

# Hongos entomopatógenos nativos con potencial para el control del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano, en Puerto Rico<sup>1,2</sup>

Miguel A. García-Carrucini<sup>3</sup>, Víctor Cartín Leyva<sup>4</sup> y  
Consuelo Estévez de Jensen<sup>5</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 101(1):91-106 (2017)

## RESUMEN

Se aislaron hongos entomopatógenos parasíticos de brocas del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) y picudos del plátano (*Cosmopolites sordidus* Germar) en distintos puntos de la isla de Puerto Rico con el fin de ser identificados y evaluar su patogenicidad sobre el picudo del pimiento (*Anthonomus eugenii* Cano). Los hongos fueron aislados y purificados en medio de cultivo de agar de papa y dextrosa (PDA) acidulado en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz. Se obtuvieron siete aislados de hongos del municipio de Comerío, y uno del municipio de Adjuntas. Para la identificación de los aislados, se utilizaron características morfológicas, secuenciación del ADN de distintas regiones genéticas de interés y microsatélites. De los ocho aislados obtenidos dos fueron identificados como *Beauveria bassiana*, tres como *Beauveria caledonica*, dos como *Paecilomyces fumosorosea* y uno como *Paecilomyces lilacinum*. Se realizaron pruebas de patogenicidad in vitro con suspensiones de conidias de  $1 \times 10^6$  conidias/mL para cada uno de los hongos. Los insectos se inocularon por inmersión durante 10 segundos en la suspensión de conidias. Se tomaron datos de mortalidad y se determinaron los  $TL_{50}$ ,  $TL_{90}$  y la media de los tratamientos. Todas las especies de hongos fueron patogénicas a *A. eugenii*. Los tratamientos más efectivos fueron: *P. fumosorosea* (Pae1) y *B. bassiana* (Bb1 y Bb3) con  $TL_{50}$  de 2.39, 2.53 y 2.56 días, respectivamente, mientras que para el control el  $TL_{50}$  fue de 6.56 días. Con los tratamientos el 100% de mortalidad ocurrió entre el

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 11 de abril de 2016.

<sup>2</sup>Se agradece a la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico-Recinto de Mayagüez por la colaboración en la caracterización morfológica de los aislados; del Dr. Ramón Molina-Bravo y del personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica por su apoyo durante la caracterización molecular de los aislados.

<sup>3</sup>Estudiante Graduado, DOCINADE (Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo), Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.

<sup>4</sup>Profesor retirado, Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Costa Rica.

<sup>5</sup>Catedrática, Departamento de Ciencias Agroambientales, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

cuarto y el sexto día, mientras en el control ocurrió el duodécimo día. Estos aislados tienen potencial para ser utilizados en planes de manejo del picudo del pimiento.

**Palabras clave:** *Anthonomus eugenii* Cano, entomopatógenos, *Beauveria*, *Paecilomyces*

#### ABSTRACT

Isolation of native entomopathogenic fungi with potential for control of the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano, in Puerto Rico

Entomopathogenic fungi were isolated parasitizing coffee borer beetle (*Hypothenemus hampei* Ferrari) and banana weevils (*Cosmopolites sordidus* Germar) in different parts of the island of Puerto Rico to be identified and examined for their pathogenicity on pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). Fungi were isolated and purified in acidulated potato dextrose-agar (PDA) in the laboratory of the Plant Disease Clinic at the Agricultural Experiment Station, Juana Díaz. Seven fungal isolates were obtained from the municipality of Comerío, and one from the municipality of Adjuntas. Morphology, DNA sequences of different genetic regions of interest, and microsatellites were used for identification of fungal isolates. Two of the eight isolates were identified as *Beauveria bassiana*, three as *Beauveria caledonica*, two as *Paecilomyces fumosorosea* and one as *Paecilomyces lilacinum*. Pathogenicity tests were conducted in vitro using conidia suspension ( $1 \times 10^6$  conidia/mL). Insects were inoculated by immersion (10 sec) in the conidia suspension. Daily mortality data was taken ( $TL_{50}$ ,  $TL_{90}$ ) and the mean of the treatments were determined. All the fungal species were pathogenic to *A. eugenii*. The most effective treatments were: *P. fumosorosea* (Pae1) and *B. bassiana* (Bb1 & Bb3) with  $TL_{50}$  of 2.39, 2.53 and 2.56 days, respectively, while  $TL_{50}$  for the control was 6.56. A 100% mortality for treatments occurred between the fourth and sixth day compared to control, which reached it in 12 days. These isolates have the potential to be used on an integrated management program for the control of the pepper weevil.

**Key words:** *Anthonomus eugenii* Cano, entomopathogens, *Beauveria*, *Paecilomyces*

#### INTRODUCCIÓN

El pimiento, *Capsicum annuum* L., es la cuarta hortaliza de mayor importancia económica en Puerto Rico, la cual aporta alrededor del cinco por ciento del ingreso bruto de dicho renglón. Desde la temporada 1998 hasta la 2012 la producción de esta hortaliza mermó aproximadamente en un 60% (NASS, 2014). El país cuenta con la capacidad y las condiciones climáticas para producir localmente valores cercanos al consumo total de pimiento, el cual fluctúa cerca de 6,350,292 kg anuales. Sin embargo, durante los últimos años se ha estado produciendo valores cercanos a la mitad del consumo total, lo que representa un amplio nicho para la producción local. Los principales problemas que representa la producción de *C. annuum* son el control de plagas y el manejo en temporadas lluviosas. Las principales plagas del cultivo son *Scirtothrips dorsalis* Hood, *Helicoverpa zea* Boddie y *Anthonomus eu-*

*genii* Cano, siendo este último el mayor limitante en su producción. Cuando no se logra un manejo efectivo del picudo del pimiento, *A. eugenii*, las pérdidas pueden alcanzar hasta un 100% de la producción (Estación Experimental Agrícola, 2002).

