



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* Y
Metarhizium anisopliae SOBRE PICUDO DEL
NOPAL *Metamasius spinolae***

NUVIA ORDUÑO CRUZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: **VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* SOBRE PICUDO DEL NOPAL *Metamasius spinolae*** realizada por la alumna **NUVIA ORDUÑO CRUZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR:

DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR:

DR. JOSÉ LÓPEZ COLLADO

ASESOR:

M.C. JORGE M. VALDEZ CARRASCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre 2009.

VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* SOBRE PICUDO DEL NOPAL *Metamasius spinolae*

Nuvia Orduño Cruz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2009.

El picudo del nopal (*Metamasius spinolae*), es uno de los principales factores limitantes de la producción comercial de nopal en Tlalnepantla Morelos. El control de plagas se basa en insecticidas y el uso de nuevas alternativas como los hongos entomopatógenos ha sido poco estudiada. Con el objeto de seleccionar aislamientos de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control del picudo del nopal se evaluaron seis aislamientos de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae* en cuanto a su desarrollo y patogenicidad. Los resultados mostraron un efecto no lineal de la temperatura sobre el crecimiento micelial; de 15 a 25 °C hubo un incremento en el desarrollo, pero de 30 a 35 °C el crecimiento disminuyó. En general, el grado de crecimiento de *M. anisopliae* fue mayor que el de *B. bassiana*. En cuanto a patogenicidad, se evaluaron los mismos aislamientos, se encontró que *B. bassiana* y *M. anisopliae* causaron una mortalidad diferencial, de los resultados obtenidos se seleccionaron los aislamientos Bb107, GHA y MaE, de los que se evaluó su toxicidad de acuerdo con el sexo del insecto. La mortalidad de los aislamientos de *B. bassiana* Bb107, GHA fueron significativamente mayores en relación al aislamiento de *M. anisopliae* MaE, alcanzando porcentajes de 54.4, 51.1 y 20.5 % para hembras y 62.2, 57.2 y 23.3 % para machos respectivamente; sin embargo, estadísticamente no hubo diferencias en mortalidad entre sexos. La última prueba de patogenicidad fue realizada en campo. Se encontró que en estas condiciones, la mortalidad causada por los aislamientos es menor que la ocurrida en condiciones de laboratorio, se discute sobre el papel de los factores abióticos en el nivel de la virulencia, desarrollo y esporulación de los hongos. De manera general, los aislamientos de *B. bassiana* fueron más virulentos que el aislamiento de *M. anisopliae*.

VIRULENCE OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* ISOLATES ON THE CACTUS WEEVIL *Metamasius spinolae*

Nuvia Orduño Cruz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2009.

The cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae), is considered one of the most important pest on nopalitos (immature and edible *Opuntia* pads) production at Tlalnepantla, Morelos. Its management is based on broad spectrum insecticides but biological alternatives, such as using entomopathogenic fungi, could bring an important tool toward an Integrated Pest Management Program. The objective of this work was to screen entomopathogenic isolates against the cactus weevil. Six isolates of *Beauveria bassiana* and two of *Metarhizium anisopliae* were evaluated, all of them were first characterized at laboratory. We found that temperature influence micelial growth on laboratory Petri dishes. Overall, *M. anisopliae* grew better than *B. bassiana*; the isolates presented a non linear growth related to temperature, from 15 to 25 °C the isolates grew faster, but decline from 30 to 35 °C in almost any isolate. Pathogenicity test of both species isolates showed that they were able to kill cactus weevil adults. After the evaluation I selected Bb107, GHA y MaE isolates for testing its effect on individuals of different sex. Mortality of Bb107 and GHA of *B. bassiana* was higher than MaE of *M. anisopliae*. The mortality for females was 54.4, 51.1 and 20.5 %, and for males was 62.2, 57.2 y 23.3 %, respectively. However, no significant differences were found between insect sex. . A field experiment was developed to test virulence of these three isolates. Mortality attained on field conditions were lower than those obtained on controlled (lab) conditions. I discuss the importance of abiotic factors for expressing virulence, development, and sporulation of entomopathogenic fungi. At field *B. bassiana* isolates were able to show higher virulence than the *M. anisopliae* isolate.

DEDICATORIA

A mis padres

Margarita Cruz Rodríguez y Gerardo Orduño Ramos, por su amor incondicional, por su confianza, apoyo y consejos. A ellos, que con su interminable paciencia me han enseñado el valor de la vida y el respeto.

A mis hermanos

Andrés, Columba, Iván y Rafael, por sus consejos y gran apoyo

A los amigos

Imelda León García, Juan M. Vanegas Rico, Jorge Hernández López, José Reyes Juárez y David Arroyo Beristaín, por su apoyo y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional en sus instalaciones y con sus profesores.

A la Fundación Produce Morelos A. C., por haber apoyado con en el recurso económico para la realización de mi investigación.

Al Consejo Municipal de Nopaleras de Tlalnepantla A. C. (COMUNOTLA), por su apoyo con la colecta de insectos.

Al Dr. Esteban Rodríguez Leyva por creer en mí y por apoyarme. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por enseñarme que todo se puede y que las dificultades son tan sólo retos.

Al Dr. Ariel Guzmán Franco por su amable disponibilidad para escuchar y aclarar dudas, por sus consejos para mejorar el trabajo y por el tiempo dedicado a enseñarme a trabajar con hongos entomopatógenos.

A la Dra. Raquel Alatorre por sus valiosos consejos y observaciones. Agradezco el que me haya regalado un poco de su tiempo para escuchar mis inquietudes.

Al M.C. Jorge M. Valdez Carrasco por su tiempo, asesoría y las facilidades otorgadas durante la Investigación.

Al Dr. José López Collado, por su asesoría y disponibilidad durante la investigación.

Al Dr. Gustavo Mora por sus valiosas observaciones y consejos para mejorar el trabajo.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez por las facilidades otorgadas durante la investigación y por sus valiosos comentarios.

A los amigos, Imelda León García, Juan M. Vanegas Rico, Jorge Hernández López, Talina Olivia Martínez, Martín Palomares, Erika Muñiz por su apoyo y confianza. Quienes hicieron que mi estancia en el CP fuera una experiencia importante en mi vida.

A los compañeros de Patología (Johny, Carolina, Fabián, Víctor, Santo, Lupita y Gabriela).

Al laboratorio de Manejo de la Resistencia y muy especialmente al Sr. Lauro Hernández y al Sr. Rubén Hernández Gamero, por todo el apoyo y las enseñanzas brindadas.

A los compañeros de Control Biológico (Iliana, Patricia y Alfonso).

A los compañeros de fruticultura (Altagracia, Rubén, Luis y Edgardo).

CONTENIDO

	PÁG.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1. Hongos entomopatógenos	5
1.1.1. Biología de <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	6
1.1.1.1 <i>Beauveria bassiana</i>	6
1.1.1.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	7
1.1.2. Rango de huéspedes	8
1.1.3. Efecto de factores bióticos y abióticos en la biología de los hongos	9
1.1.3.1. Factores abióticos	9
1.1.3.1.1. Temperatura	9
1.1.3.1.2. Humedad relativa	10
1.1.3.1.3. Precipitación, radiación solar y suelo	10

1.1.3.2.	Factores bióticos (Insecto huésped)	11
1.1.3.2.1.	Estrés	11
1.1.3.2.1.1.	Nutrición	12
1.1.3.2.1.2.	Edad	12
1.1.3.2.2.	Estado de desarrollo del insecto	13
1.1.3.2.3.	Sexo del insecto	13
1.1.3.2.4.	Densidad de población	13
1.2.	Producción de nopal verdura <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller en México	14
1.2.1.	Plagas del nopal (<i>Opuntia</i> spp.)	16
1.2.1.1.	El picudo del nopal <i>Metamasius spinolae</i>	17
1.2.1.1.1.	Métodos de control de <i>M. spinolae</i>	18
CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO <i>IN VITRO</i>		
DE AISLAMIENTOS DE <i>Beauveria bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i>		
2.1.	INTRODUCCIÓN	20
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.2.1.	Aislamientos	21
2.2.2.	Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos infectados en campo	22
2.2.3.	Conservación de aislamientos	23
2.2.4.	Cultivo de hongos	23
2.2.4.1.	Obtención de inóculo	23

2.2.5. Crecimiento de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> a diferentes	
temperaturas	24
2.2.5.1. Diseño experimental	25
2.2.5.2. Análisis estadístico	25
2.2.5.3. Estimación del área de crecimiento micelial	26
2.3. RESULTADOS	27
2.3.1. Características de las colonias	27
2.3.2. Crecimiento de aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> e	
interacción con temperatura	27
2.4 DISCUSIÓN	31
CAPÍTULO 3. VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE <i>Beauveria bassiana</i> Y	
<i>Metarhizium anisopliae</i> HACIA ADULTOS DEL PICUDO DEL NOPAL Y SU	
INTERACCIÓN CON EL SEXO DE LOS INSECTOS	
3.1. INTRODUCCIÓN	33
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.2.1. Adultos de picudo del nopal <i>Metamasius spinolae</i>	34
3.2.2. Aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> e	
inóculo	35
3.2.3 Estimación de la virulencia de aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M.</i>	
<i>anisopliae</i> hacia adultos de picudo del nopal	35
3.2.3.1. Inoculación	35
3.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico	36

3.2.5.	Efecto del sexo de adultos del picudo del nopal en la virulencia de aislamientos seleccionados de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	37
3.2.5.1.	Diseño experimental y análisis estadístico	38
3.3.	RESULTADOS	38
3.3.1.	Virulencia de aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> hacia adultos de picudo del nopal	38
3.3.1. 1.	Diferencia entre virulencia de especies de hongos entomopatógenos	38
3.3.1.2.	Efecto de los diferentes aislamientos de cada especie de hongo entomopatógeno	40
3.3.2	Mortalidad de aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre individuos de diferente sexo de adultos de picudo del nopal	42
3.3.2.1.	Diferencia entre virulencia de especies de hongos entomopatógenos	42
3.4.	DISCUSIÓN	45
3.4.1	Patogenicidad y selección de aislamientos infectivos contra picudo del nopal	45
3.4.2	Efecto de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en la sobrevivencia de hembras y machos de picudo del nopal	49
CAPÍTULO 4. VIRULENCIA DE <i>Beauveria Bassiana</i> Y <i>Metarhizium anisopliae</i> SOBRE ADULTOS DE PICUDO DEL NOPAL EN CONDICIONES DE CAMPO		52
4.1.	INTRODUCCIÓN	52
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	53

4.2.1.	Obtención del inóculo	53
4.2.2.	Tratamientos y métodos de inoculación	54
4.2.3.	Establecimiento del experimento en campo	54
4.2.4.	Diseño experimental y análisis estadístico	55
4.3.	RESULTADOS	56
4.3.1.	Evaluación de insectos en el control positivo	57
4.3.2.	Evaluación de insectos bajo condiciones de campo	59
4.4.	DISCUSIÓN	60
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES		64
5.1.	CONCLUSIONES	64
5.2.	RECOMENDACIONES	66
CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA		68

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> empleados en el experimento de crecimiento a diferentes temperaturas.	21
Figura 1. Crecimiento micelial promedio de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> (Bb, B4-P, Bb4, Bb107,GHA, Bb88), y <i>M. anisopliae</i> (ETL y MaE) a cinco temperaturas a 20 d.	28
Figura 2. Crecimiento promedio de los aislamientos <i>B. bassiana</i> (Bb, B4-P, Bb4, Bb107,GHA, Bb88), y <i>M. anisopliae</i> (ETL y MaE), (a) 15 °C, (b) 20 °C, (c) 25 °C, (d) 30 °C y (e) 35 °C.	30
Figura 3. Niveles de virulencia promediados de aislamientos de <i>B. bassiana</i>  , <i>M. anisopliae</i>  y testigo  sobre adultos del picudo del nopal obtenidos en las tres repeticiones.	39
Figura 4. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal causada por los aislamientos de <i>B. bassiana</i> en condiciones de 25 ± 1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41 d. Cada figura (a,b,c) representan un experimento.	41
Figura 5. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal causada por dos aislamientos de <i>M. anisopliae</i> en condiciones de 25 ± 1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41 d. Cada figura (a, b, c) representa un experimento.	42
Figura 6. Virulencia de aislamientos de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i> sobre adultos del picudo del nopal a 25 ± 1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8.	43

Figura 7. Mortalidad de picudo del nopal 41 días posteriores a la inoculación para los diferentes tratamientos (25 ± 1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8)	44
Figura 8. Mortalidad en adultos de picudos del nopal de diferente sexo inoculados con <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> bajo condiciones controladas (25 ± 1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41d).	44
Figura 9. Mortalidad de adultos del picudo del nopal causada por aislamientos de los hongos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> a los 90 d bajo condiciones controladas (25±1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O) y de campo (17.4±1 °C y 62% HR).	57
Figura 10. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal con las especies de hongos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> , a los 90 d , evaluados a 25±1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O.	58
Figura 11. Virulencia de los aislamientos MaE (<i>M. anisopliae</i>), y Bb107 y GHA (<i>B. bassiana</i>) a los 90 d sobre adultos del picudo del nopal bajo condiciones controladas (25±1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O).	59
Figura 12. Virulencia de los aislamientos MaE (<i>M. anisopliae</i>) Bb107 y GHA (<i>B. bassiana</i>) sobre adultos del picudo del nopal bajo condiciones de campo (17.4 °C y 62.13% HR) a 90 días posteriores a la inoculación.	60

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las cactáceas representan uno de los recursos bióticos más importantes en zonas áridas y semiáridas del mundo por su capacidad de retención de agua, transformación a biomasa y por su potencial de aprovechamiento (Mena-Covarrubias, 2004). Existen especies que se usan como plantas de ornato, forraje, fruto, verdura e incluso como huéspedes de insectos para producir colorantes naturales (Granados y Castañeda, 1991; Pimienta, 1997). Algunas otras especies pueden usarse en la industria cosmética, alimenticia e incluso en la farmacéutica (Reyes-Agüero *et al.*, 2004; Sáenz-Hernández *et al.*, 2002). Dentro de las cactáceas, el nopal (*Opuntia* spp.) es uno de los géneros que más se aprovechan en México. En el caso particular del nopal para verdura, *Opuntia ficus-indica* L., se cultivan alrededor de 11,950 ha, lo que convierte a nuestro país en el principal productor y consumidor de esta hortaliza en el mundo. Esta superficie se distribuye, principalmente, en el sur del Distrito Federal y los estados de Morelos y México (SIAP/SAGARPA, 2008). Alrededor del 97% de la producción de nopal verdura se consume en fresco y el 3% restante se utiliza como materia prima por las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos (Musalem, 2001).

Por la tradición de consumo del nopal verdura y la superficie que se destina a su producción en México, es un cultivo importante desde el punto de vista económico, social y ambiental, y es importante conocer los factores que afectan su producción. Dentro de estos, los factores bióticos como plagas y enfermedades son de los más importantes. En México se han descrito al menos 11 especies de

insectos como plagas del nopal (*O. ficus-indica*), siendo el picudo del nopal, *Metamasius (=Cactophagus) spinolae* Gyllenhal, uno de los principales (Mann, 1969; Granados y Castañeda, 1991; Badii y Flores, 2001). El adulto causa un daño directo al alimentarse de los bordes de los cladodios inmaduros. Las larvas se alimentan de los tejidos internos ocasionando galerías en los cladodios o pencas que proporcionan soporte a la planta; en casos extremos esto puede provocar el derribo de la planta. En los puntos donde inicia el ataque de las larvas se observa una acumulación de secreciones en las pencas, misma que pudiera ser punto de entrada a patógenos (Muñiz, 1998). El ataque de este insecto disminuye la producción y, en casos extremos, la muerte de la planta (Mann, 1969; Granados y Castañeda, 1991; Muñiz, 1998). La distribución de este insecto abarca desde el suroeste de EUA hasta Centroamérica. En México, este insecto se encuentra presente en todas las regiones con *Opuntia* spp. y *Nopalea* spp. (Mann, 1969; Méndez, 1994) y es particularmente abundante en el centro del país en el D.F., estados de México y Morelos, que es la principal zona productora de nopal verdura (SIAP/SAGARPA, 2008).

A pesar de ser una plaga endémica en México, la investigación relacionada con las estrategias de manejo no ha sido suficiente. Por mencionar un aspecto importante, no existen plaguicidas autorizados para su uso en nopal verdura en México (CICOPLAFEST, 2004). No obstante, eso no influye para que el control del picudo del nopal se realice, en muchas ocasiones, con insecticidas organosintéticos (organofosforados, carbamatos, y piretroides), que usados inadecuadamente

pueden provocar daños al productor, al consumidor y al ambiente (Badii y Flores, 2001, Gallegos *et al.*, 2006; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008b).

