

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *BEAVERIA*
BASSIANA, AISLADA DE DIFERENTES INSECTOS EN TRUJILLO
- VENEZUELA**

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF *BEAVERIA*
BASSIANA ISOLATES FROM DIFFERENT INSECTS IN TRUJILLO
STATE, VENEZUELA**

**Carmen Elena Castillo^{1*}, Luis Miguel Cañizalez¹, Rafael Valera¹, Jean
Carlos Godoy¹, Clemencia Guedez¹, Rafael Olivar², Solbey Morillo³.**

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico “Dr. Carlos Díaz Polanco”. Universidad de Los Andes ²Ministerio de Educación. ETA. “Adolfo Navas Coronado”. Estado Trujillo, Venezuela. ³Universidad de los Andes, Departamento de Metodología, Escuela de Criminología, Facultad de Ciencias Jurídicas y Políticas.

Resumen

Beauveria bassiana, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Deuteromycetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos, por lo que es considerado uno de los patógenos más importantes. Los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue la caracterización morfológica de diez aislados de ***Beauveria spp.***, provenientes de insectos colectados en el Estado Trujillo. Se realizaron cultivos monospóricos de los diez (10) aislamientos procedentes de diferentes hospedantes y se colocaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para su crecimiento. Con la finalidad de medir el tamaño de las esporas se realizaron cámaras de crecimiento en portaobjeto de tal forma que las estructuras del hongo se conservaran en su disposición y tamaño natural. Al tercer día se procedió a medir 100 esporas por aislamiento con el micrómetro ocular, instalado en el microscopio óptico. Para la caracterización cultural se realizaron observaciones a los 13 días después de sembrados los diez (10) aislamientos en PDA, describiéndose características como color, borde, aspecto de la colonia y pigmentación del medio. Observaciones realizadas al microscopio permitieron caracterizar a las esporas de los diez (10) aislamientos como morfológicamente pertenecientes a la especie ***B. bassiana***.

Palabras Clave: Entomopatógeno, *Beauveria*, Aislados, Pigmentación, Monospóricos, Micelio, Esporulación.

Abstract

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus that belongs to the class Deuteromycetes, according to the morphology of the reproductive structure and is commonly found infesting a large number of species of insects, so it is considered one of the most important insect pathogens. Dead insects infected with *Beauveria* species, have a very dense white coating formed by the mycelium and sporulation of the fungus. For this reason the objective of this study was the morphological characterization of ten isolates of ***Beauveria spp.***, from insects found in Trujillo State. Monospore culture were made from the ten (10) isolates from different hosts and placed in the potato-dextrose agar (PDA) for growth. To measure the size of the spores were conducted in growth chambers in order to the structures of the fungus were retained in its layout and natural size. On the third day 100 spores were measured per isolate with ocular micrometer installed in the optical microscope. For cultural characterization observations were made at 13 days after growing the ten (10) isolates on PDA, describing features such as color, edge of the colony appearance and pigmentation of the medium. Observations at the microscope allowed characterization of spores of the ten (10) isolates as belonging to the species morphologically ***B. bassiana***.

Key Words: Entomopathogenic, *Beauveria*, Isolates, Pigmentation, Monospores, Micelyum, Sporulation.

Recibido: 10/07/2011 - Aprobado: 17/02/2012

Introducción

Beauveria bassiana, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Deuteromycetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora (conidial), y de esta manera entra en la clasificación de los hongos superiores (hongos imperfectos) [1] y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos.

B. bassiana, se caracteriza por presentar células conidiógenas globosas a sub-globosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) con un cuello muy corto, las estructuras conidiógenas forman grandes grupos, conidióforos apiñados formando sinnemas o grupos de conidióforos muy juntos, las conidias son hialinas y lisas, globosas elipsoidales, raquis en zíg-zag y el desarrollo en medio de cultivo es levantado de color blanco, tomando coloraciones amarillentas en el reverso de la placa cuando tiene mucho tiempo [1].