Al presente, en Puerto Rico el control del picudo se ha realizado mediante el uso de insecticidas como piretroides y carbamatos. Esta plaga ha presentado resistencia a diferentes insecticidas y se ha observado que la resistencia a agroquímicos varía según las distintas localidades (Servín et al., 2008). Debido a su difícil manejo y a lo perjudicial del uso de agroquímicos en diferentes lugares, se han realizado ensayos con el fin de controlar la plaga mediante el uso de hongos entomopatógenos. En Costa Rica, por ejemplo, se han reportado mortalidades mayores al 90% mediante el uso de *Beauveria bassiana* (Carballo et al., 2001). Los hongos nativos del lugar donde se interese controlar el insecto generalmente son más eficientes como entomopatógenos debido a su adaptación a las condiciones ambientales de la zona.

Los hongos entomopatógenos son importantes agentes de control biológico. Con frecuencia producen epizootias, lo que reduce significativamente poblaciones de plagas. Aunque solo se han empleado alrededor de diez especies de hongos para el control de plagas, se conocen sobre 700 especies de entomopatógenos (Hajeck y Leger, 1994). Los entomopatógenos más ampliamente utilizados en el control biológico pertenecen a la subdivisión Deuteromycotina y a la clase Hyphomycetes (Araujo y Maranhao, 2008-2009). Según una investigación realizada en Costa Rica bajo condiciones de laboratorio, los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sorokin demostraron que son eficientes en el control del picudo del pimiento (Rodríguez, 1999).

Gómez y Jiménez (1994) realizaron un estudio en condiciones de laboratorio donde determinaron que *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden causar mortalidad superior al 90% en el caso del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman. Los mismos investigadores realizaron un estudio en donde observaron el efecto de diferentes cepas de *B. bassiana* sobre el picudo del pimiento mediante el método de inmersión en suspensiones de  $1 \times 10^8$  conidias/mL, y encontraron que todas las cepas utilizadas fueron eficientes en el control del picudo. Schuster et al. (1996) evaluaron el efecto de los hongos: *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecanii* sobre *A. eugenii*, y determinaron que los tres hongos fueron patógenicos al insecto. En el CATIE, Turrialba, Costa Rica, Carballo et al. (2001) realizaron un ensayo de laboratorio donde evaluaron doce cepas de *B. bassiana* para el control del picudo del pimiento. De las cepas evaluadas, diez presentaron índices de mortalidad de 90% o más, con tiempos letales al 50% ( $TL_{50}$ ) de 2.40 a 3.66

días, lo que representa valores por debajo de los obtenidos por Brenes y Carballo (1994) en un ensayo sobre *Cosmopolites sordidus* Germar, el cual arrojó valores de  $TL_{50}$  de aproximadamente siete días.

En Puerto Rico no se han realizado trabajos referentes al uso de entomopatógenos para el control de *A. eugenii*. El Conjunto Tecnológico para la Producción del Pimiento (EEA, 2005) solo hace referencia al uso de insecticidas sintéticos como método de control. Para lograr el control adecuado del insecto, se realizan hasta tres aspersiones de agroquímicos por semana, causando desequilibrio en el agroecosistema. Esta investigación tuvo como objetivo aislar, caracterizar y evaluar la efectividad de hongos entomopatógenos sobre el picudo del pimiento en condiciones in vitro. Esto permitirá contar con un banco de aislados de hongos que puedan ser validados como potencial método de control biológico y aprobados para reducir el uso de agroquímicos en este cultivo en un futuro cercano. Como parte del estudio se recolectaron brocas del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), insecto de la familia Curculionidae, para el cual existe parasitismo de forma natural en los cafetales de la isla. Además, se recolectaron picudos del plátano (*Cosmopolites sordidus*), para el cual también se ha observado parasitismo natural. Los hongos entomopatógenos aislados de estos insectos pueden tener de igual manera efectos biocontroladores en el picudo del pimiento puesto que son plagas similares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Aislamiento de hongos entomopatógenos*

Se recolectaron brocas del café parasitadas por hongos en cafetales de los municipios de Adjuntas y Comerío, ubicados en diferentes áreas de la zona montañosa del país. De igual forma, en el municipio de Comerío se recolectaron picudos del plátano parasitados por hongos. Las muestras se llevaron al laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, donde se aislaron los hongos entomopatógenos en agar de papa y dextrosa acidulado (PDA). Los hongos se aislaron con un aguja de inoculación a partir de brocas donde se observó crecimiento micelial. El micelio se transfirió al centro de la placa y se incubó a  $26 \pm 5^\circ \text{C}$  por siete días. Para la purificación de aislados, se utilizó PDA con sulfato de estreptomycin a una concentración de 1 mg/L, para evitar el crecimiento de bacterias. Finalmente, para obtener cultivos monospóricos se siguió el protocolo de Cañedo y Ames (2004), donde se realizaron diluciones hasta obtener entre 50 a 100 conidias por mililitro, de la dilución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se inocularon

en PDA. Al cabo de siete días se seleccionó una colonia proveniente de una sola conidia, se cortó la sección de agar y se transfirió a un nuevo plato petri con PDA.

