

# Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae)

Conchita Toriello<sup>1</sup>, Elena Montoya-Sansón<sup>1</sup>, Monserrat Zavala-Ramírez<sup>1,2</sup>, Hortensia Navarro-Barranco<sup>1</sup>, David Basilio-Hernández<sup>1</sup>, Víctor Hernández-Velázquez<sup>3</sup>, Teresa Mier<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México D.F. 04510 México. <sup>2</sup>Depto. El Hombre y su Ambiente, UAM-Xochimilco, México D.F. 04960 México. <sup>3</sup>Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (SAGARPA, Tecomán, Colima, Mexico y Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México

## Virulence and thermotolerance of monospore cultures of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolated from spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae)

**Abstract.** The virulence and thermotolerance of 18 monospore cultures of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* derived from isolates of the spittlebug (*Aeneolamia* sp.) in sugarcane were tested. Virulence was determined by the median lethal time (LT<sub>50</sub>) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and thermotolerance by fungal growth at 25, 30, 35 and 40 °C. Thermotolerance of monospore isolates was studied by the diameter of the fungal colonies at day 14. Virulence results revealed EH-481/1, EH-469/6, EH-476/3, EH-474/6, EH-475/2 y EH-473/4, with a LT<sub>50</sub> of 5.19, 5.76, 5.97, 6.04, 6.15 and 6.53 days, respectively. The highest growth of isolates and of reference strain FI-1029, corresponding to *M. anisopliae* var. *anisopliae*, same as the isolates from Mexico, occurred at 25 and 30 °C. Growth at 35 °C was very low, and no growth occurred at 40 °C. Results show the relevance of virulence and thermotolerance studies for strain selection to be used as biological control microbial agents.

**Key words:** biological control, entomopathogenic fungi, agricultural pests.

**Resumen.** Se evaluó la virulencia y termotolerancia de 18 cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* derivados de aislados originales de la mosca pinta (*Aeneolamia* sp.), plaga de la caña de azúcar. La virulencia de las diferentes cepas se determinó en pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) considerando el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) y la termotolerancia durante el crecimiento de los cultivos monospóricos a 25, 30, 35 y 40 °C, considerando el crecimiento radial durante 14 días. De acuerdo con los resultados del TL<sub>50</sub> y la mortalidad acumulada, los aislados con mayor virulencia fueron EH-481/1, EH-469/6, EH-476/3, EH-474/6, EH-475/2 y EH-473/4, con TL<sub>50</sub> de 5.19, 5.76, 5.97, 6.04, 6.15 y 6.53 días, respectivamente. Los resultados de termotolerancia indicaron que el mayor crecimiento de los cultivos monospóricos y de la cepa de referencia FI-1029 correspondiente a *M. anisopliae* var. *anisopliae* fue igual a los aislados de México evaluados a 25 y 30 °C. El crecimiento de los aislados a 35°C fue menor, y a 40°C no hubo crecimiento. Se discute la relevancia de la virulencia y termotolerancia para la selección de cepas de hongos como agentes microbianos para el control biológico.

**Palabras clave:** control biológico, hongos entomopatógenos, plagas agrícolas.

Received 10 August 2008; accepted 1 December 2008.

Recibido 10 de agosto 2008; aceptado 1 de diciembre 2008.

Autor para correspondencia: Conchita Toriello  
toriello@servidor.unam.mx

## Introducción

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin es un biorregulador natural de la mosca pinta o salivazo de los pastos (*Aeneolamia* sp., *Prosapia* sp.) (Hemiptera: Cercopidae) el cual ha sido usado exitosamente para el control de esta plaga en Brasil (Sobral da Silveira, 1990), Trinidad (Allard *et al.*, 1990), Australia (Samuels y Pinnock, 1990) y Guatemala (Toriello *et al.*, 1999). A nivel mundial existen productos registrados a base de conidios de *M. anisopliae* (Jenkins y Gryzwacz, 2000) que representan una alternativa ecológica al uso de insecticidas químicos. En México, *M. anisopliae* se ha aplicado en programas de manejo integrado de la mosca pinta, insecto que afecta en promedio 150,000 ha de caña de azúcar (Flores, 1994; García de León y Mier, 2003; Leal-Guerra *et al.*, 1998).

Con el fin de garantizar la calidad de un bioinsecticida biológico se requiere llevar a cabo estudios para seleccionar y caracterizar los aislados con mayor potencial. La efectividad de *M. anisopliae* var. *anisopliae* para el control del salivazo de los pastos, requiere de estudios interdisciplinarios que garanticen su eficacia bajo condiciones de campo, entre ellos, el desarrollo de técnicas para el monitoreo e identificación de aislados termotolerantes y con mayor grado de virulencia. La temperatura es un factor ambiental relevante que afecta la eficacia de los hongos entomopatógenos (Ayala-Zermeño *et al.*, 2005; De Cross y Bidochka, 1999; Ouedraogo *et al.*, 1997) así como la virulencia en insectos (Hajek y St. Leger, 1994; Liu *et al.*, 2000; Torres de la Cruz *et al.*, 2006). También la viabilidad de las esporas de los hongos es afectada cuando las formulaciones se exponen a altas temperaturas (Luz y Fargues, 1997), el crecimiento vegetativo (Ouedraogo *et al.*, 1997), la tasa de penetración del tubo germinativo en el insecto (Xu *et al.*, 2002) y la colonización y reproducción en los hospederos (Alves *et al.*, 2002; Glare y Milner, 1991).

