

Valoración de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas

Teresa Mier ¹, Judith Castellanos M. ¹, Karina García G. ¹, Miguel Ayala-Zermeño ¹, Víctor Fernández V. ² y Conchita Toriello N. ³

¹ Departamento de El Hombre y su Ambiente, UAM, México.

² Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. SAGARPA.

³ Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM

tmier@correo.xoc.uam.mx



Resumen / Abstract / Résumé

En esta nota de investigación, se presentan los resultados de un estudio realizado sobre la actividad enzimática y la virulencia de cultivos monospóricos de dichos hongos, a fin de optimizar la selección para la producción de micoinsecticidas. Esta información se utiliza para la caracterización de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Paecilomyces fumosoroseus*, biorreguladores naturales de la mosquita blanca y la langosta. Los autores pudieron darse cuenta de que los aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* que mostraron la producción de proteasas mayor (144 UP/ml), intermedia (56.82 UP/ml) y menor (4.27 UP/ml) causaron en un tiempo menor (8 días), intermedio (11 días) y mayor (14.8 días), el 100% de mortalidad en la langosta. Asimismo, los aislados de *P. fumosoroseus* mostraron relación entre la actividad temprana de proteasas o quitinasas (120-160 h) y un porcentaje de mortalidad mayor en las ninfas inoculadas con concentraciones de conidios más altas (4.7x10⁶ y 4.7x10⁵/ml). UAM, ©2004

*In this research note, the authors present the outcomes of a study about enzymes' activities and virulence of monosphoric cultivates of the *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fuogoroseus*, to improve the selection for mico-insecticide production. This information is used to characterize the fungi as a natural bio-regulator of the white fruit fly and the grasshopper. The research shows that *M. anisopliae* var. *Acridum* cultivates followed the production of proteases as high (144 UP/ml), medium (56.82 UP/ml) and minor (4.27 UP/ml), and caused the death of grasshoppers following this patterns: 18 days, 11 days, 14.8 days. Moreover the *P. fumosoroseus* showed a relation between the early activity of proteases or quitinasas (120-160h) and a higher mortality of inoculate nymph with higher concentrations of conidia (4.7 x 10⁶ and 4.7 x 10⁵ ml).*

*Dans cette note de recherche, qui part de la caractérisation de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* et *Paecilomyces fumosoroseus*, respectivement biorégulateurs naturels de la mouche blanche et de la sauterelle, les auteurs présentent les résultats d'une étude réalisée sur l'activité enzymatique et la virulence des cultures monosporiques de ces champignons, pour optimiser la sélection des isolés pour la production de micoinsecticides. Cette recherche rend compte du fait que les isolés de *M. anisopliae* var. *acridum* qui ont montré la production de protéases majeure (144 UP/ml), intermédiaire (56.82 UP/ml) et mineure (4.27 UP/ml) ont causé en un temps mineur (8 jours), intermédiaire (11 jours) et majeur (14.8 jours) 100% de mortalité à la sauterelle. Ainsi, les isolés de *P. fumosoroseus* ont démontré une relation entre l'activité précoce de protéases ou chitines (120-160 h) et un pourcentage de mortalité plus important des nymphes inoculées par des concentrations plus élevées de conidies (4.7x10⁶ et 4.7x10⁵/ml).*

Palabras clave:
Hongos entomopatógenos
enzimas
virulencia

Key words:
entomopathogen fungi
enzymes
virulence

Mots-clés:
Champignons entomopathogènes
enzymes
virulence.

Introducción

La presente investigación se fundamenta en los criterios generales del campo de la lucha biológica, de gran importancia para la sustentabilidad de los ecosistemas, con base en el conocimiento de la ecología de la microflora del suelo y del efecto que pueden tener en varias de sus poblaciones, las estrategias de manejo usadas para el control de las plagas (Quimby et al., 2002). Los temas nodales y paradigmas de este artículo se sustentan en:

- a) Los procesos y mecanismos referentes al control biológico, aspecto fundamental de la evolución y selección natural para la regulación de la abundancia y distribución de las poblaciones.
- b) El estudio del comportamiento fisiológico de los hongos entomopatógenos respecto al desarrollo y virulencia de estos biorreguladores naturales de plagas, durante la relación huésped-parásito establecida entre hongos e insectos.

El abandono del control tradicional de plagas de cultivos de importancia económica da lugar a la problemática abordada, ocasionada por el uso desmedido de insecticidas químicos. Estas sustancias causan efectos perjudiciales como son: la acumulación de residuos tóxicos en los mantos freáticos, el subsuelo y los alimentos; la aparición de variedades resistentes de insectos y de plagas secundarias; las repercusiones en la salud del hombre y la fauna silvestre y doméstica; los desequilibrios en el funcionamiento de las redes tróficas; la producción de generaciones de plaguicidas cada vez más agresivos y resistentes a las variables ambientales; el uso en campo de dosis más elevadas para incrementar la producción de los cultivos, y el abatimiento de la biodiversidad y el equilibrio de los agroecosistemas (Restrepo, 1988; Albert, 1989).

