

## Control biológico de la chinche pata de hoja, plaga del piñón de cerro en condiciones de laboratorio\*

### Biological control of leaf-footed bug in purging nut under laboratory conditions

Oscar Daniel Barrera Sánchez<sup>1</sup>, Gloria Humberta Calyecac Cortero<sup>2</sup>, Víctor Rogelio Castrejón Gómez<sup>1</sup> y Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo- Horticultura, Fitotecnia y Preparatoria Agrícola. <sup>2</sup>Centro de Producción de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI Núm. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C. P. 6231. (danielbarrera9@gmail.com; hcalyecac@yahoo.com; vcastrej@ipn.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jaxayacatl@gmail.com.

#### Resumen

Si bien *Jatropha curcas* L. comúnmente conocido como piñón de cerro, es frecuentemente usado para producir biodiesel mediante el uso del aceite extraído de sus semillas, en México, en el Totonacapan estas (tostadas), se han empleado milenariamente como alimento humano, haciendo evidente su domesticación e importancia antropocéntrica. No obstante, actualmente esta especie enfrenta la incidencia de diversas plagas, destacando la chinche pata de hoja, *Leptoglossus zonatus* (Dallas). La incidencia de este insecto reduce el rendimiento de la semilla hasta en 21%. El uso de hongos entomopatógenos puede ser una alternativa viable para su control biológico. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad y virulencia de tres cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.), sobre adultos de esta especie bajo condiciones de laboratorio. La cepa BB01 aislada de *Melanoplus* spp., registró una mortalidad de 85.7% en el primer ensayo y del 100% en el segundo bioensayo cuya cepa fue extraída de *L. zonatus*. La dosis letal 50 (DL50) fue de  $5.2 \times 10^7$  conidios ml<sup>-1</sup> y el tiempo letal 50 (TL50) fue de 5.9 días. Para la comparación de medias se utilizaron las pruebas de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y LSD ( $\alpha=0.06$ ) en el primer y segundo ensayo respectivamente. Para las variables DL50 y TL50 se utilizó un análisis *Probit* mediante el programa

#### Abstract

*Jatropha curcas* L. commonly known as purging nut, is often used to produce biodiesel using oil extracted from its seeds, in Mexico, in Totonacapan these (toasted), have been used as human food, making clear its domestication and anthropocentric importance. However, currently this species faces the incidence of various pests, highlighting the leaf-footed bug, *Leptoglossus zonatus* (Dallas). The incidence of this insect reduces seed yield up to 21%. The use of entomopathogenic fungi can be a viable alternative as biological control. This study aimed to evaluate the pathogenicity and virulence of three *Beauveria bassiana* (Bals.) strains on adults of this species under laboratory conditions. The BB01 strain isolated from *Melanoplus* spp., recorded a mortality rate of 85.7% in the first assay and 100% in the second bioassay, strain that was extracted from *L. zonatus*. The 50 lethal dose (LD50) was  $5.2 \times 10^7$  conidia ml<sup>-1</sup> and lethal time 50 (LT50) was 5.9 days. For mean comparison, the Tukey tests ( $\alpha=0.05$ ) and LSD ( $\alpha=0.06$ ) were used in the first and second assay respectively. Probit analysis was used for variables LD50 and LT50 using S.A.S version 9.0, concluding that this strain showed greater potential to be used in field conditions as a control agent for the pest.

\* Recibido: septiembre de 2016  
Aceptado: diciembre de 2016

S.A.S versión 9.0 concluyéndose que dicha cepa evidenció mayor potencial de ser usada en condiciones de campo como agente de control para dicha plaga.

**Palabras clave:** *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Beauveria bassiana* (Bals.), *Jatropha curcas* L., control biológico.

## Introducción

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), es originaria de México y Centroamérica, utilizada principalmente para obtener biodiesel mediante la transesterificación de los aceites extraídos de las semillas. Actualmente esta especie se encuentra distribuida en Centro y Sudamérica, África, India, Sureste de Asia y Australia (Carels, 2009). Por su alto contenido de aceite y proteína (40% y hasta 28%, respectivamente), está siendo estudiada ampliamente en el mundo (Francis *et al.*, 2013). El piñón de cerro, como se le conoce comúnmente a *J. curcas*, es una especie que en México cuenta con diversos usos tradicionales, principalmente en la Huasteca y pueblos totonacos (Totonacapan); como tutor de la vainilla, para la elaboración de comidas típicas, para reforestación, cercas vivas, conservación de suelos, medicinal y su uso potencial industrial es como bioenergético (Vera *et al.*, 2014).

Dentro del complejo de plagas que atacan al piñón de cerro, se encuentra *Leptoglossus zonatus* Dallas, (Heteroptera: Coreidae), conocido comúnmente como “chinche pata de hoja”. Este insecto es un generalista que se alimenta de un amplio rango de plantas entre las que destacan cultivos básicos como maíz, sorgo, frijol, tomate, cítricos y algunos frutales como guayaba y maracuyá (Xiao y Fadamiro, 2009). La chinche pata de hoja se ha encontrado alimentándose y reproduciéndose en el piñón de cerro. Las ninfas y adultos de *L. zonatus* que se alimentan de frutos de *J. curcas*, reducen el rendimiento en semillas hasta en 21% (Morales *et al.*, 2011). No obstante, según Calyecac (Com. Pers.), este problema está incrementándose considerablemente en monocultivo.

Debido a que el piñón cuenta con potencial alimenticio, medicinal y a que puede asociarse con otras especies vegetales de importancia alimenticia para el hombre, la búsqueda de alternativas de control biológico para las plagas que inciden en su cultivo cobra importancia.