Asimismo, la temperatura y la humedad relativa del ambiente durante el periodo de almacenamiento y aplicación en el campo, pueden influir en la estabilidad de las formulaciones (Lecuona y Alves, 1995). Es fundamental considerar dichos factores durante la selección de aislados para el control biológico.

La termotolerancia está estrechamente relacionada con la presencia de proteínas hidrofóbicas de la pared celular de los conidios, que protegen al hongo del estrés térmico y contribuyen a su adhesión a la cutícula del insecto, lo cual está directamente relacionado con la virulencia de los hongos (Ying y Feng, 2004).

En el presente trabajo se estudió la variabilidad de 18 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* considerando su termotolerancia y su virulencia en pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), utilizado como modelo experimental, con el objetivo de seleccionar cepas con alto potencial para el control biológico de la plaga de la mosca pinta.

## Materiales y métodos

### Hongo y condiciones de crecimiento

Los aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* fueron obtenidos de adultos de la mosca pinta de los pastos (*Aeneolamia* sp.) infectados que fueron colectados en cultivo de caña de azúcar y otros provienen del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), SAGARPA-DGSV, Tecomán, Colima, México. Los cultivos monospóricos fueron obtenidos en el Laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, UNAM, y se conservan en agua destilada, aceite mineral y nitrógeno líquido a -196 °C. Para los diferentes ensayos se sembraron en medio APD (infusión de papa blanca 30 %, dextrosa 2 %, agar 1.5 %) y agar de Sabouraud-dextrosa adicionado de extracto de levadura (SDYA: peptona de soya 1 %, glucosa 4 %, extracto de levadura 1 % y agar 1 %).

Tabla 1. Aislados de México de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (*M. a.* var. *a.*) y cepas de referencia del género *Metarhizium* estudiados

Clave	Clave	Insecto Hospedero	Nombre actual	Origen
CNRCB <sup>1</sup>	UNAM <sup>2*</sup>			
MaZC1A	EH-465/8	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaZC2N	EH-466/2	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaZC3A	EH-467/6	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaGB2A	EH-468/1	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaGB3A	EH-469/6	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaGB4	EH-470/6	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
NL18	EH-471/3	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
NP1	EH-472/6	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
MaNL1	EH-473/4	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
MaNL2	EH-474/6	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
MaNM1	EH-475/2	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
MaNM2	EH-476/3	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	SLP
MaOPS1	EH-477/5	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Oaxaca
MaOPS2	EH-478/1	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Oaxaca
MaMV	EH-479/2	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaZP	EH-480/8	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaBA	EH-481/1	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Veracruz
MaPA1	EH-482/8	<i>Aeneolamia</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>a.</i>	Oaxaca
Cepas de referencia				
1941 <sup>3</sup>	EH-525	<i>Nephotettix virescens</i>	<i>M. album</i>	Filipinas
1914 <sup>3</sup>	EH-526	<i>Oryctes rhinoceros</i>	<i>M. a.</i> var. <i>majus</i>	Filipinas
1184 <sup>3</sup>	EH-527	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	<i>M. f.</i> <sup>5</sup> var. <i>flavoviride</i>	Francia
2037 <sup>3</sup>	EH-528	<i>Niliparvata lugens</i>	<i>M. f.</i> var. <i>minus</i>	Filipinas
2948 <sup>3</sup>	EH-529	Homoptera	<i>M. flavoviride</i> tipo E	Brasil
FI-985 <sup>4</sup>	EH-530	<i>Austracris guttulosa</i>	<i>M. a.</i> var. <i>acridum</i>	Australia
FI-147 <sup>4</sup>	EH-532	<i>Lepidiodia consobrina</i>	<i>M. a.</i> var. <i>lepidiotum</i>	Australia
FI-1029 <sup>4</sup>	EH-533	<i>Schistocerca gregaria</i>	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	Eritrea
FI-698 <sup>4</sup>	EH-534	<i>Porina</i> sp.	<i>M. a.</i> var. <i>novazealandicum</i>	N. Zelanda
FI-987 <sup>4</sup>	EH-535	<i>Ornithacris cavroisi</i>	<i>M. a.</i> var. <i>acridum</i>	Nigeria
FI-72 <sup>4</sup>	EH-573	<i>Pemphigus trehemi</i>	<i>M. a.</i> var. <i>pemphigum</i>	Inglaterra

<sup>1</sup>Aislados originales del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Tecomán, Colima, México.

<sup>2</sup>Cultivos monospóricos de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

\*En cada aislado se indica el número de monospórico utilizado por una diagonal y el dígito correspondiente.

<sup>3</sup>ARSEF, USDA= Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, United States Department of Agriculture.

<sup>4</sup>CSIRO = Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia

<sup>5</sup>*M. f.* = *Metarhizium flavoviride*.

Se utilizaron 11 cepas de referencia del hongo (Tabla 1) de las colecciones de entomopatógenos del Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, United States Department of Agriculture (ARSEF-USDA) y del Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia

(CSIRO), representantes de los 10 clados (grupos) taxonómicos descritos por Driver *et al.* (2000), para comparar la termotolerancia con los aislados de México. Antes de realizar los bioensayos, la virulencia de las cepas fue reactivada en larvas de *Tenebrio molitor* Linneo (Coleoptera: Tenebrionidae).

