

Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.)

Díaz, B.M. y R.E. Lecuona

RESUMEN

Se estudiaron distintas cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) aisladas de larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* (F.) y otros insectos hospedantes, recolectadas de diferentes regiones del área maicera argentina. En ensayos de laboratorio todas las cepas fueron patógenas en larvas de *D. saccharalis*. La virulencia osciló entre el 30 y 96 %. Estudios de velocidad de germinación, crecimiento radial, producción de conidios, tiempo letal medio y otras características culturales de las colonias variaron significativamente entre las cepas. No se logró establecer una relación entre estos parámetros y la virulencia. El análisis en conjunto de los mismos permitió seleccionar tres cepas de *B. bassiana* para futuros estudios como insecticida microbiano para *D. saccharalis*.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Diatraea saccharalis*, patogenicidad, virulencia, germinación, crecimiento, producción.

Díaz, B.M. y R.E. Lecuona, 1995. Evaluation of thirty Argentinian strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.)(Deuteromicotina). Agriscientia XII : 33-38.

SUMMARY

Strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin), isolated from overwintering *Diatraea saccharalis* (F.) larvae and other hosts, from different locations of the Argentine corn region, were studied under laboratory conditions. All strains were pathogenic against *D. saccharalis* larvae, with virulence ranging from 30 to 96 %. Germination rates, radial growth, conidial production, medial lethal time and others colony characteristics also varied substantially among strains. However no relation between these

parameters and virulence was found. As a whole, this information allowed the selection of three strains of *B. bassiana*, for further studies as a microbial insecticide against *D. saccharalis*.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Diatraea saccharalis*, pathogenicity, virulence, germination, growth, production.

B.M. Díaz. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. IMYZA-CICA-INTA Castelar. C.C. 25, 1712 Castelar, Buenos Aires. R.E. Lecuona. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. IMYZA-CICA-INTA Castelar. C.C. 25 1712 Castelar, Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

Entre los hongos entomopatógenos más importantes utilizados en el control microbiano de insectos plaga se cita a *Beauveria bassiana* Balsamc (Vuillemin) (McCoy, 1990). La utilización de este entomopatógeno como base de bioinsecticida se está llevando a cabo en otros países (Riba et Silvy, 1991) y para lograr dicha meta, es necesario el conocimiento de la variabilidad natural que permita seleccionar a las cepas más promisorias. La virulencia de éstas ha sido correlacionada con ciertas características microbiológicas relativamente fáciles de obtener (Samuels *et al.*, 1989). Sin embargo, existen variaciones entre las especies de hongos involucradas así como entre cepas. Del mismo modo, el hospedante de origen puede o no ser un factor limitante de esta virulencia (Moorhouse *et al.*, 1993).

En nuestro país, dicho entomopatógeno se encuentra parasitando naturalmente a larvas del "barrador" *Diatraea saccharalis* (F.), procedentes de caña de azúcar (Fresa, 1979) y de maíz (Dagoberto *et al.*, 1981; Lecuona, 1990), siendo este insecto una plaga considerable en ambos cultivos (Dagoberto y Lecuona, 1982).

Sin embargo, hasta el presente no se han iniciado estudios para determinar el potencial biológico de las distintas cepas encontradas. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue caracterizar cepas argentinas del hongo *B. bassiana* para el control de *D. saccharalis*, aisladas de distintas localidades e insectos hospedantes, como paso previo a la selección de un bioinsecticida microbiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Se estudiaron 30 cepas argentinas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* provenientes del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA (CI-

CA-INTA Castelar). Las localidades e insectos hospedantes donde fueron encontradas se resumen en la Tabla 1.

Los aislamientos monospóricos se realizaron por dilución seriada decimal y fueron cultivados a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ sobre medio nutritivo completo compuesto por: 0,4 g KH_2PO_4 , 1,4 g NaHPO_4 , 0,6 g SO_4Mg , 1 g KCl, 0,7 g NH_4NO_3 , 10 g glucosa, 15 g agar, 5 g extracto de levadura, 1000 ml agua destilada (Riba, 1985). Las colonias fúngicas se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Patogenicidad y tiempo letal medio sobre *D. saccharalis*

La patogenicidad de las cepas de *B. bassiana* mencionadas fue evaluada utilizando larvas de tercer estadio de *D. saccharalis* criadas sobre dieta artificial. La inoculación se realizó por inmersión en una suspensión de 1×10^8 conidios/ml salvo el tratamiento testigo, cuyos insectos se sumergieron en agua destilada estéril. Se emplearon 40 larvas por tratamiento, las cuales fueron mantenidas individualmente durante 15 días en condiciones controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ \text{C}$), humedad relativa ($70 \pm 10\%$) y fotofase (14 h).

