

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* en insectos plaga de granos almacenados.

Boris Andrés Bastidas Basantes

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biología

Quito, 30 de abril de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* en insectos plaga de granos almacenados.

Boris Andrés Bastidas Basantes

Nombre del profesor, Título académico

Carlos Ruales, Ms.

Quito, 30 de abril de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Boris Andrés Bastidas Basantes

Código: 00131495

Cédula de identidad: 1718773848

Lugar y fecha: Quito, abril de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* fueron aisladas de insectos plaga infectados en campo, éstas fueron purificadas en laboratorio y codificadas BB-(CGor, C3, C6 y CGm). Luego, se cultivó cada cepa en 500mL de ViveSoy + 40g glucosa + minerales (KNO₃ (0,5 g), KH₂PO₄ (0,5 g), CaCO₃ (0,5g) por 10 días en una incubadora con agitación a temperatura ambiente (25°C).

El efecto de cada una de las cuatro cepas de *B. bassiana* fue evaluada en 2 especies de insectos plaga de granos almacenados, gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) y redondilla del maíz suave (*Pagiocerus fiorii*) para lo cual se utilizó recipientes los cuales contenían 15 individuos por especie con cuatro réplicas por tratamiento.

Se evaluó la mortalidad luego de dos aplicaciones, separadas por dos días, para ello se utilizó una concentración de 6 mL de cada cepa cultivada y diluida en 1 L de agua destilada, añadiendo 2 mL de fijador agrícola en todos los tratamientos. El control utilizó solo agua destilada y fijador.

Luego de evaluar la mortalidad, se utilizó un Análisis de Varianza para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y luego un Test Tukey HSD para determinar diferencias entre pares de tratamientos, se encontró en *S. zeamais*, a BB-CGor con una mortalidad de 92,0% y BB-C3 con 88,0%. ($F_{4, 15} = 229,7$; $p = 2,93 \cdot 10^{-13}$). En *P. fiorii* a BB-CGor = 90,0% y BB-C3 = 86,75% ($F_{4, 15} = 182,6$; $p = 1,58 \cdot 10^{-12}$). El estudio determinó la eficiencia de cada una de las cepas sobre cada especie de plaga encontrando que en las dos plagas las cepas CGor y C3 fueron las más efectivas sin diferencia significativa entre ambas. Se puede seleccionar éstas dos cepas para el control de insectos del mismo grupo.

Palabras Clave: Hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Sitophilus zeamais*, *Pagiocerus fiorii*, cultivo líquido, mortalidad, insectos plaga.

ABSTRACT

Four strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were isolated from field-infected pest insects, these were purified and BB- encoded (CGor, C3, C6 and CGm). Then, each strain was grown in 500mL of ViveSoy + 40g glucose + minerals (KNO₃ (0.5g), KH₂PO₄ (0.5g), CaCO₃ (0.5g) for 10 days in an incubator with shaking at room temperature (25° C).

The effect of each of the four strains of *B. bassiana* was evaluated in 2 species of stored grain pest insects, corn weevil (*Sitophilus zeamais*) and soft corn roundworm (*Pagiocerus fiorii*), for which containers were used which contained 15 individuals per species with four replicates per treatment.

Mortality was evaluated after two applications, separated by two days, for which a concentration of 6 mL of each cultivated strain was used and diluted in 1 L of distilled water, adding 2 mL of agricultural fixative in all treatments. The control used only distilled water and fixative.

After evaluating mortality, an Analysis of Variance was used to determine significant differences between treatments, and then a Tukey HSD Test to determine differences between pairs of treatments. BB-CGor was found in *S. zeamais* with a mortality of 92, 0% and BB-C3 with 88.0%. (F₄, 15 = 229.7; p = 2.93.10-13). In *P. fiorii* at BB-CGor = 90.0% and BB-C3 = 86.75% (F₄, 15 = 182.6; p = 1.58.10-12). The study determined the efficiency of each of the strains on each pest species, finding that in both pests that CGor and C3 strains were the most effective without significant difference between the two of them.

