EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA Y QUITINOLÍTICA DE *TRICHODERMA INHAMATUM* Y *BEAUVERIA BASSIANA* EN LA MOSCA DE LA FRUTA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Julio G. Vallejos Sirpa[a]; Christian Espinal Churata[a]; Patricia Mollinedo[b]; Enrique Terrazas Siles[a] (†)*

[a]Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, Av. Saavedra Nº 2224, Miraflores, La Paz –Bolivia; [b]Instituto de Investigaciones en Productos Naturales IIPN, Carrera de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, Campus Universitario UMSA, Edificio FCPN 2º Piso, Calle Andrés Bello y Calle 27, Cota Cota, P.O. Box 303, La Paz, Bolivia

Keywords: *larvicida, insecticida, quitinasas*

ABSTRACT

The use of microorganisms with biocontrol potential is an alternative born as a result of excessive use of chemicals to control pests and diseases in agricultural crops. Fungi such as *Trichoderma inhamatum* (cepa bol – 12 qd) and *Beauveria bassiana* (cepa bol 2 – qc) have demonstrated good biocontrol potential of plant pathogens and pests. In the analysis of the insecticide and enzymatic activity, it was established that the fungus *B. bassiana* has a higher insecticidal activity on *Drosophila melanogaster* (cepa orr) than *T. inhamatum*. With regard to the enzyme activity, it was found that both *T. inhamatum* and *B. bassiana*, have β chitinolytic action, however, this chitinolytic activity is higher in the fungus *B. bassiana*.

*Corresponding author: christian_espinalch@yahoo.es

RESUMEN

El empleo de microrganismos con capacidad biocontroladora, es una alternativa que nace a raíz del manejo desmesurado de agentes químicos para el control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas. Hongos como: *Trichoderma inhamatum* (cepa bol – 12 qd) *y Beauveria bastiana* (cepa bol 2 – qc), han demostrado tener una buena capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos y plagas. En el análisis de la actividad insecticida y enzimática, se estableció que el hongo *B. bassiana*, posee una actividad insecticida mayor sobre *Drosophila melanogaster* (cepa orr) respecto a *T. inhamatum.* Con relación a la actividad enzimática se encontró que tanto *T. inhamatum y B. bassiana,* poseen acción β quitinolítica, sin embargo la actividad β quitinolitica es mayor en el hongo *B. bassiana.*

INTRODUCCION

En nuestro país, existen diferentes tipos de problemas dentro el sector agrícola, entre los que destacan las fitoenfermedades (originada por hongos) y las plagas (insectos); esta última se presenta como la principal problemática del norte paceño, en regiones del valle y trópico de Bolivia [1]. Este tipo de afección se observa en la mayoría de los cultivos de frutas, ya sean de semillas, tropicales, cítricos, etc., y dentro de las plagas más representativas tenemos: a la mosca de fruta *Ceratitis capitata* y *Anastrepha spp* [2].

Existen numerosos métodos para el control de plagas unos más agresivos que otros, tenemos el control natural, que usualmente es llevado a cabo por otros insectos, que matan y devoran al insecto plaga. El control químico, que es uno de los métodos más usados, pero deterioran el ecosistema de la región, contaminando el producto y el suelo. El control biológico, que utilizan componentes como ser extractos de plantas, metabolítos de bacterias y hongos, que poseen la característica de no deteriorar el suelo ni el producto (fruto), debido a que los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos son fácilmente degradables por los factores ambientales [3].

En Bolivia, el uso de larvicidas e insecticidas biológicos no es muy frecuente, debido a que la mayoría de los productores agrícolas, no tienen conocimiento sobre esta alternativa de control de plagas, que no solamente puede ayudar al control de insectos, sino que también puede mejorar el rendimiento de producción de los cultivos.

El empleo de microorganismos como los hongos entomopatógenos, caracterizados por su capacidad biocontroladora sobre insectos, ha cobrado importancia en los últimos años, debido a que estos microorganismos se caracterizan por su producción de metabolitos secundarios y enzimas tales como: proteasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, quitinasas, etc [4], que son los factores clave en el biocontrol, Esta última (quitinasas), se caracterizan por hidrolizar el enlace α y β, del polímero N – acetilglucosamina, componente esencial en la estructura de cubierta y membrana de la mayoría de los insectos y microorganismos[5], lo que da pie al deterioro de la misma y facilita la acción de los demás componentes involucrados en el biocontrol (metabolitos secundarios).

