

Manejo de *Aethina tumida* (Murray) con *Beauveria bassiana* (Bals) y *Metarhizium anisopliae* (L.). Ensayo *in vivo*



<https://cu-id.com/2248/v46e07>

Management of *Aethina tumida* (Murray) with *Beauveria bassiana* (Bals) and *Metarhizium anisopliae* (L.) *In vivo* assay

✉ Yander Fernández Cancio^{1*}, ✉ Jorge Luis Sanabria Cruz², ✉ Jorge Demedio Lorenzo²,
✉ Marcos T. García González¹, ✉ Juan Emilio Hernández García¹, ✉ Marcia M. Jáuregui Rodríguez¹,
✉ Yuleiky Mira Falcón¹, ✉ Magda Elena Beltrán Cuenca³, ✉ Edna Martínez Aguilera³

¹Universidad de Sancti Spiritus José Martí Pérez, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo Investigación Bioproductos, CP: 60100, Sancti Spiritus, Cuba.

²Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, Facultad de Medicina Veterinaria, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, México.

RESUMEN: El trabajo se realizó en el Laboratorio III de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad de Sancti Spiritus para determinar el efecto de cuatro dosis de las cepas LBb-111 y LBb-1234 de *Beauveria bassiana* Bals. y la Ma-34 de *Metarhizium anisopliae* L. en la mortalidad de larvas y adultos de *Aethina tumida* colectados en apiarios infectados. Para el desarrollo del experimento, se elaboró una mezcla con 375g de suelo + 100g de arena lavada + cuatro dosis de los entomopatógenos. Luego se colocaron 500g de la mezcla en boxes (6,2cm de alto x15,5cm de diámetro). En un primer ensayo, se colocaron 10 larvas/boxes/dosis y en otros, 10 adultos/boxes/dosis con siete réplicas por tratamiento, respectivamente. Cada 24 horas se determinó el porcentaje de mortalidad y se realizó un análisis factorial con interacción entre las dosis y las cepas empleadas. La cepa LBb-111 de *B. bassiana* y Ma-34 de *M. anisopliae* alcanzaron el mayor porcentaje de mortalidad de adultos con 40g y 60g, con valores superiores al 50 % en 96 horas. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas se alcanzó con la dosis de 60g con la cepa LBb-111 de *B. bassiana* en 96 horas.

Palabras clave: Abejas, entomopatógenos, escarabajo, hongos, mortalidad.

ABSTRACT: The work was carried out at Laboratory III, Agricultural Sciences Faculty, University of Sancti Spiritus. Its aim was to determine the effect of four doses of strains LBb-111 and LBb-1234 of *Beauveria bassiana* Bals. and Ma-34 of *Metarhizium anisopliae* L. on the mortality of *Aethina tumida* larvae and adults collected in infected beehives. A mixture of 375 g of soil + 100 g of washed sand + four doses of entomopathogens was used for the experiment. Then, 500 g of the mixture were placed in boxes (6.2 cm high x 15.5 cm diameter). Ten larvae/boxes/dose were placed in a first assay and 10 adults/boxes/dose in others, with seven replicates per treatment, respectively. Mortality percentages were determined every 24 hours and a factorial analysis was carried out with an interaction between the doses and the strains used. As a result, Strain LBb-111 of *B. bassiana* and Ma-34 of *M. anisopliae* reached the highest percentage of adult mortality with 40g and 60g, with values higher than 50 % in 96 hours. The highest percentage of larval mortality was reached with the 60g dose with strain LBb-111 of *B. bassiana* in 96 hours.

Key words: Bees, entomopathogens, beetle, fungi, mortality.

INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo se ha reportado gran diversidad de especies que invaden las colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), generando alteraciones importantes y nuevas epizootiologías que afectan la estabilidad y dinámica ecosistémica de su hábitat. Estos organismos provocan pérdidas económicas importantes en el material biológico y en las cosechas de miel y polen al reducir el rendimiento productivo. Los patógenos y parásitos introducidos a menudo tienen la capacidad de cambiar de huésped, lo que plantea nuevas amenazas a las especies nativas que carecen de cualquier habilidad innata para el desafío del parásito y se apoyan en métodos de defensa

generalizados, que pueden o no ser suficientes para proporcionar una protección adecuada contra el patógeno (1).