Para el bioensayo de virulencia se utilizaron 16 cultivos monospóricos, y para los ensayos de termotolerancia se utilizaron 18 monospóricos y 11 cepas de referencia (Tabla 1).

### Insectos

Como indicador biológico de la virulencia del hongo se usaron pupas de *T. molitor* (Alves, 1999). Los insectos fueron mantenidos en recipientes de plástico a temperatura ambiente y fueron alimentados con alimento para pollo estéril y agua. Después de establecida la cría, los insectos fueron separados de acuerdo a los estadios de larva, pupa y adulto. Durante el transcurso del experimento las condiciones de las pupas de *T. molitor* se mantuvieron idénticas a las mencionadas para la cría. La pupa del coleóptero *T. molitor* fue utilizada como insecto de elección para este estudio por reunir requisitos de cría y manejo sencillos, y además por presentar alteraciones definidas y fácilmente observables después de ser inoculado con *M. anisopliae* (Alves, 1999).

### Bioensayos de virulencia

Antes de la infección con el hongo, las pupas fueron lavadas y esterilizadas con agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 5 %, agua destilada estéril, etanol al 70 % y agua destilada, cada uno durante 1-2 minutos (Goettel e Inglis, 1997). Después las pupas fueron depositadas en cajas de Petri con papel filtro estéril y se secaron en el interior de una campana de flujo laminar. Los insectos fueron tratados con 2 µL de una suspensión fúngica de 10<sup>7</sup> conidios/mL de Tween® 80 al 0.1 % depositando la suspensión entre el tórax y abdomen. Los insectos tratados fueron colocados en cajas de Petri y éstas dentro de un contenedor con una humedad relativa mayor de

90 % (solución saturada de sulfato de potasio) durante 24 h a 28 °C. Después de este tiempo las pupas se transfirieron a cajas con agar-agua y se incubaron a 28 °C durante nueve días (216 h). Por cada aislado, se trataron 15 pupas con tres repeticiones por cada uno (45 pupas por aislado). Se utilizaron como testigos, 15 pupas inoculadas solamente con Tween 80 al 0.1 %, de igual forma se realizaron tres repeticiones.

Para registrar el número de insectos muertos se revisaron diariamente utilizando un microscopio estereoscopio (Olympus SZ40). El criterio para establecer la muerte de la pupa fue la observación de crecimiento fúngico en una zona diferente a donde se había depositado el inóculo. Se corroboró la identificación del hongo específico mediante siembras de muestras en APD.

La virulencia fue determinada mediante el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) aplicando análisis Probit (Finney, 1972) con el paquete estadístico POLO PC (1987), con base en el porcentaje de mortalidad acumulada. Se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA, α=5 %) univariado previa transformación de los datos a arcoseno (%)/100. En caso de observar diferencias significativas, se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (Montgomery, 1991).

### Termotolerancia

La determinación de la termotolerancia se llevó a cabo según el método de Driver *et al.* (2000) modificado. Se obtuvo una suspensión conidial de 10<sup>8</sup> conidios/mL a partir de cultivos en APD de 10 días de crecimiento a 28 °C. En el centro de cajas de Petri (100 x 15 mm) con medio de SDYA se colocó un círculo de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro y se impregnó con 2 µL de la suspensión conidial (2 x 10<sup>5</sup> conidios). Se utilizaron cinco cajas por aislado y por cepa de referencia y se incubaron a cuatro diferentes temperaturas: 25, 30, 35 y 40 °C. El crecimiento fue medido diariamente considerando dos diámetros perpendiculares de las colonias,

determinando el crecimiento radial por el promedio de los diámetros menos el diámetro del papel filtro. El análisis de los promedios del crecimiento radial se hizo a los 14 días de incubación.

Para determinar las variaciones en el crecimiento de los hongos a las temperaturas evaluadas se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) con los datos obtenidos a un nivel de significancia de α = 0.05. Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS, versión 12, 2003.

## Resultados y discusión

*Tenebrio molitor* (o escarabajo de la harina) ha sido utilizado como hospedero del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* en diversos estudios de virulencia (Sosa Gómez, 1983; Vanninen *et al.*, 1989) ya que es considerada una especie modelo para este tipo de estudios debido a su facilidad de manejo, a condiciones y requerimientos sencillos y de ciclo biológico simple (Sevala *et al.*, 1994).