Key words: Entomopathogenic fungi, liquid culture, mortality, insect pests, *Beauveria bassiana*, *Sitophilus zeamais*, *Pagiocerus fiorii*.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	10
Desarrollo del Tema	11
Metodología.....	11
Resultados y Discusión.....	12
Conclusiones.....	18
Referencias bibliográficas	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultado del Análisis de Varianza para <i>Sitophilus zeamais</i>	12
Tabla 2. Resultado del Análisis de Varianza para <i>Pagiocerus fiorii</i>	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja de la mortalidad de las 4 cepas + Control sobre <i>Sitophilus zeamais</i>	12
Figura 2. Resultado del Test Tukey HSD en <i>Sitophilus zeamais</i>	13
Figura 3. Diagrama de caja de la mortalidad de las 4 cepas + Control, sobre <i>Pagiocerus fiorii</i>	14
Figura 4. Resultado del Test Tukey HSD en <i>Pagiocerus fiorii</i>	15

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una industria creciente, cada vez hay más demanda de alimentos pero los recursos son cada vez más escasos. Se busca potenciar la producción de plantas para lograr suplir la demanda. En este intento, la protección vegetal utiliza diferentes estrategias para cuidar a las plantas, en especial de plagas. Las plagas de insectos son controlados usualmente con insecticidas convencionales, los cuales pueden ser nocivos para muchos organismos no blanco (Ortiz, Luo & Keyhani, 2015). Una alternativa son los micoinsecticidas, que son bioinsumos que tienen como agente activo a cepas de hongos entomopatógenos, los cuales son capaces de manejar las excesivas poblaciones de ciertos grupos de insectos (Lopez & Sword, 2015). Esta investigación tiene el objetivo de evaluar la mortalidad de cuatro cepas del entomopatógeno *Beauveria bassiana* en dos especies de insectos plaga de granos almacenados, con el uso de un medio de cultivo líquido.

B. bassiana es un hongo Ascomycota, familia de los Cordyceps se reproduce por conidias asexuales y produce un micelio blanco esponjoso hasta polvoso en PDA (Ortiz-Urquiza et al., 2010) No se comprende bien los factores asociados a la virulencia del hongo, se cree que el hospedador del que se aisló juega un papel fundamental (Leckie et al., 2008; Mann & Davis, 2020). Por esta razón, se evaluará diferentes cepas aisladas de distintos hospedadores. El hongo será cultivado en un medio líquido económico. Los insectos utilizados fueron dos especies plagas del maíz, gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) y redondilla del maíz suave (*Pagiocerus fiorii*). Ambos con tiempos generacionales cortos y alta supervivencia en condiciones de laboratorio (Lopez & Sword, 2015).

DESARROLLO DEL TEMA

Metodología

Cuatro cepas de *Beauveria bassiana* fueron aisladas de insectos plaga infectados en campo, éstas fueron purificadas en laboratorio, aisladas en PDA y codificadas BB-(CGor (Orden: Coleoptera -gorgojos), CGm (*Galleria mellonella* – Orden: Lepidoptera), C3 y C6 (Orden: Hemiptera - Sternorrhyncha). Luego, se cultivó cada cepa en 500mL de ViveSoy (leche de soya comercial) + 40g glucosa + minerales (KNO_3 (0,5 g), KH_2PO_4 (0,5 g), CaCO_3 (0,5g)) por 10 días en una incubadora con agitación a 25°C.

El efecto de cada una de las cuatro cepas de *B. bassiana* fue evaluada en dos especies de insectos plaga de granos almacenados, gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) y redondilla del maíz suave (*Pagiocerus fiorii*) para lo cual se utilizó recipientes los cuales contenían 15 individuos por especie con cuatro réplicas por tratamiento. Cada recipiente contenía alimento maíz y un papel húmedo para facilitar el crecimiento del hongo.

Se evaluó la mortalidad luego de dos aplicaciones, separadas por dos días, y luego se contaron los individuos muertos luego de un total de 4 días luego de la primera aplicación. Los individuos muertos se determinaron con una lupa entomológica. Para las aplicaciones se utilizó una concentración de 6 mL de cada cepa cultivada en líquido y diluida en 1 L de agua destilada, añadiendo 2 mL de fijador agrícola en todos los tratamientos. El control utilizó solo agua destilada y fijador.

Luego de evaluar la mortalidad, se utilizó un Análisis de Varianza para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y luego un Test Tukey HSD para determinar diferencias entre pares de tratamientos.

