

Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura

Miguel Angel Ayala-Zermeño¹, Teresa Mier¹,
Jesús Sánchez Robles¹, Conchita Toriello²

¹ Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F. 04960, México

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

Intraspecific variability of *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*): Effect of temperature on growth

Abstract. The effect of temperature (15, 25, 30 and 35°C) on the growth rate of six isolates of insects and coffee rust (polyspore isolates), six monospore cultures derived from these isolates, and six reference strains of *Lecanicillium lecanii* of different countries was assayed. All studied fungi exhibited the highest growth rate at 25 °C (2.55 ± 0.43 mm/day); all showed a better growth at 15 ((1.52 ± 0.23 mm/day) than at 30 °C (0.95 ± 0.67 mm/day); and no fungal growth was observed at 35°C. Significant differences ($p < 0.001$) among growth rates at 15, 25 and 30 °C of polyspore isolates, monospore cultures, and reference strains were shown, as well as in the majority of original and monospore cultures, with the exception of isolates EH-459 and EH-572 at 15 °C, EH-458 at 25 °C, and EH-457 at 25 and 30°C. The difference of growth at the temperatures assayed among the different isolates showed the intraspecific variability of *L. lecanii*.

Key words: *Lecanicillium lecanii*, growth rate, intraspecific variability.

Resumen. Se estudió el efecto de diferentes temperaturas (15, 25, 30 y 35 °C) sobre el crecimiento de seis cultivos aislados de insectos y de la roya del café de México (polispóricos), seis monospóricos derivados de estos cultivos y seis cepas de referencia de *Lecanicillium lecanii* de diferentes países. Todos los hongos estudiados presentaron la mayor tasa de crecimiento a 25 °C (2.55 ± 0.43 mm/día), crecieron mejor a 15 °C que a 30 °C, y ninguno creció a 35 °C. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la tasa de crecimiento de los cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia de este hongo a 15, 25 y 30 °C, así como en la mayoría de los cultivos polispóricos y sus monospóricos, con excepción de los aislados EH-459 y EH-572 a 15 °C, EH-458 a 25 °C, y EH-457 a 25 y 30°C. La diferencia de crecimiento a las temperaturas ensayadas entre los hongos estudiados muestra la variabilidad intraespecífica de *L. lecanii*.

Palabras clave: *Lecanicillium lecanii*, tasa de crecimiento, variabilidad intraespecífica.

Received November 22 2004; accepted April 28 2005.

Recibido 22 de noviembre 2004; aceptado 28 abril 2005.

El efecto de factores abióticos como la temperatura en los hongos entomopatógenos debe ser considerado como un punto de partida para la selección de cepas con potencial para el control biológico [4]. Este factor ambiental es relevante para la eficiencia como agentes microbianos fúngicos por incidir en su crecimiento vegetativo y persistencia en campo

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

[14, 20]. *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & W. Gams (= *Verticillium lecanii*) es un biorregulador natural de plagas de importancia económica como la mosquita blanca, pulgones, trips y de la roya del café, y ha sido considerado como una alternativa ambiental de control [1, 2, 6, 13]. En el presente trabajo se estudió la variabilidad intraespecífica, expresada por el crecimiento de diferentes aislados y cepas de

la misma especie fúngica, en este caso, como respuesta a diferentes temperaturas de incubación, en cultivos poli- y monospóricos y cepas de referencia de *L. lecanii*. Para ello se determinó la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas, como parte de los requisitos para la selección de cepas para su uso en control biológico.