La virulencia de los aislados fúngicos fue determinada con base en su TL<sub>50</sub>. Para considerar los aislados de mayor virulencia, se tomaron en cuenta también los límites

Tabla 2. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) y mortalidad acumulada de pupas de *Tenebrio molitor* después de la infección por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Aislado original CNRCB <sup>1</sup>	Cultivo monospórico UNAM <sup>2</sup> *	TL <sub>50</sub> (días)	Límites de confianza**		Mortalidad acumulada (% ± DS)***
			LI	LS	
MaZC1A	EH-465/8	7.18	6.92	7.46	80 ± 0.00 <sup>bc</sup>
MaZC2N	EH-466/2	6.53	5.67	7.41	80 ± 0.00 <sup>bc</sup>
MaZC3A	EH-467/6	7.69	7.30	8.16	78 ± 3.85 <sup>bc</sup>
MaGB2A	EH-468/1	5.97	5.70	6.22	93 ± 0.00 <sup>abc</sup>
MaGB3A	EH-469/6	5.76	4.98	6.45	91 ± 7.70 <sup>abc</sup>
MaGB4	EH-470/6	7.40	7.16	7.66	91 ± 3.85 <sup>abc</sup>
NP1	EH-472/6	6.80	6.43	7.21	73 ± 6.67 <sup>bc</sup>
MaNL1	EH-473/4	6.53	5.35	6.72	100 ± 0.00 <sup>a</sup>
MaNL2	EH-474/6	6.04	5.44	6.67	84 ± 7.69 <sup>abc</sup>
MaNM1	EH-475/2	6.15	5.32	7.16	89 ± 13.87 <sup>abc</sup>
MaNM2	EH-476/3	5.97	5.46	6.46	96 ± 7.70 <sup>ab</sup>
MaOPS1	EH-477/5	7.60	7.21	8.10	69 ± 10.18 <sup>c</sup>
MaOPS2	EH-478/1	6.6	5.77	7.61	73 ± 0.00 <sup>c</sup>
MaMV	EH-479/2	6.75	6.47	7.04	87 ± 11.54 <sup>abc</sup>
MaZP	EH-480/8	7.08	6.55	7.76	78 ± 3.85 <sup>bc</sup>
MaBA	EH-481/1	5.19	4.73	5.61	93 ± 6.67 <sup>abc</sup>

<sup>1</sup>Aislados originales del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Tecmán, Colima, México.

<sup>2</sup>Cultivos monospóricos de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

\*En cada aislado se indica el número de monospórico utilizado por una diagonal y el dígito correspondiente.

\*\*Límites de confianza al 95%. LI = límite inferior; LS = límite superior.

\*\*\*En los valores de mortalidad seguidos por las mismas letras no hay diferencias significativas según la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%. Los valores representan los resultados de tres réplicas (F= 4.364; g.l.= 15, 32; p < 0.05).

de confianza del  $TL_{50}$  y el análisis de varianza y pruebas de medias del porcentaje de mortalidad acumulada (Tabla 2). De acuerdo a la separación de medias de los datos de la mortalidad acumulada, los aislados con mayor virulencia fueron EH-481/1, EH-469/6, EH-476/3, EH-474/6, EH-475/2, EH-473/4, EH-468/1, EH-470/6 y EH-479/2 (Tabla 2). Sin embargo, dentro de estos aislados, los más virulentos son EH-481/1, EH-469/6, EH-476/3, EH-474/6, EH-475/2 y EH-473/4, debido a que caen dentro del intervalo de confianza de cada valor calculado de  $TL_{50}$  entre los aislados. Durante el bioensayo, en el aislado EH-481/1 con un  $TL_{50}$  de 5.19 días, la mortalidad de las pupas comenzó a registrarse a partir del

tercer día, mientras que el aislado EH-467/6 con un  $TL_{50}$  de 7.69 días la mortalidad comenzó a registrarse hasta el quinto día. Por otro lado, el aislado EH-473/4, con un  $TL_{50}$  de 6.53 días, fue el único que ocasionó en las pupas tratadas un 100% de mortalidad acumulada, y los insectos muertos comenzaron a registrarse entre los tres y cuatro días (Tabla 2). Los insectos del grupo testigo tuvieron un desarrollo normal y todas las pupas alcanzaron la fase de adulto.

La medición de la virulencia en los microorganismos puede llevarse a cabo a través de diferentes pruebas como la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) o la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), entre otras. Sin embargo, la determinación del tiempo letal

