

Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) en adultos del escarabajo *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) de casetas avícolas del estado de Colima

Omar Prado-Rebolledo¹, Roberto Lezama-Gutiérrez², Daniel Contreras-Benicio¹, Daniel Contreras-Lara¹, Eduardo J Morales-Barrera³, Guillermo Tellez⁴

Departamento de Producción Avícola ¹, Departamento de Control Biológico², Departamento de Aves³, Center of Excellence of Poultry Science⁴

Nombre de la institución o acrónimo ¹ Nombre de la institución o acrónimo ²

Tecomán, Colima, México ^{1,2}, México D.F ³, Fayetteville, AR, USA⁴

omarpr@ucol.mx, rlezama32@hotmail.com, cobedan@gmail.com, contreras.l.d@hotmail.com, jemorab@yahoo.com.mx, gtellez@uark.edu

Abstract— The aim of this study was to evaluate five Mexican strains pathogenic fungus *Beauveria bassiana* adult beetle in bed *Alphitobius diaperinus* under laboratory conditions. Five strains were used *B. bassiana* isolated from other Coleoptera. Strain BB174 is capable of killing up to 87 % of adult *A. diaperinus* from 6 days post inoculation. Bb3 and BB174 strains could be selected for biological control of adult *A. diaperinus*. BB174 strain may be selected for future research in order to be used for the control of this insect in poultry farms.

Keyword— *Biological control, Alphitobius diaperinus, Beauveria bassiana, chicken broiler.*

Resumen— Se evaluó la patogenicidad de cinco cepas mexicanas del hongo *Beauveria bassiana* en adultos de escarabajo de la cama *Alphitobius diaperinus* bajo condiciones de laboratorio. Se utilizaron cinco cepas de *B. bassiana* aisladas de otros Coleópteros. La cepa Bb174 es capaz de matar hasta un 87 % adultos de *A. diaperinus* a partir de los 6 días post inoculación. Las cepas Bb3 y Bb174 pudieran ser seleccionadas para el control biológico de adultos de *A. diaperinus*. La cepa Bb174 puede ser seleccionada para futuros investigaciones con miras a ser utilizada para el control de este insecto en granjas avícolas.

Palabras claves— *Anphitobius diaperinus, control biológico, Beauveria bassiana, pollo de engorda.*

I. INTRODUCCIÓN

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) es uno de los mayores problemas en el mundo de la avicultura [1,2] que además de transmitir enfermedades a las aves que lo consumen, esta plaga destruye la fibra de vidrio y material aislante de poliestireno, lo que ocasiona pérdidas económicas [3,4]. En Georgia, EU se estimó un costo anual de \$1 000 000 de dólares por uso de insecticidas para el control del escarabajo de las camas avícolas y los daños ocasionados alcanzaron valores de alrededor de los \$8 476 000 dólares [5].

El control de esta plaga, por lo general se basa en el uso de insecticidas químicos, pero su eficacia está limitada por la continua presencia de aves dentro de las casetas y a pesar de que son efectivos, pueden causar intoxicación en estas. Además, como el escarabajo se esconde entre la cama, la eficiencia del insecticida se reduce porque se aplica solo en la superficie y su vida media es corta [6,7,8,9].

Se han investigado métodos alternativos con el objetivo de reducir el uso de insecticidas químicos, ya que el uso continuo de estos puede desarrollar resistencia ante el escarabajo, o eliminar enemigos naturales de este, lo que provocaría una mayor infestación. Una alternativa es el control biológico con hongos entomopatógenos, ya que muestran ser inocuos a animales endotérmicos como las aves.

Además, la temperatura, la humedad relativa, y el suelo de las casetas avícolas proveen de un ambiente adecuado para la sobrevivencia de hongos entomopatógenos [10, 11, 12].

Se ha demostrado que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se hospeda en un amplio rango de insectos y posee un potencial como control biológico [13]. Además, tiene ventajas sobre los plaguicidas convencionales, pues persiste en la población de insectos que infecta, reduce su longevidad y ocasiona altas tasas de mortalidad en larvas y adultos. Por lo cual, el género *Beauveria* promete ser uno de los agentes más eficaces y con menores consecuencias para las aves y el ambiente cuando se usa en el control biológico de artrópodos; pues se propaga con facilidad, por su capacidad para penetrar la cutícula en una amplia variedad de insectos [14,15].