B. bassiana, es uno de los patógenos más importantes que afectan los insectos. Es común encontrarlo en restos de insectos o bien en insectos que quedan adheridos a las hojas de la planta. Es un parásito facultativo, esto es que puede crecer tanto en su hospedante como sobre medios artificiales [2]. La vía de penetración del hongo por la cutícula del insecto es la ruta directa más común, aunque puede ocurrir por cualquier parte del insecto, incluyendo el ano o la boca [3]. Luego de la germinación de las conidias en la cutícula del insecto, los tubos germinativos penetran el integumento de éste, por acción mecánica y efectos enzimáticos, pasando a la hemolinfa donde ataca los tejidos [4]. La duración de las diferentes fases del ciclo del hongo depende de la especie y de las condiciones ambientales presentes durante la infección [5]. En condiciones favorables para el entomopatógeno se desarrolla micelio, conidióforos y conidias sobre la cutícula del insecto, proporcionando otra fuente de inóculo para afectar otros individuos [6].

B. bassiana, generalmente es asociado con el término Muscardina Blanca, ya que el micelio y los conidios cubren el cuerpo o los espacios articulares con una capa de color blanco. Constantine, (1977), define a los Hiphomycetes, como hongos que produce conidios sobre hifas algonodosas, o más o menos flojas [7].

Las infecciones producidas por hongos en los insectos son frecuentes y se pueden detectar con facilidad debido al crecimiento de micelio en dichos insectos. Algunos de estos hongos son **B. bassiana**, **Metarhizium anisopliae**, **Verticillium sp**, **Aschersonia sp**, y **Entomophora sp**. Estos hongos producen epizootias naturales en el campo y son un mecanismo regulador de las poblaciones de insectos en ecosistemas que hayan sido alterados [1].

Dado el carácter cosmopolita de **B. bassiana**, nos propusimos una búsqueda activa con la finalidad de aislar y caracterizar morfológicamente cepas nativas en el estado Trujillo a partir de diferentes insectos, para aumentar la colección de hongos entomopatógenos en el laboratorio y así realizar la evaluación a futuro de la patogenicidad de las mismas como posibles controladores biológicos en las diversas plagas agrícolas de la región, toda vez que las diferentes cepas pueden presentar diferentes grados de esporulación [8], por lo que es importante estudiar su patogenicidad previo a su masificación.

Materiales y métodos

Los insectos muertos infectados por especies de **Beauveria**, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo. Generalmente los insectos atacados se momifican quedando adheridos en la planta, principalmente en el envés de la hoja [9]. Es por ello que mediante búsqueda activa se recogieron varios insectos sospechosos de estar infectados con *B. bassiana*, en algunos cafetales de la región así como también en otros lugares (Parroquia La Paz, Municipio Pampán; Parroquia Cuicas, Municipio Carache, Parroquia Mitón, Municipio Carache; Cabimbú, Municipio Urdaneta; El Corozo, Parroquia Monseñor Carrillo, Municipio Trujillo; San Jacinto Parroquia Monseñor Carrillo, Municipio Trujillo; Arapuey, Municipio Julio César Salas, Estado Mérida), los cuales fueron transportados al Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico Dr. Carlos Díaz Polanco de la Universidad de Los Andes, Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, Trujillo - Venezuela.

Para caracterizar morfológicamente los diez aislamientos de **B. bassiana**, se realizaron cultivos monospóricos de los diez (10) aislamientos procedentes de diferentes hospedantes y se colocaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para su crecimiento.

Para medir el tamaño de las esporas se realizaron cámaras de crecimiento en portaobjeto con la finalidad de que las estructuras del hongo se conservaran en su disposición y tamaño natural. Al tercer día se procedió a medir 100 esporas por aislamiento con el micrómetro ocular, instalado en el microscopio óptico.

Para la caracterización cultural se realizaron observaciones a los 13 días después de sembrados los diez (10) aislamientos en PDA, describiéndose características como color, borde, aspecto de la colonia y pigmentación del medio.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se presenta la procedencia de las cepas de **Beauveria** que fueron aisladas en el laboratorio. Así también se presenta el código que le fue asignado a cada cepa a fin de caracterizar las mismas.

Morfología microscópica de los diez (10) aislamientos de *B. bassiana*.