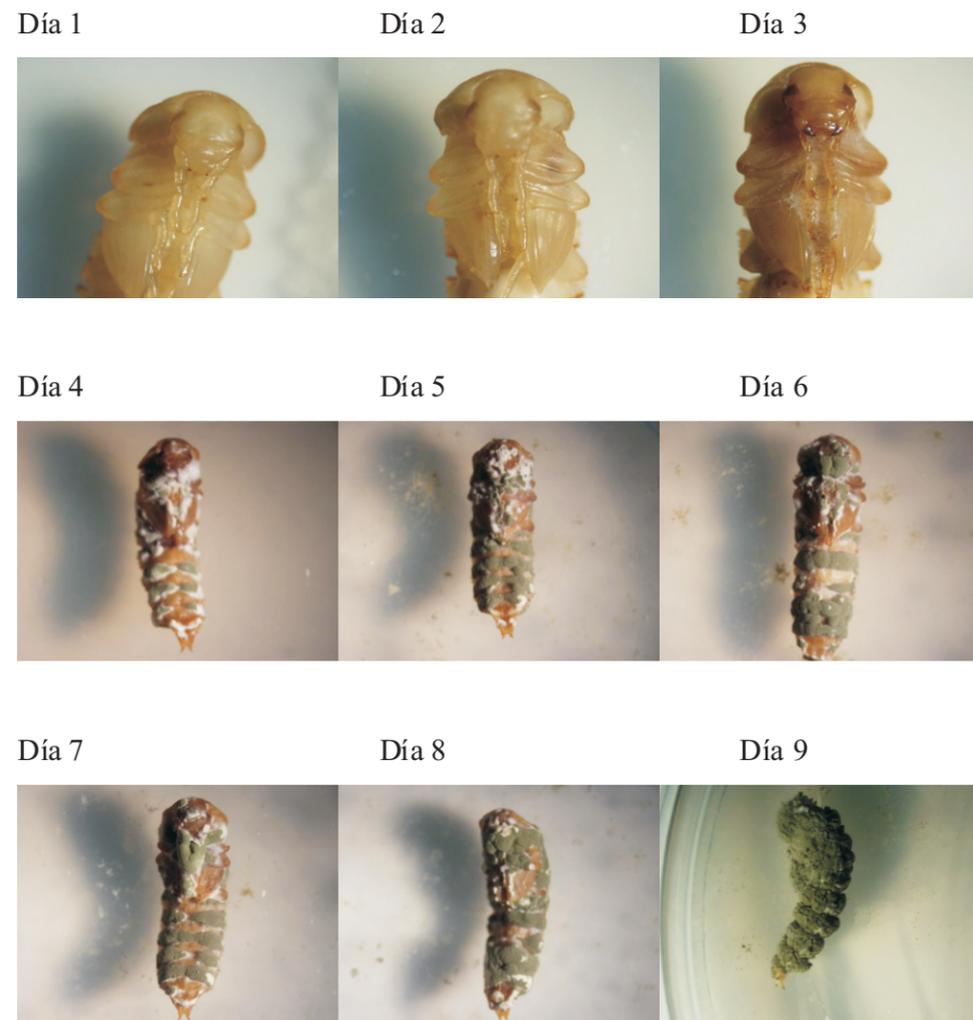


Figura 1. Pupas de *Tenebrio molitor* infectadas por el cultivo monospórico EH-481/1 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* durante un periodo de 9 días.

Tabla 3. Efecto de las temperaturas de 25, 30 y 35 °C sobre el crecimiento de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de México y cepas de referencia del género *Metarhizium*

Cultivos monospóricos	Diámetro final 25 °C (mm ± DS)	Diámetro final 30 °C (mm ± DS)	Diámetro final 35 °C (mm ± DS)
EH-465/8	75.00 ± 0.83 <sup>b</sup>	79.80 ± 0.44 <sup>a</sup>	33.10 ± 2.13 <sup>abc</sup>
EH-466/2	63.00 ± 0.70 <sup>f</sup>	64.00 ± 0.70 <sup>ef</sup>	17.20 ± 3.91 <sup>e</sup>
EH-467/6	72.40 ± 0.89 <sup>bc</sup>	71.60 ± 0.41 <sup>bc</sup>	17.70 ± 1.60 <sup>c</sup>
EH-468/1	78.20 ± 0.83 <sup>a</sup>	70.60 ± 0.51 <sup>c</sup>	37.20 ± 1.60 <sup>a</sup>
EH-469/6	65.00 ± 0.00 <sup>ef</sup>	72.00 ± 1b <sup>c</sup>	27.50 ± 0.79 <sup>cd</sup>
EH-470/6	66.40 ± 0.89 <sup>de</sup>	71.20 ± 1.64 <sup>bc</sup>	24.60 ± 1.85 <sup>d</sup>
EH-471/3	64.60 ± 0.54 <sup>ef</sup>	67.00 ± 0 <sup>d</sup>	29.20 ± 1.92 <sup>bcd</sup>
EH-472/6	45.80 ± 3.76 <sup>h</sup>	62.20 ± 1.25 <sup>g</sup>	25.90 ± 1.19 <sup>b</sup>
EH-473/4	57.60 ± 0.54 <sup>g</sup>	58.50 ± 0.86 <sup>g</sup>	28.10 ± 3.47 <sup>bcd</sup>
EH-474/6	65.00 ± 0 <sup>ef</sup>	67.80 ± 0.44 <sup>d</sup>	33.50 ± 2.80 <sup>ab</sup>
EH-475/2	71.40 ± 0.89 <sup>c</sup>	70.80 ± 3.36 <sup>c</sup>	32.70 ± 4.54 <sup>abc</sup>
EH-476/3	62.40 ± 1.51 <sup>f</sup>	64.00 ± 0.70 <sup>ef</sup>	25.10 ± 4.03 <sup>d</sup>
EH-477/5	78.00 ± 0 <sup>a</sup>	66.70 ± 01.20 <sup>de</sup>	7.50 ± 0.50 <sup>f</sup>
EH-478/1	73.80 ± 0.83 <sup>bc</sup>	72.20 ± 0.44 <sup>bc</sup>	17.30 ± 3.65 <sup>e</sup>
EH-479/2	67.80 ± 1.09 <sup>d</sup>	67.70 ± 0.97 <sup>d</sup>	33.80 ± 1.35 <sup>ab</sup>
EH-480/8	66.00 ± 1.73 <sup>de</sup>	71.00 ± 0.70 <sup>bc</sup>	18.70 ± 1.30 <sup>e</sup>
EH-481/1	74.0 ± 0b <sup>c</sup>	73.20 ± 0.83 <sup>bc</sup>	16.80 ± 0.83 <sup>e</sup>
EH-482/8	75.00 ± 0 <sup>b</sup>	73.70 ± 0.67 <sup>b</sup>	26.10 ± 0.167 <sup>d</sup>
Cepas de referencia			
1941	13.00 ± 0 <sup>g</sup>	10.40 ± 0.65 <sup>h</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
1914	46.70 ± 0.57 <sup>c</sup>	51.40 ± 0.89 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.19 <sup>b</sup>
1184	45.80 ± 0.57 <sup>c</sup>	27.20 ± 1.09 <sup>e</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
2037	28.00 ± 0 <sup>c</sup>	27.00 ± 1.06 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
2948	28.00 ± 3.39 <sup>e</sup>	15.70 ± 0.57 <sup>f</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
985	42.30 ± 0.44 <sup>d</sup>	41.80 ± 1.09 <sup>c</sup>	20.04 ± 1.341 <sup>a</sup>
FI-147	53.20 ± 0.83 <sup>b</sup>	38.20 ± 0.44 <sup>d</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
FI-1029	76.20 ± 1.30 <sup>a</sup>	60.20 ± 0.44 <sup>a</sup>	21.80 ± 6.58 <sup>a</sup>
FI-698	19.00 ± 0 <sup>f</sup>	6.00 ± 0.00 <sup>i</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
FI-987	47.00 ± 0 <sup>c</sup>	39.70 ± 0.44 <sup>d</sup>	7.20 ± 1.78 <sup>b</sup>
FI-72	45.00 ± 0.64 <sup>c</sup>	13.90 ± 0.22 <sup>g</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>