El empleo de hongos entomopatógenos, usados como una alternativa de control en el manejo integrado, puede disminuir los problemas asociados con insecticidas convencionales (Butt *et al.*, 2001). Estos microorganismos pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula, y ejercer múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el huésped desarrolle resistencia (Tanada y Kaya, 1993). Estos hongos se han evaluado en varias especies de curculiónidos (Zimmermann, 1993; De la Rosa *et al.*, 1997; Pava-Ripoll, *et al.*, 2008), pero existe poca información relacionada con estudios del efecto que pueden tener factores bióticos y abióticos con la interacción hongo entomopatógeno-picudo del nopal. Esta información puede permitir desarrollar estrategias de uso de estos microorganismos en el campo. Debido a la importancia del picudo del nopal como plaga del nopal verdura en el país, y a la necesidad de información relacionada con la interacción hongo entomopatógeno-picudo del nopal, la presente investigación estudió el efecto que pueden tener algunos factores, tanto bióticos como abióticos, en el desarrollo de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* Sorokin, así como en los niveles de infección ocasionados en adultos del picudo del nopal. Esto se logró mediante el cumplimiento de los siguientes objetivos particulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento *in vitro* de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.
- Estimar la virulencia de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre adultos del picudo del nopal, y conocer su efecto sobre individuos de diferente sexo de esta especie.
- Evaluar el potencial de control de aislamientos sobre poblaciones del picudo del nopal en condiciones de campo.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Hongos entomopatógenos

El empleo de hongos entomopatógenos en el control de plagas tiene potencial por su especificidad (St. Leger y Roberts, 1997; Goettel *et al.*, 2005), inocuidad, y alta virulencia (McCoy, 1990). Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos con más de 700 especies (Goettel *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006) dentro de 90 géneros que pueden infectar insectos (Goettel *et al.*, 2005). Entre los más importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Cordycepioideus*, *Cordyceps*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Furia*, *Massopora*, *Stronwellsea*, *Pandora*, *Tarichium* y *Zoophthor*. La mayoría de estos hongos pertenecen a las divisiones Ascomycota y Zygomycota (Goettel *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006).

Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los órdenes de insectos; por ejemplo Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Tanada y Kaya, 1993; Humber, 1997). En algunos órdenes los estados de ninfa o larva son más susceptibles que los adultos, en otros ocurre lo contrario. Los estados de huevo y pupa frecuentemente no son infectados por estos hongos (Tanada y Kaya, 1993).

1.1.1. Biología de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

El ciclo de vida de *B. bassiana* y *M. anisopliae* inicia con la infección de los insectos, cuando los conidios viables son retenidos por contacto en el integumento del insecto, luego germinan favorecidos por una humedad relativa alta, aproximadamente 70 % durante 14 h (Khachatourians, 1996). Después tiene lugar la formación del tubo germinativo que rastrea y reconoce la superficie del insecto, para localizar sitios receptores por donde la hifa penetra la cutícula (Wessels, 1999). Para esto, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas importantes que rompen la pared cuticular y facilitan la invasión del hongo como son exoproteasas, endoproteasas, esterases, lipasas, quitinasas y quitobiasas (St. Leger, 1993; Hajek, 1997). Una vez que alcanza el hemocelo del insecto, el hongo crece formando cuerpos hifales o blastosporas, que invaden todos los órganos del huésped hasta convertirse en una masa micelial firme. Por último, las hifas emergen desde el interior del integumento del cadáver del insecto a la superficie e inician la formación de esporas cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables (Tanada y Kaya, 1993; Hajek y St. Leger, 1994).

1.1.1.1 *Beauveria bassiana*

Conocida comúnmente como muscardina blanca, *B. bassiana* fue la primera enfermedad descubierta en insectos que era causada por microorganismos (Tanada y Kaya, 1993). Es un hongo imperfecto de la división Ascomycota, clase

Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae (Roy *et al.*, 2006). La colonia presenta una apariencia aterciopelada o polvorienta de color blanco. A medida que pasa el tiempo se puede volver de color amarillento. Los conidióforos tienen 1-2 μm de diámetro, provenientes de hifas septadas de las que nacen células conidiógenas. Estas células conidiógenas se encuentran formando grupos compactos grandes y a veces solitarios, en forma de botella de 3 a 6 μm de longitud y 3 a 5 μm de diámetro. En ciertos casos estas células se ramifican formando células secundarias. Al final de las células se forma un raquis que sostiene a los conidios. El raquis tiene una longitud de 20 μm y 1 μm de diámetro, es denticulado y sostiene una espora en cada denticulo. Conidios hialinos, globosos a ovals de 2 a 3 x 2 a 2.3 μm que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Tanada y Kaya, 1993; Humbert, 1997; Cañedo, 2004).

1.1.1.2. *Metarhizium anisopliae*

Conocido como muscardina verde, *M. anisopliae* es un hongo imperfecto de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae (Roy *et al.*, 2006). Fue uno de los primeros microorganismos que se usaron para el control de insectos plaga (Tanada y Kaya, 1993). Entre las características morfológicas destacan la coloración de la colonia, generalmente olivácea, amarillenta o verde oscura, dependiendo del aislamiento. El conidióforo es irregular y ramificado con dos a tres ramas en cada septa de 4 a 13.5 μm de longitud x 1.4 a 2.6 μm de diámetro. Fiálides cilíndricas en forma de clava,

adelgazados en el ápice, miden 6.3 a 13.5 μm de longitud y 1.8 a 3.6 μm de diámetro. Conidios unicelulares, cilíndricos y truncados, formadas en cadenas muy largas, hialinos a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μm de longitud x 1.5 a 3.5 μm de diámetro (Tanada y Kaya, 1993; Humbert, 1997; Cañedo, 2004).

1.1.2. Rango de huéspedes

B. bassiana y *M. anisopliae* infectan varios órdenes de insectos, pero algunos aislamientos tienen un alto grado de especificidad (Inglis *et al.*, 2001). *B. bassiana* tiene un amplio rango de huéspedes, lo que le permite adaptarse a casi todo tipo de condiciones (Ferron, 1978; Pucheta *et al.*, 2006). Los principales huéspedes de este hongo son lepidópteros, coleópteros y homópteros. Algunas especies de insectos de importancia económica susceptibles a este hongo son: barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner), palomilla del manzano (*Cydia pomonella* [L.]), escarabajo japonés (*Popillia japonica* [Serville]), escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), chinche blisus (*Blissus leucopterus* Say) y la palomilla de la col (*Pieris brassicae* [L.]) (Tanada y Kaya, 1993). *Metarhizium anisopliae* infecta a más de 200 especies de insectos, dentro de los órdenes Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera y Coleoptera, donde se reportan la mayor cantidad de especies 134 especies; este último orden presenta un amplio rango de hospederos, principalmente en las familias Curculionidae, Elateridae y Escarabaeidae (Zimmermann, 1993).

1.1.3. Efecto de factores bióticos y abióticos en la biología de los hongos

El ambiente afecta la biología de los hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2001; Pucheta *et al.*, 2006). Algunos factores abióticos que afectan la viabilidad y persistencia son la temperatura, humedad relativa, lluvia y radiación ultravioleta (Ignoffo, 1992; Tanada y Kaya, 1993). El huésped es un factor biótico importante que afecta la propagación, dispersión y persistencia, mismo que se relaciona con los nutrimentos presentes, y la etapa de desarrollo más susceptible a los hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2001).

1.1.3.1. Factores abióticos

1.1.3.1.1. Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la germinación, crecimiento vegetativo (Rath, 2000; Inglis *et al.*, 2001) y proceso de infección en el insecto, así como en la persistencia en campo (Ouedraogo *et al.*, 1997). La temperatura óptima para la eficiencia con agentes microbianos fúngicos en campo está entre 20 y 30 °C (Roberts y Campbell, 1977; McCoy *et al.*, 1988). También se ha reportado que la temperatura óptima para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de los hongos Hyphomycetes está entre 20 y 25 °C (Goettel e Inglis, 1997; Inglis *et al.*, 2001). La temperatura requerida varía con la especie, aislamiento y nicho ecológico del hongo (Tanada y Kaya, 1993). Temperaturas muy bajas o altas afectan la estabilidad de la respuesta de los hongos

entomopatógenos. Sin embargo, la infección puede ocurrir en un rango de temperatura entre 15 y 30 °C (Inglis *et al.*, 2001).

1.1.3.1.2. Humedad relativa

En general los hongos requieren alta humedad relativa para la germinación, infección y subsecuente esporulación en el cadáver del insecto (Luz y Fargues, 1998; Sivasankaran *et al.*, 1998), así como para su estabilidad y sobrevivencia. La humedad es el segundo factor ambiental más importante relacionado con la formación de epizootias en poblaciones de insectos y muerte de los mismos (Fuxa y Tanada, 1987), así como determinante en su desarrollo y propagación (Rath, 2000). El incremento de la humedad relativa se correlaciona, de manera positiva, con el porcentaje de mortalidad de muchos insectos (Luz y Fargues, 1999). La humedad relativa elevada (90 %) ayuda a la germinación de la espora e induce a la esporulación (Tanada y Kaya, 1993), por lo tanto el potencial epizoótico de los hongos depende también de la producción de conidios en el cadáver del insecto (Luz y Fargues, 1998).

1.1.3.1.3. Precipitación, radiación solar y suelo

La lluvia juega un papel importante en la dispersión de conidios (Inglis *et al.*, 2001); que le permite al hongo entomopatógeno dispersarse (Inyang *et al.*, 2000). Por otra parte, la radiación solar es probablemente el factor ambiental más

destrutivo que afectan la persistencia de los entomopatógenos, siendo su espectro dañino entre 290 y 315 nm (Inglis *et al.*, 2001). Puede estimular o dañar el desarrollo de los hongos, dependiendo de la especie, su etapa de desarrollo y el tipo y cantidad de radiación (Moore *et al.* 1993). Se estima que el período de vida media para conidios expuestos a radiación solar directa varía de una a 96 h (Ignoffo, 1992).

La persistencia y eficacia de los hongos entomopatógenos es afectado por el tipo de suelo (textura, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica, pH), humedad y de la presencia de microflora (Inglis *et al.*, 2001).

1.1.3.2. Factores bióticos (Insecto huésped)

La relación que existe entre huésped-hongo entomopatógeno está influenciada por factores fisiológicos y morfológicos, entre ellos la densidad de población, comportamiento, edad, nutrición, lesiones causadas por agentes mecánicos, químicos, depredadores y parasitoides (Inglis *et al.*, 2001).

1.1.3.2.1. Estrés

En el control microbiano, los huéspedes sometidos a algún tipo de estrés son más susceptibles a los entomopatógenos (Phillip *et al.*, 1991). Entre los factores de estrés en los insectos que pueden predisponerlos a ser susceptibles a entomopatógenos están la nutrición, exposición a sustancias químicas, ambiente y

mecanismos fisiológicos como la respuesta inmunodepresiva (Sikorowski y Lawrence, 1994, Inglis *et al.*, 2001).

1.1.3.2.1.1. Nutrición

La nutrición es un factor importante que regula la susceptibilidad del insecto huésped al entomopatógeno (Urrutia *et al.*, 2006), una nutrición inadecuada a menudo incrementa la susceptibilidad del insecto (Ekesi *et al.*, 2000) que lo predispone a las infecciones microbianas (Sikorowski y Lawrence, 1994). La utilización de plantas con genotipos resistentes induce al estrés alimenticio y, por consecuencia, se puede aumentar la eficacia del entomopatógeno (Hare, 1992). Por otra parte, una buena nutrición puede disminuir la susceptibilidad del insecto hacia entomopatógenos (Ekesi *et al.*, 2000).

1.1.3.2.1.2. Edad

La edad se ha considerado como uno de los factores que determina la mortalidad (Sikorowski y Lawrence, 1994). Debido a lo anterior se ha reportado que existe una edad de maduración de la respuesta inmune (Boucias y Pendland, 1984). Debido a esto, los primeros ínstares de desarrollo de los insectos son más afectados por las infecciones causadas por los entomopatógenos.

1.1.3.2.2. Estado de desarrollo del insecto

No todas las etapas en el ciclo de vida de los insectos son igualmente susceptibles a infecciones causadas por entomopatógenos. En muchos de los casos los estados inmaduros son los más susceptibles a la infección (Feng *et al.*, 1985), o la frecuencia de infección es mayor en ninfas o larvas comparada con los adultos (Tanada y Kaya, 1993).

1.1.3.2.3. Sexo del insecto

El sexo de los insectos puede jugar un papel en la respuesta a entomopatógenos en ensayos de laboratorio. En algunos casos, la diferencia de la respuesta es significativa dependiendo del sexo pero se desconoce la causa (Stadler *et al.*, 1990). Se ha mencionado que en los machos son los más susceptibles a insecticidas químicos que las hembras debido a su tasa de asimilación y metabolismo (Busvine, 1971).

1.1.3.2.4. Densidad de población

Tiene importancia en la epizootiología de la enfermedad. Cuando la densidad de la población aumenta, hay una probabilidad mayor de que el insecto tenga contacto con el patógeno a través de individuos infectados o directamente con el patógeno (Inglis *et al.*, 2001). La competencia por recursos puede ser un factor de estrés en sí mismo que favorece la susceptibilidad a determinados patógenos y las

epizootias; existen muchos ejemplos en las crías masivas de insectos (Steinhaus, 1958; Sikorowski y Lawrence, 1994).

1.2. Producción de nopal verdura *Opuntia ficus indica* (L.) Miller en México

El género *Opuntia* es uno de los más importantes de la familia Cactaceae, incluye a la especie *O. ficus-indica* de gran importancia a nivel mundial por el uso integral que se puede hacer de él (Reyes Agüero *et al.*, 2004), se puede aprovechar en diversos ámbitos, como en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmetológica (Corrales y Flores, 2003; Flores *et al.*, 2006). *Opuntia ficus-indica* tiene pocas espinas, posee gran cantidad de agua y poca fibra (Barrientos, 1965), características importantes para su aprovechamiento y cultivo en México. Dentro de esta especie para la producción de nopal verdura destacan las variedades Atlixco, Milpa Alta, Copena V1, Copena F1, Moradilla, Blanco, Blanco con espinas, Negro, Polotitlán, Manso, Oaxaca y Oreja de elefante (Corrales y Flores, 2003).

México cuenta con una superficie de 11,904 ha sembradas con nopal verdura (*O. ficus-indica*). Las principales entidades productoras son: Distrito Federal (4,337 ha), Morelos (2,725 ha), Estado de México (736 ha), Baja California Norte (706 ha) y Tamaulipas (625 ha) (SIAP-SAGARPA, 2009). Pero sólo Milpa Alta, en el D. F., y Tlalnepantla, en el estado de Morelos, proporcionan alrededor del 85 % de la producción nacional de nopal verdura (SIAP-SAGARPA, 2009), especialmente de la variedad Milpa Alta (Flores y Olvera, 1995).

A pesar de tener menos superficie cultivada que Milpa Alta, en el D.F., el municipio de Tlalnepantla, Morelos, tiene el mayor rendimiento a nivel nacional (SIAP-SAGARPA, 2009). Esto es favorecido por el clima templado y subhúmedo presente en esa región. En esta localidad, 90 % de la población tiene al nopal como cultivo primario porque genera un alto nivel de ingresos principalmente en otoño e invierno, cuando escasea en otras entidades productoras (Quesada-Salinas *et al.*, 2006).

El nopal en México se desarrolla en tres sistemas de producción, a) nopaleras silvestres, b) huertos familiares y c) plantaciones comerciales (Corrales y Flores, 2003). Según los mismos autores, de este último se incluyen un sistema tradicional intensivo y un sistema super intensivo (microtúnel).

Sistema tradicional intensivo. El nopal se cultiva en hileras de 1 a 1.5 m de separación; las pencas se siembran separadas por 0.25 a 0.50 m y las plantas se dejan crecer entre 1 y 1.5 m de altura. La densidad de plantas por hectárea varía de 15,000 a 40,000 , pero la más común es de 27,000.

Sistema de microtúnel. Es un sistema super intensivo que ha tenido un desarrollo importante para producir nopal en los meses de invierno. Consiste en camas de 1.5 a 2.0 m de ancho con calles entre camas de 1 a 1.5 m, el largo varía de 40 a 47 m. Las pencas se plantan una junto a otra con una separación de 5 cm y las hileras tienen una distancia de 20 a 30 cm entre sí. La densidad de siembra varía de 120,000 a 160,000 plantas por hectárea. En este sistema los nopales se obtienen de los brotes que emite la penca que se planta, aunque a veces se deja crecer una o dos pencas sobre ella y sobre éstas se producen los brotes. Se coloca

plástico sobre las camas durante los meses de invierno para disminuir el riesgo de daños por bajas temperaturas y se induce la producción mediante fertilización orgánica, química y riego. Este sistema permite tener alta producción por unidad de superficie y cosechar en temporadas de precios altos.

1.2.1. Plagas del nopal (*Opuntia* spp.)

Las nopales son atacados por diversos insectos plaga, en algunos lugares estos se pueden convertir en uno de los principales factores bióticos que afectan a las plantas, disminuyen la cantidad y la calidad de la cosecha así como la duración de la vida productiva de las plantaciones. Las siguientes especies son consideradas como las plagas más frecuentes en el nopal tunero: picudo barrenador (*Metamasius spinolae* Gyllenhal), picudo de las espinas (*Cylindrocopturus birradiatus* Champion), chinche gris (*Chelinidea tabulatus* Burmeister), chinche roja (*Hesperolabops gelastops* Kirkaldy y *H. nigriceps* (Ruiz-Machuca *et al.*, 2009), gusano cebrá (*Olycella nephelepasa* Dyar), gusano blanco (*Laniifera cyclades* Druce), diabrotica (*Diabrotica* sp.), gallina ciega (*Phyllophaga* sp.), cochinilla silvestre (*Dactylopius indicus* Green), trips (*Sericothrips* (= *Neohydatothrips*) *opuntiae* Hood), y barrenador del nopal (*Moneilema variolaris* Thompson) (Badii y Flores, 2001; Zimmermann y Granata, 2002; Mena–Covarrubias, 2004). Para el área de Milpa Alta, se reportan como plagas importantes a la cochinilla silvestre (*D. indicus*), chinche roja (*Hesperolabops nigriceps* Palomares-Pérez *et al.* 2010), chinche gris (*Chelinidea*

tabulatus), picudo de nopal (*Metamasius spinolae*), gusano cebra (*Olycella nephelepasa*) y gusano telarañero (*Platynota* sp.) (Sánchez, 2002; Jarquin, 2007)

Tlalnepantla, en el norte del estado de Morelos, es una de las principales regiones productoras de nopal verdura donde se presentan plagas y enfermedades, probablemente debido a que la humedad relativa es alta y no hay bajas temperaturas en la época invernal (Corrales y Flores, 2003). Estas condiciones dan oportunidad a la ocurrencia de plagas que son problemas en diferentes momentos del cultivo. Entre los artrópodos de mayor importancia en esta región productora se encuentra la cochinilla silvestre, *D. opuntiae* (Vanegas-Rico *et al.*, 2008), ácaros del nopal, *Tetranychus merganser* (Lomeli-Flores *et al.*, 2008) y picudo del nopal, *M. spinolae* (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008b).

