

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*

Angélica M. Berlanga-Padilla¹
Víctor M. Hernández-Velázquez¹

RESUMEN. Se determinó el efecto de la temperatura en la germinación y crecimiento de *Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* y *Beauveria bassiana*. La temperatura óptima para los aislamientos fue entre 24 y 30 °C. El grado de crecimiento de *B. bassiana* fue mayor que el de *M. anisopliae* a 24 °C; sin embargo, *M. a. var. acridum* presentó mejor germinación y crecimiento a 32 °C. En el bioensayo los mismos aislamientos fueron evaluados para el control de adultos de *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) a 26 y 32 °C. A 26 °C, *B. bassiana* y *M. anisopliae* causaron mortalidad de 76 y 88%, y su tiempo letal medio (TL₅₀) fue de 5,5 y 5,2 días, respectivamente, mientras que *M. a. var. acridum* a 32 °C causó una mortalidad de 93%, con un TL₅₀ de 5 días.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana*, *Schistocerca piceifrons piceifrons*, Control biológico, Germinación, Mortalidad.

ABSTRACT. Effect of temperature on the growth and virulence of *Metarhizium anisopliae*, *M. a. var. acridum* and *Beauveria bassiana* on *Schistocerca piceifrons piceifrons*. The effect of temperature on the germination and growth of *M. anisopliae*, *M. a. var. acridum* and *B. bassiana* was determined. The optimal temperature for the isolates was between 24 and 30 °C. The rate of growth of *B. bassiana* was greater than that of *M. anisopliae* at 24 °C; however, germination and growth of *M. a. var. acridum* was greater at 32 °C. In bioassays the same isolates were evaluated for the control of adults of *S. p. piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) at 26 and 32 °C. At 26 °C *B. bassiana* and *M. anisopliae* caused mortality of 76 and 88%, their half lethal time (LT₅₀) was 5.2 and 5.9 days, respectively, whilst *M. a. var. acridum* at 32 °C caused a mortality of 93%, with a LT₅₀ of 5 days.

Key Words: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana*, *Schistocerca piceifrons piceifrons*, Biological control, Germination, Mortality.

Introducción

Los hongos entomopatógenos, *Metarhizium* spp. y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, son comúnmente aislados de acrididos en diferentes partes del mundo y se han utilizado como agentes de control de chapulines y langostas (Inglis *et al.* 1997b, Lomer *et al.* 1997). *B. bassiana* ha mostrado mayor virulencia sobre chapulines en zonas templadas (Greathead 1992) y en la investigación para el control biológico de langosta en Africa, especialmente *Schistocerca gregaria* (Forsk.) y

Locusta migratoria L. (Orth: Acrididae) se ha evaluado principalmente los aislamientos *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin y *M. a. var. acridum*, conocido antes del 2000 como *M. flavoviride* Gams & Rozsypal (Driver *et al.* 2000, Welling *et al.* 1994).

Sin embargo, los resultados obtenidos sobre poblaciones de acrididos en condiciones de campo son inconsistentes debido a que la eficacia de los hongos entomopatógenos en campo está relacionada con la temperatura y la humedad relativa, especialmente en

¹ Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. SAGARPA-SENASICA-DGSV. Tecomán, Col. 28120, México

condiciones tropicales y subtropicales; estos factores juegan un papel básico en el inicio de la infección, periodo de incubación y viabilidad de estos microorganismos, además los acrididos tienen la habilidad de elevar su temperatura corporal como resultado de la exposición al sol, lo cual reduce la incidencia de hongos entomopatógenos (Ouedraogo *et al.* 1997, Inglis *et al.* 1997a) por lo que se considera que la selección de aislamientos climáticamente adaptados a temperaturas mayores de 30 °C es fundamental en la implementación del control microbiano de acrididos (Prior y Streett 1997).

Por lo anterior, es necesario conocer la temperatura óptima para el desarrollo de los aislamientos de estos hongos entomopatógenos, con el fin de liberarlos en las regiones y épocas en las cuales las temperaturas sean adecuadas. En este trabajo se evaluó la germinación y el crecimiento micelial de *M. anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *B. bassiana* a 20, 24, 27 y 32 °C y su virulencia sobre adultos de *S. p. piceifrons* a 26 y 32 °C.