#### *Caracterización morfológica de los aislamientos*

Los aislados obtenidos se caracterizaron morfológicamente observando sus características macroscópicas (i.e., crecimiento, morfología y coloración de la colonia) y microscópicas (i.e., tipo de hifas, tamaño y forma de las conidias, y presencia de otras estructuras reproductivas).

#### *Caracterización molecular de hongos entomopatógenos*

##### *Extracción de ADN*

La caracterización molecular tuvo lugar en el Laboratorio de Biología Molecular de la escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica. Para la extracción de ADN, se utilizó el protocolo de Hoyos-Carvajal et al. (2008) con algunas modificaciones. Por cada muestra se tomaron entre 50 y 100 mg de micelio y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Se agregaron 500  $\mu$ L de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7.2; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1M NaCl), y se maceró el micelio con un pistilo estéril. Una vez homogenizado el micelio se añadieron 50  $\mu$ L de mercaptanol y luego se incubó por 30 min a 60° C, mezclando cada 10 min. Luego se agregó un volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1) y se mezcló por inversión hasta formar una emulsión. Seguido se realizó una centrifugación a 6,000g a 4° C por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le añadió 0.54 volumen de isopropanol. Las muestras se mezclaron por inversión y luego se centrifugaron a 3,000g a 4° C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se mantuvo el "pellet", que fue secado al horno a 37° C por una hora. El "pellet" se resuspendió en Tris EDTA y se incubó a 60° C por 10 min. Seguido se realizó una digestión con ARNasa a un volumen total de 10  $\mu$ L, y se incubó a 37° C por 30 min. Luego se adicionó acetato de sodio pH 5.2 a una concentración final de 0.3M (10  $\mu$ L) y dos volúmenes de etanol absoluto (1 mL). La solución se centrifugó a 10,000g a 4° C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Después se colocó en un bloque caliente a 37° C por una hora. Pasada la hora se centrifugó a 3,000g a 4° C por 10 min. El precipitado se secó al horno y fue resuspendido en 100  $\mu$ L de buffer Tris EDTA. La suspensión fue centrifugada a 1,350g por 10 min, y por último se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

##### *Amplificación del ADN para microsatélites (SSR) de hongos entomopatógenos*

Con el interés de amplificar el ADN utilizando microsatélites (SSR o repetición de secuencia simple, por sus siglas en inglés) se prepara-

ron reacciones para cada par de cebadores (Cuadro 1). Las reacciones consistieron de: agua molecular (Qiagen)<sup>6</sup> 2.9 µL, buffer (Dream Taq, Thermo Fisher) 1 µL, dNTPs (Applied Biosystems) 1 µL, M13 800 0.8 µL, cebador F (0.2 µL), cebador R (1 µL), y Taq (Thermo Fisher) 0.1 µL; para un volumen final de 7 µL. Para cada amplificación, se utilizaron 7 µL de la reacción más 3 µL de ADN del hongo de interés.

### *Beauveria*

Las amplificaciones de ADN utilizando microsatélites específicos para el género *Beauveria* se realizaron con los cebadores establecidos por Rehner y Buckley (2003) (Cuadro 1). Para los cebadores Ba06, Ba08, Ba12, y Ba13, se utilizó un programa de 35 ciclos de 60 segundos a 95° C, 60 segundos a 58° C, y 60 segundos a 72° C. Este programa tuvo una extensión final de 10 min a 72° C. Para la amplificación con los cebadores Ba14, Ba15, Ba16, Ba17, Ba18, Ba20, Ba21, Ba22, Ba23, Ba24, Ba25 y Ba26 se utilizó un programa de 35 ciclos de 60 segundos a 95° C, 60 segundos a 56° C, y 60 segundos a 72° C; con una extensión final de 10 min a 72° C. Las reacciones de 10 µL se colocaron en el termociclador a 95° C durante 5 min para desnaturalizarlas.

### *Paecilomyces*

Los cebadores para amplificar el ADN utilizando microsatélites (SSR) para el género *Paecilomyces* fueron los establecidos por Dalleau-Clouet et al. (2005) (Cuadro 1). El programa para el PCR utilizando los cebadores *PfrBtD01* y *PfrBtB04* constó de 35 ciclos de 2 min a 94° C para desnaturalizar, un alineamiento de 60 segundos a 49 a 58° C y una extensión de 60 segundos a 72° C; con una extensión final de 7 min a 72° C. Las amplificaciones con los restantes cebadores se realizaron con diferentes temperaturas de alineamiento. Para los cebadores

CUADRO 1.—Cebadores utilizados en amplificaciones para SSR.

Género	Cebadores	Referencia
<i>Beauveria</i>	Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Ba14, Ba15, Ba16, Ba17, Ba18, Ba20, Ba21, Ba22, Ba23, Ba24, Ba25, Ba26	Rehner y Buckley (2003)
<i>Paecilomyces</i>	PfrBtD01, PfrBtB02, PfrBtB04, PfrBtD05, PfrBtB07, PfrBtA08, PfrBtA10, PfrBtD11a, PfrBtD11b	Dalleau-Clouet et al. (2005)

<sup>6</sup>Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

*PfrBtB02*, *PfrBtD05*, *PfrBtB07*, *PfrBtA08*, y *PfrBtA10*, se usó un rango de temperatura de alineamiento de 51 a 60 °C. Para los cebadores *PfrBtD11a* y *PfrBtD11b*, se utilizó un rango de temperatura de 56 a 65 °C. Se colocaron 10 µL de la reacción en el termociclador a 95° C durante 5 min para desnaturalizar el ADN.