Castrillo y Brooks [16] aislaron *B. bassiana* de *A. diaperinus*, de camas en casetas avícolas en Carolina del Norte y Oeste de Virginia, en los Estados Unidos Americanos. Así también, estudio hecho por Santoro et al. [4] confirman mortalidad 64.4 % y 67.2 % para las cepa CG 71 y CG 152 de *B. bassiana* respectivamente, y la cepa UNIOESTE 4 a concentraciones de 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 5.0×10^7 y 1.0×10^8 conidios/ml producen una mortalidad en adultos de 40 %, 60 %, 73% y 87 % respectivamente, cinco días después de la inoculación en *A. diaperinus*.

Actualmente existen trabajos donde reportan que otros Coleópteros son susceptibles a *B. bassiana*, tal es el caso de Almeida et al. (2005) donde prueba la viabilidad de *B. bassiana* de reaislados a partir de huevos, larvas y adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae), donde ha concentraciones de 0.62×10^6 , 0.24×10^6 y 0.43×10^6 conidios/ml causan una mortalidad de 96.7 %, 83.4 % y 91.1 %, respectivamente.

En México se ha trabajado en el control biológico de plagas de coleópteros dando resultados satisfactorios como es el caso de Najera-Rincon et al.[18] que trabajo sobre la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisoplia* contra larvas de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae), mostrando el *B. bassiana* una mortalidad del 49 %; sin embargo, el *A. diaperinus* está presente en las granjas avícolas del país y en el estado de Colima pero no existen reportes sobre el control asociados a larvas o adultos de este insecto; por lo que es necesario iniciar con un estudio tendiente a evaluar el potencial de uso que pueden tener los hongos entomopatógenos y así contar con una alternativa diferente al uso de los insecticidas químicos. El objetivo fue evaluar la patogenicidad de cinco cepas mexicanas del hongo *B. bassiana* en adultos de escarabajo de la cama *A. diaperinus* bajo condiciones de laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Lugar experimental

La primera etapa se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico No. 1, de la DES: Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Colima, ubicado en el municipio de Tecomán, en el Km 40 Autopista Colima-Manzanillo. Otra en campo en donde se recolectaron adultos y larvas del escarabajo *A. diaperinus* de granjas avícolas del estado de Colima.

B. Etapa de campo

Correspondió a la segunda etapa, donde los adultos usados en este estudio fueron recolectados de la granja Mezcales propiedad de la empresa Majahual, localizada en el municipio de Comala del estado de Colima. La captura fue de forma manual y transportados en una caja plástica de 18x30x44.5 cm con cama de crianza.

C. Etapa de laboratorio

Al llegar al laboratorio fueron lavados para reducir material contaminante, posteriormente se separaron adultos de larvas. Los adultos recolectados se usaron para elaborar un insectario sobre un

sustrato con 76 % de salvado de trigo, 17 % alimento de pollo y 7 % de levadura de tórula más dos mitades de manzana con la cara hacia el sustrato y la incubación fue durante 26 días a 31°C [19].

D. Origen de las cepas

Se utilizaron cinco cepas de *B. bassiana* aisladas de otros Coleópteros. Los hongos fueron obtenidos de la Colección de Hongos del Laboratorio de Control Biológico de la DES: Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Colima (Tabla 1).

TABLA I. RELACIÓN DE CEPAS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EVALUADOS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.

Hongo y cepa	Lugar de aislamiento	Huésped	Año de Aislamiento
<i>Beauveria bassiana</i>			
Bb 3	Zapotlanejo, Jal.	<i>Diabrotica balteata</i> (Le Conte) (Coleoptera: Chrysomelidae)	1990
Bb 7	Colima, Col.	<i>Geraeus senilis</i> (Gyll) (Coleoptera: Curculionidae)	1990
Bb 9	Oaxaca, Oax.	<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)	1992
Bb 13	Cuauhtémoc, Col.	<i>Macrodactylus murinus</i> (Bates) (Coleoptera: Scarabaeidae)	1993
Bb 174	Manzanillo, Col.	<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)	2011

E. Prueba de patogenicidad

Las cinco cepas de cada una de las especies fueron multiplicadas en papa dextrosa agar (PDA) e incubados a 25±1°C y 12 horas luz-oscuridad (Forma Scientific Modelo 3740) por 21 días. Después de este periodo, los conidios se recolectaron con la ayuda de una asa bacteriológica en agua con Tween 80 al 0.1 %. Después se homogenizo y se cuantifico la concentración, en una cámara de Neubauer. Posteriormente se preparó una suspensión de 108 conidios/ml, de cada hongo. Los tratamientos fueron: la suspensión de cada una de las cepas y el tratamiento control solo con agua y Tween 80 al 0.1. [8].