La mortalidad se registró diariamente, considerándose como larvas muertas por micosis aquellas en las cuales emergió el hongo sobre la superficie del insecto. Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. Se realizó un ANOVA y prueba de Duncan al 5 % de probabilidad. El tiempo letal medio (TL_{50}) se calculó por el método de Probit (Finney, 1964).

Velocidad de germinación

De cada cepa estudiada se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01 %. Dichas suspensiones se ajustaron a una concentración de 1×10^7 conidios/ml y poste-

Tabla 1. Lugar, fecha e insecto hospedante de las cepas de *Beauveria bassiana* analizadas.

Cepa	Lugar y fecha	Hospedante
Bb 01	Pergamino (Bs As), 25/6/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 02	Pergamino (Bs As.), 10/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 03	Colón (Bs.As.), 22/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 05	Lincoln (Bs.As), 4/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 06	9 de julio (Bs As), 5/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 07	9 de julio (Bs As), 5/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 08	25 de Mayo (Bs.As.), 6/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 09	Venado Tuerto (S.Fe), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 10	Elortondo (S.Fe), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 11	Río Cuarto (Cba.), 29/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 12	Huinca Renancó (Cba.), 30/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 13	Huinca Renancó (Cba.), 30/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 14	Pergamino (Bs.As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 15	Pergamino (Bs As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 16	Pergamino (Bs As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 17	Pergamino (Bs.As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 18	Pergamino (Bs.As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 19	Pergamino (Bs.As.), 23/3/90	<i>S. virginica</i>
Bb 20	Pergamino (Bs.As.), 3/10/90	<i>Doru sp</i>
Bb 21	Pergamino (Bs.As.), 3/10/90	<i>Doru sp</i>
Bb 22	Pergamino (Bs As.), 3/10/90	<i>Doru sp</i>
Bb 23	Pergamino (Bs As), 10/9/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 24	Colón (Bs.As), 22/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 25	Colón (Bs.As.), 22/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 26	Colón (Bs.As.), 22/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 27	Elortondo (S.Fe), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 28	Murphy (S.Fe), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 29	Murphy (S.Fe), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 30	La Carlota (Cba.), 28/8/90	<i>D. saccharalis</i>
Bb 31	Río Cuarto (Cba.), 29/8/90	<i>D. saccharalis</i>

riormente 100 µl se sembraron en cajas de Petri con medio nutritivo sólido y se esparcieron con ansa de Drigalsky. Las cajas se incubaron en estufa a 26 ± 1° C. Las observaciones se realizaron a partir de 6 horas de incubación y se continuaron cada 2 horas hasta que alcanzaron el 100 % de germinación.

En cada observación se contaron 400 conidios (cuatro repeticiones de 100 conidios cada una), considerándose germinados aquellos cuyos tubos germinativos habían alcanzado una longitud igual o mayor al diámetro del conidio. El diseño estadístico fue similar al anterior y la velocidad de germinación (TG₅₀) fue calculada por el método de Probit (Finney, 1964), obteniéndose de este modo el tiempo en el cual se alcanza el 50 % de germinación. Los

datos fueron analizados por un ANOVA y prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

Crecimiento radial y producción de conidios

Cada cepa fue sembrada en el punto central de cajas de Petri sobre el medio nutritivo citado anteriormente e incubadas en estufa a 26 ± 1° C. A los 9 días se midió, con regla milimetrada, el diámetro de las colonias. Se tomaron dos mediciones, correspondientes al diámetro mayor y menor, promediándose los valores para cada colonia.

Para calcular la producción de conidios se extrajo la colonia y se la suspendió en 10 ml de agua destilada con Tween 80 al 0,01 %. El recuento de conidios se realizó con ayuda de un hemocitómetro (cámara de Malassez), realizándose cuatro repeticiones por cepa. Para ambos estudios se utilizó un diseño estadístico similar al citado anteriormente.