**Keywords:** *Leptoglossus zonatus* (Dallas), *Beauveria bassiana* (Bals.), *Jatropha curcas* L., biological control.

## Introduction

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) is native to Mexico and Central America, its main use is for biodiesel through transesterification of oils extracted from the seeds. Currently this species is distributed in Central and South America, Africa, India, Southeast Asia and Australia (Carels, 2009). Due to its high oil and protein content (40% and up 28% respectively), is being widely studied in the world (Francis *et al.*, 2013). *J. curcas* commonly known as purging nut is a species that in Mexico has several traditional uses, mainly in the Huasteca and Totonac towns (Totonacapan); as stake for vanilla, for the preparation of traditional foods, for reforestation, hedge rows, soil conservation, medicinal and industrial potential use as bioenergy (Vera *et al.*, 2014).

Within the group of pests that attack purging nut is *Leptoglossus zonatus* Dallas (Heteroptera: Coreidae), commonly known as “leaf-footed bug”. This insect is a generalist that feeds on a wide range of plants among which are staple crops such as maize, sorghum, beans, tomatoes, citrus and fruit trees like guava and some passion fruit (Xiao and Fadamiro, 2009). The leaf-footed bug is found feeding and breeding in purging nut. *L. zonatus* nymphs and adults that feed on fruits of *J. curcas*, reduce seed yield up to 21% (Morales *et al.*, 2011). However, according to Calyecac (Pers. Comm.), this problem is increasing considerably in monoculture.

Due to purging nut has a nutritional, medicinal potential and that may be associated with other plant species of food importance to man, the search of alternatives for biological control to this pests are very important.

The use of entomopathogenic fungi to control pests from crops has been extensively studied and used in the world, because naturally in agro-ecosystems there is a specific relationship, in many cases, between pathogen and host (Gruwel and Eigenberg, 2007). Entomopathogenic fungi infect individuals in all insect orders, mainly in Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera and Orthoptera (Kirkland *et al.*, 2004). In Nicaragua two entomopathogenic fungi *Beauveria*

La utilización de hongos entomopatógenos para el control de plagas de cultivos agrícolas ha sido ampliamente estudiada y utilizada en el mundo, debido a que de manera natural en los agroecosistemas, existe una relación específica, en muchos casos, entre patógeno y hospedero (Meyling y Eigenberg, 2007). Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los órdenes de insectos; principalmente en Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Kirkland *et al.*, 2004). En Nicaragua, dos hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., evidenciaron un control satisfactorio de *L. zonatus* en el piñón de cerro (Grimm y Guharay, 1998).

Debido a la importancia que tiene el cultivo de *J. curcas* como potencial de alimento humano y a que existen pocos trabajos encaminados al control biológico de plagas en esta, en el presente trabajo se evaluó el efecto de tres cepas mexicanas nativas de *B. bassiana* para el control de *L. zonatus* bajo condiciones de laboratorio.

## Materiales y métodos

### Colecta del insecto

Adultos de *L. zonatus* fueron capturados en una plantación experimental de *J. curcas* del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI), ubicado en Barranca Honda, Yauatepec Morelos (18° 49' latitud norte y 99° 05' longitud oeste), a una elevación de 1 071 msnm con una precipitación media de 1 050 mm anuales y una temperatura promedio anual de 22 °C (García, 1987). También fueron obtenidos en parcelas de frijol y sorgo de la comunidad de San Isidro Yauatepec, en las cercanías del CEPROBI y en parcelas de sorgo dentro de la cabecera municipal.

Después de que los adultos de *L. zonatus* fueron colectados, se establecieron en el laboratorio del Banco Nacional de Germoplasma Vegetal (BANGEV) ubicado en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) (Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México).

Los insectos fueron aislados en jaulas de vidrio de 30 x 30 x 40 cm y sometidos a observación por cinco días para asegurar que estuvieran libres de patógenos y parasitoides. El

*bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok showed satisfactory control of *L. zonatus* in purging nut (Grimm and Guharay, 1998).

Due to the importance of *J. curcas* as potential for human food and because there are few studies aimed to biological control of pests of it, in this study the effect of three native Mexican strains of *B. bassiana* were evaluated to control *L. zonatus* under laboratory conditions.

## Materials and methods

### Insect Collection

*L. zonatus* adults were captured in an experimental plantation of *J. curcas* in the Development Center of Biotic Products from the National Polytechnic Institute (CEPROBI) located in Barranca Honda, Yauatepec Morelos (18° 49' north latitude and 99° 05' west longitude) at an elevation of 1071 masl with an annual average rainfall of 1050 mm and an average annual temperature of 22 °C (García, 1987). Adults were also collected in bean and sorghum plots from the community of San Isidro Yauatepec, near CEPROBI and in sorghum plots within the main municipality.

After the collection, insects were established in the laboratory from the National Plant Germplasm Bank (BANGEV) located in the Department of Plant Science at the Autonomous University of Chapingo (UACH) (Carretera Mexico- Texcoco km 38.5, Chapingo, Mexico state).

Insects were isolated in glass cages 30 x 30 x 40 cm and subjected to observation for five days to ensure that these were free of pathogens and parasites. The environment inside the cage was at a temperature of 25 to 30 ° C and relative humidity of 65 to 78%. Humidity was controlled with an electric humidifier Duracraft. Temperature was regulated by the heat emitted by 100 watts bulbs. Adults of *L. zonatus* were fed with sweet corn grains, fresh purging nut and fresh bean pods, previously washed with distilled water (Xiao and Fadamiro, 2009).