Para cada cepa fueron empleadas 4 repeticiones y 25 adultos por repetición. Los adultos fueron transferidos a un vaso de precipitado estéril de 250 ml, donde se agregó 1 ml de suspensión 108 conidios/ml, se agito manualmente por 10 segundos. En el tratamiento control, los adultos fueron inmersos en 1 ml de agua destilada estéril + 0.1% de Tween 80. Después de la inoculación los adultos se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido y alimento para pollo de engorda estéril. Las cajas de Petri fueron incubadas a 25±1°C y 12 horas luz-oscuridad (Forma Scientific Modelo 3740) por 10 días. Cada 48 horas se revisaron los tratamientos y se registró el número de adultos muertos [20].

Los individuos muertos fueron inmersos en alcohol al 70 %, durante 30 segundos y enjuagados con agua destilada, individualmente se fueron transferidos a cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua estéril y puestos a incubar a 25±1°C y 12 horas luz-oscuridad (Forma Scientific Modelo 3740) por 21 días, para que el hongo se desarrolle y se exprese, con el objetivo de confirmar la presencia del agente causal de la enfermedad. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones y los tratamientos fueron analizados mediante un análisis de varianza y prueba de medias por Tukey al 0.05 [8].

Se encontró que las cinco cepas de *B. bassiana* evaluadas en adultos de *A. diaperinus* presentaron patogenicidad a la concentración de 1x10⁸ conidios/ml. El análisis de varianza mostro diferencias altamente significativas entre la patogenicidad de las cepas (F = 17.76 y P = 0.0001). En la figura 1 se

muestra el porcentaje de mortalidad, de cada una de ellas, con valores que oscilan entre el 38 % y 87 %; los adultos del testigo no mostraron mortalidad por hongo entomopatígeno. La cepa Bb174 presentó la mayor mortalidad del 87 % a los 6 días después de establecido el experimento y fue también la de mayor patogenicidad para este insecto, aunque comparte igualdad estadística con la cepa Bb3. Sin embargo, la cepa Bb3 estadísticamente es igual a las cepas Bb13, Bb9 y Bb7 que presentaron una mortalidad del 47 %, 46 % y 38 %, respectivamente (Figura 1).

III. RESULTADOS

Se encontró que las cinco cepas de *B. bassiana* evaluadas en adultos de *A. diaperinus* presentaron patogenicidad a la concentración de 1×10^8 conidios/ml. El análisis de varianza mostro diferencias altamente significativas entre la patogenicidad de las cepas ($F = 17.76$ y $P = 0.0001$). En la figura 1 se muestra el porcentaje de mortalidad, de cada una de ellas, con valores que oscilan entre el 38 % y 87 %; los adultos del testigo no mostraron mortalidad por hongo entomopatígeno. La cepa Bb174 presentó la mayor mortalidad del 87 % a los 6 días después de establecido el experimento y fue también la de mayor patogenicidad para este insecto, aunque comparte igualdad estadística con la cepa Bb3. Sin embargo, la cepa Bb3 estadísticamente es igual a las cepas Bb13, Bb9 y Bb7 que presentaron una mortalidad del 47 %, 46 % y 38 %, respectivamente (Figura 1).