#### *Gel Acrilamida – Analyzer 4300*

Para el montaje del equipo y la preparación del gel acrilamida se siguió el protocolo establecido en el manual de aplicaciones del Analizador de ADN Modelo 4300 (LI-COR, 2012). Se preparó el gel de acrilamida utilizando 17 mL de Long Ranger (Lonza Rockland, Inc.), 10.5 µL de TEMED (Sigma-Aldrich) y 114 µL de persulfato de amonio 10% (Sigma-Aldrich). Tan pronto como se agregó, el persulfato de amonio se mezcló bien, se succionó con una jeringa y se vertió la mezcla entre los vidrios. El gel de acrilamida se colocó en un analizador de ADN 4300 conteniendo TBE (amortiguador tris borato) al 0.8%. El amortiguador TBE se preparó a partir de 107.8 g de Base Tris 0.89 M, 55.0 g de ácido bórico 0.89 M, 7.4 g de EDTA 0.02 M, y 950 mL de agua destilada. Finalmente, con una jeringa se procedió a cargar alrededor de 0.4 µL de cada muestra en las fosas. Se añadió un marcador molecular de 1 kb (Odyssey®) al inicio y al final del gel. La electroforesis se corrió a alto voltaje (1500 a 2000 voltios) por alrededor de tres horas y media.

#### *Secuenciación de regiones genéticas de interés de hongos entomopatógenos*

Se amplificaron las diversas regiones genéticas de los hongos de interés utilizando reacciones de 50 µL conteniendo 34.5 µL de agua molecular (Qiagen), 5 µL de buffer, 5 µL de dNTPs, 1 µL de cada cebador F y cebador R, 0.5 µL de polimerasa Taq, y 3 µL de ADN genómico del hongo de interés.

Para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y el factor de alargamiento del género *Beauveria*, se siguió el protocolo utilizado por Rehner (2005) (Cuadro 2). Para la región ITS1-5.8S-ITS2 se utilizaron los cebadores ITS5 e ITS4. El programa para el PCR fue: 35 ciclos de 60 segundos a 94° C, 60 segundos a 55° C y 90 segundos a 72° C, con una extensión final de 7 min a 72° C. Para la amplificación del factor de alargamiento se utilizaron los cebadores 983F y 2218R. El programa del termociclador para la amplificación fue: 2 min a 94° C; 9 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 66 a 57 °C y una extensión de 60 segundos a 72° C; 36 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 56° C, y 60 segundos a 72° C; finalizando con una extensión de 10 min a 72° C.

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 rADN y 18S rADN para los aislados de *Paecilomyces* se realizaron según el protocolo de

CUADRO 2.—Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones de interés.

Género	Región	Cebador: secuencia	Referencias
<i>Beauveria</i>	ITS1-5.8S-ITS2	ITS5: '5-GGAAAGTAAAAAGTCGTAA CAAAGG-3' ITS4: '5-TCCGCCGCTTATTGATATGC-3'	Rehner (2005)
	Factor de Alargamiento	983F: '5-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3' 2218R: '5-ATGACACCCRACRCRACRGTYTG-3'	
		ITS5: '5-GGAAAGTAAAAAGTCGTAA CAAAGG-3' ITS4: '5-TCCGCCGCTTATTGATATGC-3'	
	<i>Paeecilomyces</i>	ITS1-5.8S-ITS2	
18S			



Liang et al. (2009) utilizando los cebadores ITS4 e ITS5 (Cuadro 2). El programa de amplificación en el termociclador fue de 5 min a 95° C; 35 ciclos de 40 segundos a 95° C, 40 segundos a 49° C y 60 segundos a 72° C; con una extensión final de 10 min a 72° C. Para la amplificación de la secuencia 18S rADN, se utilizaron los cebadores NS1 y NS24 (Liang et al., 2009). Se programó el termociclador para 4 min a 94° C; 35 ciclos de 60 segundos a 94° C, 60 segundos a 52 a 55° C y 90 segundos a 72° C; con una extensión final de 7 min a 72° C.

Las amplificaciones fueron enviadas a secuenciar a facilidades comerciales (Macrogen, Corea). Las secuencias de ADN fueron alineadas y editadas utilizando el programa Bioedit. Las secuencias consenso resultantes se compararon con otras secuencias en las bases de datos utilizando los programa MycoBank Database y BLAST del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) para determinar su homología con otras especies de hongos.

#### *Recolección y mantenimiento de insectos*

Esta fase de la investigación se realizó en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental de Juana Díaz, UPRM. Los insectos utilizados en los experimentos fueron obtenidos de ajíes dulces (*Capsicum frutescens*) colectados del suelo de una plantación libre de plaguicidas en el barrio Cejas del municipio de Comerío, Puerto Rico. Los frutos se colocaron en jaulas de cría (42 cm x 42 cm x 76 cm) y se ubicaron en un área seca a temperatura ambiente. Al cabo de cinco días los picudos adultos comenzaron a emerger y se recolectaron por un periodo de tres días. Los picudos se colocaron en frascos plásticos de medio litro, los cuales fueron mantenidos a temperatura ambiente  $26 \pm 5^\circ \text{C}$  y humedad relativa de  $80 \pm 10\%$ .