Características culturales

Sobre los cultivos desarrollados en el ensayo anterior se observaron las siguientes características culturales al quinto y noveno día de la experiencia: forma de la colonia, elevación, aspecto de la superficie, color y adherencia. Este último parámetro fue referido a la resistencia que ofreció el crecimiento fúngico al ser retirado del medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *B. bassiana* fueron patógenas en *D. saccharalis*. Esto indica que no hubo especificidad hacia el insecto de origen, ya que las cepas obtenidas de *Doru sp.* y *Spilosoma virginica* fueron patógenas a *D. saccharalis*. Al respecto, Moorhouse *et al.* (1993), encontraron que cepas de *M. anisopliae* aisladas de diversos hospedantes fueron también altamente virulentas sobre *Otiorynchus sulcatus*. La virulencia de las 30 cepas estudiadas osciló entre el 30 y 96 % (Tabla 2), alcanzando sólo seis de ellas una mortalidad igual o mayor al 80 % sobre *D. saccharalis*.

Con respecto al origen geográfico, para algunas localidades se detectaron diferencias importantes en la virulencia, como es el caso de las cepas Bb 28 (33 %) y Bb 29 (73 %) provenientes de Murphy (S. Fe), mientras que para las cepas Bb 24, 25 y 26, aisladas de la localidad de Colón (Bs. As.), no se detectó este comportamiento ya que la virulencia osciló entre 32 y 41 %.

En la Tabla 2 se observan las diferencias en la velocidad de germinación entre las cepas analizadas. En un lapso entre 11 y 20 h pueden ubicarse los

TG₅₀ de todas las cepas. La más lenta en alcanzar el 50 % de germinación fue Bb 12, siendo por otra parte una de las más virulentas sobre *D. saccharalis*. Por otro lado, la cepa más virulenta, Bb 16, fue además una de las de menor tiempo de germinación (12:25 h).

De la misma manera, se hallaron diferencias entre estas cepas de *B. bassiana* en el crecimiento radial y la producción de conidios (Tabla 3) sobre el medio de cultivo utilizado. La cepa Bb 9 fue la que más creció al cabo de 9 días, alcanzando un diámetro de 46,13 mm; sin embargo, su producción de propágulo

los fue menor ($29,5 \times 10^7$ conidios/ml) comparándola con la Bb 12 que produjo 130×10^7 conidios/ml. En relación con la virulencia, ambas cepas presentan valores medios, 70 y 60 % respectivamente.

Como puede observarse, las características estudiadas no tuvieron en todos los casos relación con la patogenicidad, difiriendo esto de lo encontrado por Samuels *et al.* (1989), en cepas de *M. anisopliae*, donde una rápida velocidad de germinación, elevado crecimiento y bajo volumen de producción de conidios fue correlacionado con una mayor virulencia hacia la plaga *Nilaparvata lugens*.

Al no hallarse parámetros ligados a la patogenicidad, se seleccionaron, en una primer instancia, las cepas que superaron el 80 % de mortalidad en laboratorio (Bb 16, 12, 10, 5, 3 y 6). Sobre ellas se calculó el TL₅₀ (Tabla 2). De este modo, Bb 16 presenta como características sobresalientes: alta mortalidad (96 %), rápida germinación (12:25 h) y bajo TL₅₀ (2,77 días). Por su parte, Bb 10 presenta: alta mortalidad (88 %), rápida germinación (13:36 h) y bajo TL₅₀ (2,09 días). Asimismo, Bb 5 presenta: alta mortalidad (85 %) y aceptables velocidad de germinación (14:17 h) y TL₅₀ (5,02 días) (Tabla 2). Sin embargo, las tres cepas restantes si bien presentan valores altos de mortalidad (Bb 12 = 90 %, Bb 3 = 81 % y Bb 6 = 80 %), sus TL₅₀ son mayores a los 7 días (Tabla 2). A esto se le debe agregar la lenta germinación de Bb 12 (20:04 h) y Bb 3 (16:32 h) (Tabla 3). A pesar que la cepa Bb 6 no presenta diferencias estadísticas con la Bb 5 en cuanto a la mortalidad y velocidad de germinación, a esta última cepa le demanda casi 3 días menos en matar al 50 % de los insectos (Tablas 2 y 3). En consecuencia, se seleccionaron las cepas Bb 5, 10 y 16 para futuros estudios de producción masiva y formulación de un bioinsecticida.