Resultados y Discusión

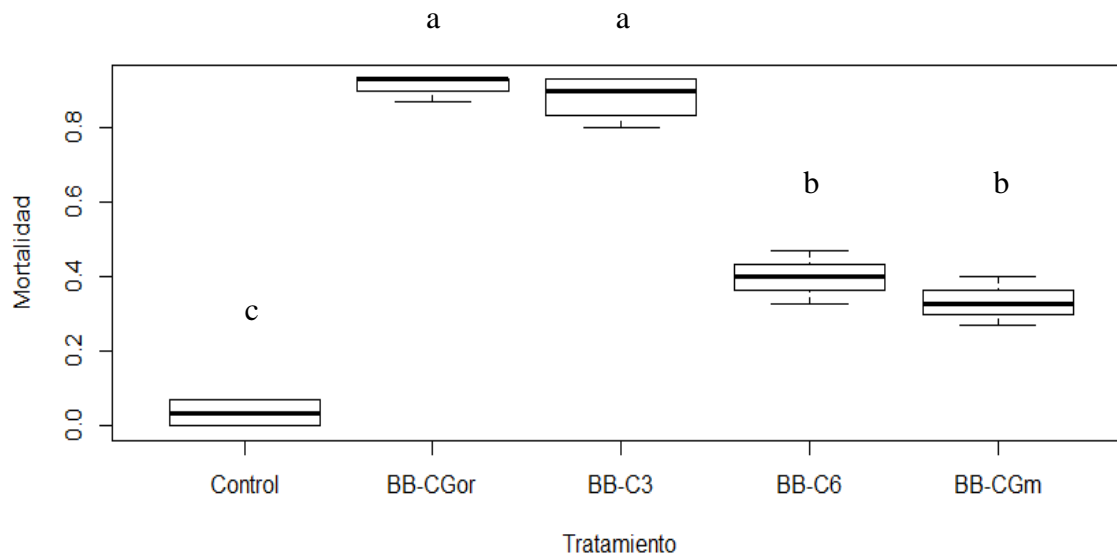


Figura 1. Diagrama de caja de la mortalidad de las 4 cepas + Control sobre *Sitophilus zeamais*.

La mortalidad más alta se registró en BB-CGor con una mortalidad promedio de 92,0% y BB-C3 con 88,0%

	GL	SS	MS	F	P
TRATAMIENTO	4	2.2879	0.572	229.7	2.93E-13
RESIDUALES	15	0.0373	0.0025		

Tabla 1. Resultado del Análisis de Varianza para *Sitophilus zeamais*.

Existe evidencia para rechazar la hipótesis nula sobre igualdad y se acepta la hipótesis alternativa sobre la diferencia entre las medias de los tratamientos.

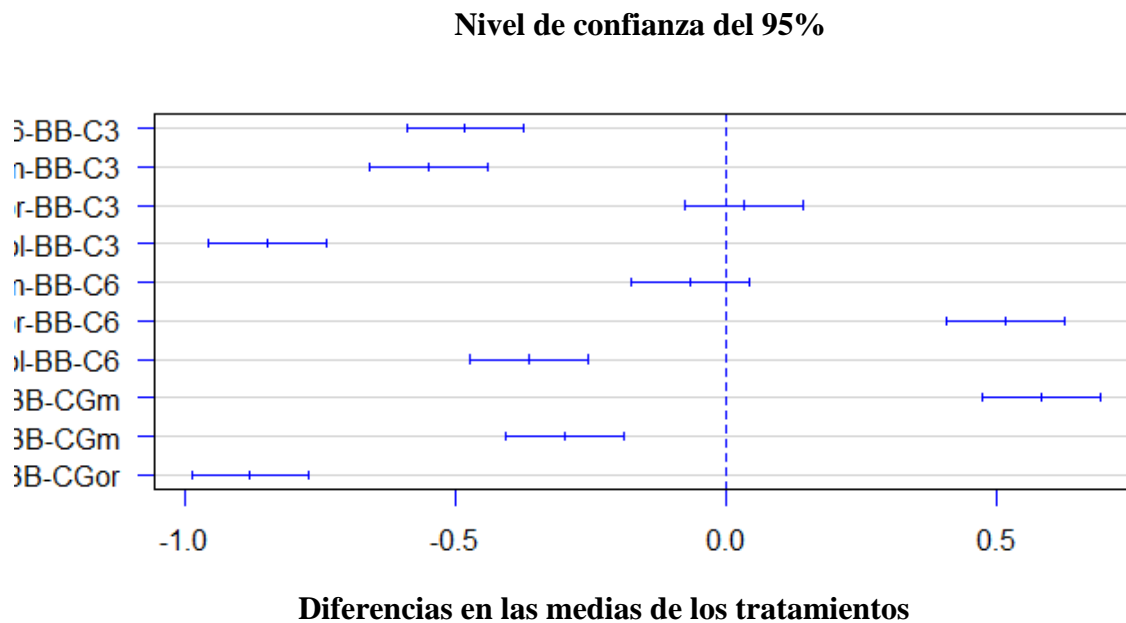


Figura 2. Resultado del Test Tukey HSD en *Sitophilus zeamais*.