#### *Pruebas de entomopatogenicidad in vitro*

Para la preparación de inóculo, se rasparon las conidias de la superficie de dos placas petri (14 días de crecimiento) de cada hongo entomopatógeno. Las conidias se mezclaron con 10 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0.05% (Cañedo y Ames, 2004). Se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a  $10^{-4}$ . Con ayuda de un hemacitómetro (cámara de Neubauer) se estimó el número de conidias por mililitro de solución. La concentración de conidias de la solución inicial fue determinada con la fórmula:

$$\text{conidias/mL de solución} = (\text{promedio conidias por cuadrante}) \\ (250,000) \times (\text{dilución utilizada}).$$

A partir de la concentración estimada de la solución madre de cada aislamiento, se prepararon soluciones de aproximadamente  $1 \times 10^6$  conidias por mL.

Para las pruebas in vitro se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos y un control. Se realizaron tres réplicas en el tiempo por tratamiento y 20 insectos por réplica. Los insectos por réplica provinieron de la misma población. Cada tratamiento constó de una solución de conidias de cada uno de los aislados a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias por mL de solución.

Para la inoculación se utilizó el método de inmersión (Miossi-Rondelli et al., 2012; Cañedo y Ames, 2004). Se prepararon placas petri con papel de filtro estéril y 1 mL de agua destilada estéril. Los picudos se colocaron en una gaza y se sumergidos en la solución de conidias por diez segundos y luego se colocaron en placas petri identificadas por tratamiento. Se dejaron las placas con los insectos a temperatura ambiente ( $26 \pm 5^\circ \text{C}$ ) por un periodo de 12 días. Se registró la mortalidad diaria y se corrigió utilizando la fórmula de Abbott (World Health Organization, 2009). Luego se estimó el tiempo letal (TL) al 50% ( $\text{TL}_{50}$ ) y al 90% ( $\text{TL}_{90}$ ) mediante regresión lineal de los datos. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y a las medias se les aplicó la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias entre tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Identificación morfológica de hongos entomopatógenos*

Los aislamientos obtenidos en el municipio de Adjuntas y cuatro de los obtenidos en Comerío mostraron un crecimiento radial de 1.5 cm a 1.7 cm de diámetro a los 10 días, respectivamente. Durante los primeros días las colonias produjeron micelio blanco algodonoso, de superficie plana (Figura 1A). Luego de siete días las colonias de hongos adquirieron una apariencia polvorienta y fueron cambiando a amarillo, especialmente al reverso de la colonia del centro hacia fuera. Estas observaciones concuerdan con las características macroscópicas del género *Beauveria* (García et al., 2011).

Al examinar los aislados de *Beauveria* bajo microscopio se observó que un aislado proveniente de Adjuntas (Bb1) y uno de Comerío (Bb3) presentaban conidias agrupadas en racimos espesos organizados en forma irregular. Las conidias unicelulares, hialinas y generalmente redondas poseen un diámetro que osciló entre 2.0 a 3.1  $\mu\text{m}$ . El raquis del conidióforo fue en forma de zigzag y las fiálides en forma de botella similar a la descripción realizada por Cañedo y Ames (2004). Estas características se observaron en los otros tres aislados (Bb4, Bb5 y Bb6). Sin embargo, las conidias tenían forma elipsoidal con una ligera curva, algunas más delgadas en la parte del media, con medidas de  $2 \times 5.2 \mu\text{m}$  (Figura 1C).

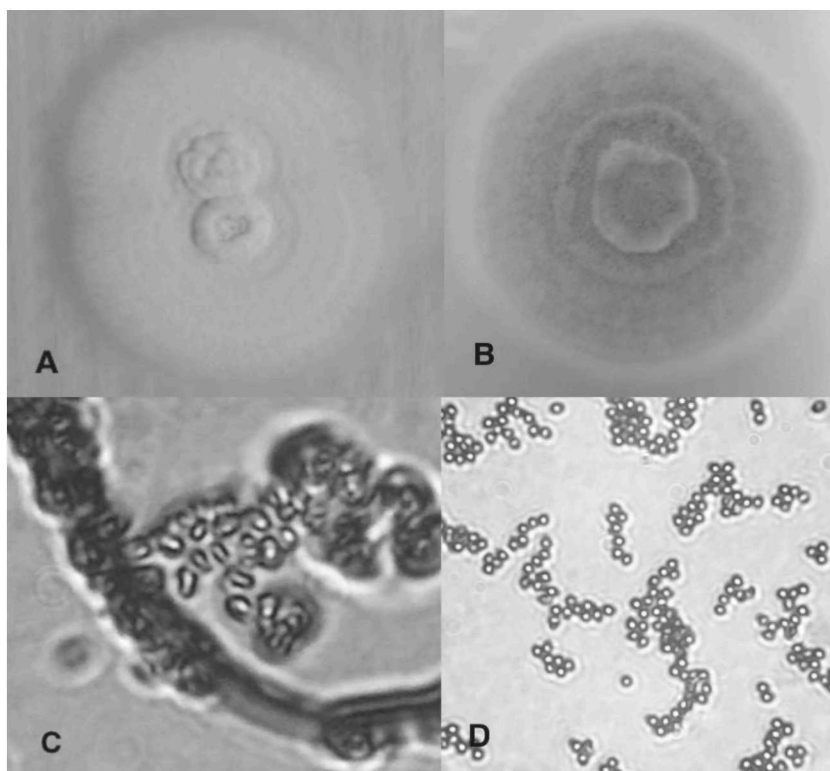


FIGURA 1. A. Colonia de *Beauveria bassiana* en PDA al cabo de siete días. B. Crecimiento de *Paecilomyces fumosoroseus* en PDA al cabo de 21 días. C. Conidias de *Beauveria caledonica*. D. Conidias de *Paecilomyces lilacinus*.