La procedencia de los hongos estudiados se muestra en la Tabla 1. Los cultivos polispóricos o aislados originales fueron obtenidos directamente en campo a partir del hospedero. Los cultivos monospóricos se obtuvieron a partir de estos aislados originales (polispóricos). Las cepas de referencia corresponden a cultivos del hongo depositados en la colección "Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi" (ARSEF, USA). Los hongos se cultivaron en medio de Sabouraud dextrosa agar (SDA, Bioxón, México) incubando a 28 °C durante 7 días. Los cultivos monospóricos se obtuvieron a partir de una suspensión conidial de cada polispórico estudiado en 3 ml de Tween 80 al 0.05%, ajustada a una suspensión de 100 conidios/ml. Se aplicaron 200 µl de la suspensión en cajas de Petri en un medio translúcido (en g/l: agarosa 8, dextrosa 2, gelatina 1, cloranfenicol 0.5). En el reverso de la caja se trazó un cuadrado con cuadrantes de 1 cm². Las cajas se incubaron a 28 °C, se revisaron por el reverso, cada 24 horas, al microscopio óptico a 4 y 10X, para marcar con un punto (al lado del conidio) el cuadrante donde hubiera solamente un conidio con tubo germinativo. Al cabo de 96 h las colonias provenientes de un solo conidio, se pasaron a tubos de cultivo con SDA. Se ensayó un cultivo monospórico de cada polispórico.

Se depositaron 4 x 10⁴ conidios obtenidos de suspensiones de los cultivos (polispóricos, monospóricos y cepas de referencia) en círculos de 5 mm de papel filtro, se colocaron por separado en el centro de cajas de 90 mm con SDA, incubando a 15, 25, 30 y 35 °C durante 15 días, considerando 10 réplicas. El crecimiento de las colonias se midió diariamente con base en el promedio de dos diámetros

perpendiculares trazados en el fondo de las cajas, durante 15 días, y al final del periodo de incubación se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final entre 15 días: mm/día). Se llevó a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 12.0 [12].

Todos los cultivos mostraron la mayor tasa de crecimiento a 25 °C (2.55±0.43), crecieron mejor a 15 °C (1.52±0.2338) que a 30 °C (0.95±0.67) (Tabla 2) y ningún cultivo creció a 35 °C. Las cepas que mostraron el mayor y menor crecimiento a las temperaturas ensayadas fueron las de Israel (ARSEF 1029) y la India (ARSEF 1026), respectivamente. Los aislados de México que mejor desarrollo tuvieron a 25 °C fueron los cultivos polispóricos EH-457 y EH-459, y los cultivos monospóricos EH-572/7, EH-457/5, y EH-458/2. En general, se observó diferencia significativa (p < 0.001) entre la tasa de crecimiento de los cultivos polispóricos y sus monospóricos, con algunas excepciones como por ejemplo para EH-459 y EH-572 a 15 °C; EH-458 a 25 °C y EH-457 para 25 °C y 30 °C (Tabla 2).

Esta diferencia puede deberse a la condición de homocariosis del conidio a partir del cual se origina el cultivo monospórico, en contraste con el carácter heterocariótico de los cultivos polispóricos [17]. En otros estudios de *L. lecanii* [3] también encontraron diferencias entre cultivos polispóricos y monospóricos al analizar otras características fenotípicas tales como morfología de la colonia, largo, producción y tiempo de germinación de conidios.

Respecto a la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas (Tabla 2) se encontró variabilidad fenotípica intraespecífica entre los aislados de México estudiados y las cepas de referencia de *L. lecanii* como expresión de la variabilidad genética existente en la especie la cual puede manifestarse como la variación de aspectos morfológicos y/o bioquímicos [15]. Esta condición relevante de los requerimientos térmicos de los candidatos a ser utilizados en

el control biológico de plagas, ha hecho que se estudie la variabilidad inter e intraespecífica de los hongos entomopatógenos a diferentes temperaturas [4, 14, 16].

El presente estudio sobre el crecimiento de *L. lecanii* a diferentes temperaturas indica que éste es un hongo mesofílico debido a que la mayoría de los aislados se desarrollaron mejor a una temperatura de 25° C. Este dato coincide con lo observado por López-Llorca y Carbonell [9],

Monteiro *et al.* [11] y Li *et al.* [8] para aislados de *Verticillium lecanii* (= *L. lecanii*) de España, Brasil y China, respectivamente, así como para aislados provenientes de los Estados Unidos de Norteamérica, Reino Unido, Dinamarca y Alemania [19]. Estos últimos resultados se encuentran dentro del intervalo de temperatura óptima de la mayoría de los hongos entomopatógenos mesofílicos [5]. Por otro lado, las cepas de referencia provenientes de Israel, clima

Tabla 1. Características de los aislados de *Lecanicillium lecanii* estudiados.