### Fungi characteristics

The strains used in bioassays (Table 1) were provided by the State Plant Health Committee of Guanajuato (CESAVEG) through MC Fernando Tamayo and reactivated at UACH,

ambiente dentro de las jaulas se mantuvo a una temperatura de 25 a 30 °C y humedad relativa de 65 a 78%. La humedad fue controlada con un humidificador eléctrico marca Duracraft. La temperatura fue regulada mediante el calor emitido por focos de 100 watts. Los adultos de *L. zonatus* fueron alimentados con granos de maíz tierno, frutos frescos de piñón y vainas frescas de frijol, previamente lavados con agua destilada (Xiao y Fadamiro, 2009).

### Características del hongo

Las cepas utilizadas en los bioensayos (Cuadro 1), fueron proporcionadas por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Guanajuato (CESAVEG) a través del M. C. Fernando Tamayo y reactivadas en la UACH, en medio de cultivo solidificado agar dextrosa saborau (ADS), y mantenidas en cajas Petri de plástico a 25 °C hasta su utilización en los bioensayos.

### Cuadro 1. Procedencia de las cepas de *B. bassiana* utilizadas en los bioensayos.

Table 1. Origin of *B. bassiana* strains used in bioassays.

Cepa	Aislamiento	Lugar de colecta y coordenadas geográficas	Fecha de colecta	Fecha de reactivación
BB01	Chapulín <i>Melanoplus</i> spp.	San Bartolo, Municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato (20°30'47.77''N, 100°33'2.05''O)	10/02/2004	14/04/2009
BB02	Chinche <i>Lygus</i> spp. En maíz	Irapuato (20°44'50.71''N, 101°19'38.1''O).	08/08/2004	14/04/2009
BB32	<i>Bactericera</i> spp. en Chile	Irapuato	08/08/2004	14/04/2009

### Evaluación de la patogenicidad de tres cepas de *B. bassiana*

Para la patogenicidad y virulencia se evaluaron las tres cepas y un testigo utilizando el diseño completamente al azar, cada tratamiento tuvo tres repeticiones y nueve insectos por repetición. Por cinco días, los adultos de *L. zonatus* se mantuvieron aislados. Al término de la cuarentena, se sumergieron por tres segundos en una suspensión acuosa de Tween 80 al 0.03% con  $1 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup> para cada cepa. El testigo consistió solamente en la inmersión de los insectos en agua con Tween 80 a 0.03%. Inmediatamente después de la inmersión, los insectos fueron colocados en cajas Petri con papel filtro con la finalidad de eliminar el exceso de la suspensión (Grimm y Guharay, 1998). Posteriormente los insectos fueron colocados en recipientes de plástico de 500 cm<sup>3</sup> de acuerdo a cada tratamiento y fueron alimentados con frutos frescos de *J. curcas* y vainas frescas de frijol. Durante el bioensayo, los insectos permanecieron en una incubadora

in culture medium solidified saborau dextrose agar (ADS), and kept in plastic Petri dishes at 25 °C for use in bioassays.

### Evaluation of pathogenicity from three strain of *B. bassiana*

Pathogenicity and virulence were evaluated for the three strains and a control using a completely randomized design, each treatment had three replications and nine insects per repetition. For five days, adults of *L. zonatus* were kept isolated. At the end of the quarantine were immersed for three seconds in an aqueous suspension Tween 80 at 0.03% with  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> for each strain. The control consisted only in the immersion of the insects in water with Tween 80 at 0.03%. Immediately after immersion, insects were placed in Petri dishes with filter paper in order to remove excess of the suspension (Grimm and Guharay, 1998). Later insects were placed in plastic containers of 500 cm<sup>3</sup>

according to each treatment and were fed with fresh fruits of *J. curcas* and fresh bean pods. During the bioassay, insects were kept in an incubator (Seedburo MP6-3000 B) at a temperature of  $24 \pm 1$  °C with a range of relative humidity from 65 to 78% (Xiao and Fadamiro, 2009).

### Mortality assessment

Insect mortality was counted daily for 50 days and was adjusted through *Abbott's* formula. Dead insects were placed individually in Petri dishes with sterile filter paper moistened with distilled water and incubated for two weeks at 25 °C to promote the mycelia growth and production of conidia.

The sporulation percentage was determined and also the intensity thereof submerging sporulated insects in a solution Tween 80 at 0.03%. Stirred manually for 1 minute and then 10 µL aliquot was taken and diluted in 1 mL of the solution indicated at 0.03% and counted conidia using a Neubauer chamber.

(marca Seedburo modelo MP6-3000 B) a una temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1$  con un rango de humedad relativa de 65 a 78% (Xiao y Fadamiro, 2009).

### Evaluación de la mortalidad

La mortalidad de los insectos fue contada diariamente durante 50 días y fue ajustada mediante la fórmula de *Abbott*. Los insectos muertos fueron colocados de manera individual en cajas Petri con papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada e incubados por dos semanas a  $25^{\circ}\text{C}$  para favorecer el crecimiento de micelio y producción de conidios.

Se determinó el porcentaje de esporulación y también la intensidad de la misma sumergiendo los insectos esporulados en una solución Tween 80 a 0.03%. Se agitó manualmente por 1 minuto y después se tomó una alícuota de  $10\mu\text{L}$  y se diluyó en 1 mL de solución indicada al 0.03% y se procedió al conteo de conidios usando una cámara de Neubauer.

### Germinación de conidias

El porcentaje de germinación de conidias se determinó tomando muestras de la misma suspensión utilizada en este bioensayo ( $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) y colocando alícuotas de  $10\mu\text{L}$  en cajas Petri con medio ADS solidificado e incubadas durante 24 h a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Una vez transcurrido este periodo, se contabilizó el número de unidades germinadas de cada 300 conidias utilizando una cámara Neubauer. Este paso se realizó seis veces por cada cepa.