1.2.1.1. El picudo del nopal *Metamasius spinolae*

M. spinolae pertenece a la familia Curculionidae (Mann, 1969; Muñiz, 1998), se encuentra distribuido desde Chihuahua y Tamaulipas hasta Michoacán y Veracruz, con mayor abundancia en el centro del país y el Altiplano (Mann, 1969; Méndez, 1994). Es decir, prácticamente en todo el país donde hay superficies importantes de *Opuntia*. El picudo del nopal es una de las principales plagas que afectan a esta planta y disminuye la cantidad y calidad de la producción comercial del cultivo (Mann, 1969; Mena-Covarrubias, 2004; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008b). Es un insecto de color negro con 4 manchas rojas sobre los élitros y 2 más sobre la parte anterior del protórax, de tamaño relativamente grande (2.5 cm

aproximadamente). Este insecto sólo tiene una generación al año, tiene poca movilidad, y es un fitófago específico de *Opuntia* (Mann, 1969). Las larvas se alimentan del tejido interno de las pencas y forman galerías en los ejes principales (Mann, 1969); *M. spinolae* presenta 5 estadios larvales con una duración promedio de 5.2 meses en condiciones de laboratorio (Hernández-Olmos *et al.*, 2009). Los adultos se alimentan de los cladodios inmaduros ocasionando daños considerables en las plantaciones comerciales (Mann, 1969; Granados y Castañeda, 1991; Aguilar, 1993).

1.2.1.1.1. Métodos de control de *M. spinolae*

Control Cultural. Debido a su lento desplazamiento, el adulto se puede recolectar de las pencas durante los meses de mayo a septiembre y destruir mecánicamente. Las larvas se pueden extraer de las pencas afectadas que se reconocen por la secreción que fluye del punto dañado (Borrego y Burgos, 1986; Badii y Flores 2001). Durante las podas de saneamiento se deben eliminar las pencas demasiado dañadas y buscar a la larva para eliminarla. Además, resulta importante la selección de las pencas cuando se establece la huerta. Las pencas deberán estar libres de plagas y enfermedades. Plantaciones infestadas que no tiene manejo deben eliminarse de la zona.

Control Biológico. Se ha mencionado la existencia de un pequeño coleóptero parasitoide de pupas, *Bothrideres cactopagi* en la Región de Milpa Alta (Mann, 1969; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008a), pero se carece de mayores estudios acerca

de este insecto. También se lograron infecciones a nivel de laboratorio con nematodos entomopatógenos de la especie *Heterorhabditis indica* (Cortés-Madrigal y Rodríguez-Leyva, 2008). Existen investigaciones donde se evaluó a algunos hongos entomopatógenos en laboratorio (Tafoya *et al.* 2003; Orduño-Cruz *et al.*, 2008, 2009), y el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal recomienda el uso de *Bauveria bassiana*, pero no se proporciona información que respalde su eficiencia.

Control Químico. Las recomendaciones de control de plagas se manejan de manera personal, en virtud de que cada productor tiene una apreciación diferente de la magnitud del daño en la producción de nopal verdura. Se ha mencionado que para el control de este picudo, algunos productores utilizan los insecticidas azinfos metílico, endosulfan, malatión, y paratión metílico (Badii y Flores, 2001). Con excepción de *Bacillus thuringiensis*, no hay plaguicidas autorizados para su uso en nopal verdura de acuerdo con la normatividad nacional (CICOPLAFEST, 2004), lo cual resalta la importancia de investigar a hongos entomopatógenos y su relación con el picudo del nopal, para generar información que pueda servir de base para el desarrollo de estrategias de manejo microbiano de esta plaga.

CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*

2.1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos constituyen uno de los grupos de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas (Hajek y Leger, 1994). Entre los más importantes están *B. bassiana* y *M. anisopliae*, mismos que han tenido éxito por tener un amplio rango de huéspedes (Tanada y Kaya, 1993; Pucheta, *et al.*, 2006). Aún así, la temperatura es uno de los principales factores abióticos que afectan la germinación de los conidios (Rath, 2000; Inglis *et al.*, 2001), crecimiento vegetativo (Shimazu, 2004), proceso de infección (Roberts y Campbell, 1977; McCoy *et al.*, 1988;) y muerte del hospedante (Ignoffo, 1992), así como también de su persistencia en campo (Tanada y Kaya, 1993; Inglis *et al.*, 2001). La temperatura para el desarrollo óptimo de hongos entomopatógenos está entre 20 y 25 °C según Inglis *et al.* (2001), pero la respuesta varía considerablemente entre aislamientos y especies, con una temperatura óptima que va de 20 a 32 °C (Fargues *et al.*, 1992; Ouedrago *et al.*, 1997).

Debido a que diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos pudieran tolerar diferentes condiciones de temperatura, crecer y desarrollarse de diferente forma, el proceso de selección de aislamientos con potencial para el control de plagas debe considerar el efecto de la temperatura en el desarrollo de los aislamientos. Los experimentos *in vitro* permiten estudiar el efecto de la temperatura sobre diferentes aislamientos. Seleccionar aislamientos con base en

su desarrollo a diferentes temperaturas puede ayudar a considerar su potencial de acuerdo con el tipo de clima donde eventualmente se empleará el hongo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el crecimiento *in vitro* de ocho aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* bajo cinco temperaturas constantes.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Aislamientos

Se utilizaron ocho aislamientos de hongos entomopatógenos: dos de *M. anisopliae* y seis de *B. bassiana* (Cuadro 1). Seis de ellos fueron proporcionados por el laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y dos se aislaron de adultos de picudo del nopal colectados en Tlalnepantla, Morelos, en la primavera del 2007.

Cuadro 1. Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* empleados en el experimento de crecimiento a diferentes temperaturas.

Aislamiento	Especie	Huésped	Origen
Bb4-P	<i>B. bassiana</i>	Aislado de picudo del nopal infectado de manera artificial en laboratorio	Infección artificial en laboratorio a partir del aislamiento Bb4
Bb	<i>B. bassiana</i>	Picudo del nopal (<i>M. spinolae</i>)	Tlalnepantla, Morelos, México
Bb4	<i>B. bassiana</i>	Broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>)	Ecuador
Bb88	<i>B. bassiana</i>	Broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>)	Costa de Oaxaca, Oaxaca, México

Bb107	<i>B. bassiana</i>	Producto comercial NOCON Cepa Col-P	Colima, México
GHA	<i>B. bassiana</i>	Producto comercial Mycotrol®	
ETL	<i>M. anisopliae</i>	Picudo del nopal (<i>M. spinolae</i>)	Tlalnepantla, Morelos, México
MaE	<i>M. anisopliae</i>	Gallina ciega	Jerécuaro, Guanajuato, México

2.2.2. Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos infectados en campo

Los aislamientos obtenidos de picudos del nopal infectados naturalmente en campo se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta por Goettlel e Inglis (1997). Ésta consistió en colocar el cadáver del insecto en alcohol al 70 % por 20 segundos para romper la tensión superficial, posteriormente se sumergió en hipoclorito de sodio al 5 % por dos minutos y se enjuagó con agua destilada estéril (ADE). El cadáver se colocó sobre papel filtro para eliminar el exceso de humedad, posteriormente se colocó sobre una superficie estéril para cortar una parte del abdomen el cual se dividió en cinco secciones que se colocaron en una placa de agar dextrosa sabouraud, ADS (Bioxon®). Las placas se incubaron a 25 °C en una cámara bioclimática Lab-Line® durante 15 días en completa oscuridad.

2.2.3. Conservación de aislamientos

La preservación de los aislamientos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Humber (1997) y se describe a continuación. Se cortaron círculos de 5 mm de diámetro de colonias de hongos con 15 días de edad cultivados en placas de ADS (Bioxon®). Los círculos se depositaron en crio-viales de 2 ml de volumen (CORNING®) conteniendo 1 ml de glicerol al 10 %, este último se utilizó como crio-protector. Los tubos se agitaron con la intención de cubrir el agar y los hongos completamente con el crio-protector. Posteriormente los crio-viales se transfirieron a un ultracongelador a -80 °C para su preservación.

2.2.4. Cultivo de hongos

2.2.4.1. Obtención de inóculo

Con el fin de uniformizar el material utilizado en el experimento, todos los aislamientos se sembraron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 20 ml de ADS e incubados bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.2.2. Dos semanas posteriores a la siembra, cuando se presentó esporulación abundante, los conidios de la placa de ADS se separaron del medio mediante una asa bacteriológica y se suspendieron en 20 ml de Tween 80 al 0.03 % contenido en un tubo de centrifuga de 50 ml. La suspensión se agitó durante 2 min para separar los conidios del micelio. Posteriormente, con el fin de remover micelio y remanentes de agar, se filtró mediante una capa doble de pañalina y se transfirió a otro tubo de 50 ml. Una vez separados los conidios, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml se realizó una

dilución 1 en 1000; para lograr esto, se colocó 999 μl de Tween 80 al 0.03 % más 1 μl de la suspensión inicial. La cuantificación de conidios de esta suspensión se realizó en una cámara de Neubauer. Una vez que se determinó el número de conidios en la suspensión inicial se realizaron diluciones para lograr la concentración de 1×10^7 conidios/ml, misma que se empleó para sembrar placas de 20 ml de ADS e incubadas a 25 °C durante 72 h.

2.2.5. Crecimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a diferentes temperaturas

El crecimiento de cada aislamiento se evaluó cada 24 h durante 20 d, a cinco temperaturas 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Para iniciar los experimentos el procedimiento para cada aislamiento y temperatura fue similar. Se consideró como unidad experimental una caja de Petri (90 mm de diámetro) con 15 ml de medio de cultivo ADS. De las colonias sembradas con 1×10^7 conidia/ml e incubada a 25 °C por 72 h (Sección 2.2.4.1), se tomó un círculo de 5 mm de diámetro extraído de la orilla de la colonia. El círculo se colocó en el centro de la caja Petri (90 mm de diámetro) de manera invertida procurando que el micelio del hongo quedara totalmente en contacto con el medio de cultivo. Cada caja se selló con Parafilm "M" (Pechiney Plastic Packaging®) y se incubó a la temperatura seleccionada en completa obscuridad en cámaras bioclimáticas; la temperatura se monitoreó constantemente con un termómetro digital RADIOSHACK®. El crecimiento micelial (mm^2) se estimó en base a la superficie ocupada por el hongo, mediante el procesamiento de

fotografías de las placas, utilizando el programa Image Tool, versión 3.0. Estas fotografías se tomaron cada 24 h durante 20 días o hasta que una de las colonias alcanzó el borde de la caja de Petri.

2.2.5.1. Diseño experimental

Tanto la asignación de temperaturas a cada incubadora, así como la distribución de cada unidad experimental dentro de cada incubadora fue bajo un diseño completamente al azar. La combinación aislamiento por temperatura fue repetida cuatro veces teniendo un total de 160 colonias en el experimento, y todo el experimento se repitió en dos ocasiones lo cual ayudó a reducir el error experimental.

2.2.5.2. Análisis estadístico

Se usó el paquete GENSTAT para Windows versión 9.0. Los análisis se realizaron con una estructura de covarianzas de ante-dependencia (Kenward, 1987), este método se basa en la adopción de una estructura de dependencia en la covarianza de las observaciones, se usa para comparar observaciones repetidas en el tiempo. Para esto se realizó la prueba de χ^2 con un nivel de significancia de 0.05.

Se estimó una estructura de orden usando la prueba ANT-ORDER; Esto describe la dependencia que un dato de medición tiene con datos de medición anteriores. La prueba realizada fue χ^2 con un nivel de significancia del 0.05, esto indica los tiempos en los cuales ocurre un efecto de tratamiento así como el efecto

total de tratamientos. En adición a los análisis de ante-dependencia, los resultados fueron analizados con una estructura de tratamiento factorial completamente al azar (aislamiento x temperatura) para investigar si existió un efecto principal de los tratamientos y su interacción con la temperatura, La estructura completamente al azar simplemente representó los componentes principales del diseño, cajas dentro de incubadora dentro de repetición.

2.2.5.3. Estimación del área de crecimiento micelial

Para calcular el área de crecimiento diario de cada aislamiento en la primera repetición (2.2.5), se tomaron fotografías con una cámara digital Sony Cybershot Dscs650 7.2 Mp por unidad experimental en cada fecha de muestreo. En la segunda repetición este mismo procedimiento se realizó con un escáner de luz transmitida HP Scanjet G4050 (2.2.5). Posteriormente, las imágenes digitales se procesaron con el programa Photoshop CS3, para delimitar el crecimiento de las colonias y después medir el área de cada colonia, esto último se realizó con el programa Image Tool, versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Características de las colonias

En general las colonias de los distintos aislamientos de *B. bassiana* fueron de apariencia algodonosa y blanca, a medida que pasaba el tiempo se tornaron amarillentas y de aspecto polvoso, en algunos aislamientos la forma de los bordes fue irregular. En el caso de *M. anisopliae* la colonia presentó crecimiento uniforme de color amarillento y con escasa esporulación.

2.3.2. Crecimiento de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* e interacción con temperatura

Antes de realizar el análisis de ante-dependencia, se determinó la estructura de orden (ANTORDER), de las 20 fechas analizadas y se encontró diferencia en cada fecha hasta el Orden 16. Esto significa que todos los datos dependían de 16 mediciones anteriores, e independientes de mediciones subsecuentes. El análisis de ante-dependencia fue realizado usando esta estructura de orden.

En general se encontraron diferencias en los patrones de crecimiento de los aislamientos ($\chi^2 = 1270.4$, $P < 0.001$). Las diferencias encontradas en el crecimiento de los aislamientos fueron detectadas en cada una de las fechas de evaluación ($P < 0.001$) se presentaron diferencias en crecimiento, lo que indica un efecto de los tratamientos en el tiempo (Figura 1). La interacción tratamiento x temperatura fue

significativo ($P < 0.001$) lo que quiere decir que el crecimiento está relacionado directamente con la temperatura ($\chi^2_8 = 1270.4$, $P < 0.001$) (Figura 1).

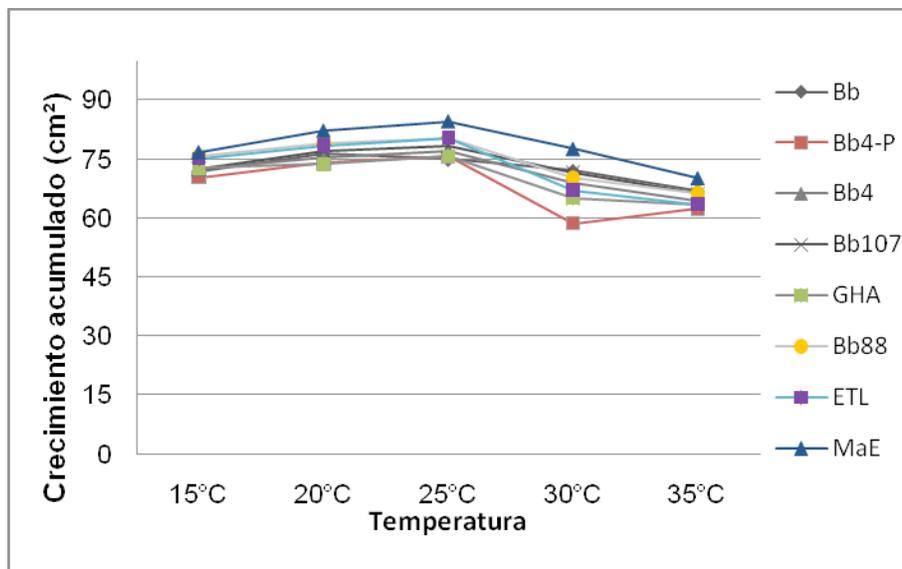


Figura 1. Crecimiento micelial promedio de los aislamientos de *B. bassiana* (Bb, B4-P, Bb4, Bb107, GHA, Bb88), y *M. anisopliae* (ETL y MaE) a cinco temperaturas a 20 d.

El análisis realizado de antedependencia, en donde se realizó la comparación de los tratamientos por cada temperatura, demostró diferencia significativa en la mayoría de las combinaciones.

Cuando los aislamientos fueron expuestos a 15 °C mostraron crecimiento uniforme, estadísticamente no existió diferencia entre aislamientos. Los aislamientos MaE, ETL y Bb88 respondieron mejor a esta temperatura, mientras que el aislamiento con el menor crecimiento fue el aislamiento Bb4-P (Figura 2a). Al final del experimento (20 días) ningún aislamiento logró esporular.