Clave UNAM	Clave Original	Hospedero	Plaga de cultivo	Origen
México				
EH-348	Aislado C ¹	<i>Trialeurodes vaporarionum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Frijol	Morelos, MX
EH-457	IE-363 ²	<i>Hemileia vastatrix</i> (Basidiomycota: Uredinales)	Café	Veracruz, MX
EH-458	IE-397 ²	<i>Hemileia vastatrix</i> (Basidiomycota: Uredinales)	Café	Veracruz, MX
EH-459	IE-388 ²	<i>Hemileia vastatrix</i> (Basidiomycota: Uredinales)	Café	Edo. de México, MX
EH-460	IE-393 ²	<i>Hemileia vastatrix</i> (Basidiomycota: Uredinales)	Café	Puebla, MX
EH-572	V-262 ³	<i>Toxoptera aurantii</i> (Homoptera: Aphididae)	Limón	Colima, MX
Cepas de referencia (ARSEF) ⁴				
313		Aislado monospórico del micoinsecticida Vertalec	Manipulada en laboratorio Invernadero	Países Bajos
972		<i>Trialeurodes vaporarionum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)		Polonia
980		<i>Pulvinaria floccifera</i> (Homoptera: Coccidae)	INP ⁵	Turquía
1026		<i>Myzus persicae</i> (Homoptera: Aphididae)	INP ⁵	India
1029		<i>Saissetia oleae</i> (Homoptera: Coccidae)	Clavel	Israel
4064		<i>Bemisia tabaci</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Tabaco	Dinamarca

¹Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, Depto. El hombre y su Ambiente, México D.F.

²Herbario XAL, Instituto de Ecología, A.C.

³Centro Nacional de Referencia de Control biológico, Tecmán, Colima.

⁴ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, E.U.A.

⁵INP = Información no proporcionada.

generalmente subtropical, y también las cepas de Dinamarca y Polonia, países donde predominan las temperaturas bajas, sorpresivamente, se desarrollaron mejor a 30 °C, hecho que puede deberse al lugar de origen del hospedero a partir del cual se obtuvo el hongo [16].

La temperatura de la región donde vaya a ser empleado *L. lecanii* como agente de control biológico es decisiva para el éxito del hongo en campo debido a que constituye un factor climático importante que afecta no sólo el crecimiento de los hongos entomopatógenos sino también su eficacia como agente de control biológico al incidir en la esporulación y germinación de conidios [10], en la tasa de invasión [18] y en la virulencia del hongo [7]. Los sistemas hospedero-parásito son diversos y complejos y extrapolar los

datos obtenidos *in vitro* para predecir la respuesta del hongo en condiciones de campo no siempre es válido [16]. Sin embargo, como prerrequisito para la selección de aislados, los estudios *in vitro* de los factores que rigen el crecimiento y la infección de los hongos tienen que ser considerados dado que proporcionan información necesaria para la caracterización de las cepas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la M. en C. Gloria Carrión la gentil donación de los aislados de *Verticillium lecanii* (Herbario de XAL), y a Víctor Hernández Velázquez y Angélica Berlanga

por el aislamiento del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico, Tecomán, Colima. Este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del CONACyT (G-31451-B), a quien el primer autor agradece su beca de maestría.