### Efectividad biológica de la cepa BB01

Una vez que se determinó que la cepa BB01 fue la cepa más patógena y virulenta de acuerdo a los resultados del ensayo anterior se establecieron seis tratamientos con tres repeticiones, ocho insectos por repetición. Los tratamientos consistieron en cinco concentraciones de conidios ( $1 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) suspendidas en una solución Tween 80 al 0.03% y el testigo el cual solo fue la solución Tween 80 al 0.03%.

Las concentración de conidias que provocan 50% de la mortalidad, dosis letal 50 (DL50), fue calculada tomando en cuenta el número de insectos vivos al inicio y al final de cada tratamiento, incluidas las repeticiones. El tiempo en el que murió 50% de la población, el tiempo letal 50 (TL50), fue evaluado para ambos ensayos calculado mediante el análisis *Probit*.

### Conidial germination

Conidial germination rate was determined by taking samples from the same suspension used in this bioassay ( $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) and placing aliquots of  $10\mu\text{L}$  in Petri dishes with ADS solidified and incubated for 24 h at  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . After this period, the number of germinated units of each 300 conidia was counted using a Neubauer chamber. This step was performed six times per strain.

### Biological effectiveness of strain BB01

Once it was determined that the BB01 strain was the most pathogenic and virulent according to the results from the above assay, six treatments with three replicates, eight insects per replicate were established. Treatments consisted of five conidia concentrations ( $1 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) suspended in a solution Tween 80 at 0.03% and control which was only Tween 80 at 0.03%.

Conidia concentrations that cause 50% mortality, lethal dose 50 (LD50) was calculated taking into account the number of insects alive at the beginning and end of each treatment, including replications. The time in which 50% of the population died, lethal time 50 (LT50) was evaluated for both assays calculated through *Probit* analysis.

### Data analysis

Data variables: 1) mortality rate; 2) sporulation percentage; 3) sporulation intensity; and 4) spore germination, were analyzed under a completely randomized design with an analysis of variance using SAS statistical software version 9.0 and a comparison of means using Tukey with a confidence interval of  $\alpha=0.05$  for the first bioassay and LSD test with  $\alpha=0.06$  for the second bioassay. The determination and evaluation of mortality rate, percentage and sporulation concentration were conducted in the same manner as in the first assay.

## Results and discussion

### Pathogenicity of three strains of *B bassiana*

BB01 strain isolated from *Melanoplus* spp., was the strain with the highest mortality (85.71%) and higher percentage spore germination (99.28%), compared to the other

## Análisis de datos

Los datos de las variables: 1) porcentaje de mortalidad; 2) porcentaje de esporulación; 3) intensidad de esporulación; y 4) germinación de esporas, fueron analizados bajo el diseño Completamente al Azar (DCA) con una prueba de análisis de varianza utilizando el programa estadístico SAS versión 9.0 y una prueba de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un intervalo de confianza de  $\alpha=0.05$  para el primer bioensayo y con la prueba de LSD y un  $\alpha=0.06$  para el segundo bioensayo. La determinación y evaluación del porcentaje de mortalidad, porcentaje y concentración de esporulación, fueron realizadas de la misma forma que en el primer ensayo.

## Resultados y discusión

### Patogenicidad de tres cepas de *B. bassiana*

La cepa BB01 aislada de *Melanoplus* spp. fue la cepa que presentó la mayor mortalidad (85.71%) y un mayor porcentaje de germinación de esporas (99.28%), en comparación con las otras dos cepas. En las variables porcentaje y concentración de esporulación, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2).

### Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad y esporulación, concentración de esporulación y germinación de conidias de tres cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *L. zonatus*.

Table 2. Mortality and sporulation rate, sporulation concentration and germination of conidia from three *B. bassiana* strains on adults of *L. zonatus*.

Cepa	Mortalidad (%)	Esporulación (%)	Concentración de la esporulación (1)	Germinación de conidias (%)
BB01	85.71 a*	93.33 a	18.8925 a	99.28 a
BB02	42.86 ab	66.67 a	19.2370 a	96.67 b
BB32	47.62 ab	88.89 a	18.5920 a	95.40 b
TESTIGO	22.22 b	0.00 b	-----	-----

(1) logaritmo natural (Ln) de la cantidad de conidas mL<sup>-1</sup>; \*, letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.05$ ) en la prueba de Tukey.

*Beauveria bassiana* ha sido utilizada para regular poblaciones de diferentes coleópteros de los géneros *Diabrotica*, *Colapis*, y *Maecolapis* (Sosa *et al.*, 1994), además reduce hasta en 50 a 70% poblaciones de *Ixodes scapularis* y de *Rhipicephalus sanguineus* (Kirkland *et al.*, 2004). La aplicación de *B. bassiana* en el suelo reduce la emergencia de adultos de *Diabrotica undecimpunctata*, y el daño a la raíz es menos severo en suelo tratado con el hongo que en los suelos infestados con la plaga sin tratamiento

two strains. In the variable percentage and sporulation concentration, there were no statistically significant differences (Table 2).



Figura 1. Esporulación de tres cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Leptoglossus zonatus*.

Figure 1. Sporulation of three *Beauveria bassiana* strains on adults of *Leptoglossus zonatus*.

*Beauveria bassiana* has been used to regulate populations of different Coleopteran genera *Diabrotica Colapis* and *Maecolapis* (Sosa *et al.*, 1994) also reduces by up to 50 to 70% populations of *Ixodes scapularis* and *Rhipicephalus sanguineus* (Kirkland *et al.*, 2004). The application of *B. bassiana* in the soil reduces the emergence of adults of *Diabrotica undecimpunctata*, and root damage is less severe in soil treated with the fungus than in soils infested with the pest without conidial treatment (Krueger and Roberts, 1997). Grimm and Guharay (1998) mentioned that can also be used as a biological control agent for *L. zonatus* and *Pachycoris klugii*, which are the two main pests of *J. curcas* in Nicaragua, Guatemala and Brazil.