El test determina que hay diferencias significativas entre todos los grupos y el control. Pero, no diferencias entre BB-CGor y BB-C3 y entre BB-CGm y BB-C3.

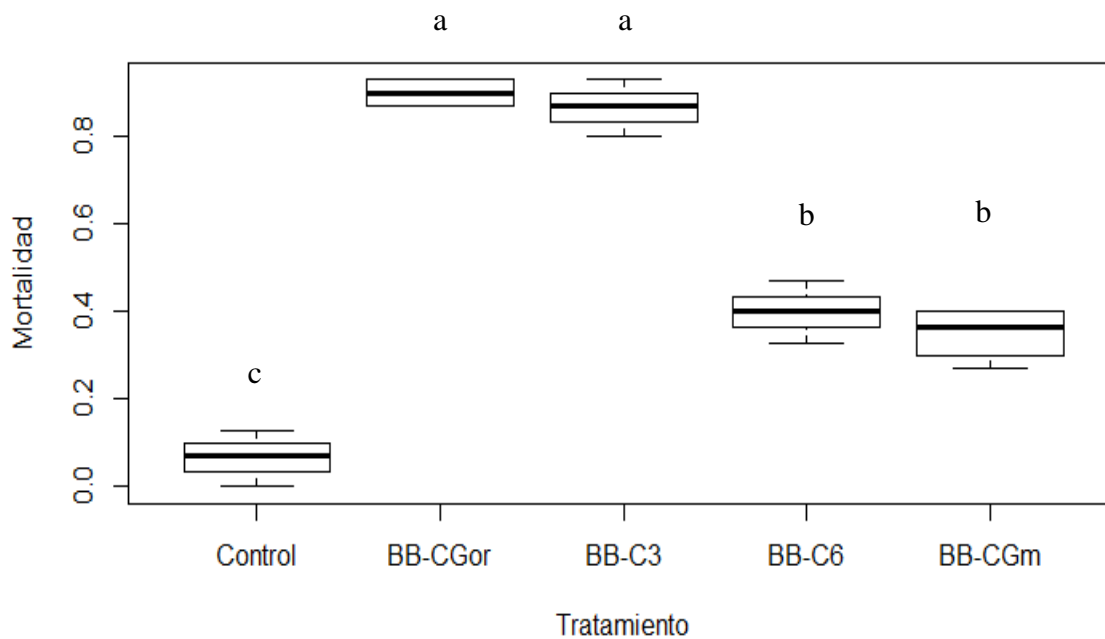


Figura 3. Diagrama de caja de la mortalidad de las 4 cepas + Control, sobre *Pagiocerus fiorii*.

La mortalidad más alta se logró con BB-CGor = 90,0% y con BB-C3 = 86,75%.

	GL	SS	MS	F	P
TRATAMIENTO	4	2.0527	0.5132	182.6	1.58E-12
RESIDUALES	15	0.0421	0.0028		

Tabla 2. Resultado del Análisis de Varianza para *Pagiocerus fiorii*.

Hay evidencia para rechazar la Hipótesis nula, existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

