



## EFFECTO INSECTICIDA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE *Beauveria bassiana* OBTENIDAS DE FMS SOBRE *Cyclocephala lunulata* Burm. BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Lluvia de Carolina Sánchez Pérez <sup>1</sup> Silvia Rodríguez Navarro<sup>2</sup>, Juan Esteban Barranco Florido<sup>3</sup>, Víctor Hugo Marín Cruz<sup>4</sup> y Constanza Abigail Almeida Alcántara<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Agropecuarias, <sup>2</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, <sup>3</sup>Depto. de Sistemas Biológicos, <sup>4</sup>Doctorado en Ciencias Agropecuarias y <sup>5</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-Xochimilco. [abigail\\_12@hotmail.com](mailto:abigail_12@hotmail.com)

### RESUMEN

Para control biológico de plagas; las enzimas hidrolíticas producidas por los hongos entomopatógenos son importantes, ya que facilitan la degradación del tegumento del insecto; llegar al hemocele y establecer la infección. La FMS permite la producción industrial de enzimas a gran escala, con altas concentraciones de productos. Se evaluó el efecto del extracto enzimático producido en fermentación sólida para el control de *C. lunulata*. La FMS consistió en medio mineral, caparazón de camarón y bagazo de caña; se inoculó con  $1 \times 10^7$  esporas/mL de *Beauveria bassiana*. Los conidios y extracto enzimático se obtuvieron de 15 y 5 días de respectivamente, los extractos fueron analizados para determinar la actividad enzimática de: lipasas, proteasas, endo y exo quitinasas. Las larvas de *Cyclocephala lunulata* se aclimataron a  $25 \pm 2$  °C; 50 % de HR. Se evaluó: mortalidad (%) y tiempo de muerte (días de muerte); mediante seis tratamientos con un diseño completo al azar, cada larva fue inyectada con 10  $\mu$ l, las evaluaciones cada 24 hrs. por 10 días. En el extracto enzimático se observó la actividad de lipasas, proteasas (Pr1) y (Pr2), endo y exo quitinasas. Los resultados comprueban la actividad insecticida de las enzimas con una diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ). El extracto enzimático y extracto más conidios con 100% de mortalidad en 1.2 días; control positivo con extracto con 100% de mortalidad en 1.7 días. Conidios con 100% en 2.8, control positivo 60% en 8.8 días. Se demostró la actividad insecticida del extracto enzimático solo y en conjunto con conidios en poblaciones de *C. lunulata*.

### INTRODUCCIÓN

Las enzimas hidrolíticas: proteasas, quitinasas y lipasas son producidas por los hongos entomopatógenos (HE), degradan el tegumento del insecto, poseen un elevado potencial para el biocontrol de plagas, (1). La virulencia está en función del equipamiento enzimático que el hongo posea (2). El sistema de fermentación sólida permite la producción industrial de enzimas a gran

escala (3), con altas concentraciones de productos (4). Las enzimas son consideradas una de las alternativas más eficientes y de bajo impacto ambiental; por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar la reducción del tiempo de muerte de *Cyclocephala lunulata* plaga de importancia económica en pastos.