It is possible that *B. bassiana* can exercise effective control in *L. zonatus* due to the high mortality rate obtained in this work, however, it must be taken into account that for an organism to be used as a biological control agent, is not enough a high mortality rate on the target organism, but must also achieve mortality fairly rapidly, so that lethal time 50, is a variable that becomes important. The BB01 strain evaluated in this study reached TL50 at 7.8 days, followed by BB02 and BB32 with 16.9 and 17.4 days, respectively (Table 3).

conidial (Krueger y Roberts, 1997). Grimm y Guharay (1998), mencionaron que también se puede utilizar como un agente de control biológico para *L. zonatus* y *Pachycoris klugii*, los cuales son de las dos principales plagas de *J. curcas* en Nicaragua, Guatemala y Brasil.

Es posible que *B. bassiana* pueda ejercer un control efectivo en *L. zonatus* debido al alto porcentaje de mortalidad obtenido en el presente trabajo, sin embargo, se debe tomar en cuenta que para que un organismo sea utilizado como agente de control biológico, no es suficiente un alto porcentaje de mortalidad sobre el organismo objetivo, sino también debe lograr la mortalidad con cierta rapidez, por lo que el tiempo letal 50, es una variable que cobra importancia. La cepa BB01 evaluada en este trabajo alcanzó TL50 a los 7.8 días, seguida por la BB02 y BB32 con 16.9 y 17.4 días respectivamente (Cuadro 3).

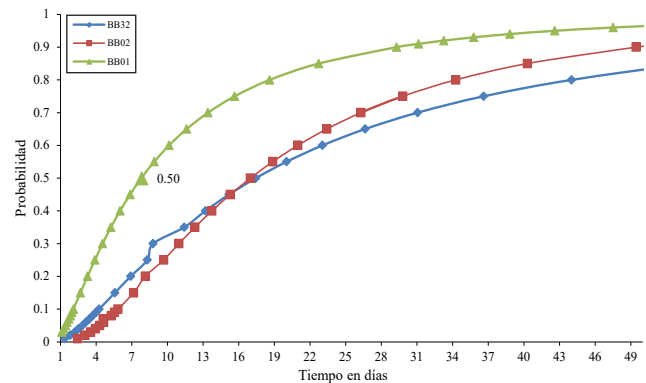
En relación a la rapidez del hongo en tener un efecto sobre sus hospedero, Lezama *et al.* (1998), mencionan que algunas cepas de *B. bassiana* presentan virulencia variable sobre *Spodoptera frugiperda*, con un parasitismo de hasta 90% en huevos y 100% en larvas, el aislamiento más sobresaliente presentó una TL50 de 3.1 y 2.8 días en huevos y larvas del mismo insecto, y una DL50 de  $2.4 \times 10^3$  conidias mL<sup>-1</sup>. Por otra parte, en bioensayos realizados sobre el picudo del plátano *Cosmopolites sordius*, *B. bassiana* causa mortalidades de 63-97% en los 35 días posteriores a la exposición de las esporas. (Kaaya *et al.*, 1993). Dado lo anterior, es posible notar que la mortalidad y rapidez con que actúa *B. bassiana*, depende a) el organismo inoculado, b) la concentración de la aplicación del hongo, c) el estado de desarrollo del organismo objetivo y e) las condiciones ambientales.

En bioensayos realizados sobre *M. sanguinipes*, las cepas de *B. bassiana* GK2016, "tipo nativo" (virulento), y GK2051, presentaron un TL50 de 5.8 y 7.8 días respectivamente, aunque fueron sólo dos días de diferencia en el valor de TL50, la cepa GK2051 requirió 17 días para matar al 90% de la población y nunca produjo 100% de mortalidad, mientras que la cepa "tipo nativo" GK2016, causó 00% de muerte en 8-10 días (Kosir *et al.*, 1991). Grimm y Guharay (1998), reportan que al evaluar la mortalidad de adultos de *L. zonatus* inoculados con tres diferentes cepas de *B. bassiana*, se alcanzó 50% de la mortalidad entre los 10 y 13 días después de la inoculación. Es posible deducir que la mortalidad del organismo, no sólo depende de las características de éste, sino también depende de las características de la cepa utilizada.

**Cuadro 3. Tiempo letal 50 en días y significancia de tres cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *L. zonatus*.**

**Table 3. Lethal time 50 in days and significance of three strains of *B. bassiana* on adults of *L. zonatus*.**

Cepa	TL50	Pr > ChiSq
BBO1	7.80679	<.0001
BB02	16.98266	<.0001
BB32	17.43740	<.0001



**Figura 2. Tiempo letal 50 de tres cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Leptoglossus zonatus*.**

**Figure 2. Lethal time 50 of three strains of *Beauveria bassiana* on adults of *Leptoglossus zonatus*.**

In relation to the speed of the fungus to have an effect on their host, Lezama *et al.*, (1998) mention that some strains of *B. bassiana* exhibit varying virulence on *Spodoptera frugiperda*, with parasitism up to 90% in eggs and 100% in larvae, the most outstanding insulation was an LT50 of 3.1 and 2.8 days in eggs and larvae of the same insect, and an LD50 of  $2.4 \times 10^3$  conidia mL<sup>-1</sup>. Moreover, in bioassays performed on banana weevil *Cosmopolites sordius*, *B. bassiana* causes mortality of 63-97% at 35 days after exposure to the spores (Kaaya *et al.*, 1993). Given the above, it is possible to note that mortality and speed at which *B. bassiana* acts, depends on a) inoculated organism, b) fungus concentration of the application, c) state of development of target organism e) environmental conditions.