A 25°C: Cultivos monospóricos (F=226.602; g.l.=17, 72;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

Cepas de referencia (F=1126.871; g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

A 30°C: Cultivos monospóricos (F= 86.389; g.l. = 17, 72;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

Cepas de referencia (F= 2988.797; g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

A 35°C: Cultivos monospóricos (F=49.541; g.l.=17, 72;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

Cepas de referencia (F=74.087; g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ , en letras iguales no hay diferencia significativa).

medio ( $TL_{50}$ ), también es válida y especialmente importante en la determinación de la virulencia de los hongos entomopatógenos para valorar el desarrollo de la enfermedad en función del poder agresivo del patógeno (Butt y Goettel, 2000; Robertson *et al.*, 2007).

El progreso de la infección del cultivo monospórico

EH-481/1 en *T. molitor* fue gradual y la esporulación del hongo se expresó de manera marcada a los 9 días (216 h) del experimento (Figura 1). La presencia temprana de micelio en los últimos segmentos abdominales, área retirada de la zona de inoculación indicó que el hongo penetró por la cutícula, invadió el interior del insecto, y le causó la muerte, para luego

salir y esporular sobre la superficie de la pupa (Figura 1). Cuando se sembraron en APD las muestras de las diferentes cepas del hongo que salieron sobre la superficie cuticular de las pupas tratadas, se observaron los conidióforos y conidios basípetos catenulados que son específicos y característicos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. En el testigo no se registraron pupas muertas e infectadas.

La mortalidad de los insectos está relacionada a la concentración de conidios de *M. anisopliae* (Butt y Goettel, 2000). En estudios previos utilizando *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), se encontraron mortalidades entre 26.6 y 88.6% en diversos aislados (Brito *et al.*, 2008). En *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), se observó una mortalidad entre 11 y 34% al utilizar dosis entre 1.3 a 2.9 x 10<sup>7</sup> conidios/mL con cinco cepas de *M. anisopliae* (De la Rosa Reyes *et al.*, 1995). En nuestro trabajo, en infección de un coleóptero con *M. anisopliae* se alcanzó una mortalidad del 100% con un aislado, y para los demás, la mortalidad varió de 69 a 96 % pero nunca fue menor. La cantidad de conidios utilizada debe alcanzar cierta concentración para obtener una penetración efectiva del hongo en la cutícula del insecto y así ocasionar la muerte del hospedero (Zhioua *et al.*, 1997).

Los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* que mayor crecimiento mostraron a 25 °C fueron EH-468/1 y EH-477/5 y el de menor desarrollo fue EH-472/6. Con respecto a las cepas de referencia incubadas a 25 °C, la que mayor crecimiento alcanzó fue FI-1029 proveniente de la colección CSIRO de Australia y que corresponde a *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Tabla 1), especie igual a la estudiada en nuestro trabajo. La cepa 1941 de la colección ARSEF de Filipinas que corresponde a *M. album* (Tabla 1) mostró el menor crecimiento colonial a esta misma temperatura. Las diferencias observadas en el crecimiento a 25 °C fueron significativas tanto entre los aislados de México (F=226.602; g.l.=17, 72;  $p < 0.01$ ), todos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como entre las cepas de referencia (F=1126.871;

g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ ), de diferentes especies de *Metarhizium* (Tabla 3).