Los otros tres aislados obtenidos en Comerío (Pae1, Pae2 y Pae3) presentaron un crecimiento radial promedio de 2.1 cm de diámetro a los 10 días. En sus inicios las colonias tuvieron una apariencia algodonosa de color blanco que luego de varios días se tornaron en tonalidades de púrpura a partir del centro de las colonias, tomando un aspecto aterciopelado (Figura 1B). Esto concuerda con la descripción ofrecida por Mier et al. (2002) para el género *Paecilomyces*.

Los aislados Pae1 y Pae3 (*Paecilomyces*) presentaron hifas septadas con conidióforos irregularmente ramificados. Las fiáldes tenían forma de botella y se encontraban mayormente en grupos de tres, de las cuales salía una larga cadena de conidias. Las conidias cilíndricas con los extremos redondeados y agrupadas en cadenas basipetales. El tamaño promedio de las conidias fue de  $4.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ . Las característi-

cas observadas coinciden con las ofrecidas por Cedeño y Ames (2004) para *Paecilomyces fumosorosea*. El aislado Pae2 presentó las mismas características exceptuando que las conidias, aunque en cadenas fueron circulares (Figura 1D).

#### *Análisis de ADN de hongos entomopatógenos*

Las secuenciaciones de ADN de la región ITS1-5.8S-ITS2 y del factor de alargamiento para los aislados Bb1 y Bb3, poseen 99% de homología con las accesiones AY531913.1 y EF193189.1 de *B. bassiana* en la base de datos MycoBank. Las secuencias de ADN de los aislados Bb4, Bb5 y Bb6 mostraron 99% de homología con la accesión HQ881014.1 de *Beauveria caledonica* e igual porcentaje con AY531912.1 de *B. bassiana*. Sin embargo, las características morfológicas de las conidias (elipsoidales con una ligera curva) de los aislados Bb4, Bb5 y Bb6 concuerdan con las descritas para *B. caledonica*.

Al analizar las muestras de ADN de los distintos aislados de *Beauveria* por medio de microsatélites se distinguen dos grupos, donde los aislados Bb1 y Bb3 están estrechamente relacionados entre sí, pero alejados de Bb4, Bb5 y Bb6. Estos últimos están estrechamente relacionados entre sí. Las especies del género *Beauveria* son anamorfias (reproducción asexual), lo que disminuye la variabilidad genética dentro de una misma especie. Los dos aislados correspondientes a *B. bassiana* fueron colectados de brocas del café. Los tres aislados correspondientes a *B. caledonica* se encontraban parasitando el picudo del plátano lo que sugiere cierta especificidad de *Beauveria* sobre los insectos que parasita. Las distintas especies de *Beauveria* pueden tener la capacidad de secretar distintas enzimas como quitinasas, proteasas y lipasas entre otras a diferentes concentraciones, siendo estas las responsables de degradar los componentes del exoesqueleto del insecto. Siendo esto determinante en la virulencia del hongo sobre las distintas especies de insectos.

Los aislados Pae1 y Pae3 fueron obtenidos de especímenes de *H. hampei* y *C. sordidus*, respectivamente, parasitados de forma natural. Estos fueron obtenidos en fincas no aledañas, no obstante los resultados de los microsatélites indican que Pae1 y Pae3 están estrechamente relacionados entre sí. Al comparar las secuencias de los aislados de *Paecilomyces* contra las accesiones de las bases de datos MycoBank Database y BLAST, se encontró que los aislados Pae1 y Pae3 poseen 99% de homología con las secuencias de FJ765008.1 y AF461747, identificadas como *P. fumosorosea*, datos que concuerdan con las características morfológicas. Al analizar las secuencias del aislado Pae2 este posee 99% de homología con la accesión AB103380, la cual corresponde a *Paecilomyces lilacinus*.

*Patogenicidad in vitro*

El análisis de varianza muestra diferencias en los datos de mortalidad obtenidos según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 3). Los tratamientos Bb1, Bb3 y Pae1 no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero fueron significativamente diferentes de los tratamientos Bb4, Bb5, Bb6, Pae2, Pae3 y el control (Cuadro 3). El tratamiento Pae1 obtuvo el  $TL_{50}$  más bajo con 2.39 días, seguido por Bb1 y Bb3 con 2.53 y 2.56 días, respectivamente. En los tratamientos Bb4, Bb5, Bb6, Pae2 y Pae3 se observó un  $TL_{50}$  entre 4.06 y 4.57 días, mientras que el control mostró  $TL_{50}$  de 6.54 días (Cuadro 3). Los dos aislamientos de *B. bassiana* (Bb1 y Bb3) y un aislado de *P. fumosorosea* (Pae1) causaron el 100% de mortalidad a los cuatro días después de la inoculación. Para ese periodo de tiempo los aislados restantes causaron de un 16 a 40% de mortalidad. Luego de cuatro días de la inoculación, el control presentó un 16.6% de mortalidad, alcanzando el 100% para el 12mo día después de la inoculación. La regresión lineal de la mortalidad acumulada en el tiempo fue similar para los aislados Bb1, Bb3 y Pae1, pero distintas a las de los aislados Bb4, Bb5, Bb6, Pae2 y Pae3, las cuales a su vez fueron distintas a la regresión del control (Figura 2). Esto evidencia la eficacia de los aislados Bb1, Bb3 y Pae1 en el control del picudo en condiciones de laboratorio. Los resultados del  $TL_{50}$  de los aislados del género *Beauveria* sobre *A. eugenii* son similares a los obtenidos por Carballo et al. (2001) quienes utilizando varios aislamientos de *Beauveria* obtuvieron un  $TL_{50}$  de 1.80 a 3.66 días. De igual modo, el porcentaje de mortalidad de sus aislamientos (90 a 100%) resultó similar a los nuestros (100%). Datos similares fueron obtenidos por Marín y Bustilo (2008), quienes encontraron un porcentaje de mortalidad de 94 a 100% para varios