A 20 °C los aislamientos MaE (86.5 cm²), ETL (79.4 cm²), Bb88 (78.9 cm²) y Bb107 (76.8 cm²) presentaron el mayor crecimiento, mientras que el crecimiento mínimo lo presentó el aislamiento Bb4-P (73.92 cm²) (Figura 2b).

El mayor desarrollo en todos los aislamientos se logró a 25 °C. Los aislamientos MaE (84.6 cm²), ETL (80.3 cm²), Bb88 (80.3 cm²) y Bb107 (78.2 cm²) alcanzaron el máximo crecimiento y el aislamiento con el menor crecimiento fue Bb (74.88 cm²) (Figura 2c).

Cuando los aislamientos se expusieron a 30°C, el área mayor de crecimiento la alcanzaron los aislamientos MaE (71.8 cm²), Bb107 (71.5) seguida de Bb88 (70.15). Nuevamente, el aislamiento Bb4-P presentó el mínimo crecimiento (Figura 2d).

Cuando los aislamientos se desarrollaron a 35°C, el crecimiento decayó en relación a la temperatura de 25 °C. Sólo los aislamientos MaE, Bb, Bb88 y Bb107 lograron un crecimiento de 70.1, 66.87, 66.31 y 66.12 cm², respectivamente (Figura 2e). El micelio del aislamiento de MaE fue de color amarillento con escasa esporulación (Figura 2e).

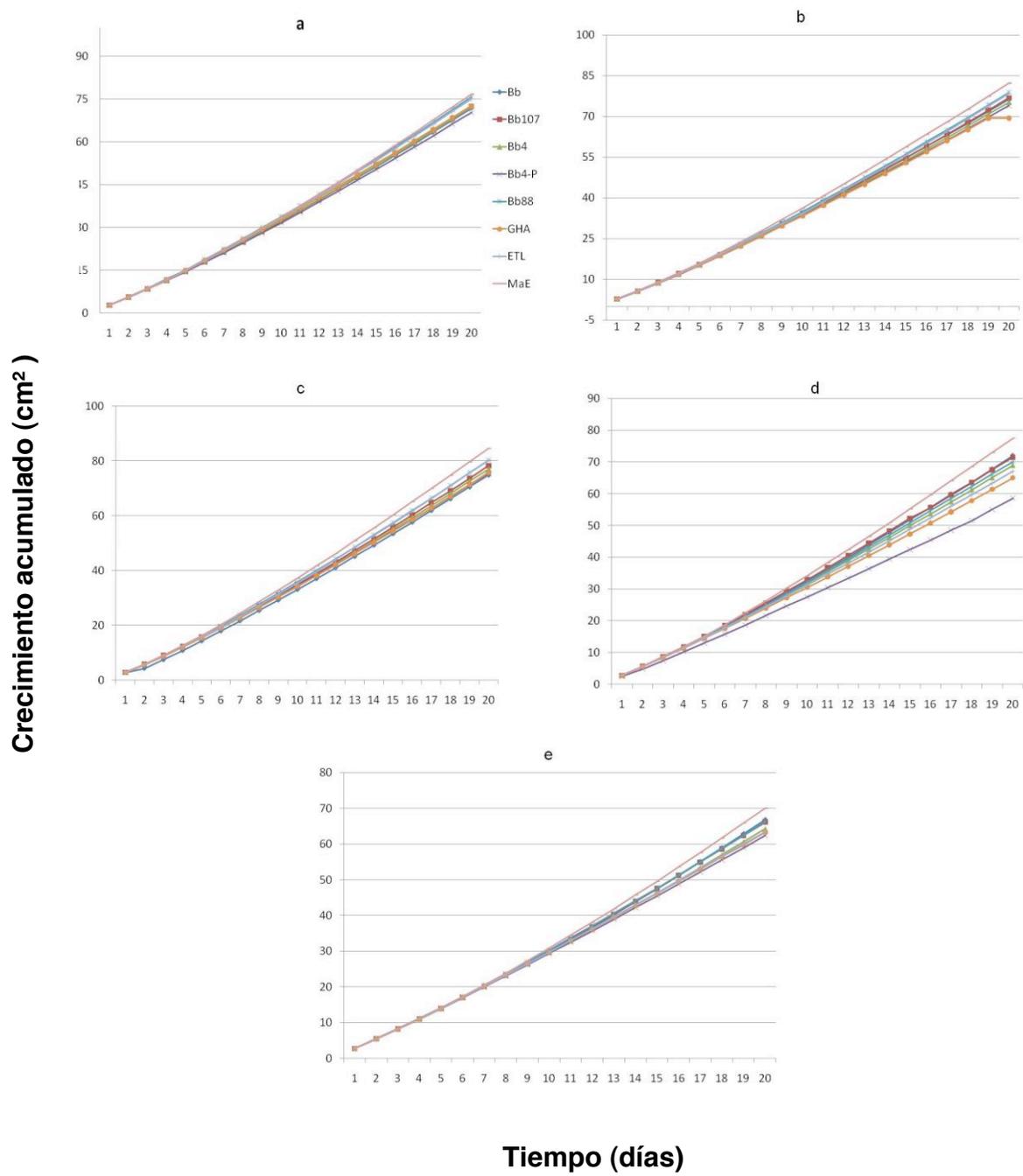


Figura 2. Crecimiento promedio de los aislamientos *B. bassiana* (Bb, B4-P, Bb4, Bb107, GHA, Bb88), y *M. anisopliae* (ETL y MaE), (a) 15 °C, (b) 20 °C, (c) 25 °C, (d) 30 °C y (e) 35 °C.

2.4 DISCUSIÓN

Todos los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* estudiados presentaron diferencias en crecimiento en la mayoría de los días de evaluación, desde las 24 hasta las 288 h. Algunos Ascomycetes (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces spp.*, *Lecanicillium lecanii*) tienen crecimiento lineal durante los primeros días del crecimiento *in vitro* (Vidal *et al.*, 1997; Yeo *et al.*, 2003). Este mismo tipo de comportamiento se observó en todos los aislamientos durante las primeras 72 h de evaluación.

De manera general, hubo crecimiento micelial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en todas las temperaturas evaluadas. A 15 °C el crecimiento de los aislamientos de las dos especies fue lento y en ninguno de los casos se logró la esporulación, a 25°C alcanzaron su crecimiento máximo y a 30 y 35 °C disminuyó el desarrollo de *B. bassiana* pero no así de *M. anisopliae*. Es decir, los aislamientos de *M. anisopliae* fueron más tolerantes a temperaturas altas en relación a los aislamientos de *B. bassiana*.

El mayor crecimiento de los aislamientos se presentó a 25 °C, lo que concuerda con Fargues *et al.* (1997), Ouedraogo *et al.* (1997) y Ekesi *et al.* (1999). Este último reportó que *M. anisopliae* responde mejor a 25 °C, al igual que *B. bassiana*. Algunos autores (Goettel e Inglis, 1997; Inglis *et al.*, 2001) indican que el óptimo crecimiento de la mayoría de los hongos Hyphomycetes está entre 20 y 25 °C.

El crecimiento de los hongos varían considerablemente con el aislamiento (Sato *et al.*, 1993; Tanada y Kaya, 1993), probablemente se deba a la diversidad genética que existe entre ellos. Riba *et al.* (1982) menciona que esta variación puede estar favorecida con el rango de huésped. Autores como Poprawski *et al.* (1988), sostienen que es a consecuencia de variaciones generacionales por mutación, hibridación y parasexualidad, mientras que Sato *et al.* (1993), Fargues *et al.* (1997), Vidal *et al.* (1997), y Dimbi *et al.* (2004) han señalado que el potencial de los aislamientos para tolerar altas y bajas temperaturas está relacionado con el clima de la región geográfica del aislamiento.

La temperatura de la región en donde vayan a ser empleados los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* como agente de control biológico es decisiva para el éxito de los hongos en campo, debido a que constituye un factor climático importante que afecta al crecimiento, (Tanada y Kaya, 1993; Rath, 2000; Inglis *et al.*, 2001). Por tanto, es importante hacer pruebas *in vitro* para predecir la respuesta de los hongos, y esto se considera un prerrequisito para la selección de aislamientos.

CAPÍTULO 3. VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* HACIA ADULTOS DEL PICUDO DEL NOPAL Y SU INTERACCIÓN CON EL SEXO DE LOS INSECTOS

3.1. INTRODUCCIÓN

El picudo del nopal, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae), es una de las principales plagas que afectan la producción de nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008b). Su importancia se debe al daño causado por las larvas, así como también por los adultos (Aguilar, 1993; Mena–Covarrubias, 2004). Con el fin de reducir las pérdidas por el ataque de este insecto, el productor tiene como herramienta principal el uso de insecticidas (Badii y Flores, 2001; Gallegos *et al.*, 2006). Sin embargo, los efectos adversos que causan estos productos al ambiente y a organismos inocuos hace necesario la búsqueda de nuevas técnicas de control. Los hongos entomopatógenos, como estrategia del control biológico, pueden ser una alternativa en el manejo de esta plaga. Las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son microorganismos que ejercen un control natural sobre poblaciones de insectos de varias órdenes (Inglis *et al.*, 2001), entre estos Hemiptera, Lepidoptera y Coleoptera (Tanada y Kaya, 1993; Zimmermann, 1993). En particular, pueden ser una alternativa para el manejo del picudo del nopal ya que no son patógenos ni tóxicos para mamíferos y otros organismos, permitiéndoles ser aplicados poco antes de la cosecha (Weinzier *et al.*, 1997). La selección de aislamientos con base en virulencia es una etapa importante en el desarrollo de programas de manejo microbiano de plagas. Este tipo de

experimentos para el caso del picudo del nopal son prácticamente inexistentes. Por lo que el objetivo de estos experimentos fue evaluar la susceptibilidad de adultos del picudo del nopal a diferentes aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como su efecto sobre individuos de diferentes sexos de esta especie.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente sección contiene información correspondiente a dos series de experimentos con aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre picudo del nopal; el primero fue orientado a probar ocho aislamientos de hongos, y en base a los resultados seleccionar los tres más patogénicos hacia el insecto. El segundo consistió en probar el efecto de esos tres aislamientos seleccionados en individuos de diferente sexo.

3.2.1. Adultos de picudo del nopal *Metamasius spinolae*

Los adultos de picudo del nopal que se emplearon en este experimento se colectaron en la zona nopalera de Tlalnepantla, Morelos, durante los veranos de 2007 y 2008. Para inspeccionar la salud de los insectos, los adultos se mantuvieron en jaulas plásticas (16 x 16 x 7.5 cm) con perforaciones de 4 cm de diámetro en sus cuatro lados. Éstas se cubrieron con malla metálica (5 x 5 mm) para proporcionar ventilación y evitar que los insectos escaparan. En cada jaula se colocaron 20 insectos a los que se les proveía de cladodios inmaduros de nopal durante tres

semanas antes de realizar las pruebas con hongos, cualquier insecto que mostrara sintomatología asociada con alguna enfermedad se eliminó.

3.2.2. Aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e inóculo

Para la primera serie de experimentos se utilizaron ocho aislamientos de hongos, seis de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae* (Cuadro 1). El inóculo se obtuvo a partir del material preservado a -80 °C (Sección 2.2.3). Cada uno de los aislamientos se propagó en placas de ADS e incubó a 25 °C durante 15 días en completa oscuridad. Suspensiones de conidios de cada aislamiento se realizaron mediante el método descrito en la sección 2.2.4.1.

3.2.3 Estimación de la virulencia de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* hacia adultos de picudo del nopal

3.2.3.1. Inoculación

Grupos de 20 adultos del picudo del nopal se inocularon mediante inmersión con la siguiente metodología. Para cada aislamiento se prepararon 500 ml de una suspensión de Tween 80 al 0.03 % con una concentración de 1×10^8 conidios/ml. El testigo consistió en una solución de Tween 80 al 0.03 %. Para lograr la inmersión de los insectos en la suspensión, éstos se colocaron en un recipiente con capacidad de 250 ml; este recipiente tenía una perforación de 5 cm de diámetro en

su base. La perforación estaba cubierta con malla metálica (apertura de 5 x 5 mm) lo que permitió la entrada de la suspensión al interior del recipiente. El tiempo de inmersión fue de 10 segundos, posteriormente los insectos se colocaron en papel absorbente para retirar el exceso de humedad e inmediatamente se colocaron en jaulas de plástico (16 x 16 x 7.5 cm) como las descritas en la sección 32.1.

Todos los experimentos se incubó a 25 ± 1 °C, 80 % de HR y con un fotoperiodo de 16:8 luz: oscuridad. Durante este periodo, los insectos se alimentaron con 20 ± 1.5 g de nopal verdura. La primera evaluación se realizó a las 24 h después de la inoculación, a partir de ese momento la mortalidad se registró cada 48 h por 41 días. Los adultos muertos se colocaron individualmente en cajas Petri de 90 mm de diámetro bajo las mismas condiciones que el bioensayo, sin humedad relativa adicional durante dos días. Al término de estos dos días, y para confirmar causa de muerte, se colocó un rectángulo de papel absorbente humedecido con ADE en cada caja Petri de cada insecto muerto, con la finalidad de incrementar la humedad relativa y propiciar la esporulación del hongo.

3.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento (Bb4-P, Bb, Bb4, Bb88, Bb107, GHA, ETL, MaE) más el testigo (solución de Tween 80 al 0.03 %). Con el fin de mejorar la inferencia de los resultados, todo el experimento se repitió en tres ocasiones diferentes. Los resultados de mortalidad obtenidos a los 21 d de evaluación se analizaron mediante

un modelo de regresión logística binaria con el paquete estadístico SAS para Windows versión 9.0. Con los resultados de estos experimentos se realizaron dos análisis. El primero consistió en una comparación de los tres experimentos (los componentes principales del modelo fueron experimento y tratamiento) para determinar si existía diferencia entre ellos. Después de encontrar diferencia entre al menos uno de ellos, fue necesario realizar análisis para cada experimento. El segundo análisis fue para comparar los tratamientos dentro de cada experimento (los componente principales del modelo fueron tratamientos). De encontrar diferencias se realizaron comparaciones mediante contrastes entre especies, de aislamientos dentro de especie, del testigo con cada especie, y comparaciones entre aislamientos.

3.2.5. Efecto del sexo de adultos del picudo del nopal en la virulencia de aislamientos seleccionados de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

En este segundo experimento, y con base en resultados de los experimentos anteriores se seleccionaron los tres aislamientos en base al mayor porcentaje de mortalidad en picudo del nopal. El procedimiento de recolecta y manipulación de los adultos fue el mismo descrito en la sección 3.2.1. El procedimiento de inoculación de los insectos fue el mismo empleado en la sección 3.2.3.1

3.2.5.1. Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tres aislamientos sobre individuos de diferente sexo, la unidad experimental se constituyó por 20 insectos machos y hembras, dependiendo del sexo involucrado en el bioensayo. Este experimento presentó dos factores, aislamientos y sexo con un arreglo completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento (GHA, Bb107 y MaE) más un testigo (solución de Tween 80 al 0.03 %) por sexo. Con el propósito de mejorar la inferencia de los resultados, todo el experimento se repitió en tres ocasiones diferentes . Se utilizó regresión logística usando un modelo factorial en donde los componentes fueron experimento, tratamiento, sexo y la interacción del tratamiento con el sexo. La prueba de comparación de los tratamientos fue mediante contrastes.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Virulencia de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* hacia adultos de picudo del nopal

3.3.1. 1. Diferencia entre virulencia de especies de hongos entomopatógenos

De manera general los resultados del muestran que los aislamientos de las especie *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron virulentos en diferente grado hacia el picudo del nopal.

Los resultados de las repeticiones realizadas en las tres diferentes ocasiones fueron significativamente diferentes ($\chi^2=82.30$, $P<0.0001$), por lo que fue necesario realizar análisis independientes para cada fecha.

Para la primera repetición, las mortalidades promediadas obtenidas para los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron similares ($\chi^2=2.6$, $P<0.1058$). No obstante, los resultados de la segunda y tercera repetición para los resultados de las especies fueron significativamente diferentes (Repetición dos $\chi^2=78.01$, $P<0.0001$; repetición tres $\chi^2=10.51$, $P<0.0012$). A pesar de las diferencias en los niveles de mortalidades obtenidos en cada repetición, se encontró que los aislamientos de *B. bassiana* ocasionaron mayor mortalidad (Figura 3).

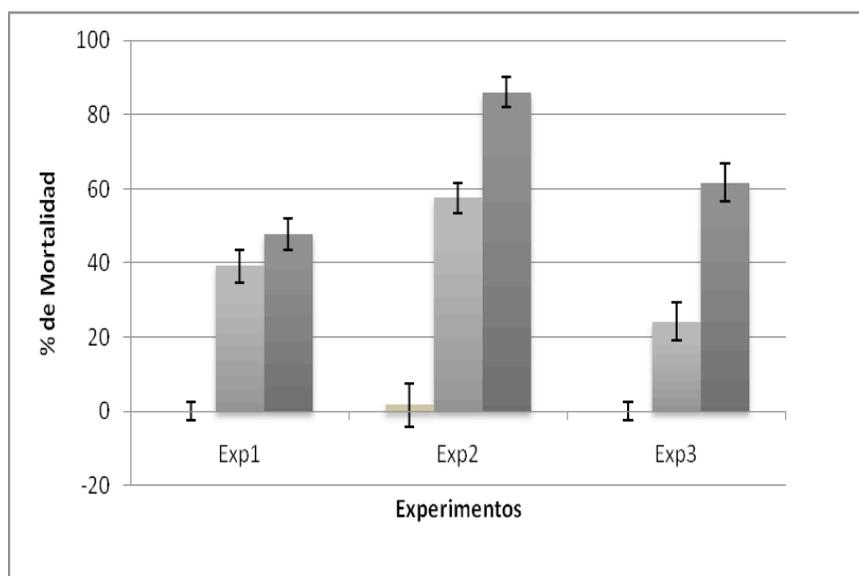


Figura 3. Niveles de virulencia promediados de aislamientos de *B. bassiana* ■, *M. anisopliae* ■ y testigo ■ sobre adultos del picudo del nopal obtenidos en las tres repeticiones.