El aislado de México que alcanzó el mayor desarrollo a 30°C fue EH-465/8, y los aislados que mostraron el menor desarrollo fueron EH-472/6 y EH-473/4 (Tabla 3). De las cepas de referencia la que mayor crecimiento alcanzó a esta misma temperatura fue la cepa FI-1029 (CSIRO) de Australia, misma de *M. anisopliae* var. *anisopliae* que tuvo el mejor crecimiento de las de referencia a 25° C. La cepa FI-698 (CSIRO, Nueva Zelanda) que corresponde a *M. anisopliae* var. *novazealandicum* mostró el menor desarrollo a 30 °C. Las diferencias observadas en el crecimiento a 30 °C fueron significativas tanto entre los aislados de México (F= 86.389; g.l. = 17, 72;  $p < 0.01$ ), todos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como entre las cepas de referencia (F= 2988.797; g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ ), de diferentes especies de *Metarhizium* (Tabla 3).

A 35°C, los aislados de México que alcanzaron el mayor crecimiento fueron EH-468/1, EH-474/6, EH-479/2, EH-465/8 y EH-475/2 a diferencia de los aislados EH-466/2, EH-467/6, EH-478/1, EH-480/8 y EH-481/1 que mostraron el menor crecimiento (Tabla 3). A esta temperatura, el crecimiento de las cepas de referencia disminuyó considerablemente con excepción de las cepas FI-1029 (CSIRO) de Eritrea y 985 (ARSEF) de Australia que registraron un crecimiento intermedio. Estas dos cepas corresponden a *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI-1029), misma de los aislados de México y a *M. anisopliae* var. *acridum* de Australia. Las diferencias observadas en el crecimiento a 35 °C fueron significativas tanto entre los aislados de México (F=49.541; g.l.=17, 72;  $p < 0.01$ ), todos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como entre las cepas de referencia (F=74.087; g.l.=10, 44;  $p < 0.01$ ), de diferentes especies de *Metarhizium* (Tabla 3). A 40 °C, ni los aislados de México ni las cepas de referencia tuvieron crecimiento.

De acuerdo con nuestros resultados, las temperaturas óptimas para el crecimiento de los aislados de México son 25 y 30 °C. Esto concuerda con los resultados de

Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez (2002), quienes encontraron altos porcentajes de germinación en cultivos de *M. anisopliae* a 27 °C. Fargues *et al.* (1992) también reportó que *M. anisopliae* requiere para su crecimiento micelial una temperatura óptima entre 25 y 28 °C, mientras que los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* tienen un mayor desarrollo a 25 °C.

Los aislados que tuvieron el mayor crecimiento a 25 y 30 °C fueron colectados en regiones tropicales del estado de Veracruz (Tabla 1). Con respecto a las cepas de referencia, la que alcanzó un mayor crecimiento en estas temperaturas fue *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI-1029) proveniente de Eritrea (Tabla 1), con clima tropical. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Driver *et al.* (2000) quienes realizaron ensayos de termotolerancia con cepas representativas de diversos clados (grupos) del género *Metarhizium*, pues muestran la relación entre la región geográfica de procedencia de la cepa y su tolerancia a temperaturas asociadas a la región en donde fueron aisladas. Observaciones similares fueron obtenidas por Bidochka *et al.* (2001) quienes realizaron análisis de genética de poblaciones de 83 aislados de *M. anisopliae*, de un área forestal y otra agrícola de Ontario, Canadá. Los aislados se separaron en dos grupos, cada uno de los cuales estuvieron asociados a las condiciones del hábitat pero no al grupo de hospedero. En este mismo trabajo (Bidochka *et al.*, 2001), las cepas provenientes del área forestal, crecieron en medios de cultivo a temperaturas bajas, aproximadamente a 8 °C; mientras que las cepas provenientes del área agrícola, crecieron a temperaturas mayores como 35 °C, y además estas mismas mostraron una mayor resistencia a la exposición de rayos UV.

En este estudio se muestra la variabilidad intraespecífica existente entre aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* provenientes de tres estados mexicanos: Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz, considerando la virulencia en pupas de *T. molitor* y la termotolerancia a 25, 30, 35 y 40 °C

durante el crecimiento. Con base en los resultados obtenidos concluimos que los aislados EH-481/1, EH-469/6, EH-476/3, EH-474/6, EH-475/2 y EH-473/4 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* debido a su virulencia y buen crecimiento a 25, 30 y 35°C serían buenos candidatos para ser utilizados en el control microbiano de la mosca pinta; sin embargo, es necesario realizar estudios en condiciones de campo con el objeto de evaluar su eficacia.

## Agradecimientos

Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo del CONACYT, megaproyecto grupal G-31451-B, en colaboración entre la UNAM, el CNRCB y la UAM-X

## Literatura citada

- Aguirre-Acosta, E., E. Pérez-Silva, 1978. Descripción de algunas especies del género *Laccaria* de México. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 12: 33-58.
- Allard, G.B., C.A. Chase, J.B. Heale, J.E. Isaac, C. Prior, 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane frog hopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Homoptera: Cercopidae). Journal of Invertebrate Pathology 55: 41-46.
- Alves, S.B., R.M. Pereira, R.B. Lopes, M.A. Tamai, 2002. Use of entomopathogenic fungi in Latin America. In: Upadhyay, R. K. (ed.), Advances in microbial control of insect pests. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp.193-212.
- Alves, T.R., 1999. Development of mycoinsecticide formulations and application techniques appropriate for pest control. Tesis Doctoral, University of London, Imperial College of Science, Technology and Medicine Department, Londres.
- Ayala-Zermeño, M.A., T. Mier, J. Sánchez Robles, C. Toriello, 2005. Variabilidad intraespecífica de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Micología 20: 93-97.
- Berlanga-Padilla, A., V.M. Hernández-Velázquez, 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. Manejo Integrado de Plagas 63: 51-55.
- Bidochka, M.J., A.M. Kamp, M.T. Lavender, J. Dekoning, J.N.A. De Cross, 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? Applied and Environmental Microbiology 67:1335-1342.
- Brito, E.S., A. R. de Paula, L. P. Vieira, C. Dolinski, R. I. Samuels, 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). Biocontrol Science and Technology 18: 665-673.
- Butt, T. M., M. S. Goettel, 2000. Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon, A., K. R. S. Ascher (eds.), Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing, Wallingford, pp. 141-