Después de los años 40, con el advenimiento y la introducción al mercado de los modernos plaguicidas sintéticos, como el DDT, decayó el interés por el uso de otros métodos de control. Sin embargo, la continua e intensa presión selectiva ha propiciado la aparición de plagas resistentes que requieren dosis cada vez más elevadas de insecticidas. Más de 400 plagas de insectos han desarrollado resistencia a estos productos y además, aparecen en número aún

mayor después de cada tratamiento, debido a que también son eliminados sus enemigos naturales, así como los de las plagas secundarias, que al quedar fuera de control pueden rebasar el umbral económico y producir pérdidas considerables (Adkisson, 1987).

Los plaguicidas son sustancias perjudiciales que sólo deben ser usados cuando sea necesario, aplicándolos en las dosis adecuadas y manejándolos como complemento y no como alternativa de los métodos de lucha biológica y de manejo de cultivos, utilizados tradicionalmente. En las últimas décadas, como consecuencia de la preocupación acerca de estas limitaciones, ha resurgido el interés por los hongos entomopatógenos como valiosos recursos naturales para ser usados como herramientas útiles en el manejo integrado de plagas. Los hongos penetran en el hospedero a través de su cutícula, provocando epizootias que arrasan con grandes poblaciones de insectos cuyos cuerpos una vez muertos, sirven al hongo como sustrato para esporular y esparcir sus conidios como propágulos infecciosos. Bajo condiciones de humedad sus micelios producen infinidad de conidios que se diseminan ampliamente y sus estructuras de resistencia les permiten sobrevivir en estadios de dormancia durante largos periodos, bajo condiciones ambientales extremas, asegurando así su persistencia. Por otra parte, los hongos entomopatógenos son numerosos y diversos, no eliminan totalmente a su hospedero y generalmente, no producen toxinas ni micosis en el hombre y los animales (Goettel et al., 2001, Inglis et al., 2001).

En países como Brasil, Cuba, Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Inglaterra, Rusia y la República Popular China se han implementado programas para el uso de hongos entomopatógenos. En México se han llevado a cabo estudios con *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae*, *Aschersonia* sp., *Hirsutella thompsonii*, *V. lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y con diversas especies de hongos pertenecientes al orden de los Entomophthorales (Garza, 1995; Mier, T. 1990). Sin embargo, a pesar de la existencia de un gran número de plagas, especialmente insectos, factibles de ser controlados biológicamente con hongos entomopatógenos, en México se han implementado pocos programas donde se incluya el uso de estos biorreguladores naturales.

Por ejemplo, la plaga de la mosquita blanca (Homoptera: Aleirodidae), *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* y *B. argentifolii*, es cosmopolita y ha sido considerada como una de las más dañinas debido a la magnitud de las pérdidas económicas que ocasiona en gran cantidad de cultivos y de plantas silvestres (Osborne y Landa, 1992). La acción succionadora de este insecto, su papel como vector de enfermedades virales y el hecho de que sus secreciones, ricas en sustancias nutritivas, propicien la proliferación de hongos fitopatógenos (Venezia et al., 1983), favorece aún más la baja productividad de los cultivos. Por otra parte, la mosquita blanca ha desarrollado resistencia hacia los insecticidas (Prabhaker et al., 1985) y esto repercute aún más en la problemática del control químico en los agrosistemas.

En México, esta plaga afecta la producción de cultivos destinados al consumo animal y humano, así como a la industria y a la exportación. Entre ellos destacan el algodón, berenjena, calabaza, frijol, lechuga, melón, pepino, sandía, soya, tabaco, tomate y flores de ornato como el crisantemo y la nochebuena. En la República Mexicana, la mosquita blanca ha causado graves daños a la agricultura nacional, directa e indirectamente, siendo en algunas ocasiones de proporciones devastadoras debido a sus hábitos alimenticios y a su capacidad para transmitir virus fitopatógenos. Por ejemplo, en 1991, la introducción de *B. argentifolii* produjo pérdidas en diversos cultivos, estimadas en 60 millones de pesos; en 1992, en el algodón se redujo el rendimiento casi en un 50% y las pérdidas fueron de 40 millones de pesos; en 1995 se perdieron 3,330 ha de soya en Sinaloa, así como 500 ha de melón y 480 ha de tomate debido a la acción de esta plaga (Aguirre Uribe, 1995). En los últimos años ha aumentado notablemente la incidencia de la plaga en diversas zonas hortícolas del estado de Morelos, de Baja California y del sur de Sonora.