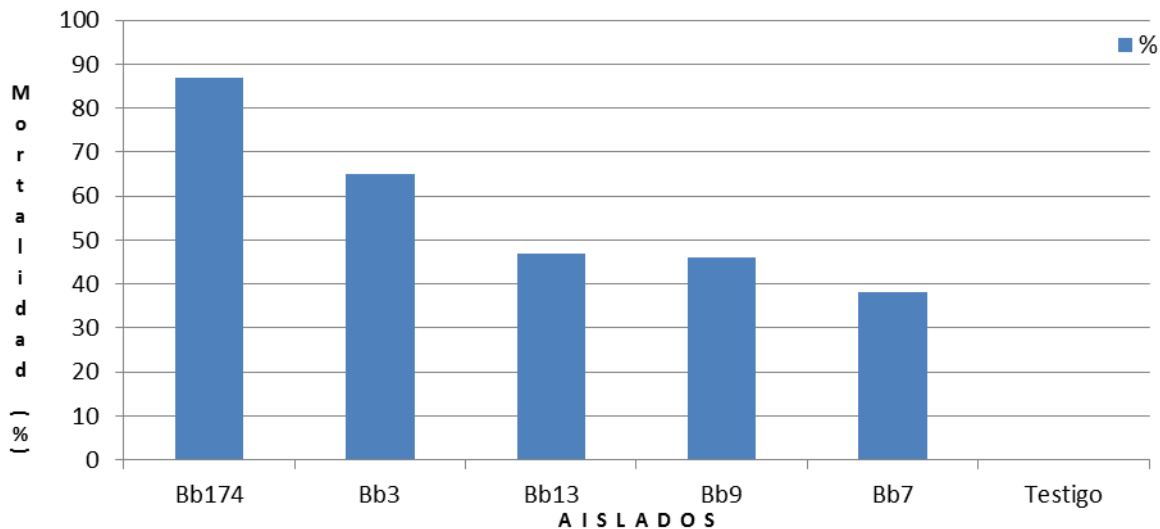


Fig. 1. Porcentaje de mortalidad de adultos de *A. diaperinus* por diferentes aislados de *B. bassiana* a la concentración de 1×10^8 conidios/ml.

IV. DISCUSIÓN

La hipótesis del presente trabajo era que si *A. diaperinus* es susceptible a cepas del hongo *B. bassiana* originaria de otros países como Brasil o España, entonces los adultos son también susceptibles a cepas mexicanas de esta especie de hongo, en condiciones de laboratorio. Los resultados permitieron demostrar que efectivamente las cepas mexicanas de *B. bassiana* presentaron patogenicidad hacia los adultos de *A. diaperinus*; sin embargo los análisis de varianza mostraron que entre las cepas existen diferencias en patogenicidad, no obstante todas fueron aisladas de coleópteros y que son de diferentes lugares geográficos.

De Oliveira et al. [12] evalúan diferentes cepas de *B. bassiana* aislados de hemípteros y coleópteros, dentro de ellos *A. diaperinus* y encuentran que casi todas las cepas presentan patogenicidad tanto en larvas como en adultos; ellos también observan que al parecer las larvas son más susceptibles al hongo y

mencionan que posiblemente se debe a que presentan cuerpo más membranoso mientras que los adultos tienen un exoesqueleto más esclerosado, al igual que Rohde et al.[11].

En este trabajo se evaluaron cinco cepas de *B. bassiana* aislados de coleópteros diferentes a *A. diaperinus*, no obstante fueron capaces de matar entre 38 % y 87 % sería recomendable que se llevara a cabo un trabajo de investigación tendiente a aislar hongos entomopatógenos asociados a larvas y adultos de *A. diaperinus* en diferentes explotaciones avícolas tanto en el estado de Colima como en otros del país, a fin de contar con un cepario de hongos con posibilidades de ser seleccionados, para ser utilizados dentro un programa de manejo integrado de este insecto. Ya que Rohde et al. [11] en su trabajo encuentra que cepas aisladas de *A. diaperinus* son capaces de matar larvas y adultos con porcentajes de mortalidad superior a la obtenida por otras cepas aislados de otros insectos.

No obstante lo anterior, De Oliveira et al. [12] evaluaron la patogenicidad de cepas de *B. bassiana*, también en larvas y adultos y encuentra diferencias en patogenicidad entre cepas aisladas de *A. diaperinus*, lo que obligaría a evaluar varias de ellas y poder seleccionar la que presente mayor virulencia [21,22]. Sin embargo de este trabajo la cepa Bb174 puede ser seleccionada para futuros investigaciones con miras a ser utilizada para el control de este insecto en las diversas granjas avícolas.

V. CONCLUSIONES

Con base a las condiciones experimentales en que se llevó a cabo la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Se encontró que las cinco cepas de *B. bassiana* evaluadas en adultos de *A. diaperinus* presentaron patogenicidad a la concentración de 1×10^8 conidios/ml.
2. Se encontraron diferencias en patogenicidad entre las cinco cepas evaluadas en adultos de *A. diaperinus*.
3. La cepa Bb174 es capaz de matar hasta un 87 % adultos de *A. diaperinus* a partir de los 6 días post inoculación.
4. Las cepas Bb3 y Bb174 pudieran ser seleccionadas para el control biológico de adultos de *A. diaperinus*.