Materiales y métodos

Aislamientos

Los hongos evaluados son parte de la colección de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de Tecomán, Colima, México. La información sobre cada uno de los hongos utilizados se presenta en el Cuadro 1. Las especies de *Metarhizium* (MaPL35 y MaPL39) se aislaron de *S. p. piceifrons*. La cepa de *B. bassiana* se obtuvo de *Anthonomus grandis* Boheman.

Los aislamientos fueron inoculados en medio de cultivo a base de agar dextrosa Sabouraud (ADS) y conservados a 27°C durante 10 días.

Desarrollo de los entomopatógenos a diferentes temperaturas

El porcentaje de germinación se evaluó a 20, 24, 27 y 32 °C, usando un diseño factorial completamente al azar. De una suspensión de 1×10^6 conidios/ml de cada especie se depositaron dos gotas por caja de Petri con ADS; y se extendieron sobre la caja mediante una varilla de vidrio estéril. La viabilidad de los conidios se evaluó a las 15, 20 y 24 horas. El porcentaje de germinación se determinó contando 100 conidios por caja Petri, utilizando cuatro cajas por tratamiento. El criterio para evaluar la germinación fue el tamaño del tubo germinativo, considerándose como viable aquel que fue mayor o igual al tamaño de su conidio. La germinación se analizó a las 20 horas utilizando el pa-

quete para diseños experimentales FAUNL versión 2.5 (Olivares 1994) previa transformación arco seno y_i .

El porcentaje del crecimiento micelial, se evaluó bajo el mismo diseño experimental utilizado en la prueba anterior. Para cada tratamiento se inocularon dos cajas Petri conteniendo ADS con una suspensión de conidios y se incubaron por tres días a 27°C, a partir de las cuales se obtuvieron porciones de micelio de 5 mm de diámetro. Estos se colocaron en el centro de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo a base de ADS enriquecido con extracto de levadura y extracto de malta al 10%; se utilizaron cuatro cajas por tratamiento. Posteriormente, fueron colocadas en una cámara de incubación a 20, 24, 27 y 32 °C durante 20 días. Se midió el crecimiento micelial (mm) cada tres días, tomando dos lecturas del desarrollo diametral del hongo.

Cuadro 1. Origen de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* evaluados.

Clave	Especie	Hospedante	Origen
MaPL35	<i>M. anisopliae</i>	<i>S. p. piceifrons</i>	Tecomán, Colima, México
MaPL39	<i>M. a. var. acridum</i>	<i>S. p. piceifrons</i>	Isla Socorro, Colima, México
Bb7	<i>B. bassiana</i>	<i>A. grandis</i>	Estados Unidos

Virulencia sobre *S. p. piceifrons*

Los insectos utilizados en este bioensayo se recolectaron en la Isla Socorro del Archipiélago Revillagigedo Colima, México. Todos los especímenes correspondieron al estado adulto joven, en fase gregaria. Posteriormente, los especímenes fueron conducidos al Laboratorio de Entomopatógenos del CNRCB en Tecomán, Col. donde se mantuvieron en jaulas de cría durante una semana utilizando hojas tiernas de maíz como dieta.

Los aislamientos evaluados fueron sembrados dos semanas antes de realizar el bioensayo en cajas de Petri con medio nutritivo a base de ADS y conservados a 27 °C. La obtención de conidios de cada aislamiento se realizó el primer día del experimento, contabilizando el número de conidios por ml en cámara hematimétrica. Posteriormente, se homogeneizaron las suspensiones a 1×10^7 conidios/ml y se les adicionó el dispersante Extravón 40[®], al 0,025%.

Se utilizaron 20 insectos por unidad experimental, con cuatro repeticiones por tratamiento, colocando 10 insectos en un recipiente de plástico de boca ancha, con capacidad de 1 L. Los recipientes se cubrieron con muselina, y en el fondo de cada recipiente, se colocó un papel filtro; la dieta se cambió cada 48 h. Los insectos fueron inoculados de 10 en 10, seleccionando los de apariencia sana. Estos se colocaron en bolsas de plástico de 22 X 33 cm y se asperjaron con 3 ml de la suspensión de conidios. A los testigos se les aplicó agua con el dispersante usado en las suspensiones y en la misma concentración. Posteriormente, los recipientes fueron colocados a temperatura constante de día y noche, 26 y 32°C, respectivamente en una cámara bioclimática Lab-Line. La humedad relativa no se controló.