Literatura citada

- Butt, T.M., C. Jackson, N. Magan, 2001. Introduction Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Butt, T.M., C. Jackson, N. Magan (eds.), Fungi as Biological Agents. CAB International, Nueva York. pp. 1-8.
- Carrión, G., 1988. Estudio sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 79-86.
- Cortez-Madrigrá, H., R. Alatorre-Rosas, G. Mora-Aguilera, H. Bravo-Mojica, C. F. Ortiz-García, L. A. Aceves-Navarro, 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *BioControl* 48: 321-334.
- Fargues, J., N. K. Maniania, J. C. Delmas, N. Smits, 1992. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie* 12: 557-564.
- Ferron, P., J. Fargues, G. Riba, 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora, D.K., L. Ajello, K.G. Mujkeri (eds), *Handbook of Applied Mycology*. Dekker, New York. Vol. 2. pp. 665-706.
- García-Juárez, M., C. Ramírez, F. Rivera, T. Mier, 1999. Evaluación en campo de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homoptera: Aleyrodidae) en un cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Micología* 15: 1-9.
- 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.
- Li, G., Y. Yuhua, W. Liying, 1991. Influence of temperature and nutrition on growth of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Beijing strain). *Chinese Journal of Biological Control* 7: 115-119.
- López-Llorca, L.V., T. Carbonell, 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología* 16: 136-142.
- Luz, C., J. Fargues, 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138: 117-125.
- Monteiro, A. C., C. Camargo-Barbosa, A.C. Bracelos-Correa, G.T. Pereira, 2004. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 561-565.
- Montgomery, D.C., 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F.
- Osborne, L., Z. Landa, 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology* 75: 456-471.
- 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.
- Steenberg, T., R.A. Humber, 1999. Entomopathogenic potential of *Verticillium lecanii* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 309-314.
- Vidal, C., J. Fargues, L. A., Lacey, 1997. Intra-specific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 18-26.
- Webster, J. (1986). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Yeo, H., J.K. Pell, P.G. Alderson, S.J. Clark, B.J. Pye, 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59: 156-165.
- Ying, S.H., M.G. Feng, 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology* 97: 323-331.

Tabla 2. Tasa de crecimiento de diversos aislados de *Lecanicillium lecanii* a diferentes temperaturas.

Hongos	Tasa de crecimiento mm/día X ± DS ¹		
	15 °C	25 °C	30 °C
EH-348	1.19 ± 0.048g**	1.96 ± 0.081g	0.28 ± 0.042h
EH-348/2 ³	1.06 ± 0.133h	2.46 ± 0.047e	0.48 ± 0.181fgh
EH-457	1.66 ± 0.047bc	2.64 ± 0.078c	0.42 ± 0.206fgh
EH-457/5	1.70 ± 0.069b	2.68 ± 0.042c	0.39 ± 0.133fgh
EH-458	1.69 ± 0.082b	2.62 ± 0.069cd	0.43 ± 0.141fgh
EH-458/2	1.51 ± 0.070de	2.67 ± 0.056c	0.66 ± 0.047efg
EH-459	1.73 ± 0.048b	2.66 ± 0.047c	0.36 ± 0.156gh
EH-459/1	1.71 ± 0.070b	2.48 ± 0.063e	1.03 ± 0.141cd
EH-460	1.58 ± 0.042cd	2.61 ± 0.070cd	0.97 ± 0.152cde
EH-460/1	1.70 ± 0.069b	2.51 ± 0.052de	0.73 ± 0.221def
EH-572	1.41 ± 0.052ef	2.51 ± 0.108de	1.26 ± 0.249bc
EH-572/7	1.42 ± 0.051ef	2.69 ± 0.048c	1.32 ± 0.347bc
ARSEF ⁴ 313	1.48 ± 0.091def	2.48 ± 0.063e	0.86 ± 0.282de
ARSEF 972	1.40 ± 0.051f	2.72 ± 0.051c	1.47 ± 0.341b
ARSEF 980	1.43 ± 0.067ef	2.12 ± 0.096f	0.73 ± 0.275def
ARSEF 1026	1.07 ± 0.031h	1.40 ± 0.096h	0.71 ± 0.150defg
ARSEF 1029	1.86 ± 0.000a	3.41 ± 0.070a	2.58 ± 0.103a
ARSEF 4064	1.68 ± 0.063bc	3.26 ± 0.115b	2.40 ± 0.452a
Promedio	1.52 ± 0.2338	2.55 ± 0.43	0.95 ± 0.67
ANOVA α = 0.05	F = 121.426; g.l. 17,162; P<0.001	F= 353.659; g.l. 17,162; P<0.001	F= 84.461; g.l. 17,162; P<0.001

¹ X ± DS = media ± desviación estándar.

² Letras iguales indica que no existe diferencia significativa (P < 0.05) entre ellas (comparación múltiple de medias de Tukey).

³ Las claves con diagonal seguidas de un dígito corresponden al cultivo monospórico obtenido del original.

⁴ ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, E.U.A.