3.3.1.2. Efecto de los diferentes aislamientos de cada especie de hongo entomopatógeno

En la primera repetición, como se mencionó anteriormente, no se encontró diferencias entre especies, pero sí se encontró diferencias significativas entre aislamientos de *B. bassiana* ($\chi^2_5 = 13.51$, $P < 0.019$). Los aislamientos GHA, Bb4-P y B107 produjeron un mortalidad promedio de 63.33, 53.33 y 51.67% respectivamente; mientras que el aislamiento que presentó el valor más bajo fue Bb4 con 35% de mortalidad (Figura 4a).

En la segunda repetición sí se detectaron diferencias entre especies de hongos entomopatógenos. *B. bassiana* presentó mayor mortalidad que *M. anisopliae*. (Figura 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos de *B. bassiana* ($\chi^2_5 = 6.24$, $P < 0.284$). Se observa una tendencia de mayor porcentaje de mortalidad logrado por los aislamientos Bb y Bb107. (Figura 4b). Finalmente, la diferencia entre aislamientos de *B. bassiana* en la repetición tres fue significativa ($\chi^2_5 = 19.05$, $P < 0.0019$). El aislamiento GHA logró un 80% de mortalidad en poblaciones del picudo del nopal, y el aislamiento que presentó la menor mortalidad fue Bb4 (Figura 4c).

Todos los insectos muertos e incubados en cámara húmeda presentaron signos del hongo después de 72 h, los que se manifestaron a través de un micelio blanco emergiendo a través de la unión de los élitros y partes blandas de las patas. Transcurridos cinco días de muertos se observó esporulación que cubrió totalmente

la superficie del insecto. Los que murieron a causa de *B. bassiana* esporulaban con mayor rapidez y abundancia con respecto a los de *M. anisopliae*.

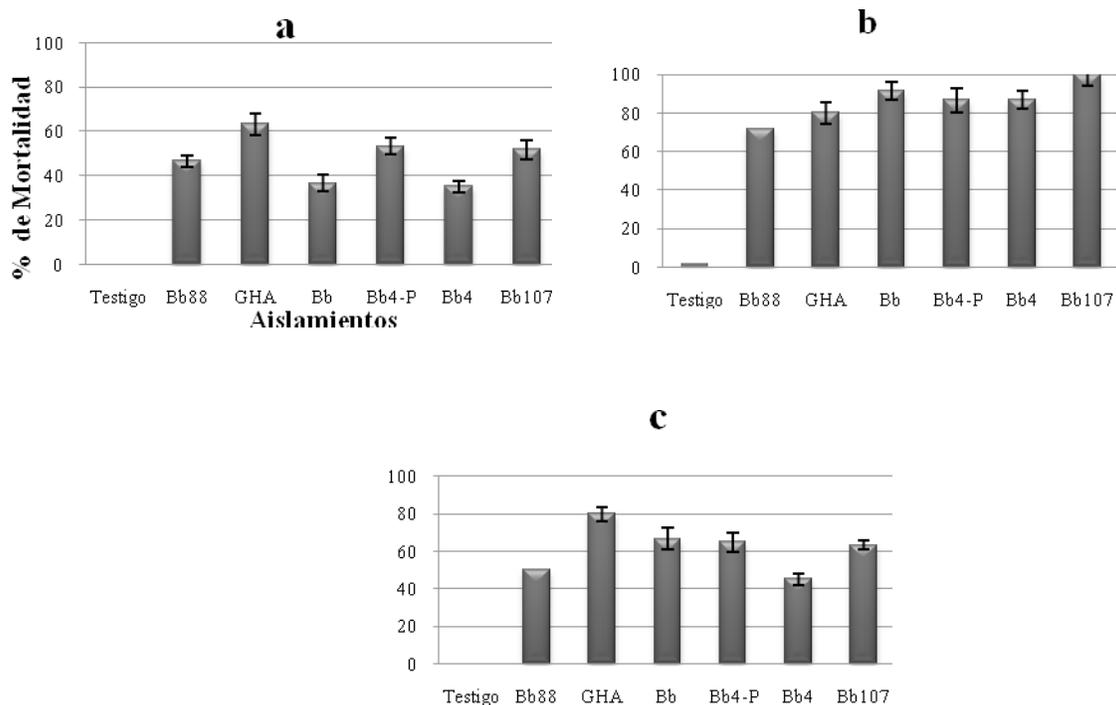


Figura 4. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal causada por los aislamientos de *B. bassiana* en condiciones de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41 d. Cada figura (a,b,c) representan un experimento.

En el caso de los aislamientos de *M. anisopliae* sobre picudo del nopal, estos causaron mortalidad pero en ninguna de las tres repeticiones a través del tiempo se detectó diferencias en mortalidad entre aislamientos ($\chi^2=0.31$, $P<0.575$; $\chi^2=1.66$, $P<0.197$; $\chi^2=0.41$, $P<0.523$) (Figura 5).

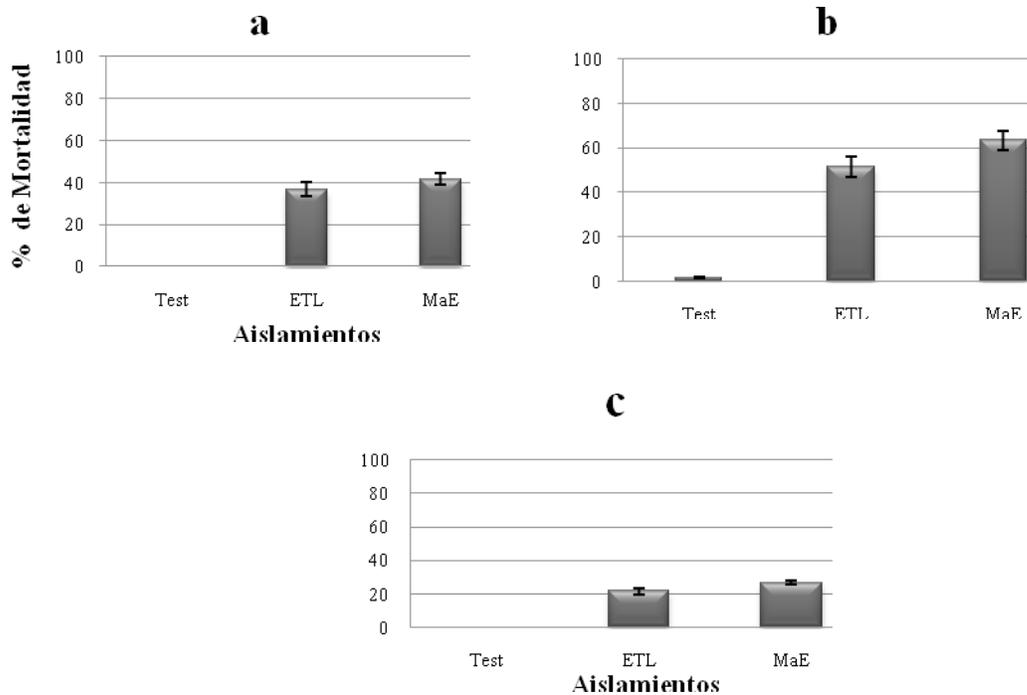


Figura 5. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal causada por dos aislamientos de *M. anisopliae* en condiciones de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41 d. Cada figura (a, b, c) representa un experimento.

3.3.2 Mortalidad de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre individuos de diferente sexo de adultos de picudo del nopal

3.3.2.1. Diferencia entre virulencia de especies de hongos entomopatógenos

Cuando se realizó el análisis para determinar si los aislamientos obtenidos tuvieron alguna interacción con el sexo del insecto, no se encontró alguna significancia ($\chi^2=0.227$, $P<0.973$). Es decir, hembras y machos del picudo del nopal murieron en la misma proporción cuando fueron tratados con un mismo aislamiento (Figura 8).

De manera general, se encontraron diferencias significativas entre las dos especies de hongo en las mortalidades totales logradas en las poblaciones del picudo de nopal ($\chi^2=106.078$, $P<0.0001$). Se observó que *B. bassiana* logró la mortalidad mayor comparada con *M. anisopliae*, independientemente del sexo del insecto (Figura 6). En el caso de *B. bassiana*, los dos aislamientos producen una mortalidad similar ($\chi^2=1.275$, $P<0.258$) (Figura 7).

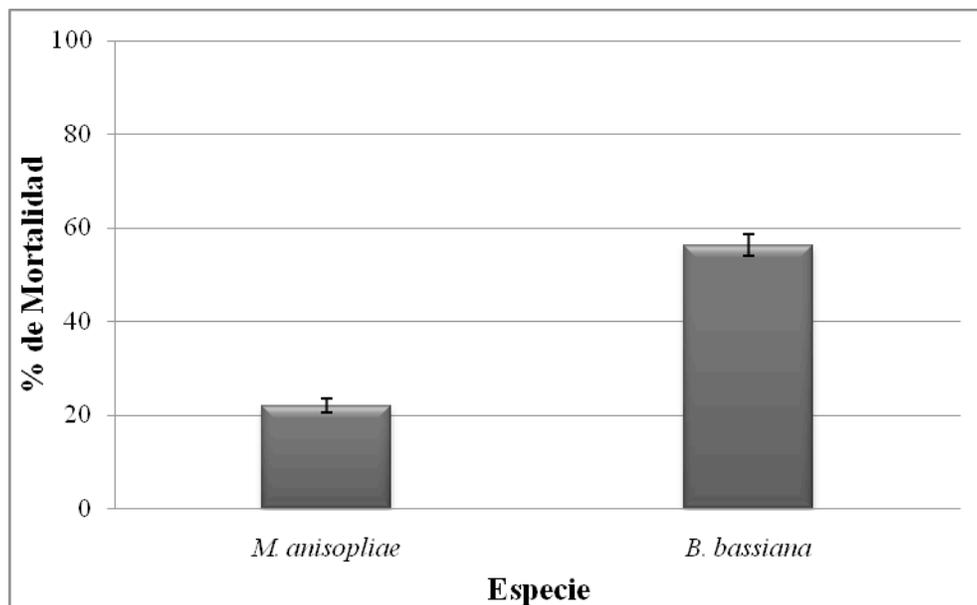


Figura 6. Virulencia de aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos del picudo del nopal a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8.

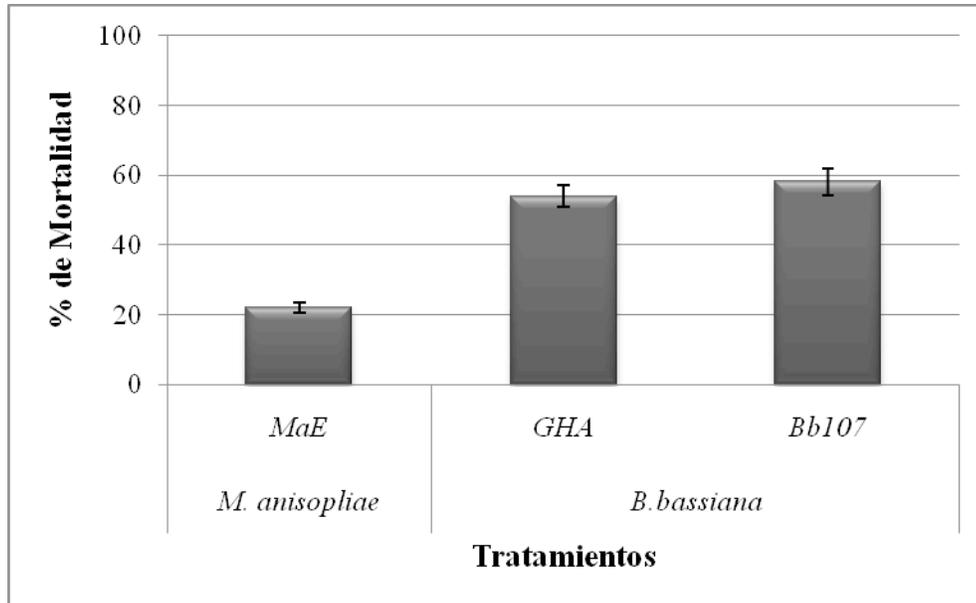


Figura 7. Mortalidad de picudo del nopal 41 días posteriores a la inoculación para los diferentes tratamientos ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8)

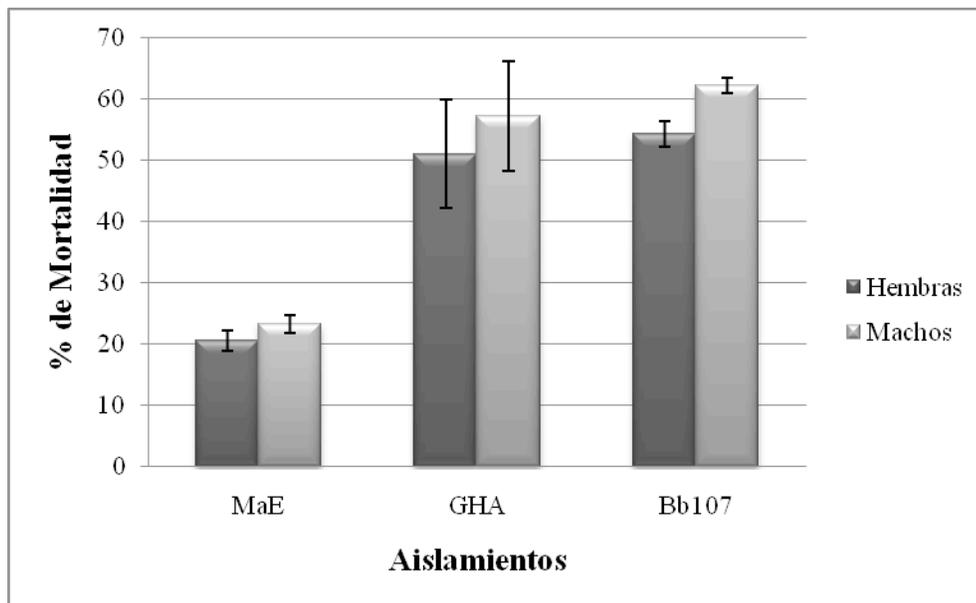


Figura 8. Mortalidad en adultos de picudos del nopal de diferente sexo inoculados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* bajo condiciones controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 durante 41d).

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1 Patogenicidad y selección de aislamientos infectivos contra picudo del nopal

Se han desarrollado varios trabajos con el fin de seleccionar aislamientos mediante pruebas de laboratorio para el control de insectos plaga, el propósito es seleccionar aislamientos con mayor virulencia, persistencia, y adaptabilidad (Vicentini *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002, Gindin *et al.*, 2006). De esta manera se espera tener una mayor probabilidad de éxito en campo para controlar a la plaga objetivo (McCoy, 1990; James *et al.*, 1998).

De manera general los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* causaron una mortalidad diferencial sobre los adultos de picudo del nopal. Esta situación coincide con la literatura con respecto a la patogenicidad y virulencia de estas especies sobre insectos plagas de importancia económica (Goettel *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006). Particularmente, de la susceptibilidad de los coleópteros en estado adulto a estas especies de hongos (Fargues *et al.*, 1996; De la Rosa *et al.*, 1997; France *et al.*, 2000; Godonou *et al.*, 2000; Batta, 2004; Ihara *et al.*, 2003; Gindin *et al.*, 2006; Liu y Bauer, 2006).

A pesar de que todos los aislamientos causaron mortalidad en los picudos, la virulencia se manifestó de diferente forma en cada una de las repeticiones de los experimentos. En la primera y en la tercera repetición se presentó una virulencia relativamente baja (24 a 61%) comparada con la segunda repetición (57 a 86%). La virulencia de las especies y aislamientos está relacionada con factores bióticos y

abióticos (Ignoffo, 1992; Tanada y Kaya, 1993; Inglis *et al.*, 2000). Trabajos anteriores determinaron que la humedad y temperatura influyen en la capacidad de los hongos para infectar a sus insectos hospedantes (Vidal *et al.*, 1997); en particular la temperatura, que es un factor determinante que influye en la germinación y crecimiento, lo que está estrechamente relacionado con la virulencia (St. Leger, 1993; Wessels, 1999). En el caso de la humedad, además de la germinación, también es importante en el proceso de infección y esporulación (Luz y Fargues, 1998).

De acuerdo con la información disponible, en este trabajo se proporcionaron condiciones ambientales favorables para el desarrollo de enfermedad de ambas especies de hongos entomopatógenos, 80% de humedad relativa, 25°C y fotoperiodo 16:8 h L:O. Estas condiciones se mantuvieron en las tres repeticiones en el tiempo del experimento. Por este motivo, las condiciones abióticas no fueron limitantes para la expresión de la virulencia de los entomopatógenos sobre el picudo del nopal en ninguna de las repeticiones.