Se registró la mortalidad diaria, los insectos muertos se colocaron individualmente en cajas de Petri que contenían papel filtro humedecido con 0,2 ml de agua destilada estéril. Las cajas fueron selladas con cinta "parafilm" para registrar el tiempo y sitio de emergencia del patógeno, así como la fecha de inicio de la esporulación. Los insectos que murieron en las primeras 72 horas no fueron considerados para el análisis estadístico. El experimento se analizó con el porcentaje de mortalidad acumulada al 6° día, previa transformación arc. sen y_i , utilizando el paquete de diseños experimentales FAUNL versión 2.5 (Olivares 1994). Con los datos de mortalidad diaria acumulada corregida con la fórmula de Abbot se determinó el Tiempo Letal Medio (TL₅₀), Tiempo Promedio de Supervivencia (TPS) y la varianza del TPS de acuerdo al lo propuesto por Moore *et al.* (1995).

Resultados y discusión

Desarrollo a diferentes temperaturas

La temperatura óptima para la germinación de las especies evaluadas fue de 27 °C (Cuadro 2). *M. anisopliae* y *B. bassiana* alcanzaron altos porcentajes de germinación en todas las temperaturas a las 20 horas, excepto el aislamiento de *M. a. var. acridum* que mostró un porcentaje de germinación mínimos a 20 °C. Este aislamiento fue más tolerante a altas temperaturas, logrando los mayores porcentajes de germinación entre 27 y 32 °C.

Para el crecimiento del micelio, los resultados fueron similares a los porcentajes de germinación, en los cuales *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron un crecimiento óptimo entre 24 y 27 °C y *M. a. var. acridum* se desarrolló mejor a temperaturas entre 27 °C y 32 °C

(Fig. 1). Para este último aislamiento; no obstante, a que su desarrollo comienza a disminuir a 32°C, crece más rápido que *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Al respecto Fargues *et al.* (1992) informaron que *M. anisopliae* requiere para su crecimiento micelial una temperatura óptima promedio de 25 a 28 °C; mientras la temperatura óptima de *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Saccardo) Petch, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson es de 25 °C. Por otra parte Inglis *et al.* (1997a) consideran que la baja eficiencia de *B. bassiana* en el control de chapulines es el resultado de las condiciones de temperatura y exposición solar y no de la virulencia del patógeno.

Cuadro 2. Porcentaje de germinación de aislamientos de *M. anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *B. bassiana* en medio de cultivo a diferentes temperaturas.

Aislamiento	Temperatura	Porcentaje germinación		
		15 horas	20 horas*	24 horas
Bb7	20 °C	0	35 C	95
	24 °C	78	100 A	100
	27 °C	95	100 A	100
	32 °C	8	76 B	99
MaPL35	20 °C	42	95 B	100
	24 °C	99	100 A	100
	27 °C	98	99 A	99
	32 °C	95	99 A	100
MaPL39	20 °C	0	0 C	9
	24 °C	4	79 B	91
	27 °C	80	96 A	98
	32 °C	86	98 A	99

*Las letras separan las medias estadísticamente iguales con la prueba DMS con nivel de significancia 0,05

CV=4,70%

Se determinó que *M. a. var. acridum* crece más lento a 20 °C pero es más tolerantes a temperaturas altas en comparación con *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Welling *et al.* (1994) mencionan que aislamientos de *M. anisopliae* y *M. a. var. acridum* pueden resistir temperaturas de 40 °C o mayores durante algunas horas, pero con una marcada reducción en su grado de crecimiento, indicando que este último aislamiento fue más resistente a temperaturas entre 44 y 25 °C.