De las características culturales analizadas, la forma, el borde y el color resultaron comunes a todas las cepas, encontrándose diferencias con respecto a la elevación, superficie y adherencia. Todas ellas presentaron colonias de forma circular, borde liso y color blanco. En cuanto a la elevación, se distribuyeron según siete tipos diferentes, desde plana a convexa, con situaciones intermedias referidas a la altura de los bordes y al tamaño de la elevación central. La cepa Bb 8 mostró ser variable en cuanto a la elevación, ya que algunas colonias formaron anillos más elevados y otras depresión central con crecimiento de altura irregular. En relación con el aspecto de la superficie, la mayor parte de las colonias no presentaron irregularidades y sólo algunas produjeron anillos concéntricos. En cuanto a la adherencia, algunas colonias se presentaron sueltas y pulverulentas,

Tabla 2. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Diatraea saccharalis* y germinación de las cepas fúngicas.

Cepa	% mortalidad	TG ₅₀ (h:min)
Bb 16	96 A (2,77) ¹	12:25 QR
Bb 12	90 Ab (7,78)	20:04 A
Bb 10	88 ABC (2,09)	13:36 LM
Bb 05	85 BCD (5,02)	14:17 HI
Bb 03	81 BCDE (7,31)	16:32 D
Bb 06	80 CDE (7,74)	14:08 IJ
Bb 19	77 DEF	13:23 MN
Bb 15	77 DEF	12:10 R
Bb 13	75 EF	12:45 P
Bb 11	75 EF	18:02 B
Bb 29	73 EFG	13:14 NO
Bb 09	70 FGH	15:08 E
Bb 07	70 FGH	14:19 HI
Bb 27	70 FGH	12:32 PQ
Bb 17	65 GHI	13:54 JK
Bb 01	64 GHI	17:23 C
Bb 14	61 HIJ	11:33 S
Bb 31	61 HIJ	12:26 Q
Bb 02	60 IJK	14:28 GH
Bb 08	60 IJK	13:43 KL
Bb 18	54 JK	13:01 O
Bb 20	52 JK	13:44 KL
Bb 22	51 K	17:25 C
Bb 26	41 L	14:47 F
Bb 21	34 LM	14:16 HI
Bb 25	33 LM	14:50 F
Bb 28	33 LM	14:37 FG
Bb 24	32 LM	17:27 C
Bb 23	30 M	15:19 E
Bb 30	30 M	12:32 PQ

Medias con la misma letra no difieren significativamente por el test de Duncan, al 5 % de probabilidad.

1. Valores correspondientes al TL₅₀, expresados en días.

Tabla 3. Crecimiento radial y producción de conidios de cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa	Diámetro (mm) 9 días	Cepa	Conidios (n x 10 ⁷) 9 días
Bb 09	46,13 A	Bb 02	130,0 A
Bb 31	42,63 B	Bb 27	120,0 AB
Bb 02	41,13 BC	Bb 08	113,8 AB
Bb 06	39,75 CD	Bb 01	105,0 BC
Bb 03	39,38 CDE	Bb 25	83,2 CD
Bb 29	38,75 CDE	Bb 16	77,0 DE
Bb 27	38,25 DEF	Bb 03	71,5 DEF
Bb 23	38,13 DEF	Bb 26	71,5 DEF
Bb 21	37,63 DEFG	Bb 17	70,5 DEF
Bb 05	36,88 EFG	Bb 13	69,2 DEF
Bb 16	35,75 FGH	Bb 23	66,5 DEF
Bb 17	35,75 FGH	Bb 28	60,5 DEFG
Bb 28	35,63 FGH	Bb 20	57,7 DEFGH
Bb 30	35,13 GHI	Bb 29	55,7 EFGH
Bb 19	35,00 GHIJ	Bb 18	50,0 FGHI
Bb 12	33,88 HIJK	Bb 24	46,0 FGHI
Bb 15	33,88 HIJK	Bb 22	40,7 GHIJ
Bb 07	33,75 HIJK	Bb 21	39,0 GHIJ
Bb 20	33,63 HIJK	Bb 11	38,0 GHIJ
Bb 14	33,63 HIJK	Bb 12	36,7 GHIJ
Bb 13	32,50 IJK	Bb 19	34,0 HIJK
Bb 18	32,38 IJK	Bb 31	33,5 HIJK
Bb 10	32,25 JK	Bb 09	29,5 IJK
Bb 22	31,75 K	Bb 07	28,0 IJKL
Bb 08	27,88 L	Bb 05	26,7 IJKL
Bb 24	24,88 M	Bb 30	16,5 JKL
Bb 25	24,63 M	Bb 06	15,5 JKL
Bb 01	24,13 MN	Bb 15	15,2 JKL
Bb 26	22,50 MN	Bb 10	9,1 KL
Bb 11	21,75 N	Bb 14	2,8 L