Además de los factores abióticos los factores bióticos juegan un papel decisivo en la manifestación de la virulencia de los entomopatógenos. Entre estos factores los más importantes son la variabilidad genética de los aislamientos, así como también las condiciones propias de los insectos como la edad, estrés, nutrición y variación genética (Inglis *et al.*, 2001). Es posible que la variación en los resultados en las tres repeticiones en tiempo del experimento sea atribuible a la edad y estrés de los insectos. Anteriormente se mencionó que los insectos de la primera y tercera repetición pasaron menor tiempo confinados desde la colecta

hasta la inoculación (un mes). Esto es explicable porque el picudo del nopal es univoltino, y la segunda repetición se realizó, junto con la primera durante 2007, con insectos del mismo año. Sin embargo, los insectos fueron colectados del campo al mismo tiempo. para prevenir su exposición a insecticidas que se usan de manera común en la zona productora, lo que ocasionó que tuvieran 1.5 meses más de edad, comparado con el resto de las repeticiones. Además, que estuvieran en esa condición diferente a las condiciones naturales por más tiempo (estrés).

Esta condición de mayor virulencia de algunos entomopatógenos sobre insectos adultos de mayor edad se ha reportado para otros casos. Además, Sikorowski y Lawrence (1994) mencionaron de manera general que cualquier situación de estrés puede hacer más susceptibles a los insectos a cualquier entomopatógeno. Es probable que el incremento en edad, además del incremento en alguna condición de estrés en el laboratorio, ocasionara esas diferencias marcadas en virulencia sobre los insectos de la segunda repetición. Adicionalmente, otro factor que puede estar relacionado con la susceptibilidad de cada insecto es indudablemente la variabilidad genética en la población, pero este factor se previno en los experimentos realizando mezclas de insectos de colectas donde se presentan poblaciones elevadas del picudo del nopal en Tlalnepantla, Morelos.

El otro factor biótico que contribuye a explicar las diferentes tendencias de la virulencia de los aislamientos, dentro de cada especie entre repeticiones, puede estar relacionado con la diversidad genética. En particular sobre los aislamientos de *B. bassiana*, ya que dentro de *M. anisopliae* estos no presentaron diferencia en la

mortalidad del picudo del nopal. MaCoy (1990), y Maniana (1991) demostraron que existe una gran virulencia entre aislamientos de una misma especie y entre especies de hongos. Esto se debe a la variabilidad genética entre aislamientos de hongos entomopatógenos (Feng y Johnson, 1990), a factores poligénicos (Riba *et al.*, 1982) y ambientales (Ferron, 1985).

Tanada y Kaya (1993), Maurer *et al.* (1997), y Castrillo y Brooks (1998) mencionaron que *B. bassiana* se considera como un ensamble heterogéneo de cepas, condición que se debe a la capacidad para incrementar su material celular (parasexualidad). Esta forma de multiplicación, permite al hongo la transformación de ADN por medio de la fusión de núcleos, por la presencia de unidades móviles estimuladas en gran medida por factores ambientales; o del efecto de la asociación con su hospedante. De esta manera, el hongo genera un gran número de aislamientos con alto nivel de polimorfismo a nivel genético, y que se expresa fenotípicamente en su plasticidad para adaptarse y sobrevivir en ambientes heterogéneos.

Fegan *et al.* (1993) señalaron que el alto grado de diversidad genética de *M. anisopliae* var *anisopliae* se relaciona con la localización geográfica y grupos de patogenicidad. La evolución de los diferentes genotipos se incrementa por el polimorfismo de las poblaciones geográficas, como consecuencia de variaciones generacionales por mutación, hibridación, y parasexualidad (Poprawski *et al.*, 1988; Hajek y St. Leger, 1994). La alta variabilidad genética intraespecífica que se observa entre aislados de *Metarhizium* (Hajek y St. Leger, 1994) es consecuencia de que muchas de las cepas están incluidas en unas pocas clases de genotipos

geográficamente distribuidos, la persistencia de estos en el tiempo y espacio sugiere que han tenido una estructura poblacional clonal.

Como se ha mencionado, existen diversos factores importantes de la virulencia, como la variación genética, de los entomopatógenos relacionado con la mortalidad; ésta última como criterio primordial para la selección. Además de mortalidad, otro de los factores que se debe considerar es el tiempo de sobrevivencia de los insectos frente a la infección. En el caso de aislamientos de *B. bassiana* éste fue de 9 a 12 días. El tiempo letal medio es 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)

Con base en los resultados obtenidos, los aislamientos que se consideraron con potencial para realizar pruebas posteriores de campo sobre picudo del nopal fueron Bb107, GHA y MaE.

3.4.2 Efecto de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la sobrevivencia de hembras y machos de picudo del nopal

La evaluación de hongos entomopatógenos en laboratorio, mediante bioensayos, es una etapas fundamentales en la búsqueda de aislamientos con potencial para el control de plagas. Existe gran variabilidad de factores que puede afectar estos bioensayos, Lagunes y Vázquez (1994) mencionan que estos se dividen en factores inherentes al procedimiento experimental e inherente al

organismo de prueba. En el caso de los factores inherentes a los organismos, el sexo ha mostrado ser importante en las respuestas a insecticidas organosintéticos (Georghiou, 1994; Lagunes y Vázquez, 1994). Busvine (1971) menciona que las hembras son menos susceptibles a los insecticidas que los machos, por lo que es mejor realizar bioensayos con hembras. Esta diferencia en susceptibilidad a insecticidas organosintéticos pudiera relacionarse con su masa corporal y los tipos de resistencia metabólica o no metabólica (como el almacenamiento en los tejidos inertes) como lo señaló Saume (1992). Esta tolerancia natural en hembras también se documentó en *Zabrotes subfasciatus* y se atribuyó a su masa corporal, aunque no se especificó algún mecanismo de resistencia (Weaver *et al.*, 1994).

En el caso de hongos entomopatógenos se ha proporcionado menor importancia al sexo, quizá porque los trabajos se concentran en la susceptibilidad a diferentes factores, entre los más importantes al aislamiento (Poprawski *et al.*, 1985), concentración (Ondiaka *et al.*, 2008), y estados de desarrollo, especialmente inmaduros (Ihara *et al.*, 2003) y adultos (De La Rosa *et al.*, 2000; Pava-Ripoll *et al.*, 2008). Aunque existe un reporte que sugirió mayor susceptibilidad a *B. bassiana* en hembras adultas del picudo del nopal (Tafoya *et al.*, 2004), existe poca evidencia experimental que sustente diferente susceptibilidad dependiendo del sexo en el estado adulto (Kraaijeveld *et al.*, 2000). Una posible explicación de esta similitud de los sexos en la respuesta a hongos entomopatógenos obtenida en esta investigación pudiera ser que estos tienen mecanismos de acción complejos que dan inicio con la adhesión y germinación de la espora en el integumento (Khachatourians, 1996), producción de exoenzimas que coadyuvan en el proceso

de penetración, y por presión mecánica que inicia por el apresorio (St. Leger, 1993; Hajek, 1997). Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpo hifal que se disemina dentro del hemocelo e invade diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos (Tanada y Kaya, 1993; Hajek y St. Leger, 1994; Deshpande, 1999). Por esta complejidad en los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos, es difícil ofrecer una respuesta diferencial dependiendo del sexo de los insectos y se requiere mucha más evidencia experimental para encontrar, primero, si hay diferente susceptibilidad, y después para que pudiera ser atribuida a alguna característica particular en los sexos.

CAPÍTULO 4. VIRULENCIA DE *Beauveria Bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* SOBRE ADULTOS DE PICUDO DEL NOPAL EN CONDICIONES DE CAMPO

4.1. INTRODUCCIÓN

El picudo del nopal, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae), es uno de los principales factores limitantes de la producción comercial de nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2008b). Con el fin de reducir los daños que éste provoca, los productores hacen uso de insecticidas, sin considerar su efectividad contra la plaga y su probable residualidad (Badii y Flores, 2001; Cerón-González *et al.*, 2008). El control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos representa una alternativa que, usado dentro de las estrategias de manejo integrado, pudiese contribuir al combate de esta plaga y a la disminución de los efectos adversos de plaguicidas.

Los hongos entomopatógenos pueden ocasionar enfermedad y propagarse en la población dependiendo de diversos factores e interacciones entre hongo, plaga y ambiente (Tanada y Kaya, 1993). Factores del hongo tales como patogenicidad, virulencia, dispersión y persistencia; factores del huésped como susceptibilidad, densidad, edad, nutrición y comportamiento; y factores del ambiente como radiación solar, temperatura, humedad relativa, viento y lluvias (Tanada y Kaya, 1993; Inglis *et al.*, 2001). Dicho de otra manera, la interacción hongo y plaga es altamente dependiente del ambiente (Elliot *et al.*, 2002), e impacta en su eficiencia (Inglis *et al.*, 2001). Por esta razón, existe una gran discrepancia

entre resultados de laboratorio y campo (Hannusch y Boland, 1996; James *et al.*, 1998) que hace difícil predecir el efecto real de los hongos entomopatógenos.

Debido a todos los factores que pueden influir en el desarrollo del proceso de infección de aislamientos de hongos entomopatógenos y el picudo del nopal en condiciones de campo, el objetivo de este trabajo fue determinar la susceptibilidad ecológica del picudo del nopal a los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* considerando las condiciones naturales en las que vive este insecto.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en un lote experimental de nopal tunero, *Opuntia ficus indica* (L.), de aproximadamente 3600 m² y 10 años de edad. Esta plantación era manejada por personal del programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, y no recibió tratamientos de insecticidas en al menos 10 meses anteriores al establecimiento del experimento, ni durante el desarrollo de éste.

4.2.1. Obtención del inóculo

Se emplearon los aislamientos de *B. bassiana* Bb107 y GH, y de *M. anisopliae* el MaE. El inóculo se obtuvo de material preservado en crio-viales a -80°C (Sección 2.2.1.2).

4.2.2. Tratamientos y métodos de inoculación

Los tratamientos fueron los aislamientos Bb107, GHA, MaE y un testigo absoluto el cual consistió en Tween 80 al 0.03%. Para este experimento la unidad experimental consistió de 40 insectos. Para la aplicación de los tratamientos se empleó el método de inmersión (3.2.3.1). Para cada aislamiento se prepararon 500 ml de una suspensión de Tween 80 al 0.03 % con una concentración de 1×10^8 conidios/ml. El tiempo de inmersión fue de 10 s, posteriormente los insectos se colocaron en papel absorbente para retirar el exceso de humedad e inmediatamente se colocaron en jaulas de plástico (16 x 16 x 7.5 cm) descritas en la sección 3.2.1. Del total de insectos (40 insectos) en cada tratamiento, 20 insectos se incubaron en condiciones controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 luz: oscuridad). Estos fueron considerados como control positivo, lo que fue de utilidad para confirmar la actividad de los aislamientos. Los otros 20 insectos se llevaron a campo y se colocaron en las jaulas metálicas del bloque correspondiente para cada tratamiento.

4.2.3. Establecimiento del experimento en campo

La parcela experimental estuvo constituida por 600 m^2 dentro del lote de nopal tunero. En esta superficie se distribuyeron jaulas de alambre galvanizado (25 x 25 x 35 cm) recubiertas con malla metálica (abertura 5 x 5 mm). Cada unidad experimental (20 insectos) se colocó en una jaula y cada jaula estaba a 50 cm de distancia de las plantas de nopal, y con una separación de 200 cm entre jaulas.

Dentro de cada jaula se colocaron pencas de nopal de 20-25 cm de largo y 2 cm de grueso. Estas pencas tenían brotes que sirvieron como alimento a los insectos. Las pencas de nopal se colocaron de tal manera que se producía un espacio entre éstas y el suelo lo que servía de refugio a los insectos.

Se realizaron evaluaciones y registros de mortalidad semanales y en cada ocasión se aprovechó para darles cladodios inmaduros a los insectos como alimento. Por otro lado, los insectos mantenidos en cámara de cría (control positivo) se alimentaron con trozos de nopal (20 ± 1.5 g) como se describió en la sección 3.2.3.1, en éstos se evaluó y registró mortalidad cada 48 h. El experimento se mantuvo por 60 d, durante este periodo de tiempo, los adultos muertos de los tratamientos se colocaron en cajas Petri de 90 mm de diámetro bajo las mismas condiciones que el control positivo, sin humedad relativa adicional durante dos días. Al término de estos dos días, y para confirmar causa de muerte, se colocó un rectángulo de papel absorbente humedecido con agua destilada estéril en cada caja Petri con la finalidad de incrementar la humedad relativa y propiciar la esporulación del hongo.

4.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental para el trabajo en campo fue un bloques completos con tratamientos aleatorizados (tres aislamientos más un testigo absoluto al cual sólo se le aplicó Tween 80 al 0.03%). Cada bloque consistió en una hilera de nopal dentro de la parcela experimental, el experimento consistió de cinco bloques. Con

lo que respecta al control positivo, se mantuvo en la cámara de cría con un arreglo completamente al azar. El análisis estadístico que se utilizó en este experimento fue el de regresión logística (SAS para Windows versión 9.0.). Se realizaron análisis independientes para los experimentos de campo y laboratorio a los 90 d. Los componentes del modelo para ambos experimentos fueron tratamientos y bloques. La comparación entre tratamientos se realizó a través de contrastes.

4.3. RESULTADOS

Este es el primer estudio que evalúa el efecto de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre el picudo del nopal bajo condiciones de campo. En el capítulo previo, se encontró que estos aislamientos infectaron y mataron insectos adultos del picudo del nopal bajo condiciones controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16: 8 L:O).

El análisis de los datos indicó diferencia significativa en porcentaje de mortalidad entre los insectos en laboratorio (control positivo) y los de campo ($\chi^2 = 58.393$, $P < 0.0001$). Por lo tanto, las condiciones constantes de temperatura y humedad relativa mantenidas en el control positivo influyeron de manera decisiva en el porcentaje de mortalidad de los aislamientos de hongos (Figura 9).

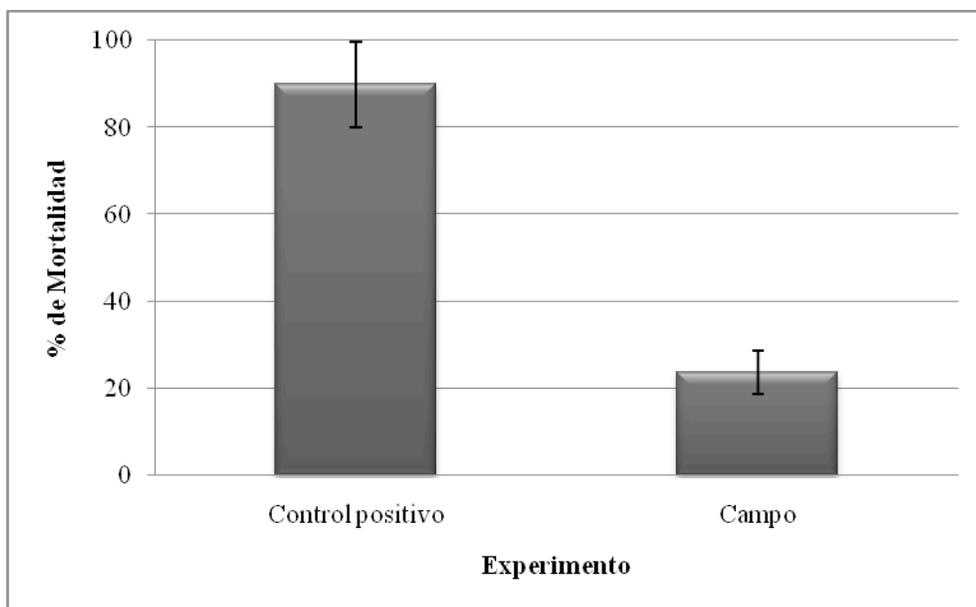


Figura 9. Mortalidad de adultos del picudo del nopal causada por aislamientos de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* a los 90 d bajo condiciones controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O) y de campo ($17.4\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 62% HR).

4.3.1. Evaluación de insectos en el control positivo

No hubo mortalidad en el testigo lo que aseguró confiabilidad en los resultados. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles de mortalidad logrados por ambas especies ($\chi^2 = 24.515$, $P < 0.0001$). Se observó que la mortalidad más elevada se obtuvo con *B. bassiana* (Figura 10).