In bioassays on *M. sanguinipes*, strains of *B. bassiana* GK2016, "wild-type" (virulent) and GK2051, showed a LT50 of 5.8 and 7.8 days, respectively, although there were only two days apart in the LT50 value, strain GK2051 required 17 days to kill 90% of the population and never produced 100% mortality, while strain "wild type" GK2016, caused 00% death in 8-10 days (Kosir *et al.*, 1991). Grimm and Guharay (1998) report that when evaluating mortality

Considerando los resultados indicados, la cepa BB01 de *B. bassiana* evaluada en este experimento, es más patógena y virulenta sobre adultos de *L. zonatus* que las cepas del mismo hongo reportadas por Grimm y Guharay (1998), para el control de éste mismo insecto.

#### Efectividad biológica de la cepa BB01 de *B. bassiana*

Debido al mayor porcentaje de mortalidad (85.7%), menor tiempo en días para alcanzar el TL50 (7.8 días) y al mayor porcentaje de germinación de esporas (99.28%), la cepa BB01, fue utilizada para realizar el segundo bioensayo. La suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  fue la que presentó los valores más altos en las variables de mortalidad (100%), esporulación (79.16%) y en la concentración de la esporulación (19.53), en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad y esporulación, concentración de esporulación de cepa BB01 de *B. bassiana* sobre adultos de *L. zonatus*.**

**Table 4. Mortality and sporulation rate, sporulation concentration of strain BB01 from *B. bassiana* on adults of *L. zonatus*.**

Tratamiento	Mortalidad (%)	Esporulación (%)	Concentración de la esporulación (1)
$1 \times 10^4$	75.12 ab*	50.233 b	18.4533 c
$1 \times 10^5$	70.15 b	62.667 ab	19.4600 ab
$1 \times 10^6$	70.14 b	53.373 b	18.7333 bc
$1 \times 10^7$	80.11 ab	68.053 ab	19.1300 abc
$1 \times 10^8$	100.0 a	79.167 a	19.5333 a
Testigo	16.67 c	0.000 c	0.0000 d

(1) logaritmo natural (Ln) de la cantidad de conidas  $\text{mL}^{-1}$ , \*; diferente letra indica diferencias significativas entre tratamientos bajo la prueba LSD ( $p=0.06$ ).

Al respecto, la mortalidad de larvas y adultos de la catarina de la papa *Leptinotarsa decemlineata* está relacionada con aplicaciones en diferentes dosis ( $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  conidias  $\text{cm}^{-2}$  de área foliar) de *B. bassiana* (Fargues *et al.*, 1994). Por otra parte, Grimm y Guharay (1998), al estudiar el efecto de diferentes cepas de *B. bassiana* ( $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ), sobre adultos de *L. zonatus*, encontraron mortalidades de 88 a 99%. Las diferentes dosis de la cepa BB01 de *B. bassiana* (Cuadro 4), evaluadas en el presente trabajo, presentaron mortalidades desde 70% hasta 100%, este último valor obtenido en la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , por lo que la mortalidad de *L. zonatus* también está relacionada con las dosis aplicadas del hongo.

La susceptibilidad y la relación de los hongos con los hospederos se asocian con los nutrientes presentes sobre el cuerpo de los insectos, los cuales a su vez son el medio para la

on adults of *L. zonatus* inoculated with three different strains of *B. bassiana*, reached 50% mortality between 10 and 13 days after inoculation. It is possible to deduce that mortality of an organism, not only depends on its characteristics, but also depends on the characteristics of the strain used.

Considering the results shown, strain BB01 from *B. bassiana* evaluated in this experiment, is pathogenic and virulent on adults of *L. zonatus* than strains of the same fungus reported by Grimm and Guharay (1998), for the control of the same insect.

#### Biological effectiveness of strain BB01 from *B. bassiana*

Due to higher mortality rate (85.7%), less time in days to reach LT50 (7.8 days) and the highest spore germination rate (99.28%), strain BB01 was used for the second bioassay.

The suspension of  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  was the one with the highest values in variables mortality (100%), sporulation (79.16%) and sporulation concentration (19.53) compared to other treatments (Table 4).

In this regard, the mortality of larvae and adults of potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* is related with applications in different doses ( $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{cm}^{-2}$  leaf area) of *B. bassiana* (Fargues *et al.*, 1994). Moreover, Grimm and Guharay (1998), by studying the effect of different strains of *B. bassiana* ( $1 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) on adults of *L. zonatus*, found mortalities of 88 to 99%. Different doses of strain BB01 from *B. bassiana* (Table 4), evaluated in this study, presented mortalities from 70% to 100%, the latter value was obtained in the concentration  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , so the mortality of *L. zonatus* is also related to the applied doses of the fungus.



propagación, dispersión y persistencia de dichos organismos (Meyling y Eigenberg, 2007). Debido a lo anterior, la esporulación del hongo en el cuerpo del insecto es un medio de dispersión y propagación tal y como se observa en nidos de la hormiga de fuego, *Solenopsis invicta*, donde *B. bassiana* crece y esporula (Pereira *et al.*, 1993), por lo que representa un agente potencial de control biológico para dicha hormiga (Siebenelcher *et al.*, 1992). En este experimento, la dosis de  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  tuvo la mayor esporulación (79.167%), (Cuadro 4), por lo que la capacidad de dispersión del hongo y de infección a otros insectos, es mayor.

La DL50 de la cepa BB01 sobre adultos de *L. zonatus* fue de  $5.2 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{Pr} > \text{ChiSq} = 0.0021$ ) (Cuadro 5), por lo que la DL50 se encuentra dentro del rango de las concentraciones evaluadas en el presente trabajo.