En general, los hongos representan una excelente alternativa de biocontrol, porque pueden colonizar diferentes estados de desarrollo en el insecto y estos son de baja o nula patogenicidad para el ecosistema. Sin embargo, en nuestro medio hasta la fecha, es muy escasa la información referente al empleo de biocontroladores en base a bacterias y hongos para el control de insectos. Es por tal razón, que en el presente trabajo se pretende evaluar la actividad insecticida y quitinolítica de los hongos *T. inhamatum* y *B. bassiana*, frente a la mosca de la fruta *D. melanogaster*.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Medición de la actividad insecticida

En la figura 1, se aprecia los resultados de la actividad insecticida de los hongos *T. inhamatum y B. bassiana*, luego de haber aplicado un inoculo de esporas a una concentración de 6,0 x 10^6 propagulos / mℓ, sobre la mosca de la fruta *D. melanogaster*. En la misma se evidenció que ambos hongos poseen actividad insecticida, sin embargo, si estas actividades son comparadas con el control positivo, observamos que el hongo *B. bassiana*, posee una mayor efectividad como insecticida, logrando un número de 15 moscas muertas (igual al control negativo); En tanto que el hongo *T. inhamatum* solo alcanzó a colonizar 12 moscas.

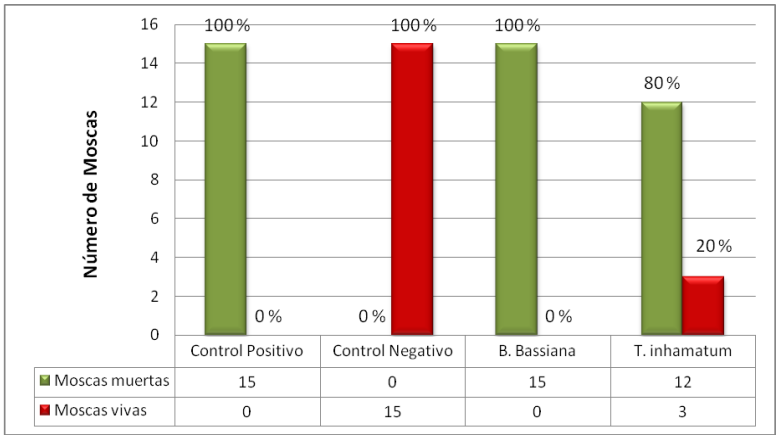

Figura 1. *Número de moscas muertas, ocasionado por la colonización de esporas de los hongos T. inhamatum y B. bassiana.*

La colonización de los hongos controladores sobre el insecto huésped, se desarrolla en cuatro etapas [6] adherencia, germinación, diferenciación y penetración. La adherencia, se produce cuando el conidio se une a la cutícula, mediante el reconocimiento y compatibilidad, entre el conidio y las células del tegumento del insecto, influida por la fuerza electroestáticas e hidrofóbicas, y la secreción de mucílagos, que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana y generan un ambiente favorable para la secreción de enzimas [7]. Una vez adherido, inicia la germinación, que es dependiente de las condiciones que le puedan brindar el insecto y el ambiente [8]. La diferenciación del hongo, inicia con la formación de un tubo germinativo, el cual ayuda a la penetración de la cutícula por la actividad enzimática extracelular del hongo (quitinasas, lipasas, esterasas, y proteasas) (Figura 2.A)

[8], lo que facilita la invasión de la epidermis e hipodermis. Finalmente, se produce la invasión y proliferación de las hifas en el tracto digestivo. Este paso ocurre luego de la muerte del insecto, ocasionado por daño mecánico, desnutrición y toxicidad, y es cuando las hifas secretan la oosporina, metabolito secundario que actúa como bactericida en el intestino del insecto (Figura 2.B) [7]. Suprimidas las barreras inmunes del insecto, el hongo invade el tracto digestivo, se alimenta de su interior y lo momifica [8].

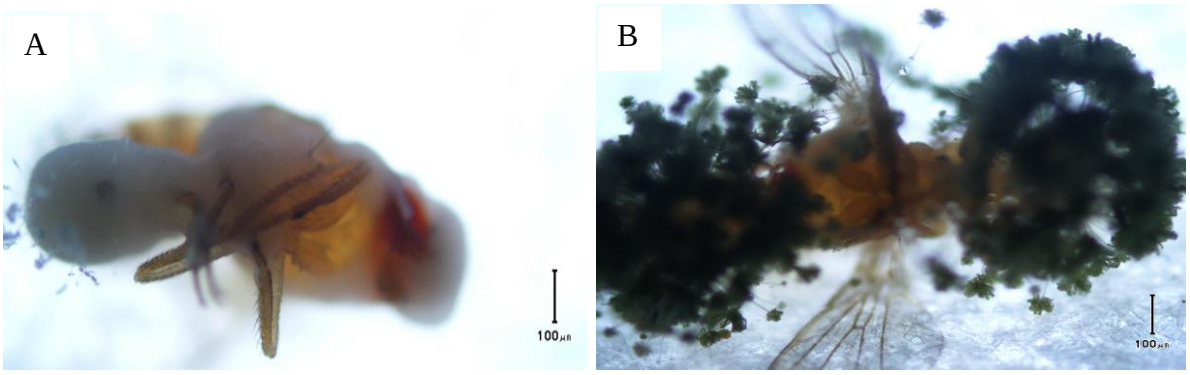

Figura 2*.Observación microscópica con aumento de 40X.* ***A****. Drosophila melanogaster cepa ORR, inoculada con la cepa B. bassiana, durante el proceso de diferenciación.* ***B.*** *Drosophila melanogaster cepa ORR, colonizada por la cepa de T. inhamatum, durante el proceso de colonización.*