Observaciones realizadas al microscopio permitieron caracterizar a las esporas de los diez (10) aislamientos como morfológicamente pertenecientes a la especie **B. bassiana** (de acuerdo al tamaño y forma, así como también al raquis en forma de “zigzag”, tal como se observa en la figura 1). El promedio de largo y ancho de las esporas para todos los aislamientos se presentan en la Tabla 2.

Las esporas de todos los aislamientos estudiados se caracterizaron por ser globosas, hialinas y lisas; con células conidioforas anchas en la parte basal, con un raquis en forma de “zig-zag” de donde emergen las esporas (Figura 1).

De esta manera se coincide con lo expuesto por Samson (1981) y Brady (1979) quienes encontraron que las esporas de **B. bassiana** se diferencian de otras especies de **Beauveria** como **B. brongniartii** [10, 11].

Según Vargas (2003), la forma y el tamaño de las conidias, esféricas para **B. bassiana** y elipsoidales para *B. brongniartii*, así como las características de las células conidiógenas, es el criterio morfológico más utilizado para la clasificación de ambas especies, pero debido a la variabilidad entre los aislamientos de **Beauveria** y a la especificidad que muestran hacia los diferentes insectos, es importante recurrir a técnicas moleculares para su identificación y caracterización [12].

Glare e Inwood (1998), compararon diversas cepas de especies de **Beauveria**, provenientes de Nueva Zelanda con cepas de otros países utilizando criterios morfológicos y moleculares basándose en las dimensiones de las conidias clasificando las cepas en dos grandes grupos: las cepas con conidias mayores de 3 μm de diámetro fueron clasificadas como **B. brongniartii**, mientras que las cepas con conidias esféricas y menores de 3 μm de diámetro fueron consideradas como **B. bassiana** [13].

Tamaño de las esporas:

El tamaño de las esporas de los diez (10) aislamientos de **B. bassiana** osciló entre 2,6 x 2,2 μm para el Bb-04 y 2,9 x 2,8 μm para el Bb-05.

Morfología macroscópica.

En medio de cultivo de PDA a 25°C, los diez (10) aislamientos presentaron colonias de aspecto algodonosa al principio, que luego se tornaron pulverulentas con superficie semi-elevada y crecimiento moderado (Figura 2). Las colonias presentaron color blanco que durante el crecimiento micelial fue tomando un color amarillento, por la parte posterior de la caja de Petri (Tabla 3). Estas características morfológicas se corresponden con lo reportado por otros autores previamente [8, 12, 13].

Conclusiones

1. El crecimiento de los aislados de hongos entomopatógenos en cámaras húmedas permite la caracterización morfológica.
2. Las características morfológicas de los diez (10) aislamientos evaluados en este estudio mostraron que pertenecen a la especie **B. bassiana**.
3. Todos los diez (10) aislamientos caracterizados como *B. bassiana* presentaron colonias algodonosas de color blanco que luego se tornaron pulverulentas.

Recomendaciones

1. Caracterizar todos los aislamientos de **B. bassiana** a través de técnicas moleculares, para compararlos con estos estudios.
2. Realizar ensayos de Virulencia de los diez (10) aislamientos estudiados en el desarrollo de este trabajo, contra las plagas más importantes en los diferentes cultivos del estado Trujillo.
3. Masificar para su aplicación en el campo, aquellas cepas autóctonas de **B. bassiana** que demuestren mayor actividad controladora a nivel de laboratorio.

Bibliografía:

- ALCAZAR, S. K. KAMAN; E. TORRES Y E. YUBAR. 1990. “**Beauveria spp**, hongo amigo del agricultor”. En *Medio Ambiente*, Lima n°45 p.44-46.
- ALVES, SERGIO B. 1986. *Control Microbiano de insectos*. Brasil. Editorial Manole LTDA.407pag.
- BRADY, B. 1979. **Beauveria bassiana**. CMI. *Descriptions of pathogenic fungi and Bacteria*. Commonwealth Mycological Institute-England N-602.
- BUSTILLO, A. 1991. “Perspectivas de un manejo integrado de la broca del café (**Hypothenemus hampei**)”, en Colombia. En: *Miscelánea Sociedad Colombiana de Entomología*. Medellín: No. 8; p. 106-118.
- CONSTANTINE, JOHN A. 1977. *Introducción a la Micología*. Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- FERRON, P. 1981. “Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*”. En: *Microbial control of pests and plant diseases 1970- 1980*, ed. H. D. Burges, Chap. 24, p 465-482. Academic Press, New York, 949 p.
- GLARE R., T. 1992. “Fungal pathogens of scarabs”. En: JACKSON, T.A. and GLARE, R.T. *Use of pathogens in scarabs pest management*. London: Athenaeum press, p. 63-79.
- GLARE, T.R., INWOOD, A.J., 1998. *Morphological and genetic Characterization of Beauveria spp*. From New Zealand. *Mycological Research*, 102 (2): 250-256.
- GODOY J.C., VALERA R.E., GUÉDEZ C., CAÑIZALEZ L. M. Y CASTILLO C.E., 2007. “Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de **B. bassiana**”. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2007, 24: 415-425.
- ROBERTS, L.; M. WILLIAM. 1990. *Introducción al manejo de plagas de insectos*. Editorial Limusa. México.
- RODRÍGUEZ, S. D. 1993. *Hongos entomopatógenos en el control biológico en Colombia*. Primera edición. Pp. 226-237.
- SAMSON, R. A. 1981. “Identificación de entomopatogenic deuteromycetes”. En *burgers, H.D. Microbial control of pest and plant disease*. London. Academic press, pp. 93-106.
- VARGAS, M. 2003. “Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Sacardo) Petch y su virulencia en **Phthorimaea operculella** (Zeller) y **Symmetrischema tangolias** (Gyen)”. Tesis digitales UNMSM. Peru.

Tabla 1. Procedencia de los diez (10) aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Código	Procedencia	Insecto
Bb-01	Monay (Trujillo)	Chipo (<i>Rodnius prolixus</i>)
Bb-02	Monay (Trujillo)	Escarabajo (<i>Heliotaurus ruficollis</i>)
Bb-03	Cuicas (Trujillo)	Broca (<i>Hypothenemus hampei</i>)
Bb-04	Cuicas (Trujillo)	Broca (<i>Hypothenemus hampei</i>)
Bb-05	Cabimbú (Trujillo)	Gusano Blanco (<i>Premnotrypes vorax</i>)
Bb-06	Monay (Trujillo)	Cucaracha (<i>Periplaneta americana</i>)
Bb-07	Arapuey (Trujillo)	Broca del Café (<i>Hypothenemus hampei</i>)
Bb-08	El Corozo (Trujillo)	Broca del Café (<i>Hypothenemus hampei</i>)
Bb-09	Villita (Trujillo)	Broca del Café (<i>Hypothenemus hampei</i>)
Bb-10	Mitón (Trujillo)	Broca del Café (<i>Hypothenemus hampei</i>)

Tabla 2. Promedio de longitud y ancho de las esporas de los diez (10) aislamientos de ***B. bassiana*** en medio de cultivo de PDA.

Aislamiento	Tamaño de las esporas
Bb-01	2,8 x 2,3 μm
Bb-02	2,7 x 2,2 μm
Bb-03	2,3 x 2,0 μm
Bb-04	2,6 x 2,2 μm
Bb-05	2,9 x 2,8 μm
Bb-06	2,7 x 2,4 μm
Bb-07	2,5 x 2,5 μm
Bb-08	2,4 x 2,0 μm
Bb-09	2,4 x 2,1 μm
Bb-10	2,8 x 2,7 μm

Tabla 3. Morfología macroscópica de diez (10) aislamientos de ***B. bassiana*** en medio de cultivo de PDA.

Aislamientos	Color	Aspecto	Superficie
Bb-01	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-02	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-03	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-04	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-05	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada

Bb-06	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-07	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-08	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-09	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada
Bb-10	Blanco	Pulverulenta	Semi-elevada

Figura 1. Células conidiógenas de **B. bassiana** mostrando la característica típica en raquis en forma de “zig-zag”.



Figura 2. Características macroscópicas de los diez (10) aislados de **B. bassiana** provenientes de diferentes insectos en el Estado Trujillo.



Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto Código: NURR-C-305-01-01-B.