Al respecto dosis de *B. bassiana* cercanas a la DL50 redujeron el potencial reproductivo de *S. lineatus*, la fertilidad y fecundidad de *C. suppressalis* así como, el desarrollo de los huevecillos de las chicharritas en plantas de arroz (Feng *et al.*, 1994). Por otra parte aislamientos de *B. bassiana* sobre larvas y adultos de *S. frugiperda*, presentaron una DL50 de  $2.4 \times 10^3$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y una TL50 de 3.8 días (Lezama *et al.*, 1996).

La dosis de  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  fue la que presentó el menor valor en el TL50 (5.9 días), por lo que es la dosis que mata con mayor rapidez al 50% de la población de *L. zonatus* (Cuadro 6).

La dosis letal 50 de *Diatrea sacharalis* está relacionada con la dosis ingerida de esporas, dadas las primeras muertes atribuidas a *B. Bassiana*, las cuales ocurrieron a los 7.7 días en dosis de  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que para *Tetranychus urticae* con una dosis de  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , la dosis letal 50 se presentó a los 3.6 días después de la inoculación (Batista *et al.*, 2004). Por otra parte, *B. bassiana* es un organismo potencial para ser usado en el control biológico de áfidos. En un bioensayo realizado con dosis de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , el hongo presentó un alto nivel de virulencia sobre el pulgón *Phorodon humuli*, obteniéndose una DL50 de  $1.37 \times 10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y el TL50 se redujo en la medida del incremento de la dosis conidial (Dorschner *et al.*, 1991). Algo similar ocurrió en el presente trabajo debido a que las dosis más altas presentaron los valores más bajos en el TL50 (Cuadro 6).

Considerando lo citado, *B. bassiana* es un hongo que puede ser utilizado para el control biológico de poblaciones de *L. zonatus* de una forma inocua, ya que no genera contaminación

Susceptibility and the relationship of fungi with the host are associated with nutrients present on insect body, which in turn are the medium for propagation, dispersion and persistence of such organisms (Gruwel and Eigenberg, 2007). Because of this, sporulation of the fungus in the insect's body is a dispersion medium and spread as seen in fire ant nests, *Solenopsis invicta*, where *B. bassiana* grows and sporulates (Pereira *et al.*, 1993), thus representing a potential biological control agent for this ant (Siebenelcher *et al.*, 1992). In this experiment, the dose  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  had the highest sporulation (79.167%) (Table 4), so the dispersibility of the fungus and infection to other insects, is greater.

LD50 of strain BB01 on adults of *L. zonatus* was  $5.2 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{Pr} > \text{ChiSq} = 0.0021$ ) (Table 5), so that LD50 is within the range of concentrations evaluated in this work.

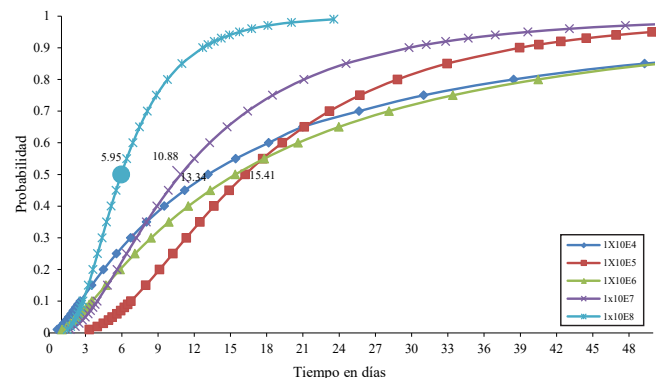
In this regard doses of *B. bassiana* close to LD50 reduced the reproductive potential of *S. lineatus*, fertility and fecundity of *C. suppressalis* and egg development of leafhoppers in rice plants (Feng *et al.*, 1994). Moreover isolates of *B. bassiana* on larvae and adults of *S. frugiperda*, showed an LD50 of  $2.4 \times 10^3$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and a TL50 of 3.8 days (Lezama *et al.*, 1996).

**Cuadro 5. Dosis letal 50, en conidias  $\text{mL}^{-1}$  de la cepa BB01 de *B. bassiana* en adultos de *L. zonatus*.**

**Table 5. Lethal dose 50 in conidia  $\text{mL}^{-1}$  of strain BB01 from *B. bassiana* in adults of *L. zonatus*.**

Tiempo	DL50*	Pr > ChiSq
8 Días	52903196	0.0021

\*Conidias por mililitro.



**Figura 3. Tiempo letal 50 de tres cepas de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Leptoglossus zonatus*.**

**Figure 3. Lethal time 50 of three *Beauveria bassiana* strains on adults of *Leptoglossus zonatus*.**

al ambiente, sin embargo, existe el riesgo potencial de dañar algunos organismos benéficos. Debido a lo anterior, habrá que realizar los estudios correspondientes en condiciones de invernadero y de campo para validar la efectividad de este hongo contra *L. zonatus* en las condiciones diversas.

## Conclusiones

El efecto de las tres cepas de *Beauveria bassiana* fue patogénico y virulento sobre adultos de *L. zonatus*.

Las cepas evaluadas evidenciaron diferente nivel de patogenicidad y virulencia sobre adultos de *L. zonatus*.

La cepa BB01 evidenció mayor potencial como agente de control biológico de *L. zonatus*.

Existe una relación directamente proporcional entre la patogenicidad y virulencia de cepas de *B. bassiana* (BB01) con la dosis aplicada sobre adultos de *L. zonatus*.