Actividad enzimática

Actividad enzimática β - quitinolítica.

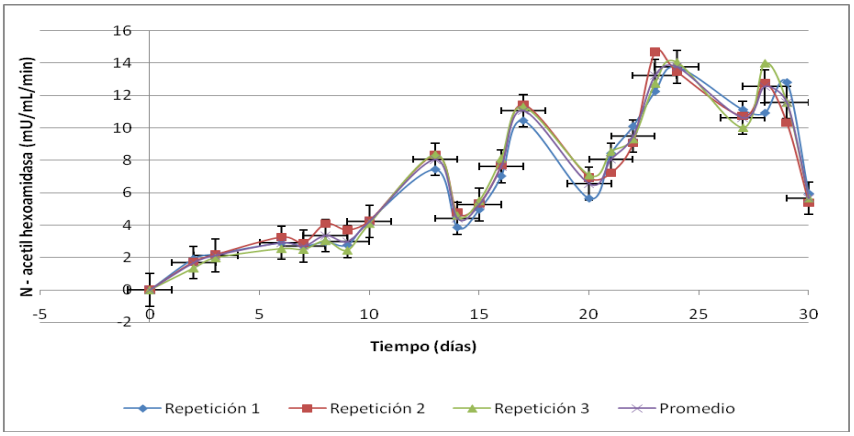

Figura 3*. Actividad enzimática β quitinolítica de T. inhamatum BOL 12 QD, medida en mediode cultivo en Bach durante un lapso de 30 días.*

En el análisis enzimático realizado a las dos cepas de estudio, se observó que los hongos *T. inhamatum y B. bassiana,* presentan actividad quitinolítica, la mejor actividad enzimática quitinolítica se observó a los 14 días, por el hongo *B bassiana* con una actividad promedio de 70,71 mU/mℓ/min (Figura 4), con respecto al hongo *T. inhamatum*, la mejor actividad reportada, se observa a los 24 días con una actividad promedio de 13,78 mU/mℓ/min (Figura 3), posterior a este resultado, se observa un descenso en la actividad enzimática.

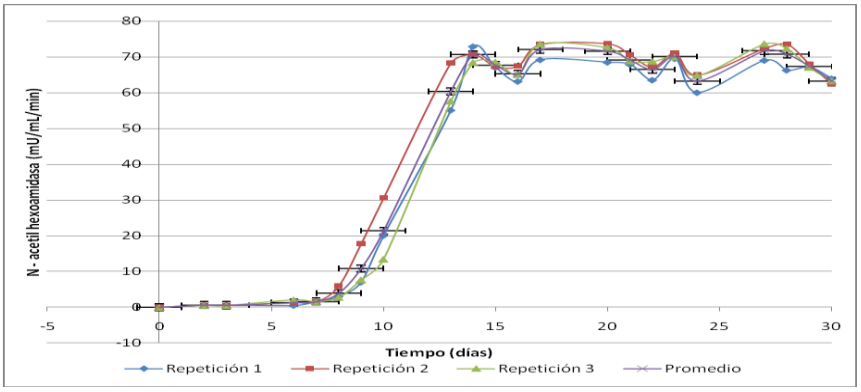

Figura 4. *Actividad enzimática β quitinolítica de B. bassiana BOL 2 QC, medida en medio de cultivo en Bach durante un lapso de 30 días.*

El análisis de la actividad enzimática, se realizó con la finalidad de conocer la capacidad degradativa de la cubierta de los insectos, la misma que se encuentra conformada por el polímero β 1-4 N-acetil glucosamina (quitina), que le da característica de dureza al insecto. Se emplearon estos microorganismos debido a que estos cuentan con capacidad lítica de β 1 – 4 N- acetilglucosaminasa.

EXPERIMENTAL

Hongos biocontroladores

Procedencia de los hongos biocontroladores

Las cepas de hongos empleadas en el presente trabajo fueron: *Trichoderma inhamatum* (BOL – 12 QD) y *Bauveriia bassiana* (BOL – 2 QC), procedentes del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

Cultivo de las cepas de estudio

Las cepas de *T. inhamatum y B. bassiana*, fueron cultivadas en medio de cultivo PDA.