El pequeño escarabajo de la colmena PEC (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera, Nitidulidae), es un ejemplo clásico de insectos que afectan la estabilidad de las colmenas, distribuido mediante el comercio mundial de productos de colmenas. Es originario de África subsahariana y reportado en los Estados Unidos de América en 1996, desde entonces, se ha propagado a Canadá, varios países de Sudamérica y Centroamérica, convirtiéndose en una plaga epizootológica conocida como Etinosis o Aethinosis. Las larvas de este insecto se alimentan de los productos de la colmena generando grandes pérdidas económicas (1)

*Correspondencia a: Yander Fernández Cancio. E-mail: yanderfcuniss@gmail.com

Recibido: 11/04/2024

Aceptado: 11/06/2024

Se desconocen aún las razones por las cuales se reportan daños superiores en los lugares donde el PEC es introducido. Las causas pudieran estar relacionadas con las variaciones de las condiciones ecológicas, el comportamiento de las subespecies de la abeja melífera africana y la europea, las técnicas de apicultura utilizadas y la presencia de enemigos naturales. Mientras que el daño producido a las colonias de abejas por escarabajos adultos es relativamente escaso, estos mismos pueden causar la dispersión de las colonias, es decir, que las abejas adultas abandonen el nido. La conducta alimentaria de las larvas, que a menudo va asociada a la fermentación de la miel almacenada, causa un grave daño a los panales y el colapso total de la estructura del nido (2).

Las pérdidas económicas, también se pueden asociar a la infestación en la sala de extracción de miel. La reproducción oculta y de bajo nivel también puede realizarse en los panales viejos o desechados, luego de la producción o debajo de los cuadros de la colmena, sin que se observen signos del daño causado a la colonia (2).

El control de esta plaga con productos químicos tiene múltiples inconvenientes, como la susceptibilidad de las abejas a tales productos, la contaminación de la miel, la cera. Otro método de control son las trampas comerciales que se colocan sobre el fondo de la colmena, dentro de un marco o en la parte superior (barra superior). Es habitual añadir vinagre de sidra de manzana a las trampas como atrayentes y el aceite mineral o vegetal para matar los escarabajos. Las trampas pueden emplearse para realizar un seguimiento periódico de la presencia de escarabajos adultos, además de constituir un método de control (3).

Algunos autores reportan también la efectividad de los nemátodos entomopatógenos en el control de *A. tumida* (4), lo cual constituye un antecedente importante en el desarrollo de alternativas de manejo de la especie sobre bases ecológicas, ya que, por ejemplo, se ha encontrado que los nemátodos y hongos entomopatógenos son agentes de control biológico efectivos cuando se aplican en el suelo contra plagas.

En Cuba no existe evidencia en el control del insecto con medios biológicos, aunque en estudios realizados por Han et al. (5) se emplean cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control de la varroa. Estos autores, obtuvieron cepas de hongos entomopatógenos tolerantes a las temperaturas del nido de cría de las abejas (*Apis mellifera*) para ser utilizados en el control de *Varroa destructor*, sin insidencia sobre *A. mellifera*. Otros autores, han empleado la *B. bassiana* en el control de varroa sin afectar las colonias de abejas (6, 7 y 8).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la susceptibilidad de larvas y adultos de *A. tumida* frente a *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el laboratorio III de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad de Sancti Spiritus, de febrero a marzo del 2019, con el objetivo de determinar la susceptibilidad de *A. tumida* a cuatro dosis de *M. anisopliae* cepa Ma34 a una concentración de $1,89 \times 10^8$ esporas/ml y *B. bassiana* cepa 111 a una concentración de $2,36 \times 10^8$ esporas/ml, cepa 1234 a una concentración de $3,51 \times 10^8$ esporas/ml. Las cepas se obtuvieron del laboratorio provincial de Sanidad Vegetal para los Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), mantenidas sobre cabecillas de arroz.