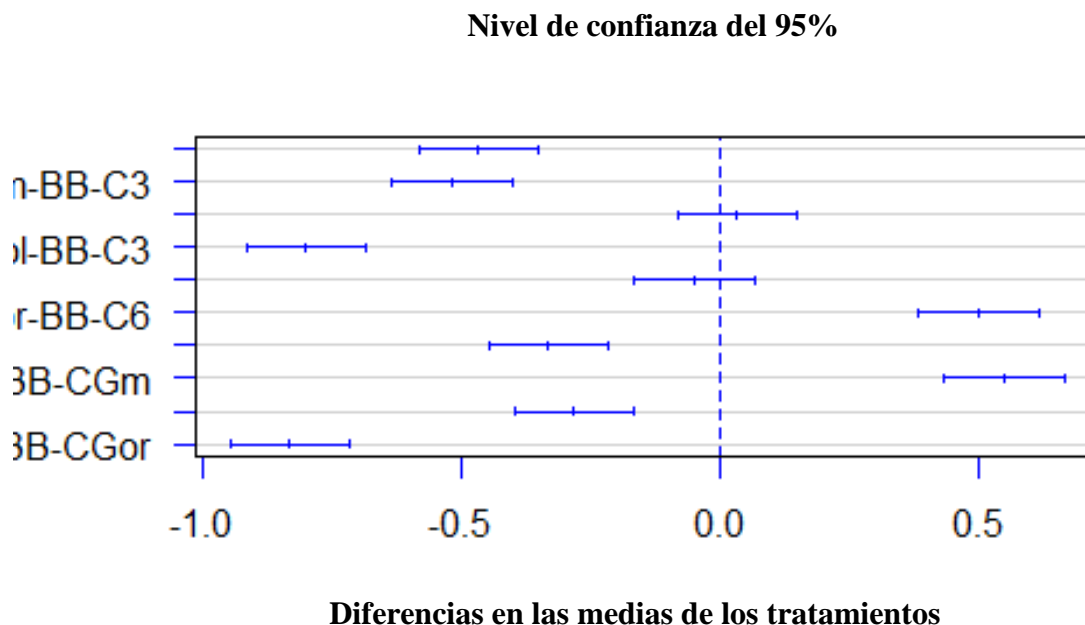


Figura 4. Resultado del Test Tukey HSD en *Pagiocerus fiorii*.

El test determina que hay diferencias significativas entre todos los grupos y el control. Pero, no diferencias entre grupo a (BB-CGor y BB-C3) y entre b (BB-CGm y BB-C3). Si hay diferencias entre a y b.

Discusión

Los resultados expuestos nos indican que los promedios de los tratamientos (Cepas + control) son significativamente diferentes entre sí. Se encontró en *S. zeamais*, a BB-CGor con una mortalidad de 92,0% y BB-C3 con 88,0%. ($F_{4, 15} = 229,7$; $p = 2,93 \cdot 10^{-13}$). En *P. fiorii* a BB-CGor = 90,0% y BB-C3 = 86,75% ($F_{4, 15} = 182,6$; $p = 1,58 \cdot 10^{-12}$). El estudio determinó la eficiencia de cada una de las cepas sobre cada especie de plaga encontrando que en las dos plagas las cepas CGor y C3 fueron las más efectivas sin diferencia significativa entre ambas. También se encontró que las cepas BB-CGm y BB-C6 no tienen diferencias significativas entre sí, las cuales fueron las cepas con las tasas de mortalidad más bajas.

Este resultado es relevante porque nos indica que las cepas aisladas, de un determinado tipo de hospedador, son eficaces contra la misma clase de insecto del que se aisló (Ortiz-Urquiza et al., 2010). En este caso, la cepa BB-CGor fue aislada de un gorgojo del maíz y esta misma cepa tuvo las tasas de mortalidad más altas en las dos especies de gorgojos utilizadas en experimentación.

Los factores que afectan a la virulencia del hongo todavía no son comprendidos a profundidad, se cree que es una interacción compleja entre la genética del hongo y el hospedador y variables ambientales (Gouli et al., 2012). La filogenia y sistemática de este grupo de Ascomycota es compleja, empezando por el hecho de que todo el grupo del género *Beauveria*, según estudios, debería considerarse como un complejo de especies muy emparentadas entre sí pero lo suficientemente diferentes para ser todo un linaje dentro de la familia Cordycipitaceae (Rehner et al., 2011). Esto explica la razón de que la cepa BB-C3 tenga tasas tan altas a pesar de provenir de Hemipteros, se necesitan más estudios genéticos sobre las cepas.

En el proceso de infección ocurre que las esporas germinan en la cutícula del insecto, penetran a los órganos internos y el insecto muere, generando más esporas para futuras infecciones (Gouli et al., 2012). Otro camino es que el hongo produce metabolitos y estos son los responsables de la muerte del insecto, que luego servirá de alimento para que el hongo produzca más esporas (Gurulingappa, McGee & Sword, 2011). En este caso, 4 días es muy poco tiempo para que el hongo cumpla todo su ciclo, desde la germinación de la espora en la cutícula del insecto, hasta la esporulación para futuras infecciones, según la literatura esto puede tomar hasta 10 días (Gurulingappa, McGee & Sword, 2011). Por lo que la muerte de los insectos es mejor explicado a través de la acción de metabolitos y realmente no de las

conidias del hongo. Sin embargo, esto no implica que el hongo luego pueda desarrollarse en el cadáver del insecto, para lo cual se recomienda hacer una tercera evaluación luego de por lo menos 10 días para identificar micelio en los insectos y poder aislarlo.