Virulencia sobre *S. p. piceifrons*

La mortalidad de adultos de *S. p. piceifrons* fue diferente significativamente entre tratamientos. Los aislamientos más virulentos fueron las especies de *Metarhizium* a 32 °C, siendo *M. a. var. acridum* el que causó la mayor mortalidad (93,75%) (Cuadro 3).

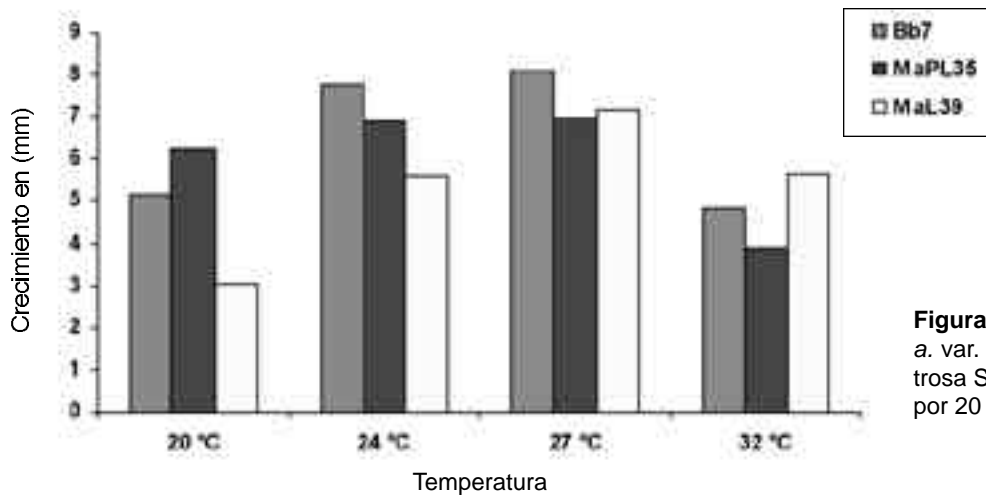


Figura 1. Crecimiento de *M. anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *B. bassiana* en agar dextrosa Sabouraud a diferentes temperaturas por 20 días.

Cuadro 3. Separación de medias con base en la mortalidad acumulada al 6º día de adultos de *S. p. piceifrons* ocasionada por *M. a. var. acridum*, *M. anisopliae* y *B. bassiana*, a dos temperaturas.

Tratamientos	Mortalidad promedio acumulada al 6º día	% de esporulación en insectos muertos
MaPL39 a 32 °C	93,75 A*	00,00
MaPL35 a 26 °C	88,14 A	59,51
MaPL35 a 32 °C	83,82 A	00,00
MaPL39 a 26 °C	79,38 AB	00,00
Bb7 a 26 °C	76,43 AB	87,39
Bb7 a 32 °C	46,53 BC	00,00
Testigo a 32 °C	38,03 C	00,00
Testigo a 26 °C	17,87 D	00,00

*Las letras separan medias estadísticamente iguales con la prueba DMS con un nivel de significancia de 0,05.

C.V.= 5,75 %

Los insectos infectados a 32 °C no presentaron esporulación sobre los cadáveres, lo cual indica que no es la temperatura óptima para el desarrollo del patógeno o bien que al ocasionar una muerte rápida del insecto a esa temperatura se presentan las condiciones óptimas para que otros microorganismos compitan y desplacen al hongo. Los resultados de mortalidad de *B. bassiana* fueron estadísticamente iguales a *M. a. var. acridum* a 26°C, pero bajo estas condiciones la in-

fección y la esporulación de *B. bassiana* se desarrolló favorablemente. Al respecto Johnson *et al.* (1992) mencionan que al realizar aplicaciones en campo de *B. bassiana* obtuvieron mortalidades de 72% a temperaturas entre 23 y 32 °C.

El TL₅₀ menor correspondió a los aislamientos de *Metarhizium* spp. a 32 °C, mientras que a esta misma temperatura *B. bassiana* presentó mortalidades menores de 50 % (Cuadro 4). A 26 °C el menor TL₅₀ (4,8

Cuadro 4. Tiempo Letal Medio (TL₅₀) y Tiempo Promedio de Supervivencia (TPS) en días, de adultos de *S. p. piceifrons* infectados con *M. anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *B. bassiana*, a dos temperaturas.