Las larvas y adultos de *A. tumida* se colectaron en apiarios infectados; el suelo utilizado fue Pardo sialítico sin carbonato (9) y se obtuvo del mismo lugar de procedencia que las larvas.

El sustrato se elaboró con 375 g de suelo y 100g de arena lavada con los cuatros dosis de los entomopatógenos. El suelo se pesó antes y después de secar durante 8 horas a 105°C y por diferencia, se determinó el contenido de agua presente inicialmente (25 %), mediante la fórmula: $P_{sh} - P_{ss} = a$, donde (P_{sh})-peso del suelo húmedo, (P_{ss})-peso del suelo seco y (a)-agua.

Para evitar la contaminación con otros organismos, los materiales de laboratorio fueron esterilizados en la autoclave a una temperatura de 120°C y una presión de 1 atmósfera durante 20 minutos, y el método del flameo para pesar, mezclar y sellar los recipientes.

Para la determinación de la susceptibilidad, se utilizó boxes (6,2 cm de alto x 15,5 cm de diámetro) con 500g del sustrato y se agregó a la mezcla cuatro concentraciones de los hongos 10g, 20g, 40g y 60g/100g del sustrato. Todos los componentes de este material se pesaron en una balanza digital modelo SARTORIUS y se colocaron en cada recipiente 10 larvas de *A. tumida* en estado larval L4 y L5, previamente desinfestadas con hipoclorito de sodio al 2 % mediante la inmersión de los insectos en la solución por cinco segundos con dos lavados en agua destilada.

Porcentajes de mortalidad de las larvas. Se realizaron evaluaciones cada 24 horas, se colectaron los insectos muertos y se situaron en cámaras húmedas para confirmar la muerte por el patógeno.

Porcentajes de mortalidad de adultos. Se observaron cada 24 horas y se colectó el 100 % de los adultos con color negro oscuro, con locomoción lenta o inmóvil y se colocaron en cámaras húmedas para confirmar la muerte por el patógeno.

En el análisis estadístico se comprobó el supuesto de normalidad por Kolmogorov Smirnov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene. Estos análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows, y para el porcentaje

de mortalidad de las larvas y adultos se realizó un análisis de varianza factorial, donde se estableció una comparación entre las medias de la interacción entre las dosis y las cepas empleadas mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey con nivel de significación 0,05. Los valores porcentuales obtenidos se transformaron para $(2 \arcsen \sqrt{P/100})$ que se ajusten a la curva normal de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las cepas y dosis sobre la mortalidad de adultos de *A. tumida*

A las 72 horas no hubo diferencias significativas entre las medias de las cepas Ma-34 y LBb-111 (30,93 % y 28,75 % respectivamente), pero estos valores fueron significativamente superiores al tratamiento con LBb-1234 que alcanzó un 21,18 % de mortalidad. Las dosis empleadas difirieron estadísticamente entre ellas, y la mezcla con 60g alcanzó el mejor valor con 36 % de mortalidad del insecto, superior a la variante con 10g del entomopatógeno que resultó la más baja (20,37%). Entre las dosis de 40g y 60g de las cepas Ma-34 y LBb-111 alcanzaron porcentajes de mortalidad superiores al resto (Figura 1).

Este efecto en la acción del hongo a las 72 horas, se le atribuye a las condiciones óptimas y controladas garantizadas en el experimento, puesto que se necesitaba la mayor expresión de infección del patógeno en condiciones controladas. Según otros autores, la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos depende de los factores bióticos y abióticos (10). Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo, se encuentran los rayos ultravioletas, la temperatura, la humedad relativa y la del medio.