CUADRO 3.—*Patogenicidad in vitro y tiempo letal ( $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ ) de aislados de Beauveria spp. y Paecilomyces sobre adultos del picudo Anthonomus eugenii Cano.*

Hongo	100% mortalidad (no. días)	$TL_{50}$ (días)	$TL_{90}$ (días)	Media <sup>1</sup>
Pae1	4	2.39	3.62	2.77 a
Bb1	4	2.53	3.67	2.95 a
Bb3	4	2.56	3.73	2.98 a
Bb4	6	4.11	5.94	4.45 b
Bb5	6	4.06	5.92	4.37 b
Bb6	6	4.33	6.32	4.58 b
Pae2	6	4.57	6.87	4.68 b
Pae3	5	4.06	6.02	4.27 b
Control	12	6.54	10.47	7.05 c

<sup>1</sup>Medias en una columna con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

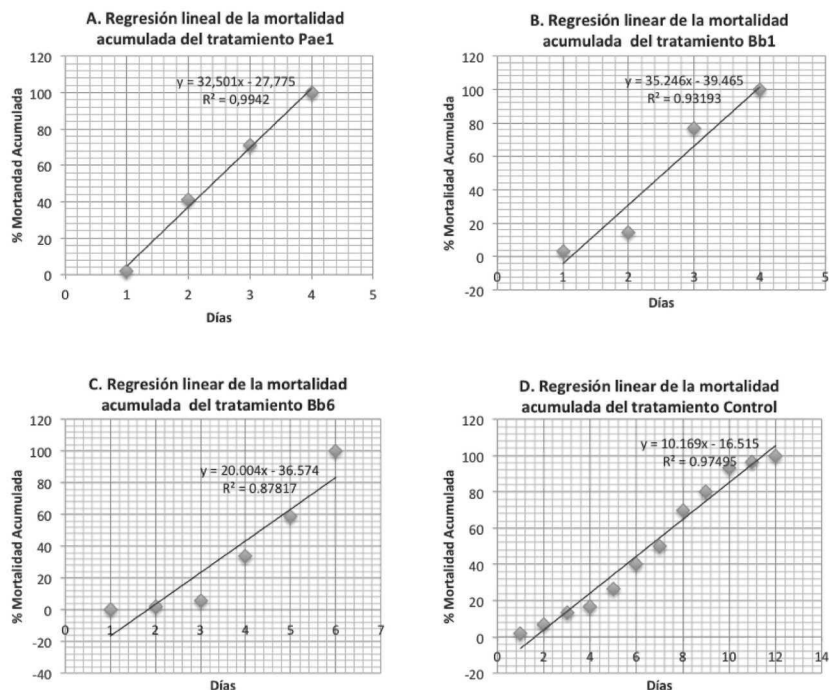


FIGURA 2. Regresiones lineales de las mortalidades acumuladas in vitro para los tratamientos: A. Pae1; B. Bb1; C. Bb6; y D. Control, sobre el picudo del pimiento.

aislamientos de *B. bassiana* sobre el picudito del cítrico (*Compsus* sp.) con  $TL_{50}$  de 4.5 a 4.8 días. Se reportan varios estudios en condiciones de laboratorio pero muy limitados en condiciones de campo, evidenciando la necesidad de comprobar la actividad de los hongos entomopatógenos en condiciones de invernadero y campo. Esto validaría su uso en programas de manejo de plagas en campo. En estudios con adultos del picudo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (tamaño de 2.5 a 4.0 mm) inoculados con suspensión de conidias ( $1 \times 10^8$  conidias/mL) de *B. bassiana* mediante inmersión encontraron mortalidades que fluctuaron entre 19.7 a 72.8% (Miossi-Rondelli et al., 2012). Estos valores difieren de los nuestros, teniendo en cuenta que el tamaño de ambos insectos es similar, pudo deberse a las características específicas del integumento del insecto dificultando o facilitando la adhesión y germinación de la conidia.

La patogenicidad de *P. fumosorosea* sobre *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae), cuyo tamaño de adulto fluctúa

entre 0.95 y 1.90 cm, comparan con nuestros resultados ya que reflejaron un 100% de mortalidad (Hunter et al., 2011). Sin embargo el 100% de mortalidad ocurrió a los 35 días, mientras que en nuestro estudio esto ocurrió más rápido, a los 4.5 días de inoculado con Pae1 y a los seis días para los tratamientos Pae2 y Pae3. La diferencia pudo deberse al método de inoculación, ya que Hunter et al. (2011) asperjaron las hojas y plántulas, mientras que en nuestro trabajo se realizó una inmersión del insecto en la solución de conidias, exponiendo el insecto en contacto directo con el hongo. Otro factor que pudo ser determinante en el tiempo letal es el tamaño de *D. abbreviatus*, el cual es mucho más grande que *A. eugenii* (2.0 a 3.5 mm), tomándole mas tiempo al hongo entomopatógeno en invadir el cuerpo y los órganos del insecto hasta ocasionarle la muerte.