Medias con la misma letra no difieren significativamente por el test de Duncan, al 5 % de probabilidad.

otras adheridas al medio y un grupo intermedio con la porción central pulverulenta y bordes adheridos. En este último grupo se observó visualmente que la producción de conidios no era igual en toda la extensión de la colonia. A través de este hecho y del crecimiento aéreo presentado por algunas colonias puede explicarse porqué las cepas de mayor crecimiento radial (Bb 9 y 31) no siempre fueron las que alcanzaron una mayor producción de conidios, coincidiendo con lo observada por Paccolla-Meirelles y Azevedo (1990) en cepas brasileras del mismo hongo. Las variaciones presentadas por las cepas de *B. bassiana* en estudio para la producción de conidios,

crecimiento radial y otras características culturales también fueron detectadas para cepas de *M. anisopliae* sobre diferentes sustratos y temperaturas (Sosa-Gómez y Alves, 1984).

De los resultados obtenidos se desprende la existencia de una variabilidad natural intraespecífica, que fue posible detectar a través de un análisis en conjunto de las principales características biológicas y microbiológicas. Estos conocimientos, acompañados de estudios de comportamiento frente a enemigos naturales y productos químicos, así como de su caracterización a nivel bioquímico y molecular, permiten la selección de cepas en laboratorio. Dicha etapa es el paso previo indispensable para la realización de cualquier prueba a nivel de campo.

CONCLUSIONES

Todas las cepas de *B. bassiana* fueron patógenas a *D. saccharalis* presentando distintos valores de virulencia.

Se observó variabilidad a nivel de cepas para todas las características microbiológicas estudiadas.

No pudo establecerse relación entre los parámetros evaluados y la virulencia de las cepas sobre *D. saccharalis*.

Se seleccionaron tres cepas, Bb 5, 10 y 16, para ser consideradas como futuros bioinsecticidas para el control de *D. saccharalis*.

AGRADECIMIENTOS

B.M. Díaz es Becaria de Perfeccionamiento del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Dagoberto, E., R. Parisi, N. Iannone y E. Frutos, 1981. Incidencia del "barrenador del tallo" *Diatraea saccharalis* (F.) en el cultivo de maíz. II Congreso Nacional de Maíz, Pergamino, 1980, pp. 194-200.
- Dagoberto, E. y R.E. Lecuona, 1982. Dinámica poblacional de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera, Pyralidae) e incidencia del daño en el cultivo. In: Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino. Carpeta de Producción Vegetal, Maíz. Tomo IV, Información n° 44, 8 pp.
- Finney, D.J., 1964. Probit analysis. A statistical treatment of sigmoid response curve. Cambridge University Press. 318 pp.
- Fresa, R., 1979. Hongos entomopatógenos observados en larvas de lepidópteros perjudiciales para cultivos de la República Argentina. IDIA (373-378): 149-155.

- Lecuona, R.E., 1990. Parasitismo natural de *Diatraea saccharalis* por el hongo entomopatogéno *Beauveria bassiana*. In: Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino. Carpeta de Producción Vegetal, Maíz. Tomo IX, Información nº 94, 2 pp.
- McCoy, C.W., 1990. Entomogenous fungi as microbial insecticides. In: Baker, R.R. & P.E. Dunn (eds.). New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, New York, pp. 139-159.
- Moorhouse, S.R., A.T. Gillespie and A.K. Charnley, 1993. Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). J. Invertebr. Pathol. 62: 15-21.
- Paccolla-Meirelles, L.D. e J.L. Azevedo, 1990. Variabilidade natural no fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*. Arq. Biol. Tecnol. 33(3):657-672.
- Riba, G., 1985. Contribution à l'étude génétique de quelques hyphomycètes entomopathogènes. Thèse Docteur d'état, Université Pierre et Marie Curie, Paris. 261 pp.
- Riba, G. et C. Silvy, 1991. Perspectives de la lutte micro-biologique contre les insectes ravageurs des cultures. Bull. Soc. Zool. Fr. 116(3-4):331-338.
- Samuels, K.D.Z., J.B. Heale and M. Llewellyn, 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliaea* toward *Nilaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53:25-31.
- Sosa-Gómez, D.R. y S.B. Alves, 1984. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Producción de conidios en diferentes medios de cultivo y sobre cadáveres de larvas de *Diatraea saccharalis* (F.). CIRPON, Rev. Invest. 2(1-2):5-25.