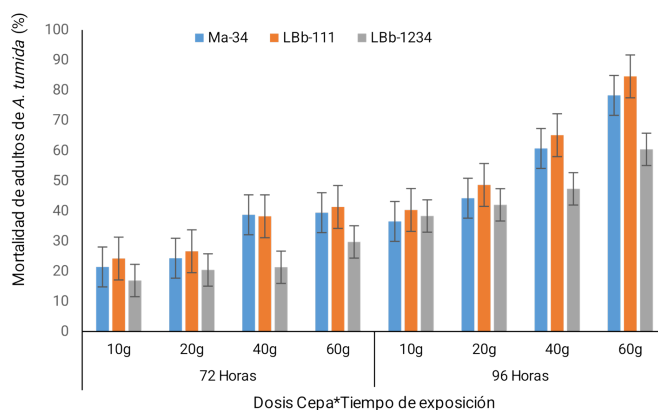
Existen diferencias estadísticas, después de las 96 horas, entre todas las medias del porcentaje de mortalidad para las diferentes dosis estudiadas,

siendo la mejor, 60g y estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Figura 1). Esto corrobora lo planteado por autores que verificaron el efecto de *B. bassiana* frente a tres coleópteros (11), que depende de las características del microorganismo, su relación con los componentes de la formulación y el ambiente de almacenamiento incluyendo la humedad y temperatura; aunque la estabilidad, viabilidad y persistencia en campo de los entomopatógenos es, en gran medida, determinada por el medio donde interactúa con el hospedero (12).

En el caso de *M. anisopliae*, la cepa Ma-34 fue la de mejor porcentaje de mortalidad con diferencia significativa del resto de los tratamientos, así como la concentración de 60g difiere del resto con una mortalidad de 72,90% en 72 horas. Resultados obtenidos en un estudio sobre el empleo de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el control de coleópteros, demostraron que todos los estadios son susceptibles a la acción de los hongos entomopatógenos, con una mortalidad superior al 80 %, luego de las 96 horas de exposición del insecto (13).

El periodo requerido para matar al insecto es variable, dependiendo de la cantidad de esporas que se depositen sobre el mismo, temperatura, especie, tamaño y edad del insecto pero, en la mayoría de los casos, la muerte, en el caso de coleópteros, ocurre posterior a las 72 horas (14).

Se destaca como resultado el control de ambas cepas Ma-34 y LBb-111, superior estadísticamente a la LBb-1234, donde los demás factores que intervienen en la infección del patógeno, como la humedad del sustrato, posibles microorganismos presentes y la temperatura fueron iguales en todos los tratamientos. El efecto sobre la transferencia de las esporas radica en los factores que determinan la interacción hongo-artrópodo, ya que las condiciones del medio influyen en una infección exitosa, con la especificidad en la adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del insecto y la evasión de las defensas del hospedador (15).



(72 horas: CV-8,82% y ES-0,014) (96 horas: CV-19,72% y ES-0,022)

Figura 1. Mortalidad de adultos de *A. tumida* a las 72 y 96 horas sometidos a la acción de los hongos. / Mortality of *A. tumida* adults at 72 and 96 hours submitted to fungi action.

Efecto de las cepas y dosis sobre la mortalidad de larvas de *A. tumida*

En las primeras 72 horas, hubo diferencias en la interacción de las variables evaluadas, donde la cepa LbB-111 con 60g fue la de mayor porcentaje de mortalidad y la de menor infección fue la variante de 10g del hongo en el sustrato con la LbB-1234 de *B. bassiana* (Figura 2). Los valores alcanzados coinciden con los reportes de virulencia de este entomopatógeno, ya que la relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes del orden coleóptero varía entre 48 y 72 horas en su medio natural (se inician cambios motores), además de la alta variabilidad de su acción que ha conllevado a su empleo como control biológico en el manejo integrado de plagas (16).

Los resultados de la mortalidad de larvas a las 72 horas de exponerlas al sustrato, demostraron que diferencias significativas entre las medias de las cepas, donde las cepas Ma-34 y LbB -111 con 30,92 % y 36,59 % de larvas muertas fueron superiores a la cepa LbB-1234 con un 21,94 %. Las dosis de 60g y 40g alcanzaron los valores porcentuales más altos de mortalidad con diferencias estadísticas del resto, siendo el peor tratamiento la variante de 10 g del entomopatógeno con solo 21,90 % de mortalidad de larvas de *A. tumida*.