Tratamiento	Patógeno	TL ₅₀ en días	TPS en días	Varianza
32 °C				
MaPL39 a	<i>M. a. var. acridum</i>	5,0440	4,7027	0,7208
MaPL35	<i>M. anisopliae</i>	4,8346	5,0245	1,7697
Bb7	<i>B. bassiana</i>	> 8	--	--
26 °C				
MaPL39	<i>M. a. var. acridum</i>	5,6261	5,6545	0,6697
MaPL35	<i>M. anisopliae</i>	5,2968	5,2242	0,6836
Bb7	<i>B. bassiana</i>	5,5580	5,3740	0,7802

días) correspondió a *M. anisopliae*, siendo muy similares con los informados por Welling *et al.* (1994) quienes concluyen que los aislamientos de *M. anisopliae* presentaron TL_{50} en un ámbito de 5,6 a 6,0 días bajo condiciones de temperaturas templadas, en contraste con *M. a. var. acridum* que es más eficaz contra langostas a altas temperaturas. Por otra parte, Thomas y Jenkins (1997) encontraron que *B. bassiana* fue más eficaz que *M. anisopliae* a bajas temperaturas; sin embargo, indican que la temperatura óptima para causar infección puede variar entre aislamientos originarios de climas similares.

M. anisopliae y *M. a. var. acridum* son comúnmente aislados en zonas cálidas en diversas regiones del mundo y produce mortalidades muy semejantes en laboratorio bajo condiciones estables (Welling *et al.*

1994). Sin embargo, el empleo de estos hongos para el control de langosta en áreas tropicales y subtropicales debe orientarse a la selección de aislamientos adaptados a temperaturas altas en las cuales se desarrolla mejor *M. a. var. acridum*. En estos casos la temperatura resulta un factor clave por lo cual los procesos de selección de aislamientos se deben desarrollar en condiciones semejantes a las presentes en campo.

Agradecimientos

Este trabajo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT G3451B) es parte del proyecto: Caracterización genotípica y fenotípica de hongos entomopatógenos: instrumento para optimizar su selección como insecticidas biológicos contra plagas agrícolas.

Literatura citada

- Driver, F; Milner, RJ; Trueman, JWH. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycology Research* 104(2):134-150.
- Fargues, J; Maniania, NK; Delmas, JC; Smits, N. 1992. Influence de la temperature sur la croissance *in vitro* d'Hyphomycetes entomopathogenes. *Agronomie* 12:557-564.
- Greathead, DJ. 1992. Natural enemies of tropical locusts and grasshoppers: their impact and potential as biological control agents. In Lomer, CJ; Prior, C. Ed. *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CABI. p. 105-121.
- Inglis, GO; Johnson, DL; Goettel, MS. 1997a. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environ. Entomol.* 26(2):400-409.
- Inglis, GO; Johnson, DL; Cheng, KJ; Goettel, MS. 1997b. Use of pathogen combination to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. *Biol. Control* 8:143-152.
- Johnson, DL; Goettel, MS; Bradley, C; vander Paauw, H; Maiga, B. 1992. Field trials with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali west Africa July 1990. In Lomer, CJ; Prior, C. Ed. *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CABI. p. 296-310.
- Lomer, JC; Prior, C; Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171:265-286.
- Moore, D; Bateman, RP; Corey, M; Prior, C. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Bioc. Sci. Tech.* 5:193-199.
- Olivares Sáenz, E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUNL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Ouedraogo, A; Farges, J; Goettel, MS; Lomer, CJ. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137:37-43.
- Prior, C; Streett, DA. 1997. Strategies for the use of entomopathogens in the control of the desert locust and other acridoid pests. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171:5-25.
- Thomas, MB; Jenkins, NE. 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper *Zonocerus variegatus*. *Mycol. Res.* 101(12):1469-1474.
- Welling, M; Nachtigall, G; Zimmermann, C. 1994. *Metarhizium* spp. isolates from Madagascar: Morphology and effect of temperature on growth and infectivity to the Migratoria Locust *Locusta migratoria*. *Entomophaga* 39(3/4) 351-361.