Todas las especies de hongos aislados a partir de brocas del café y picudos del plátano mostraron ser patogénicas a *A. eugenii*. Es importante indicar que existen diferencias en la virulencia de los aislados de *B. bassiana* y *B. caledonica*. Los aislados de *B. bassiana* tuvieron mayor virulencia sobre el picudo del pimiento en comparación con los aislados de *B. caledonica*. A nivel molecular en secuenciación de ADN de las regiones amplificadas las diferencias entre estas especies fueron mínimas, sin embargo al comparar por medio de microsatélites hubo grandes diferencias. Las especies de *Beauveria* fueron obtenidas de diferentes especies de insectos, lo cual sugiere cierta especificidad del hongo hacia los insectos. Los resultados in vitro sugieren que los aislados de *B. bassiana* (Bb1 y Bb3) y *P. fumosorosea* (Pae1) tienen potencial para ser utilizados en planes de manejo del picudo del pimiento. En condiciones de laboratorio donde se controlan la temperatura y humedad se favorece el desarrollo de los hongos en los insectos mientras que en campo la humedad relativa es variable y las temperaturas pueden ser muy altas (> 90° C) lo cual puede afectar la efectividad del método de control. Es importante realizar evaluaciones de hongos entomopatógenos en condiciones de invernadero para determinar su efectividad y las dosis apropiadas antes de utilizarse en condiciones de campo.

#### LITERATURA CITADA

- Araujo, E. y E. Albuquerque Maranhao, 2008-2009. Hongos entomopatógenos: Importante herramienta para el control de "moscas blancas" (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 5(6): 209-242.
- Brenes, S. y M. Carballo, 1994. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) para el control biológico del picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar). *Manejo Integrado de Plagas* 31:17-21.
- Cañedo, V. y T. Ames, 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

- Carballo, M., L. Rodríguez y J. Durán, 2001. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 54-59.
- Dalleau-Clouet, C., N. Gauthier, A. M. Risterucci, M. C. Bon and J. Fargues, 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Molecular Ecology Notes* 5: 496-498.
- Estación Experimental Agrícola (EEA), 2002. Prácticas para el manejo integrado del picudo del pimiento en Puerto Rico. (Boletín 301). EEA, Universidad de Puerto Rico.
- Estación Experimental Agrícola (EEA), 2005. Conjunto tecnológico para la producción de pimientos tipo "cubanelle" y "campana". Publicación No. 164. EEA, Universidad de Puerto Rico.
- García-García, M. A., S. García-Cappello, J. M. Gordillo-Lesher y R. F. Molina-Martínez, 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario* 10(2): 21-28.
- Gómez, V. y C. Jiménez, 1994. Uso de hongos entomopatógenos para el manejo del picudo del algodón. Hongos entomopatógenos de plagas en Nicaragua. Informe Final del Proyecto de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario, MAG. Proyecto CATIE- INTA-MIP (NORAD-ASDI) (1991-94).
- Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz, 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3): 451-458.
- Hunter, W. B., P. B. Avery, D. Pick y C. A. Powell, 2011. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pest of citrus. *Florida Entomologist*, 94(4): 1051-1054.
- Liang, Z. Q., Y. F. Han, H. L. Chu y R. T. V. Fox, 2009. Studies on the genus *Paecilomyces* in China V. *Taifanglania* gen. nov. for some monophialidic species. *Fungal Diversity* 34:69-77.
- LI-COR, 2012. Applications Manual: Model 4300 DNA Analyzer. LI-COR Inc. 984-13169.
- Marín-Marín, P. y A. E. Bustillo-Pardey, 2008. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* virulentos a *Compsus* n. sp. *Cenicafé* 59(2): 165-173.
- Mier, T., C. Torriello y M. Ulloa, 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México, D.F.
- Miossi-Rondelli, V., J. R. de Carvalho, D. Pratissoli, R. A. Polankzyk, J. R. De Conte Carvalho de Alencer, F.D. Zinger, y S.M. Andrade-Pereira, 2012. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolates for controlling *Sitophilus zeamais* (Mots) (Coleoptera: Curculionidae). *IDESIA* 30(3): 97-102.
- Rehner, S. A. y E. P. Buckley, 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1): 84-98.
- Rehner, S. A. y E. P. Buckley, 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales). *Molecular Ecology Notes* 3: 409-411.
- Servín, R., J. García, A. Tejas, J. Martínez y M. Toapata, 2008. Susceptibility of pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) (Coleoptera: Curculionidae) to seven insecticides in rural areas of Baja California Sur, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie) 24(003): 45-54.
- Schuster, D. J., D. R. Seal, P. A. Stansly, C. Cruz y R. Zapata, 1996. Prospects for integrated management of the pepper weevil in the Caribbean basin, pp. 71-72 In: D. N. Maynard [ed.], Proc. Natl. Pepper Conf., 8-11 Dec. 1996. Naples, FL.
- National Agricultural Statistics Service (NASS), 2014. 2012 Census of Agriculture: Puerto Rico island and municipal data. USDA 1(52).
- World Health Organization, 2009. Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70070>.