- 195.
- De Cross, J.N.A., M.J. Bidochka, 1999. Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Microbiology 45: 1055-1061.
- De la Rosa-Reyes, W., J. L. Godínez-Aguilar, R. Alatorre-Rosas, 1995. Biological activity of five strains of *Metarhizium anisopliae* upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Entomophaga 40: 403-412.
- Driver, F., R.J. Milner, J.H.W. Trueman, 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research 104: 134-150.
- Fargues, J., N.K. Maniania, J.C. Delmas, N. Smith, 1992. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'Hyphomycetes entomopathogènes. Agronomie 12: 557-564.
- Finney, D.J., 1972. Probit Analysis, 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Flores, C. S., 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. México, D.F.
- García de León, S., T. Mier, 2003. Panorama actual de la producción comercial y aplicación de bioplaguicidas en México. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente 7: 65-81.
- Glare, T.R., R.J. Milner, 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. In: Arora, D.K., L. Ajello, K.G. Mukerji (eds.), Handbook of applied mycology. Dekker, Nueva York. pp. 547-612.
- Goettel, M.S., S.D. Inglis, 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L.A. (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Londres. pp. 213-248.
- Hajek, A.E., R.J. St. Leger, 1994. Interaction between fungal pathogens and insect host. Annual Review of Entomology 39:293-322.
- Jenkins, N.E., D. Grzywacz, 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents: assurance of product performance. Biocontrol Science and Technology 10: 753-777.
- Leal-Guerra, J.F., J. Reyes Hernández, A. Guillén Vázquez, 1998. Manejo integrado de plagas de la caña de azúcar en los ingenios del grupo Saenz, Tamaulipas, México. En: Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Río Bravo, TS, México, 5-6 noviembre, p. 286.
- Lecuona, E.R., S. Alves, 1995. Epizootiología. In: Lecuona, E.R. (ed.), Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. IMYZA-CICA-INTA Castelar, Buenos Aires. pp. 17-34.
- Liu, Y.Q., M.G. Feng, S.S. Liu, 2000. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* against *Myzus persicae*. Chinese Journal of Biological Control 16:56-60.
- Luz, C., J. Fargues, 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination on isolates of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia 138: 117-125.
- Montgomery, D.C., 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F.
- Ouedraogo, A., J. Fargues, M.S. Goettel, C.J. Lomer, 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia 137: 37-43.
- Robertson, J. L., R. M. Rusell, H. K. Preisler, N. E. Savin, 2007. Bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Raton.
- Samuels, K.D.Z., D.E. Pinnock, 1990. Scarabeid larvae control in sugarcane using *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 55: 135-137.
- Sevala, V.M., L. King, J. Puiroux, A. Pedelaborde, B.G. Loughton, 1994. A comparison of the potency of proctolin analogues and their relative affinity for the proctolin binding sites on locust oviduct. In: Borkovec, A. B., M. J. Loeb (eds.), Insect Neurochemistry and Neurophysiology. CRC Press, Inc., Boca Raton. pp. 233-236
- Sobral da Silveira, N.S., 1990. Micoflora associada à rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sua interação com *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e o efeito de Bianca na sobrevivência deste fungo "in vitro" e no solo. Tese de Mestre, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Sosa Gómez, D.R., 1983. Caracterização e padronização de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 provenientes de diferentes regiões do Brasil. M.Sc. Thesis, ESALQ/USP. pp.117.
- Vanninen, I., G. B. Husberg, M. T. Hokkanen, 1989. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. Acta Entomologica Fennica 53: 65-71.
- Toriello, C., H. Navarro-Barranco, M.L. Almengor, T. Mier, 1999. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin como bioinsecticida contra la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala. Revista Mexicana de Micología 15: 119-121.
- Torres de la Cruz, M., H. Cortez-Madrigal, C.F. Ortiz García, L.C. Lagunas Espinosa, G. Díaz Godínez, 2006. Cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, (Deuteromycotina: Hyphomycetes) y su potencial para el manejo de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae) en caña de azúcar en Tabasco, México. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, noviembre 6-8, p. 319.
- Xu, S.T., M.G. Feng, S.H. Ying, 2002. Time-specific infection rate of *Beauveria bassiana* on *Myzus persicae* after topical inoculation of conidial suspension. Chinese Journal of Applied Ecology 13: 701-704.
- Ying S.H., M.G. Feng, 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. Journal of Applied Microbiology 97: 323-331.
- Zhioua, E., M. Browning, P.W. Johnson, H. S. Ginsberg, R. A. LeBrun, 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Journal of Parasitology 83: 815-818.