## MÉTODOS

Se utilizó el aislado 11 de *Beauveria bassiana*, creció en agar dextrosa sabourand durante 15 días. La FMS consistió en medio mínimo y caparazón de camarón, se le inoculó  $1 \times 10^7$  esporas/mL. Para obtener conidios: 15 días y extracto enzimático 5 días. Con el extracto enzimático se determinaron las actividades de lipasas (5); 2. subtilisina (Pr1) y tripsina (Pr2) (5), 3. Endoquitinasas y exoquitinasa. (6). Insectos: 100 larvas colectadas en el área deportiva de la UAM-X (agosto, 2013). Se colocaron individualmente en vasos de plástico transparente de ocho onzas, con 200 g de suelo del lugar de colecta. Bioensayo: A cada larva se le inyectaron 10  $\mu$ l de cada tratamiento atrás de la capsula cefálica. Los insectos se conservaron en la cámara bioclimática a  $25 \pm 2$  °C; 50 % de HR. Diseño experimental: completamente al azar, con seis tratamientos y diez repeticiones.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos, señalan que existe diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ), al evaluar el % de mortalidad. El tratamiento A (Tween 80 al 0.05%) con 0% de mortalidad; en los tratamientos B, C y D la mortalidad fue de 100%. En los tratamientos E y F la mortalidad fue de 60 y 90 % respectivamente (Tabla 2). En la evaluación del tiempo de muerte hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ); los tratamientos B y C el tiempo de muerte fue de 1.2 días. El tratamiento F tuvo 1.7 días, con una diferencia evidente con respecto a los tratamientos D y E con 2.8 y 8.8 días de muerte (Tabla 2). El extracto enzimático solo y en conjunto con los conidios redujo el tiempo de muerte, causado probablemente un efecto tóxico de las enzimas. En el extracto obtenido de FMS de cinco días, se observó la actividad de las principales enzimas que degradan de la cutícula de insectos. (Tabla 1)

Tabla 1. Valores de porcentajes de mortalidad y medias del tiempo de muerte de larvas de *C. lunulata* evaluados en días. A, B y C letras iguales, medias iguales acuerdo a Tukey. N=10

Tratamiento	Mortalidad (%)	Mortalidad (días)
(A) Control negativo		
(B) Extracto enzimático	100 <sup>A</sup>	1.2 $\pm$ 0.40 <sup>B,C</sup>
(C) Extracto enzimático + Conidios $1 \times 10^8$	100 <sup>A</sup>	1.2 $\pm$ 0.40 <sup>B,C</sup>
(D) Conidios $1 \times 10^8$	100 <sup>A</sup>	2.8 $\pm$ 0.40 <sup>B</sup>
(E) Control positivo (Bea Tron ®) $5 \times 10^8$	60 <sup>B</sup>	8.8 $\pm$ 0.057 <sup>A</sup>
(F) Control positivo + Extracto enzimático	90 <sup>A</sup>	1.7 $\pm$ 0.421 <sup>B</sup>

Tabla 2. Determinaciones de las actividades enzimáticas del extracto obtenido de *B. bassiana*

Enzima	Actividad Enzimática
Lipasas	820.83 U
Subtilisina Pr1	0.422 ± 0.07 U
Tripsina Pr2	0.095 ± 0.02 U
Endoquitinasas	3.23 ± 0.38 U
Exoquitinasas	0.00241 ± 7.30675E-05 U

## CONCLUSIONES

En el bioensayo de laboratorio los extractos enzimáticos disminuyen el tiempo de muerte de *Cyclocephala lunulata*, debido a que al utilizar en el sistema de FMS el caparazón de camarón como inductor, se favorece la síntesis de enzimas degradadoras de la cutícula: lipasas, proteasas Pr1 y Pr2 y de endoquitinasas y exoquitinasas.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kaur, G and V. Padmaja. 2009. Relationships among activities of extracelular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *J. of Basic Microbiol* 49: 1845-1852.
2. Yang, J., B. Tian, L. Liang, K.Q. Zhang. 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiol and Biotech* 75: 21-31.
3. Oberoi, H. S., Y. Chavan, S. Bansai and G. S. Dhillon. 2010. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a mayor substrate. *Food Bioproc Technol* 3: 528-536.
4. Singhanía, R. R, K. A. Patel, R. C. Soccol, A. Pandey. 2009. Recent advances in solid –state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*.
5. Ali, Shaukat., Z. Huang., S. Ren. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. *J. Pest Science* 83: 361–370.
6. Coudron, T. A., M. J. Kroha and C. M. Ignoffo. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi, comprehensive. *Biochemistry and Physiology* 79 B: 339-348.