México, el chapulín se ha presentado como plaga importante durante los últimos 5 años en pastizales y cultivos de maíz y frijol en los Estados de Zacatecas, Durango y Chihuahua. El complejo chapulín incluye a las especies *Brachystola magna* (Girard), *B. ponderosa* (Bruner), *Melanoplus* sp., *Boopedon nubilum* (Say), *B. flaviventris* (Bruner), *Acrolophitus maculipennis* (Schudder) y *Sirbula admirabilis* (Ulher) (Rivera, et al. 2000). En Durango, *Brachystola magna* es la especie de mayor importancia económica, y se presenta abundantemente en los meses de agosto y septiembre causando daños a los cultivos de maíz y frijol en los municipios de Durango, Guadalupe Victoria, Villa Ocampo, Santiago Papasquiaro y Tepehuanes; actualmente el control del chapulín se realiza con la aplicación de insecticidas como Paratión metílico, Acefate y Malatión (SAGAR, 2000).

En relación al control biológico de ortópteros, se sabe que los hongos entomopatógenos *Entomophaga grylli* (Fresenius), *Metarhizium* spp. y *Beauveria bassiana* son capaces de causar epizootias en campo y lograr el control de las poblaciones antes de que causen daños de importancia económica (Carruthers et al., 1997; Bateman et al., 1998). Jenkins et al. (1998) realizaron aplicaciones exitosas de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) a nivel de campo sobre langosta, dentro del programa LUBILOSA (*Lutte Biologique contre le Locusts et les Sauteriaux*) en Africa, mientras que en México se han utilizado bioinsecticidas a base de los hongos *M. anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* (Gams Rozsypal) y *B. bassiana* para el control de la falsa

langosta *Pterophila beltrani* (Bolivar y Bolivar) en Nuevo León y Tamaulipas (Barrientos et al., 1998).

Respecto a la evaluación de la efectividad tóxica de hongos entomopatógenos, Inglis et al. (1996) determinaron la toxicidad de *B. bassiana* sobre *Melanoplus sanguinipes* (Fabricius) a nivel de laboratorio, utilizando 5µl de una suspensión de conidios viables formulados en aceite a concentraciones de 1×10^5 a 1×10^3 conidios/ml, esta solución se aplicó en discos de lechuga de 5mm de diámetro para alimentar ninfas del insecto y ponerlas en contacto con el patógeno por 12h. La formulación en aceite fue eficaz contra ninfas de chapulines a una CL_{50} de 5.8×10^3 conidios/ml; la micosis total se observó a los 14 días después de la inoculación. Hernández y Berlanga (1998) evaluaron la toxicidad de cepas de *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* (Wize), las cepas más virulentas fueron *M. anisopliae* y *M. flavoviridae* con un tiempo letal 50 (TL_{50}) de 4.5 y 5 días; las tres cepas ocasionaron 100% de mortalidad, a los 8 días después de haber estado en contacto con el hongo.

Estos antecedentes muestran el efecto tóxico de conidios de hongos entomopatógenos sobre ortópteros plaga; no obstante, la información de toxicidad de blastosporas de hongos sobre insectos plaga como el chapulín es escasa, por lo que el presente trabajo tuvo por objetivo: Evaluar la efectividad de blastosporas de *Beauveria bassiana* producidas en fermentador, utilizando un medio de cultivo líquido a base de melaza, sobre ninfas del chapulín *B. magna* de 5 días de desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Entomología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-IPN Unidad Durango y en el área de Biotecnología Industrial del Instituto Tecnológico de Durango ITD. El hongo fue producido en un fermentador Marca Bioflo III de 7l, utilizando melaza® como fuente de carbono, las condiciones de operación del fermentador fueron las siguientes: Tiempo de incubación 6 días, volumen de trabajo 4l, tamaño de inóculo 10%, temperatura 30°C, agitación 200 rpm, aireación 1.5 vvm y pH 5.4; la composición del medio de cultivo fue: Melaza 12ml, (NH₄)₂SO₄ 6g, KH₂PO₄ 2.4g, MgSO₄ 0.5g, NaCl 0.1g, CaCl₂ 0.1g y 1l de

agua.