Cualquiera de los dos caminos conllevan que el hongo tenga que especializarse para infectar efectivamente al insecto, esto quiere decir que el entomopatógeno puede especializarse a un rango de hospedadores (Mann & Davis, 2020). Esto explica la razón por la cual la cepa BB-CGor tuvo la tasa de mortalidad más alta entre las otras cepas.

El medio líquido utilizado es congruente con estudios parecidos, la presencia de altas concentraciones de glucosa causan que el hongo se comporte como una levadura (Chong-Rodríguez et al., 2011). Esto causa que la producción de metabolitos y blastosporas sea superior a medios sólidos como el arroz, como se ha demostrado en los estudios de Eley et al., 2007, los cuales describen al metabolito Tenellina involucrado en la patogenicidad del hongo (Pham et al., 2009). Otros estudios utilizan extracto de levadura, la cual no se utilizó por su falta de disponibilidad. La fuente de proteínas y vitaminas necesarias proviene de la proteína de la soya de Vivesoy, el cual es una leche de soya comercial (Mascarin et al., 2015). Los minerales añadidos fueron en base a otros estudios realizados en medios líquidos, no se añadieron micro-elementos (Núñez-Ramírez et al., 2012). En futuros experimentos es oportuno hacer un estudio de los metabolitos para poder caracterizarlos y determinar cuál es el responsable de la mortalidad sobre los insectos plaga y así potenciar la producción de ese metabolito en producciones industriales.

CONCLUSIONES

Las cepas BB-CGor y BB-C3 pueden ser utilizadas en la fabricación de bioinsecticidas para insectos del Orden: Coleoptera. El medio líquido es una buena alternativa al medio sólido, se requieren mejores estudios de calidad, además de mejorar la virulencia para bajar la dosis utilizada. Dado que la muerte de los insectos aparentemente fue debido a la acción de metabolitos, es recomendable hacer un estudio sobre la producción de metabolitos en hongos entomopatógenos. Es recomendable escalar a campo para entender el comportamiento de las cepas en producciones industriales. Los insecticidas microbianos son una muy buena alternativa para el manejo de plagas. Se recomiendan más estudios genéticos para comprender la filogenia y sistemática del hongo en nuestro país y así comprender mejor la susceptibilidad de los hospedadores para mejorar la producción de estos insumos biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J., & Sandoval-Coronado, C. F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5736-5742.
- Eley, K. L., Halo, L. M., Song, Z., Powles, H., Cox, R. J., Bailey, A. M. & Simpson, T. J. (2007). Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *ChemBioChem*, 8(3), 289-297.
- Gouli, V., Gouli, S., Skinner, M., Hamilton, G., Kim, J. S., & Parker, B. L. (2012). Virulence of select entomopathogenic fungi to the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* Stål. (Heteroptera: Pentatomidae). *Pest management science*, 68(2), 155-157. doi:10.1002/ps.2310.
- Gurulingappa, P., McGee, P. A., & Sword, G. (2011). Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. *Crop protection*, 30(3), 349-353.
- Leckie, B. M., Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Jones, C. J., & Gwinn, K. D. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(7), 697-710.
- Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60.
- Mann, A. J., & Davis, T. S. (2020). Plant secondary metabolites and low temperature are the major limiting factors for *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) growth and virulence in a bark beetle system. *Biological Control*, 141, 104130. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104130
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kabori, N. N., Behle, R. W., & Júnior, Í. D. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of invertebrate pathology*, 127, 11-20.
- Núñez-Ramírez, D. M., Medina-Torres, L., Valencia-López, J. J., Calderas, F., López-Miranda, J., Medrano-Roldán, H., & Solís-Soto, A. (2012). Study of the rheological properties of a fermentation broth of the fungus *Beauveria bassiana* in a bioreactor under different hydrodynamic conditions. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(11), 1494-1500.

- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1057-1068.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 105(3), 270-278.
- Pham, T. A., Kim, J. J., Mm, S. G., & Kim, K. (2009). Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology*, 37(3), 218-224.
- Rehner, A., Minnis, M., Sung, G., Luangsaard, J., Devotto, L., Humber, R. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103 (5): 1055–1073. doi:10.3852/10-302.