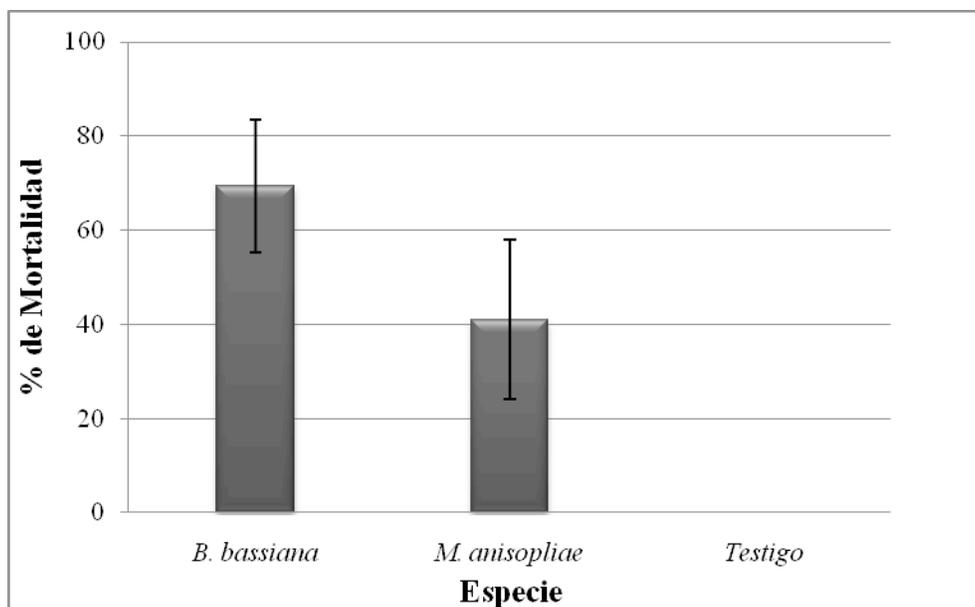


Figura 10. Porcentaje de mortalidad del picudo del nopal con las especies de hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, a los 90 d , evaluados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O.

Se observó una mortalidad ligeramente mayor con el aislamiento Bb107, comparado con el aislamiento GHA. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre aislamientos de *B. bassiana* ($\chi^2=0.217$, $P<0.641$). El aislamiento MaE de la especie *M. anisopliae* ocasionó una mortalidad inferior al 50% (Figura 11).

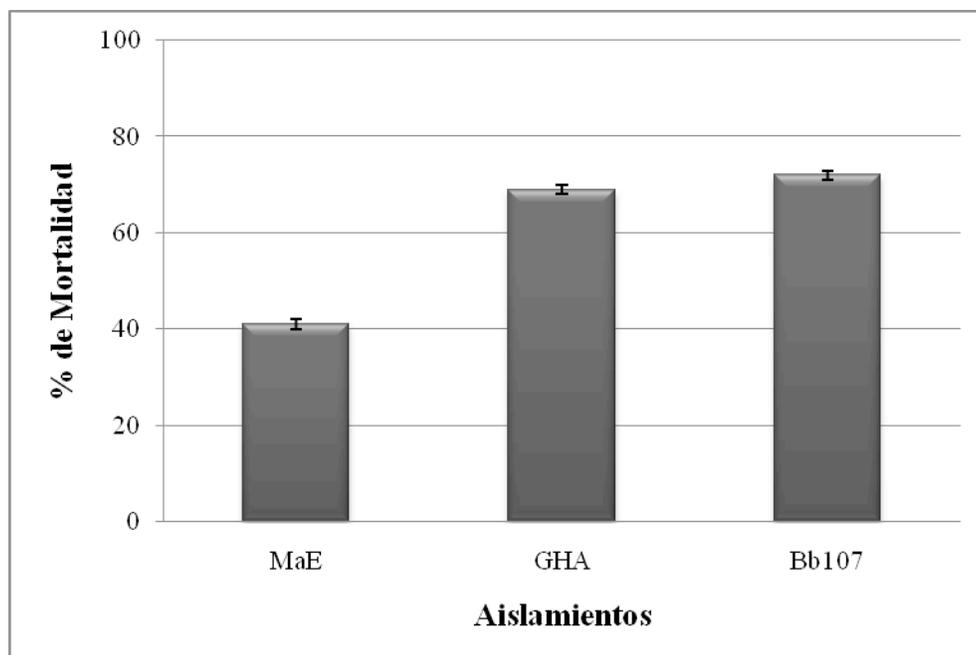


Figura 11. Virulencia de los aislamientos MaE (*M. anisopliae*), y Bb107 y GHA (*B. bassiana*) a los 90 d sobre adultos del picudo del nopal bajo condiciones controladas (25±1°C, 80% de HR y fotoperiodo de 16:8 L:O).

4.3.2. Evaluación de insectos bajo condiciones de campo

Durante el desarrollo de este ensayo las condiciones de temperatura promedio y humedad relativa fueron de 17.4 °C y 62.13 %, respectivamente. En general, los aislamientos de *B. bassiana* fueron más virulentos que el aislamiento de *M. anisopliae* ($\chi^2 = 24.515$, $P < 0.0001$), y la máxima mortalidad de los aislamientos de *B. bassiana* no rebasaron el 23% (Figura 12).

En los aislamientos de *B. bassiana* se observó una tendencia de mayor mortalidad por Bb107 (23%) comparado con GHA (20%), pero ésta no resultó significativa ($\chi^2 = 0.271$, $P < 0.602$). La mortalidad máxima de los aislamientos en condiciones de campo sucedió a los 58.57 y 43.24 días para los aislamientos de *B.*

bassiana, respectivamente y a los 90 días para el aislamiento MaE que ocasionó 7% de mortalidad durante el desarrollo del experimento.

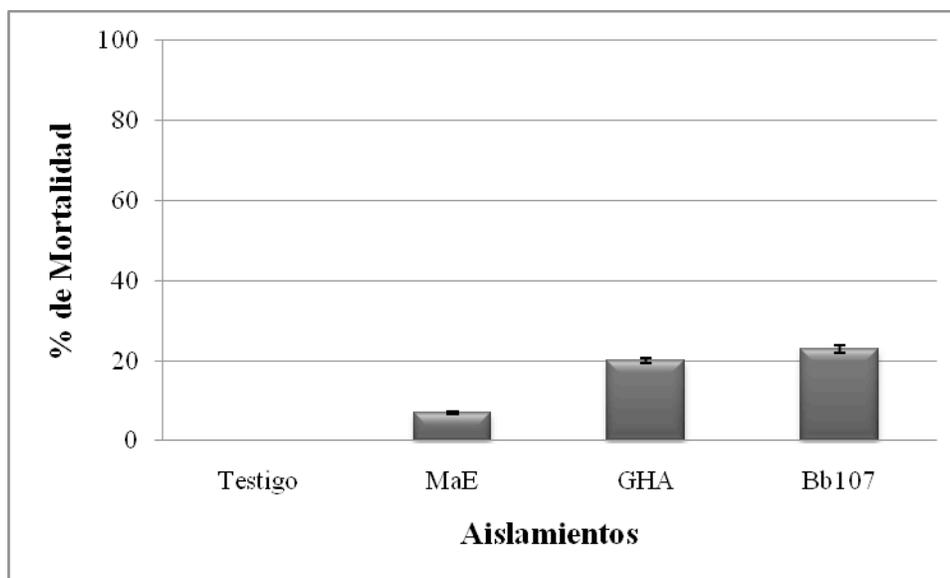


Figura 12. Virulencia de los aislamientos MaE (*M. anisopliae*) Bb107 y GHA (*B. bassiana*) sobre adultos del picudo del nopal bajo condiciones de campo (17.4 °C y 62.13% HR) a 90 días posteriores a la inoculación.

4.4. DISCUSIÓN

Las condiciones experimentales en las que se desarrollaron las repeticiones de laboratorio (control positivo) y campo ofrecieron condiciones contrastantes de factores abióticos.

Se ha señalado por varios autores que las condiciones ambientales, particularmente la temperatura y humedad, son factores abióticos decisivos en el éxito de la virulencia, desarrollo y esporulación de los hongos entomopatógenos (Fargues et al 1997). Como era previsible, en el control positivo, que tuvo las mejores condiciones de temperatura y humedad, se obtuvieron los más altos niveles de mortalidad, lo que se atribuye no solamente al control de temperatura y

humedad relativa, sino también a la exclusión de diversos factores ambientales que en condiciones de campo no se pueden controlar. En condiciones de campo la fluctuación de temperatura y humedad, con promedio de temperatura 17.4 °C y de humedad relativa 62.13 %, no favorecieron el progreso de la infección, lo que explica menor mortalidad por los aislamientos en esas condiciones. En un capítulo previo del desarrollo de hongos a diferentes temperaturas los aislamientos que se mantuvieron a menos de 20 °C mostraron menor desarrollo que aquellos mantenidos a 25 °C. Por otro lado, el promedio de humedad relativa también fue bajo comparado con las humedades relativas óptimas para el desarrollo de hongos entomopatógenos, misma que se señala cercana a 90 % (Tanada y Kaya,1993).

Por otro lado, los factores abióticos no sólo son importantes para la manifestación de mortalidad, también son importantes para disminuir el tiempo necesario para que suceda ésta (Ferron, 1978; Guzman y Axtell, 1987, Luz y Fargues, 1998). De manera general, se observó diferencia del tiempo necesario para alcanzar mortalidad entre el control positivo y la repetición de campo. Aparentemente las temperaturas bajas del campo combinadas con humedades relativas menores al 70%, en la mayor parte del tiempo de evaluación, provocaron que el desarrollo del entomopatógeno se extendiera de dos a tres veces más, comparado con el control positivo. En el control positivo la máxima mortalidad se logró alrededor de los 22 días; por el contrario, la máxima mortalidad en la repetición de campo se logró hasta los 52 u 86 días. Resultados similares para mortalidad de adultos en condiciones de campo fueron reportados por Godonou *et al.* (2000) para el picudo del platano (*Cosmopolites sordidus*).

Los aislamientos evaluados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron diferencias en virulencia. Riba *et al.* (1985), y Riba *et al.* (1986) mencionaron que la virulencia está determinada por factores que dependen de su información genética, lo que influye en la producción de enzimas y toxinas para la infección. Por tal razón, una posible causa de la disminución de la patogenicidad del aislamiento MaE podría deberse a la supresión de genes determinantes en el desarrollo de las diferentes etapas del mecanismo de infección. Hegedus y Khachatourians, (1995) encontraron una relación en la producción de amilasas y la virulencia, donde niveles elevados de amilasas se asocian con una hipervirulencia en *M. anisopliae* y los aislados con deficiencia de esta enzima, no presentan virulencia.

Ignoffo *et al.* (1982), afirman que otros factores determinantes en la virulencia son origen geográfico y hospedero. El primer factor está relacionado con el polimorfismo, como consecuencia de variaciones generacionales por mutación, hibridación, y parasexualidad (Poprawski *et al.* 1988, Hajek y St. Leger 1994)

En lo que respecta al huésped, es importante para el hongo porque de él toma los nutrientes necesarios para su desarrollo y el progreso de la enfermedad. El insecto huésped y su estado de desarrollo también está relacionado con la especificidad del hongo. Es posible que este factor haya influido en la respuesta del aislamiento hacia el picudo del nopal; a pesar de que el aislamiento de *M. anisopliae* se seleccionó por mayor virulencia en experimentos previos, éste fue aislado originalmente de poblaciones de larvas de Scarabaeidae. Probablemente, la menor virulencia, comparada con la mostrada en laboratorio, tuviese una relación con las condiciones abióticas donde se desarrollaba originalmente este aislamiento.

En el caso de *B. bassiana* la virulencia en laboratorio y campo fue la más alta. Originalmente los aislamientos fueron obtenidos de adultos de curculiónidos, Algunos autores reportaron que *B. bassiana* ocurre en mayor proporción en hospederos adultos. Autores como Fargues (1976) mencionan que los insectos son más susceptibles a aislamientos de hongos aislados de insectos de la misma especie o de especies relacionadas, por lo que es probable que los resultados obtenidos con los aislamientos sean atribuidos a este factor. Estos resultados corroboran que uno de los criterios de selección de aislamientos de hongos entomopatógenos, es que provengan de especies y estados de desarrollo relacionadas con los insectos plaga objetivo.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

5.1. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo información relevante de la interacción *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos del picudo de nopal, *Metamasius spinolae*.

La temperatura tuvo un efecto no lineal sobre el desarrollo de los aislamientos estudiados, de 15 a 25 °C hubo un incremento en el desarrollo pero luego disminuyó en las temperaturas de 30 y 35 °C. La temperatura donde se registró el crecimiento más rápido de ambas especie fue de 25 °C. Con temperaturas inferiores o superiores a 25 °C los aislamientos disminuyeron su crecimiento. Ésta disminución varió considerablemente dependiendo del aislamiento.

B. bassiana y *M. anisopliae* fueron patogénicos a los adultos de picudo del nopal en diferente grado de virulencia. En las pruebas de patogenicidad los aislamientos de *B. bassiana* (GHA y Bb107) ocasionaron mayor mortalidad que *M. anisopliae* (MaE, ETL). Dentro de la especie *M. anisopliae* un aislamiento fue el más agresivo (MaE). Esta diferencia en mortalidad también se logró apreciar con ciertas características de los cadáveres. En adición a las diferencias típicas de color de cada especie, los insectos que murieron a causa de *B. bassiana* esporulaban con mayor rapidez y abundancia, con respecto a los de *M. anisopliae*.

No se observó una respuesta diferente del sexo de los insectos a la patogenicidad y virulencia de los aislamientos. Es decir, hembras y machos del picudo del nopal murieron en la misma proporción. En general, se encontraron diferencias significativas entre las dos especies de hongos. *B. bassiana* logró la mayor mortalidad comparada con *M. anisopliae*.

La mortalidad causada por los aislamientos en condiciones de campo fue menor al compararse con la mortalidad de insectos infectados que se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad. Por lo tanto, las condiciones constantes de temperatura y humedad son decisivas en el éxito de la virulencia, desarrollo y esporulación de los hongos entomopatógenos. Adicionalmente, ésta metodología proporcionó elementos para el entendimiento del desarrollo de la enfermedad cuando no se tienen las condiciones ideales del ambiente, y también fue valioso para conocer la diferencia entre tiempo de mortalidad dependiendo de las condiciones ambientales.

5.2. RECOMENDACIONES

En este trabajo se probaron sólo algunos aislamientos de *B. bassina* y *M. anisopliae* recuperados de insectos del mismo Orden, varios de ellos de la misma familia, que se encontraban disponibles en la colección de entomopatógenos del Colegio de Postgraduados. Durante el trabajo de campo en Tlalnepantla, Morelos, se colectaron larvas, pupas y adultos de picudo del nopal infectados con hongos. Este material se encuentra ahora en la colección de patología de insectos del Colegio de Postgraduados. No se incluyó en las evaluaciones por razones de tiempo, pero trabajos futuros deberían incluir la evaluación de éste o de algunos otros aislamientos de especies diferentes que hayan sido recuperados de insectos taxonómicamente relacionados.

La dosis y forma de aplicación recomendada para pruebas de patogenicidad en laboratorio fue 1×10^8 conidias/ml mediante la técnica de inmersión. Esta técnica se usa con frecuencia en los trabajos de patología de insectos para asegurar infección bajo una concentración conocida. No obstante, no es útil para hacer inferencias con respecto a la respuesta del huésped a los hongos entomopatógenos en campo. Por esta razón, se necesitan realizar trabajos que evalúen dosis en laboratorio y campo, así como el método y momento de aplicación. Con ese tipo de ensayos se podrá mejorar el conocimiento del desarrollo del hongo sobre los insectos en campo, con el fin de seleccionar la mejor concentración y forma de aplicación que incremente el contacto del huésped con las conidias del hongo, y como consecuencia se logre una epizootia.

Debido a la influencia de las condiciones ambientales sobre la respuesta insecto-hongo, es importante realizar los ensayos de campo durante la época de aparición del insecto en Tlalnepantla, Morelos. Esos ensayos determinarán si las condiciones pueden ser favorables para el establecimiento y permanencia de los hongos en campo.

Finalmente, es importante recordar que la virulencia, patogenicidad y persistencia son características de los hongos entomopatógenos que se desean para combatir plagas, pero esa misma selección de hongos debería incluir evaluaciones de esos aislamientos sobre organismos no blanco. Esta información determinaría la posible integración de estos organismos dentro de un programa de manejo integrado del picudo de nopal.

CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA

- Aguilar, B. G. 1993. Control de varias plagas del nopal mediante aspersiones de agua helada. *Revista Fitotecnia México* 16: 63-68.
- Badii, M. H., and A. E. Flores. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in Mexico. *Florida Entomologist* 84: 503-505.
- Batta, Y. A. 2004. Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera:Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. *Crop Protection* 23: 103-108.
- Barrientos, P. F. 1965. El Nopal y su utilización en Mexico. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 26: 87-94.
- Borrego, E. F., y N. Burgos V. 1986. El Nopal. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo Coahuila, México. p 85-95.
- Busvine, J. R. 1971. A critical review of techniques for testing insecticides. 2nd. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 345 p.
- Butt, T. M., and M. S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. pp. 141-196. *In*: A. Navon, and K. R. Ascher (eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Wallingford, UK.
- Cañedo, V., y T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro internacional de la papa (CIP). Lima Perú. pp 35-40.
- Castrillo L. A., and M. Brooks. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72:190-196.
- Ceron-Gonzalez C., E. Rodríguez-Leyva, J. R. Lomeli-Flores, C. E. Hernandez-Olmos y G.Mora-Aguilera. 2008. Evaluacion de ocho insecticidas sobre el picudo del nopal *Metamasius spinolae*. (Gyllenhal) en Tlalnepantla, Morelos. pp. 4-7 *In*: Rodríguez-Leyva, E., J. R. Lomeli-Flores, y A. López-Jiménez (Eds.). Cadena Productiva del Nopal Verdura: II Taller de avances de investigación del Grupo Interdisciplinario de Investigación del Nopal (GIIN). Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo, Texcoco, México.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). 2004. Catálogo de plaguicida. CICOPLAFEST. SSA, SAGARPA, SEMARNAT, SE. México, D.F.
- Corrales, G. J., y C. A. Flores V. 2003. Nopalitos y tunas. Producción, comercialización, poscosecha e industrialización. Universidad Autónoma Chapingo. Centro de

- Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). México. 225 p.
- Cortez-Madrugal, H., y E. Rodríguez-Leyva. 2008. Potencial del nematodo *Heterorhabditis indica* Poinar en el manejo de plagas. Cuarto Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología, 30 y 31 de octubre, Morelia, Michoacán.
- De la Rosa, W., R. Alatorre, J. Trujillo, and J. F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee borer (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 1534-1538.
- De La Rosa, W., R. Alatorre-Rosas, J. F. Barrera, C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *Journal of Economic Entomology* 93: 1409–1414.
- Deshpande M.V 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*. 25: 229-243.
- Dimbi, S., N. K. Maniania, S. A. Lux, and J. M. Mueke. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49: 83–94.
- Ekesi, S., N. K. Maniania, K. Ampong-Nyarko, and I. Onu. 1999. Effect of intercropping cowpea with maize on the performance of *Metarhizium anisopliae* against *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae) and predators. *Environmental Entomology* 28: 1154-1161.
- Elliot, S. L., S. Blanford, and M. B. Thomas. 2002. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Biological Sciences* 269: 1599-1607.
- Fargues, J. 1976. Spécificité des champignons pathogènes imparfaits (Hyphomycètes) pour les larves de Coléoptères (*Scarabeidae* et *Chrysomelidae*). *Entomophaga*, 21: 313–323
- Fargues, J., N. K. Maniania, J. C. Delmas, and N. Smits. 1992. Influence de température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes, *Agronomie* 12: 557–564.
- Fargues, J., M. S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo, A. Vidal, L. A. Lacey, C. J. Lomer, and M. Roegier. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia* 86: 171–181.
- Fargues, J., M. S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo, and M. Rougier. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89: 383–392.