En la etapa de producción se tomaron muestras del fermentador cada 24 h para determinar el número de blastosporas producidas durante la fase de crecimiento exponencial la cual se presentó a las 24h; el conteo final de blastosporas, durante la fase estacionaria que inicio a los 4 días, se realizó a los 6 días de incubación utilizando un hematocímetro, siguiendo la técnica descrita por Goettel e Inglis (1994). El caldo de cultivo proveniente del fermentador tuvo una concentración de 1.2x10⁹ blastosporas/ml, y fue utilizado para preparar seis diluciones (cuadro 1); como control se uso agua destilada. A cada dilución se le agregó una gota de adherente (0.05ml) dispersante ADH para homogenizar la muestra.

Cuadro 1

Porcentaje de mortalidad y promedio de ninfas de *B. magna* causada por blastosporas de cepa BbP1 de *B. bassiana*.

Dosis	Tiempo			Efecto	
	24 h %-X	48 h %-X	72 h %-X	Dosis- mortalidad	Tiempo-mortalidad
1.2x10 ⁹	96-72	100-75	100-75	*F = 7.614	F = 0.544
7x10 ⁷	80-60	92-69	96-72	*p = 0.001	p = 0.584
2.3x10 ⁷	72-54	76-57	80-60		
7.77x10 ⁶	52-39	68-51	72-54		
2.6x10 ⁶	20-15	28-21	36-27		
8.6x10 ⁵	1-1	1-1	4-3		
TESTIGO	0-0	0-0	0-0		

* Existe efecto significativo (p£0.05) ANOVA/MANOVA.

La cría masiva del chapulín se estableció en un invernadero del INIFAP-SAGAR Durango, utilizando jaulas de 1x0.8x0.5m. La cría se inicio con chapulines adultos colectados en pastizales en San Juan del Río, Dgo, en el mes de julio del 2000, los insectos se confinaron sobre plantas de frijol cultivadas en macetas, las cuales les sir-

vieron como alimento; dentro de las jaulas se colocaron charolas con arena blanca lavada con una solución de cloralex al 1%, la arena se utilizó como sustrato de 10cm de espesor para la oviposición de las hembras; las ootecas se recogieron a partir del mes de agosto y septiembre, y se pusieron en cajas petri sobre papel filtro, la

incubación de huevecillos se realizó en una cámara climática ajustada a 24°C y 60% de HR hasta la eclosión de las ninfas.

Se utilizó el método de bioensayo por inmersión para lo cual círculos de hojas de frijol de 50 mm de diámetro fueron inmersas en cada una de las diferentes diluciones por un tiempo de 3 minutos, después se dejaron secar por un periodo de 5 minutos; posteriormente los insectos se transfirieron a cajas Petri de 55cm de diámetro en grupos de 5 ninfas/caja y finalmente se colocaron en la cámara climática. Las hojas inmersas sirvieron como medio de contacto hongo-insecto y fuente de alimento durante 72h; en cada dilución se usaron 25 ninfas por tratamiento, con 3 repeticiones. Se determinó el número de insectos muertos a las 24, 48 y 72h. Para analizar el efecto de las diferentes concentraciones y el efecto del tiempo de contacto insecto-hongo en la mortalidad de ninfas, se usó el programa ANOVA/MANOVA del paquete Statistica (1993) con un diseño factorial de dos entradas. Para determinar la concentración letal 50 (Cl₅₀) de la cepa estudiada, se utilizó el programa PC Polo (1987). Los insectos tratados se mantuvieron en una cámara de cría a 25°C y 70% de HR, durante el mismo periodo de tiempo para observar el desarrollo de la micosis y determinar el número de insectos micosados en cada dilución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de blastosporas de *B. bassiana* en medio de cultivo líquido a base de melaza fue de 1.2×10^9 blastosporas/ml, con un tiempo de incubación de 6 días. En el cuadro 1 se observa el porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. magna* a las 24, 48 y 72h después de que el hongo e insectos estuvieron en contacto, así como la mortalidad promedio en cada dilución. En estos datos se observa que la concentración de 1.2×10^9 de la cepa de *B. bassiana* BbP1 causó