Además, la susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrientes presentes en los insectos, y es por eso que los hongos entomopatógenos controlan mejor la fase larval y no a los adultos (11).

Estos valores superiores a la acción sobre los adultos en igual periodo de tiempo, se deben a los factores: encuentro hongo-insecto, la flacidez de la larva, así como el contenido graso, que permite mayor acción del patógeno con una expresión inmediata de movimientos lentos y descoordinación en los movimientos (16).

A las 96 horas de exposición de las larvas de *A. tumida* a la acción de los entomopatógenos, se sobrepasó el 50 % de mortalidad con las dosis de 60g para todas las cepas, y con Ma-34 y LbB-111 en la dosis de 40g. Se muestra, además, que los tratamientos con Ma-34 de *M. anisopliae* y la LbB-111 difieren entre ellos con valores superiores a la variante con LbB-1234. El resultado del efecto independiente de las dosis sobre las larvas del insecto, se comportó de igual manera que la observación de las 72 horas, donde la dosis con 60g del hongo con 55,35 % fue superior al resto con diferencias entre ellos, y el de menor porcentaje se obtuvo con 10g, con un 33,36 % (Figura 2).

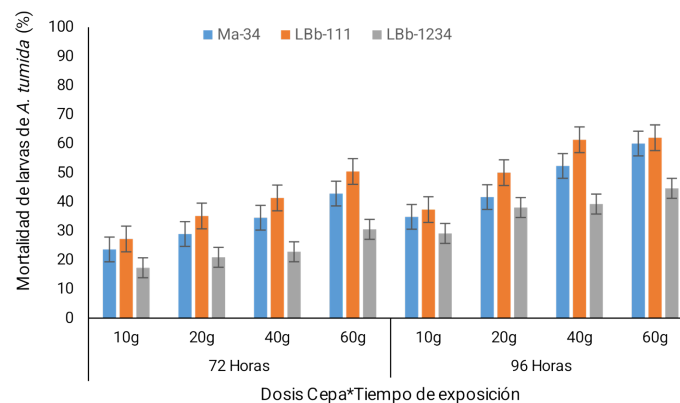
Al igual que la evaluación de las 72, se observó que a las 96 horas de iniciado el ensayo en la interacción entre las dosis y las cepas, el mejor resultado lo alcanzó la mezcla de 60g con la LbB-111, con diferencias respecto a los demás, siendo superior alcanzando valores de 66,2 % de mortalidad.

CONCLUSIONES

1. En la mortalidad de los adultos la cepa LbB-111 de *B. bassiana* y A-34 de *M. anisopliae* alcanzaron el mayor porcentaje de mortalidad de adultos con 40g y 60g, con valores superiores al 50 % en 96 horas.
2. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas se alcanzó con la dosis de 60g, con la cepa LbB-111 de *B. bassiana*.

REFERENCIAS

1. De Landa GF, Porrini MP, Revainera P, Porrini DP, Farina J, Correa-Benítez A, et al. Pathogens detection in the small hive beetle (*Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae)). Neotropical Entomology. 2021; 50:312-6.
2. Ouessou Idrissou F, Straub L, Neumann P. Keeping a low profile: Small hive beetle reproduc-



(72 horas: CV-7,24% y ES-0,013) (96 horas: CV-14,08% y ES-0,032)

Figura 2. Mortalidad de larvas de *A. tumida* a las 72 y 96 horas sometidos a la acción de los hongos. /

Mortality of A. tumida larvae at 72 and 96 hours submitted to fungi action.