REFERENCIAS

- [1] L. Cecco, H. González, P. Deluchi, H. Barrios, y M. De Franceschi, “Determinación de los estados de desarrollo de *Alphitobius Diaperinus* en granjas avícolas”, *Revista Argentina de Producción Animal*. 25: 93-99, 2005.
- [2] J. Retamales, F. Vivallo, and J. Robeson, J, “Insects associated with chicken manure in a breeder poultry farm of Central Chile”, *Archives Medical*, 43: 79-83, 2011.
- [3] E.C. Turner Jr, “Structural and Litter Pests”. *Poultry Science*, 65: 644-648, 1986.
- [4] P.H. Santoro, P.M.O.J. Neves, T.M. Alexandre, D. Sartori, L.F.A. Alves, and M.H.P. Fungaro, “Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*”, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97 (2008): 83-90, 2008.
- [5] R.L. Hamm, P.E. Kaufman, C.A. Reasor, D. A. Rutz, and J.G. Scott, “Resistance to cyfluthrin and tetrachlorvinphos in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, collected from the eastern United States” *Pest Management Science*, 62: 673-677, 2006.

- [6] C.J. Geden, and D.C. Steinkraus, "Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of Lesser Mealworm and Hide Beetle in Georgia Poultry Houses". *Journal Economic Entomology*, 96 (5): 1602-1607, 2003.
- [7] A.M. Chernaki-Leffer, L.M. Almeida, D.R. Sosa-Gómez, A. Anjos, and K.M. Vogado, "Populational fluctuation and spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in a poultry house, Cascavel, Parana state, Brazil", *Brazil Journal Biology*, 67 (2): 209-213, 2007.
- [8] S.R.F. Rezende, F.A. Curvello, M.E Fraga, R.C.S. Reis, A.M.C. Castilho, and T.S.P. Agostinho, "Control of the *Alphitobius Diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with Entomopathogenic Fungi" *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11 (2): 121 – 127, 2009.
- [9] F.L. Gazoni, C.G. Wilsmann, F. Flores, F. Silveira, R.A. Bampi, R. Boufleur, and M. Lovato, "Efficacy of Phosphine Gas Against the Darkling Beetle (*Alphitobius diaperinus*)" *Acta Scientiae Veterinariae*, 39 (2): 965, 2011.
- [10] L.F.A. Alves, M.H. Gassen, F.G.S. Pinto, P.M.O.J. Neves. and S.B. Alves, "Ocorrência Natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) Sobre o Cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em Aviário Comercial de Cascavel, PR", *Neotropical Entomology*, 34 (3): 507-510, 2005.
- [11] C. Rohde, L.F.A. Alves, P.M.O.J. Neves, S.B. Alves, E.R.L. Da Silva, and J.E.M. De Almeida, "Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)", *Neotropical Entomology*, 35 (2): 231-240, 2006.
- [12] D.G.P. De Oliveira, F.G.S. Pinto, F.G. Barcellos, L.F.A. Angeli, & M. Hungria, "Variabilidade genética de isolados de *Beauveria* spp. e virulência ao cascudinho *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)", *Ciências Agrárias*, 32 (1): 147-156, 2011.
- [13] D.D. Hegedus, M.J. Bidochka, G.S. Miranpuri, and G.G. Khachatourians, "A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*", *Applied Microbiology Biotechnology*, 36 (6): 785-789, 1992.
- [14] A.S. Da Silva, G. Hoff, D.R. Laureano, J.M. Santurio, and S.G. Monteiro, "Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório". *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(2): 177-181, 2005.
- [15] A.S. Da Silva, A.P.N. Quintal. S.G. Monteiro, R.L. Doyle, I.J.M. Santurio, and V.R.E.P. Bittencourt, "Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório", *Ciencia Rural*, 36 (6): s/n. 2006.
- [16] L.A. Castrillo, and W.M. Brooks, "Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses", *Journal Invertebrate Pathology*, 72 (3): 190-196, 1998.
- [17] J.C. Almeida, A.C. Albuquerque and E.A.L. Luna-Alves, "Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) artificialmente infectado", *Arquivos do Instituto Biologico*, 77 (4): 473-480, 2005.
- [18] M.B. Nájera-Rincón, M.M. García, R.L. Crocker, V. Hernández-Velázquez y L.A. Rodríguez del Bosque, "Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio", *Fitosanidad*, 9 (1): 33-36, 2005.

- [19] S.J. Rice, and T.A. Lambkin, “A new culture method for lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*”, *Journal of Applied Entomology*, 133 (2009): 67-72, 2008.
- [20] E.S. Loureiro, and A.C. Monteiro, “Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: formicidae)” *Revista Árvore*, 24 (004): 553-561, 2005.
- [21] G. Zimmermann, “Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*”, *Biocontrol Science and Technology*, 17 (5/6): 553-596, 2007.
- [22] J.C. Dunford, and P.E. Kaufman, “Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae)”, Department of Entomology and Nematology, University of Florida, 2006.