una mortalidad máxima de 100% a las 48 y 72h, mientras que la mínima fue de 4% en la concentración de 8.6×10^5 a las 72h, lo cual indica la susceptibilidad del insecto y la toxicidad de la cepa a las concentraciones evaluadas. La Cl₅₀ de la cepa BbP1 sobre *B. magna* tuvo un valor de 5.1×10^6 blastosporas/ml, con límites fiduciales de 2.8×10^6 - 8.3×10^6 y un valor de pendiente de 1.7 ± 0.1 , este último valor indica una respuesta homogénea de los insectos de prueba al tóxico (Cuadro 2). Resultados de toxicidad de conidios de *B. bassiana* mejores fueron encontrados por Inglis *et al.* (1996) a concentraciones de 5.8×10^3 - 1.0×10^5 conidios/ml sobre ninfas de 14 días de edad de *M. sanguinipes*, sin embargo en este trabajo es importante destacar que los cuerpos infectivos fueron blastosporas producidas en medio de cultivo líquido y las ninfas tuvieron solo 5 días de edad, a diferencia de los 14 días de edad de *M. sanguinipes*. Los insectos manifestaron el inicio de la invasión del hongo a las 24h, quedando totalmente cubiertos por micelio a las 72h, después de haber aplicado las diferentes dosis. El mayor número de insectos micosados se presentó en las diluciones con concentraciones de 1.2×10^9 y 7.0×10^7 disminuyendo notablemente en el resto de las diluciones (figura 1). El resultado de los datos analizados con el programa ANOVA/MANOVA, con el diseño correspondiente indicaron que existió un efecto directo de las diferentes concentraciones sobre la mortalidad de ninfas ($F=7.614$, $p=0.001$), pero no así con el tiempo de infección ($F=0.544$, $p=0.584$). Esto significa que a mayor dosis, mejor respuesta al tóxico; sin embargo en esta prueba el tiempo para que se manifieste la micosis no depende de la dosis si no que de algunos otros factores como tamaño, peso y susceptibilidad de los insectos a la cepa evaluada. Otro aspecto importante es que el tipo de bioensayo por inmersión de hojas de frijol usado en este experimento fue efectivo para propiciar la conta-

Cuadro 2

Cl₅₀, límites fiduciales y pendiente del blastosporas de la cepa BbP1 en *B. magna*

Cl ₅₀	n	Límite de confianza	Pendiente
5.1 X 10 ⁶	525	2.8 X 10 ⁶ - 8.3 X 10 ⁶	1.7 ±0.1

minación de los insectos de prueba por ingestión del inóculo y por contacto, confirmando con esto los resultados obtenidos por Inglis *et al.* (1996), quienes utilizaron discos de lechuga con un inóculo del agente tóxico, logrando la infección de los insectos. Sin embargo, el bioensayo por inmersión utilizado en este trabajo fue práctico y efectivo, lo que permite contar con un método rápido para evaluar la efectividad tóxica de hongos entomopatógenos sobre insectos como el chapulín.

CONCLUSIONES

La producción de blastosporas de *B. bassiana* en medio de cultivo líquido a base de melaza fue

de 1.16x10⁹ blastosporas/ml, con un tiempo de incubación de 6 días. La toxicidad de blastosporas de la cepa BbP1 de *B. bassiana*, sobre ninfas de 5 días de desarrollo de *B. magna* fue de 100%, a una concentración de 1.2x10⁹ y 4% en la concentración 8.6x10⁵ blastosporas/ml, respectivamente. La concentración de blastosporas tuvo una relación directa con la mortalidad de ninfas, pero no así con el tiempo de infección del insecto con el hongo. La Cl₅₀ de la cepa BbP1 fue de 5.1x10⁶ blastosporas/ml, sobre ninfas de 5 días de desarrollo de *B. bassiana*. El bioensayo por inmersión de discos de hoja de frijol resulto ser práctico y efectivo para lograr la infección de los insectos de prueba.