Producción de las larvas de Drosophila melanogaster (cepa ORR)

Procedencia de Drosophila melanogaster

La cepa de *Drosophila melanogaster* utilizada en el presente trabajo fue: ORR del cepario del IIFB, del área laboratorio de genotoxicidad.

Reproducción de las cepas de estudio

Las cepas ORR se encontraban en su estadio adulto, por lo cual se procedió a la reproducción en medio de cultivo de mantenimiento (12,5 g de levadura; 10 g de gelatina; 20,8 g de azúcar; 32,75g de harina amarilla; 0,002g de nipazol, 1,15 mℓ de sol. Acida en 250 mℓ de agua).

Capacidad de control entomopatógena

Evaluación de la actividad insecticida de T. inhamatum y B. Bastiana

Para el análisis de la capacidad entomopatogénica de *T. inhamatum* y *B. bassiana*, se empleó frascos schott de 250 mℓ mismo que contenía el medio de cultivo de mantenimiento, conjuntamente con 15 moscas (*D. melanogaster*)

en su estadio adulto. Posteriormente se procedió a inocular 1 mℓ de una suspensión de esporas de *T. inhamatum* y *B. bassiana* a una concentración de 6,0 x 10^6 esp/mℓ (calculado en cámara de Neubauer), se considero tres repeticiones por prueba para el análisis de la actividad insecticida, el análisis de la mortalidad se realizó a partir de los 2 días, como control negativo se empleo agua destilada y como control positivo el agroquímico Mancozeb. [9]

Actividad enzimática

Preparación de fermentos de T. inhamatum y B. bassiana

Se empleó el medio cultivo Caldo Patata Dextrosa (PDC), del que se alicuotó 30 mℓ de medio PDC a matraz de vidrio de 100 mℓ, que posteriormente fueron esterilizados en un autoclave (AH, American, Model Nº 258 MALTOWOE; WI:54220) a 120 ºC y 1,5 atm por 20 minutos. Se inóculo 1 mℓ de una suspensión de esporas de los hongos *T. inhamatum y B. bassiana*, a una concentración de 6,0 x 10^6 esp./mℓ. Se consideraron 9 repeticiones por prueba, la actividad se evaluó por 30 días.

Obtención de los sobrenadantes

Los sobrenadantes obtenidos de los medios de cultivo, fueron centrifugados a 12 000 rpm durante 15 min., a 5 ºC de temperatura, se filtró el sobrenadante en papel de nitrocelulosa de 0,2 µm.

Actividad α y β quitinolítica

La actividad quitinolítica de los fermentos, se evaluó de acuerdo a protocolo establecido por Transmo y Karman, 1993. Se definió como unidad enzimática a: "La cantidad de enzima que libera un 1 µmol de p - nitrofenol por mℓ de enzima por minuto, bajo las condiciones específicas" [5] .

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad insecticida y enzimática de los hongos *T. inhamatum y B. bassina*, con respecto a la actividad insecticida, se evidencio que ambos microorganismos poseen esta capacidad sobre la mosca de la fruta *D. melanogaster*, siendo *B. bassiana* el hongo que presenta mayor efectividad. De igual forma en el análisis enzimático de las quitinasas, la mejor actividad la presenta el hongo *B. bassiana* a los 14 días de fermentación.

REFERENCIAS

1. ALEAN, IRINA. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sociales* bondar (homóptera: aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. [tesis de licenciatura] 2003.
2. BUSTILLO, A; POSADA, F. 1996. El uso de entomopatógenos en el control de la broca del café en Colombia. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Turrialba, CR. (40) 42 p. 1-13.
3. GONZALEZ, H.; CARBALLO, M.; BLANCO, H. 1996. Efecto de cepas de *Beauveria bassiana* sobre la mortalidad de ecdytolopha torticornis en Macadamia. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Turrialba, CR. 40: 17-23.
4. MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas CATIE. Turrialba, 54: 1-12.
5. TRONSMO A, HARMAN G. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-ß-D-glucosaminidase chitobiosidase, and endochitinase in solutions and in gels. Analytical Biochemistry, 208: 74-79
6. MC.GUIRE, M; ULLOA, M; YOUNG-HOON, P; HUDSON, N. 2005. Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus (Hemiptera:Miridae)* populations Biological control. 33: 307-314.
7. Wong, H. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. [Tesis de Doctorado]. 2003.
8. Duperchy, E. Identification of up-regulated genes of the *hyphomycete Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. [Tesis de Doctorado]. 2003.
9. ESPINAL C. Evaluación de actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL12QD, frente a *Botytis faba*, causdante de manacha chocolate en cultivo de haba (*Vicia faba*) [tesis de licenciatura] 2009.