- Fegan, M., J. M. Manners, D. J. Maclean, J. A. Irwinrwi, K. Samuels, D. Z. Holdom, and L. I. Gilbert. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology*. 139: 2075-2081.
- Feng, Z., R. I. Carruthers, D. W. Roberts, and D. S. Robson. 1985. Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 259-264.
- Feng, M. G., and J. B. Johnson. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 19: 785-790.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- Ferron, P. 1985. Fungal control, *In*: Kerkut, G. A., L. I. Gilbert (eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon, Oxford. pp. 313-346.
- Flores, V. C. y J Olvera. 1995. La producción de nopal verdura en México. Memoria Conocimiento y aprovechamiento del nopal. *In*: Pimienta-Barrios, E., C. Neri-Luna, A. Muñoz-Urias y F.M. Huerta-Martínez (Comp.). 6to congreso nacional y 4to congreso internacional. Zapopan Jalisco, México. pp 282-289.
- Flores, E. A.L., S.P. Reza N., P. Ramirez B., y M. E. Alonso. 2006. Evaluación de textura, color y aceptación del nopalito variedad *Milpa Alta* escaldado, a diferentes tiempos de inmersión en solución de NaCl y CaCl₂, y empaçado al vacío. "Mercado Mundial del Nopalito" *Agrofaz*. 6: 103-110.
- France, A., M. Gerding, M. Gerding, y A. Sandoval. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. *Agricultura Técnica* (Chile) 60:205-215.
- Fuxa, J. R., and Y. Tanada. 1987. *Epizootiology of insect diseases*. A Wiley –Interscience Publication United States of America. New York. Pp 188-180.
- Gallegos, V. C., R. D. Valdez-Cepeda, M. Barron, A. F. Barrientos, J. A. Agustin, y R. Nieto. 2006. Caracterización morfológica de 40 cultivares de nopal de uso como hortaliza del banco de germoplasma del CRUCEN UACH. *Revista Chapingo* 12: 41-49.
- Georghiou, G. P. 1994. Principles of insecticide resistance management. *Herbicide resistance*. *Phytoprotection* 75: 51–59.

- Gindin, G., S. Levski, I. Glazer, and V. Soroker. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica* 34:370-379
- Godonou, I., K.R. Green, K.A. Oduro, C.J. Lomer & K. Afreh-Nuamah. 2000. Field evaluation of selected formulations of *Beauveria bassiana* for the management of the banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) on plantain (*Musa* spp., AAB Group). *Biocontrol Science and Technology*.10: 779-788.
- Goettel, M. S., and G. D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes, *In*: L. Lacey (ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego. Pp. 213–249.
- Goettel, M. S., J. Eilenberg, and T. Glare. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, *In*: Gilbert, L. I., K. Latrou, and S. Gill, (eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. 6: 361-406.
- Granados, S., y A. D. Castañeda. 1991. El Nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Ed. Trillas. México. 227 p
- Guzman, D. R., and C. R. Axtell. 1987. Temperature and water quality effects in simulated woodland pools on the infection of *Culex* mosquito larvae by *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in North Carolina. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3: 211-218.
- Hajek, A. E., and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review Entomology* 39: 293-322.
- Hajek, A. E. 1997. Ecology of territorial fungal Entomopathogens. *Advance in Microbial Ecology* 15: 193-249.
- Hannusch, D., and G. Boland. 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology* 86:156-162.
- Hare, D. 1992. Effect of plant variation on herbivore-natural enemy interactions, *In*: Fritz, S. R. and E. L. Sims (eds.). *Plant Resistance and Diseases: Ecology, Evolution and Genetics*. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 278–298.
- Hegedus, D. D., and G. G. Khachatourians. 1988. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology letter* 10: 637-642.
- Hernández-Olmos, C.E., Cerón-González C., Rodríguez-Leyva y J. R. Lomeli-Flores. 2009. Estudio de la biología básica del picudo del nopal *Metamasius spinolae*. (Gyllenhal) (Coleoptera: curculionidae) Pp 10-16. *In*: Primer simposio nacional sobre inocuidad y

sanidad vegetal en nopal. Comité Nacional Sistema Producto Nopal y Tuna. Actopan, Hidalgo, México.

Humbert, R. 1997. Fungi: Identification, *In*: L. Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic press, New York, USA. Pp 153-185.

Ignoffo, C., A. Mcintosh, C. Garcia, M. Kroha, and J. Johnson. 1982. Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga* 27:371-378.

Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist* 75: 516-525.

Ihara, F., M. Toyama, and T. Sato. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. *Applied Entomology and Zoology* 38: 461–465.

Inyang, E. N., M. Butt, H. A. McCartney, B. Oyejola, L. Ibrahim, B. J. Pye, and S. A. Archer. 2000. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research* 104: 653-661.

James, R. R., B. A. Crof, B. T. Shaffer, and B. Lighthart. 1998. Impact of temperature and humidity on host- pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a coccinelid. *Environmental Entomology* 27: 1506-1513.

Jarquín, N. I. A. 2007. Diagnóstico fitosanitario del cultivo de nopal verdura *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. en la delegación de Milpa Alta, México D.F. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Kenward, M. G. 1987. A method for comparing profiles of repeated measurements. *Applied Statistics* 36: 296-308.

Khachatourians, G. G. 1996. The relationship between biochemistry molecular biology of entomopathogenic fungi insect diseases, *In*: Esser K., P. A. Lemke, D. H. Howard, and J. D. Miller (eds.). *The Mycota, Vol. VI, Animal Human Relationships*, Springer Verlag, Berlin. Pp. 331–362.

Kraaijeveld, A. R., E. C. Limentani, and H. C. J. Godfray. 2000. Basis of trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268: 259–262.

Lagunes, A., y M. Vásquez. 1994. El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Post graduados. Montecillo. Texcoco. México. 159 p.

- Liu, H., and L. S. Bauer. 2006. Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology* 99: 1096-1103.
- Lomeli-Flores, J. R., E. Rodríguez-Leyva, G. Otero-Colina, G. Mora-Aguilera y F. Esquivel-Chavez. 2008. Primer reporte de *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae) sobre *Opuntia ficus-indica* L. en Tlalnepantla, Morelos. *Entomología Mexicana* 7: 22-25.
- Luz, C., J. Fragues. 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72: 56–63.
- Maniania, N. K. 1991. Potential of some fungal pathogens for the control of pests in the tropics. *Insect Science and its Application* 12: 63–70.
- Mann, J. 1969. Cactus-feeding insects and mites. *Bulletin of the United States National Museum* 256: 1-158.
- Maurer P., Y. Couteaudier, A. Girard, D. P. Bridge, and G. Riba. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research* 101:159–164
- McCoy, C.W., R.A. Samson and D.G. Boucias. 1988. Entomogenous fungi. Pp.151-236. *In: C.M. Ignoffo and N.B. Mandava (eds.), Handbook of natural pesticides, Volume V: Microbial Insecticides. Part A: Entomogenous protozoa and fungi. Boca Raton, FL, CRC Press.*
- McCoy C. M. 1990. Entomogenous fungi as microbial pesticides, *In: Biological control; Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases* Pp. 139-159.
- Mena-Covarrubias, J. 2004. Manejo integrado de plagas del nopal: Una propuesta para tomar mejores decisiones de control. *El Nopal. Tópicos de Actualidad. Universidad Autónoma Chapingo/ Colegio de Postgraduados.* Pp 125-140.
- Méndez, G. S. 1994. Principales plagas del nopal, *In: G. Esparza y S. Méndez (eds.). Memorias de la Reunión sobre Aportaciones Técnicas y Experiencias de la Producción de Tuna en Zacatecas. Morelos, Zacatecas.* Pp: 49-57.
- Muñiz, R. 1998. *Cactophagus spinolae* (Gyllenhal, 1838), Picudo del Nopal. *Duguesiana* 5: 45-43.
- Musalem, L. O. (ed.). 1998. Nopal, leyenda, comercio y futuro en México. *Claridades Agropecuarias.* México, D. F. 44 p. [Enlínea]. Disponible en:

<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/098/ca098.pdf> (Revisado el 19 de Abril de 2009).

- Ondiaka, I. S., N. K. Maniania, G. H. N. Nyamasyo, and J. H. Nderitu. 2008. Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. *Annals of Applied Biology* 153: 41-48.
- Orduño-Cruz, N., A. W. Guzmán-Franco, Jorge M. Valdez-Carrasco, J. López-Collado, y E. Rodríguez-Leyva. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo *in vitro* de aislamientos de hongos entomopatógenos y su virulencia sobre poblaciones del picudo del nopal *Metamasius spinolae* provenientes del estado de Morelos. XXXI Congreso Nacional de Control Biológico SMCB A.C. 19-21 de noviembre, Zacatecas, Zac. 14-17.
- Ouedraogo A., J. Fargues, M. S. Goettel, and C. J Lomer. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137: 37-43.
- Palomares-Pérez M., E. Rodríguez-Leyva, H. Brailovsky, and S. Ramírez-Alarcón. 2010. First record of *Hesperolabops nigriceps* Reuter (Hemiptera: Miridae) on *Opuntia ficus-indica* L. (Miller) in Milpa Alta, Mexico City. *Neotropical Entomology*, *In press*.
- Pava-Ripoll, M., F. J. Posadas, B. Momen, C. Wang, and R. St Leger. 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 220-226.
- Phillip, K. P., C. C. Chao, T. Molitor, M. Murtaugh, F. Strgar, and B. M. Sharp. 1991. Stress and pathogenesis of infectious disease. *Reviews of Infectious Diseases* 13: 710-720.
- Poprawski, T. J., M. Marchal, P. H. Robert. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages of five entomopathogenic hyphomycetes. *Environmental Entomology* 14: 247-253.
- Poprawski, T. J., G. Riba, W. A. Jones, and A. Aioun. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 17: 275-279.
- Pucheta, D. M., A. Flores., S. Rodriguez, y M. de la Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856-860.

- Quezada-Salinas, J. A., S. Sandoval-Islas, D. Alvarado-Rosales, y E. Cárdenas-Soriano. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, Mexico. *Agrociencia* 40: 641-653.
- Rath, A. C. 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Science & Technology* 10: 563-581.
- Reyes-Agüero, J. A., J. R. Aguirre -Rivera, and F. Carlin. 2004. Análisis preliminar de las variedades morfológicas de 38 variantes mexicanas de *Opuntia ficus indica* (L.) Miller, *In*: Esperanza, G., R. Valdez, y J. Méndez (eds.). *El Nopal. Tópicos de Actualidad*. Universidad Autónoma Chapingo y Colegio de Postgraduados. Chapingo México. pp 21-47.
- Riba, G., I. F. Bouvier, and A. Caudal. 1982. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Oeuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia* 96: 161-169.
- Riba, G., L.J. Azevedo, C. Messias, D.W. Dasilveira, and R. Tuveson. 1985. Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 46:20-25.
- Riba, G., A. Keita., G. G. Jr. Soares, and P. Ferron. 1986. Comparative studies with *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control*. 2: 469-473.
- Roberts, D. W., and A. Campbell. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous publications of the Entomological Society* 10: 19-76.
- Rodríguez-Leyva, E., J. R. Lomeli-Flores, y A. López-Jiménez (Eds.). 2008a. Cadena Productiva del Nopal Verdura: II Taller de avances de investigación del Grupo Interdisciplinario de Investigación del Nopal (GIIN). Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo, Texcoco, México. 69 pp.
- Rodríguez-Leyva, E., J. R. Lomeli-Flores, y J. Romero-Nápoles. 2008b. *Bothrioderes cactophagi* Schwarz (Coleoptera: Bothriideridae) parasitoide del picudo del nopal en Milpa Alta, D. F. XXXI Congreso Nacional de Control Biológico SMCB A.C. 19-21 de noviembre, Zacatecas, Zac. 316-319.
- Roy, H. E., D. C. Steinkraus, J. Eilenberg, A. E. Hajek, and J. K. Pell. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology* 51: 331–357.
- Ruiz-Machuca, M., S. Ramírez-Alarcón, M. Palomares-Pérez, E. Rodríguez-Leyva, y H. Brailovsky. Nuevos registro de *Hesperolabops nigriceps* Reuter (Hemiptera:

Miridae) en el oriente del Estado de México. Acta Zool. Mex. (n.s.), enviado en abril de 2009

Sánchez, B. M. 2002. Insectos plaga del nopal verdura, en Milpa Alta Distrito Federal. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Pp. 78

Sato, H., W. Mitsuhashi, and M. Shimazu. 1993. Effect of temperature on mycelial growth of three muscardine fungi. Trans. 44th Meet. Kanto Branch Jpn. For. Soc., 103–104 (in Japanese).

Saume, F. 1992. Introducción a la Química y Toxicología de Insecticidas. Maracay. Venezuela. 212 p.

Shaw, K. E., G. Davidson, S. J. Clark, B. V. Ball, J. K. Pell. 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. Biological Control 24: 266–276.

SAS (SAS Institute Inc.). 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA.

SIAP-SAGARPA, 2008. [Enlínea]. Disponible en:

http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html (Revisado el 26 de Mayo de 2009)

Sikorowski, P. P., and A. M. Lawrence. 1994. *Heliothis* cytoplasmic polyhedrosis virus and its effect upon microbial contaminant-free *Heliothis virescens*. Journal of Invertebrate Pathology, 63: 56–62.

Shimazu, M. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. Applied Entomology and Zoology. 39: 469–475.

Sivasankaran, P., S. Eswaramoorthy, and H. David. 1998. Influence of temperature and relative humidity on the growth, sporulation and pathogenicity of *Beauveria bassiana*. Journal of Biological Control 12: 71–75.

Stadler, T; I. Picollo, y N. Zerba. 1990. Factores ecofisiológicos relacionados con la susceptibilidad a insecticidas y la resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Boletín de Sanidad. Vegetal de Plagas, 16: 743-754

St Leger R. J. 1993. Biology and mechanisms of invasion of deuteromycete fungal Pathogens, In: Beckage N. C., S. N. Thompson, and B. A. Federici (ed.). Parasites and Pathogens of Insects Vol. 2, Academic Press, Inc, San Diego, CA. pp. 211–229

- St. Leger R. J., and D. W. Roberts. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol* 15: 83-87.
- Steinhaus, E. A. 1958. Crowding as a possible stress factor in insect disease. *Ecology* 39: 503-514.
- Tafuya, F., M. Zuñiga-Delgadillo, R. Alatorre, J. Cibrián-Tovar, and D. Stanley. 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist* 87: 533-536.
- Tanada, Y., and H. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, California. USA. 666 p.
- Urrutia C. M. A., W. Mark., P. Craig, and S. Wratten. 2007. Influence of host diet on parasitoid fitness: unraveling the complexity of a temperate pastoral agroecosystem. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 63–71.
- Vanegas-Rico, J. M., J. R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva, y G. Mora-Aguilera. 2008. Enemigos naturales de la cochinilla silvestre del nopal (*Dactylopius opuntiae*) en Tlalnepantla, Morelos. XXXI Congreso Nacional de Control Biológico SMCB A.C. 19-21 de noviembre, Zacatecas, Zac. 309-312.
- Vicentini, S., M. Faria, M. R. V. De Oliveira. 2001. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of anewbioassaymethod. *Neotrop. Entomol.* 30: 97–103.
- Vidal, C., J. Fargues, and L. A. Lacey. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 18–26.
- Weinzierl R., T. Heen, P. G. Koehler. 1997. *Microbial insecticides*. Univ. Illionois. Extension circular 1295, *In: Silva, A. G. y R. Hepp Gallo. (eds.). 2003. Bases para el manejo racional de insecticidas*. Universidad de Concepción. Chillán. Chile. 310 p.
- Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid & D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.
- Yeo, H., J. K. Pell, P. G. Alderson, S. J. Clark, and 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.

Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* 37: 375-379.