## Literatura citada

- Carels, N. 2009. *Jatropha curcas*: a review. in: advances in botanical research. Kader, J. C. and Delseny, M. (Eds). (50):39-86.
- Batista, A. S.; Savoi R. L.; Biaggioni, L. R.; Tamai, M. A. and Pereira, R. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Inv. Patol.* (81):70-77.
- Dorschner, K. W.; Feng, M. G. and Baird, C. R. 1991. Virulence of an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the hop aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* (20):690-693.
- Francis, G.; Oliver J. and Sujatha, M. 2013. Non toxic *Jatropha* plants as a potential multipurpose multiuse oil seed crop. *Industrial Crops and Products.* (42):397-401.
- Fargues, J.; Delmas, J. C. and Lebrun, R. A. 1994. Leaf consumption by larvae of colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) infected with the entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *J. Econ. Entomol.* 87(1):67-71.
- Feng M. G.; Poprawski, T. J. and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Review. Bio. Sci. Technol.* (4):3-34.
- García, M. E. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Para adaptarlo a las condiciones de la República mexicana. Cuarta edición. Enriqueta García de Miranda. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México D. F. 217p.

The dose of  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  was the one with the lowest value in TL50 (5.9 days), so it is the dose that kills faster 50% of the population of *L. zonatus* (Table 6).

### Cuadro 6. Tiempo letal 50 en días de la cepa BB01 de *B. bassiana* en adultos de *L. zonatus*.

Table 6. Lethal time 50 in days of strain BB01 from *B. bassiana* in adults of *L. zonatus*.

Cepa	TL50*	Pr > ChiSq
$1 \times 10^4$	13.15832	<.0001
$1 \times 10^5$	16.22547	<.0001
$1 \times 10^6$	15.41490	<.0001
$1 \times 10^7$	10.88828	<.0001
$1 \times 10^8$	5.95965	<.0001

\*Tiempo letal 50 en días.

The lethal dose 50 of *Diatraea saccharalis* is related to the ingested spores dose, given the first deaths attributed to *B. bassiana*, which occurred at 7.7 days at dose  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , while for *Tetranychus urticae* with a dose  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , lethal dose 50 was at 3.6 days after inoculation (Batista *et al.*, 2004). Moreover, *B. bassiana* is a potential organism to be used in biological control of aphids. In a bioassay performed with doses of  $1 \times 10^4$ -  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , the fungus showed a high level of virulence on the aphid *Phorodon humuli*, obtaining a LD50 of  $1.37 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and TL50 reduced as conidia dose increased (Dorschner *et al.*, 1991). Something similar happened in this paper because higher doses had the lowest values in TL50 (Table 6).

Whereas cited, *B. bassiana* is a fungus that can be used for biological control of populations of *L. zonatus* in an innocuous way, since it does not generate pollution to the environment; however, there is the potential risk of damaging some beneficial organisms. Because of this, there is need to perform studies in greenhouse and field to validate the effectiveness of this fungi against *L. zonatus* under different conditions.

## Conclusions

The effect of the three strains of *Beauveria bassiana* was pathogenic and virulent on adults *L. zonatus*.

The evaluated strains showed different levels of pathogenicity and virulence on adults of *L. zonatus*.

- Grimm, C. 1999. Evaluation of damage to physic nut (*Jatropha curcas*) by true bugs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2(92):127-136.
- Grimm, C. and Guharay, F. 1998. Control of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* and shield-backed bug *Pachycoris klugii* with entomopathogenic fungi. *Bio. Sci. Technol.* (8):365-376.
- Kaaya, G. P.; Seshu-Reddy, K. V.; Kokwaro, E. D. and Munyinyi, D. M. 1993. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Serratia marcescens* to the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. *Bio. Sci. Technol.* (3):177-187.
- Kosir, J. M.; MacPherson, J. M. and Khachatourians, G. 1991. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphism. *Can. J. Microbiol.* (37):534-541.
- Kirkland, B.; Westwood, G. and Keyhani, N. 2004. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae Tick Species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J. Med. Entomol.* 41(4):705-711.
- Krueger, S. R. and Roberts, D. W. 1997. Soil treatment with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. *Biological Control.* (9):67-74.
- Lezama, G. R.; Alatorre, R. R.; Bojalil, J. L. F.; Molina, O. J.; Arenas, V. M.; González, R. M. and Rebolledo, D. O. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia.* (3):35-39.
- Meyling, N. and Eilenberg, T. 2007. Ecology of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control.* (43):145-155.
- The BB01 strain showed greater potential as a biological control agent of *L. zonatus*.
- There is a direct relationship between pathogenicity and virulence of *B. bassiana* (BB01) strains with applied dose on adults of *L. zonatus*.

End of the English version



- Morales, M.; Aguilar A.; Quiroga, M. and Rosales, E. 2011. Insects associated with the fruit of the pine nut (*Jatropha curcas* L.) in Villaflores and Villa Corzo, Municipalities, Chiapas, México. *Dugesiana* 18(1):85-89.
- Pereira, R. M.; Alves, S. B. and Stimac, J. L. 1993. Growth of *Beauveria bassiana* in fire ant nest soil with amendments. *J. Invertebrate Pathol.* (62):9-14.
- Siebeneicher, S. R.; Vinson, S. B. and Kenerley, C. M. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebrate Pathol.* (59):280-285.
- Sosa R. G.; Batista S. A. and Tigano, M. M. 1994. Characterization and phonetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. *Pes. Agrop. Bras.* 29(3):401-409.
- Xiao, Y. and Fadamiro, H. 2009. Host Preference and development of *Leptoglossus zonatus* (Hemiptera: Coreidae) on Satsuma mandarin. *J. Econ. Entomol.* 102(5):1908-1914.
- Vera, C. Y. B.; Cuevas, J. A.; Valenzuela, Z. A. G.; Urbano, B. and González, F. 2014. Biodiversity and indigenous management on the endangered non toxic germplasm of *Jatropha curcas* in the Totonacapan (Mexico) and the implications of its conservation. *Gen. Res. Crop Ev.* 61(7):1263-1278.