- tion in African honeybee colonies. *Agricultural and forest entomology*. 2019;21(1):136-8.
- De Hernández JA, Fernanda Vargas M, Perdomo R. TEMA: EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE SUSTRATOS NATURALES, COMO ATRAYENTES PARA EL PEQUEÑO ESCARABAJO DE LAS COLMENAS (*Aethina tumida* Murray) COMO PLAGA DE LA ABEJA (*Apis mellifera*). Masferrer Investiga: Revista Científica de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. 2019;9(1).
 - Cabanillas H, Elzen P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) against the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research*. 2006;45(1):49-50.
 - Han JO, Naeger NL, Hopkins BK, Sumerlin D, Stamets PE, Carris LM, et al. Directed evolution of *Metarhizium* fungus improves its biocontrol efficacy against Varroa mites in honey bee colonies. *Scientific reports*. 2021;11(1):10582.
 - Sinia A, Guzman-Novoa E. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* GH4 and *Metarhizium anisopliae* UAMH 9198 alone or in combination with thymol for the control of Varroa destructor in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2018;57(2):308-16.
 - Steenberg T, Kryger P, Holst N. A scientific note on the fungus *Beauveria bassiana* infecting *Varroa destructor* in worker brood cells in honey bee hives. *Apidologie*. 2010;41(1):127-8.
 - Sewify GH, Ibrahim YY, El-Deen MS. *Beauveria bassiana* (Balsamo), a Potential Mycopesticide for Efficient Control of the Honey Bee Ectoparasitic Mite, *Varroa destructor* Anderson and Trueman. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2015;25(2).
 - Hernández-Jiménez A, Pérez-Jiménez JM, Bosch-Infante D, Speck NC. La clasificación de suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015. *Cultivos Tropicales*. 2019;40(1).
 - Yasin M, Wakil W, Ghazanfar MU, Qayyum MA, Tahir M, Bedford GO. Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Entomological Research*. 2019;49(1):3-12.
 - Sarker S, Choi HW, Lim UT. Evaluation of new strain (AAD16) of *Beauveria bassiana* recovered from Japanese rhinoceros beetle: Effects on three coleopteran insects. *Plos one*. 2024;19(1):e0296094.
 - Wakil W, Kavallieratos NG, Ghazanfar MU, Usman M. Laboratory and field studies on the combined application of *Beauveria bassiana* and fipronil against four major stored-product coleopteran insect pests. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(23):34912-29.
 - Ozdemir IO, Tuncer C, Erper I, Kushiye R. Efficacy of the entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F.(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2020;30(1):1-5.
 - Sayed S, Elarrnaouty S-A, AlOtaibi S, Salah M. Pathogenicity and side effect of indigenous *Beauveria bassiana* on *Coccinella undecimpunctata* and *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Insects*. 2021;12(1):42.
 - Vásquez C, Velandia P, Jiménez M, Pazmiño P, Velastegui G, Pérez-Salinas C. Efectividad in vitro del extracto etanólico de crisantemo y de hongos acaropatógenos en el control del ácaro rojo de las palmeras. *Bioagro*. 2018;30(2):135-44.
 - Muerrle T, Neumann P, Dames J, Hepburn H, Hill M. Susceptibility of adult *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) to entomopathogenic fungi. *Journal of economic entomology*. 2006;99(1):1-6.

Declaración de conflictos de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Yander Fernández Cancio: **conceptualización, análisis formal, investigación, redacción borrador original, revisión del manuscrito.** Jorge Luis Sanabria: **investigación, redacción y revisión del manuscrito.** Jorge Demedio Lorenzo: **investigación, redacción y revisión del manuscrito.** Marcos T. García González: **investigación, redacción borrador original, revisión del manuscrito.** Juan Emilio Hernández García: **investigación, redacción y revisión del manuscrito.** Marcia M. Jáuregui Rodríguez: **redacción borrador original, investigación, análisis de los resultados.** Yuleiky Mira Falcón: **redacción borrador original, investigación, análisis de los resultados.** Magda Elena Beltrán: **redacción borrador original, investigación, análisis de los resultados.** Edna Martínez Aguilera: **redacción borrador original, investigación, análisis de los resultados.** Todos los autores participaron en la discusión de los resultados, leyeron, revisaron y aprobaron el texto final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)