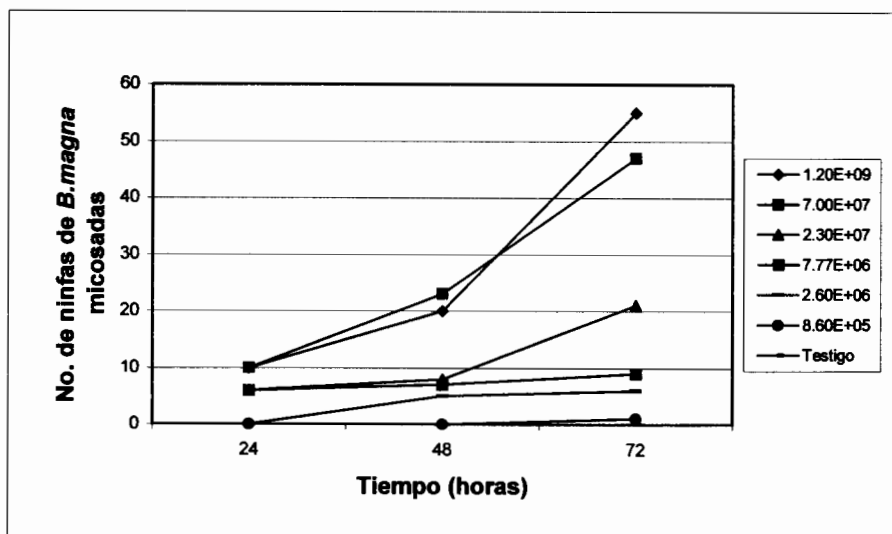


Figura 1. Ninfas de *B. magna* infectadas con blastosporas de *B. bassiana* BbP1.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación PRODUCE AC. Durango, por el financiamiento otorgado para la realización del Simposium de Control de la plaga del chapulín en Durango; al Dr. Manuel Rocha Fuentes por su asistencia en el análisis estadístico de los datos.

LITERATURA CITADA

- BARRIENTOS LOZANO, L., O. ASTACIO, F. ÁLVAREZ Y O. POOT. 1998. *Manual Técnico sobre la langosta voladora (Schistocerca piceifrons piceifrons Walker 1870) y otros acridoideos de Centro América y Sureste de México*. FAO-OIRSA. México. 162 pp.
- BATEMAN R.P., O.K. DOURO-KPINDOU, C. KOOYMAN, C. LOMER AND Z. OUAMBAMA. 1998. Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Protection*, 17(2): 151-158.
- CARRUTHERS R.I., M.E. RAMOS., T.S. LARKIN, D.L. HOSTETTER, AND R.S. SOPER. 1997. The *Entomophaga grilli*. (Fresenius) Batko species complex: Its biology ecology and use for biological control of pest grasshoppers *Memories of the Entomological Society of Canada*, 171: 329-353.
- GOETTEL, M.S. 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hypomycete fungi. *Journal of Microbiology* 15-20 pp.
- GOETTEL, M. AND G. INGLIS. 1994. Fungi: Hyphomycetes. 213-249 pp. In: L. Lacey (edit). *Manual of Techniques in insect pathology*. Academic Press. 409 p.
- GOETTEL, M.S., AND D.L. JOHNSON. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents. In: *Biological control of locust and grasshoppers*. Edited by C.J. Lomer and C. Prior. CAB international, Wallingford, U.K. pp. 356-361.
- HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, V.M.A.M. Y BERLANGA-PADILLA. 1998. *Control microbiano con hongos entomopatógenos*. SAGAR. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Col. México. 106 pp.
- INGLIS G., D.L. JOHNSON, AND M.S. GOETTEL. 1996. An Oil-Bait Bioassay Method used to test the Efficacy of *Beauveria bassiana* against Grasshoppers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 312-315.
- JENING, N.E., R. BATEMAN, AND M.B. THOMAS. 1998. The lubilosa programme-development of a microinsecticide for locust and grasshopper control. *XXI Congreso Nacional de Control Biológico*, Río Bravo, Tamps. México. p. 82.
- PC. POLO PROGRAM. 1987. Auser's guide to probit or logit Analysis. pp. 1-15. Le Oro Software, Inc. Berkley, Ca.
- PRIOR. C., C.J. LOMER., H. HERREN., A. PARAISO., C. KOOYMAN, AND J. J. SMIT. 1991. *The IIB C/IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locusts and grasshoppers*. 8-17 pp.
- RIVERA GARCÍA. E. 2000. Aspectos taxonómicos, biológicos y ecológicos de la plaga del chapulín en el Estado de Durango. *Simposio Control de Plaga de Chapulín en Durango*. Durango, Dgo. México. 9-10 de marzo del 2000. 120 pp.
- SAGAR. 2000. Antecedentes históricos de la contingencia contra el chapulín. 1993-1999.
- SAGAR Delegación Durango. *Simposio Control de Plaga de chapulín en Durango*. 9- 10 de marzo del 2000. Durango, Dgo. México.
- STATISTICA PROGRAM ver. 4.3 Stat Soft, Inc. 1993.

Recibido: 18 septiembre 2001.

Aceptado: 2 febrero 2002.