En relación con sus enemigos naturales, la mosquita blanca es atacada principalmente por los hongos entomopatógenos *P. fumosoroseus* (Vidal et al., 1997) y *V. lecanii* (García et al., 1999; Hall, 1982; Hernández et al., 1995); los cuales proliferan en todos los estadios ninfales del insecto, a excepción de los huevos, matando a los adultos e invadiendo y destruyendo sus tejidos.

Otra plaga importante, que ataca a más de 400 cultivos en el campo mexicano, es la langosta, representada principalmente por *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) (Macías y Ramírez, 1998). En México esta plaga, susceptible al hongo *M. anisopliae* var. *acidum*, se extiende en una superficie de aproximadamente 20,000 ha de campos agrícolas afectando a la caña de azúcar, los cítricos, el henequén, el maíz, los pastizales para el ganado y el sorgo y la soya, entre otros. (Barrientos et al., 1992; Barrientos, 1995).

El desarrollo de investigaciones básicas en micología ha permitido valorar a los hongos desde diversos puntos de vista y considerar sus peculiaridades biológicas, fisiológicas y ecológicas como ventajas para la producción de micoinsecticidas para el control biológico de insectos (Deshpande, 1999). Por ejemplo, se ha demostrado la relevancia de enzimas como proteasas y quitinasas, en la virulencia de las cepas hacia el insecto hospedero. El estudio de estas enzimas ha permitido no sólo entender la estructura de la cutícula y la forma en que ocurre su degradación, sino también seleccionar aislados por sus propiedades virulentas (St. Leger et al., 1986). Debido a la complejidad estructural de la cutícula de los insectos, es necesaria la degradación enzimática para que los hongos entomopatógenos puedan tener acceso a los nutrimentos del interior del insecto (Glare y Milner, 1991). Varias enzimas están involucradas en el proceso de degradación de la cutícula, así como en las demás fases de la infección. La producción de proteasas es una de las primeras respuestas bioquímicas de los hongos parásitos, una vez establecido el contacto con el hospedante. Entre las proteasas identificadas en el proceso de penetración se encuentran las llamadas Pr1, Pr1a, Pr1b, Pr2, Pr4 y una metaloproteasa (St. Leger et al., 1994), todas ellas descritas para *M. anisopliae*. La actividad de dichas enzimas ha sido comprobada ampliamente *in vitro*, así como los péptidos que son degradados por cada una de las proteasas antes mencionadas (Gillespie et al., 1998).

Las quitinasas se producen en menores cantidades debido a que el mayor componente de la cutícula es de tipo proteico y estructuralmente enmascara a la quitina cuticular, por lo que dichas enzimas comienzan a producirse hasta que la proteína que rodea a la quitina ha sido degradada. En este sentido, se ha demostrado ampliamente la intervención de la quitina-

nasa en la penetración de *Beauveria bassiana* a través de el exoesqueleto de diversos insectos (Khachatourians, 1992). También se han identificado actividades de endo y exoquitinasas de *M. anisopliae* in vitro (Chul, 1998 y 1999). Otra de las funciones de estas enzimas, sobre todo en el caso de la quitinasa, es la de proveer nutrimentos a partir de la cutícula de los insectos moribundos (Charney y St. Leger, 1991; St. Leger et al., 1987), lo que repercute en las interacciones tróficas que se dan entre la microbiota del suelo.

Por otro lado, los métodos genéticos han permitido establecer diferencias o similitudes entre los hongos mediante el polimorfismo de sus ácidos nucleicos (Driver et al., 2000; Fegan et al., 1993), así como estudiar la acción específica de enzimas codificadas por sus genes respectivos y su relación con la virulencia, mediando la interacción huésped-parásito durante el proceso del control biológico (Bidochcka et al., 1999; Jackson et al., 1985; St. Leger et al., 1996; Screen et al., 2001). Otro aspecto importante para la selección de cepas como candidatas para ser usadas en la producción de bioinsecticidas, es el estudio sobre el comportamiento fisiológico de los hongos con el objeto de optimizar los procesos de esporulación y germinación (Magan, 2001).

Dentro de este contexto, el proyecto de investigación plantea identificar y caracterizar fenotípicamente hongos entomopatógenos provenientes de la mosquita blanca y la langosta, así como de la mosca pinta, para seleccionar los aislados más adecuados con el fin de ser usados como micoinsecticidas, es decir, los que posean la mayor virulencia hacia el insecto plaga, la más alta actividad enzimática, la mayor cantidad de blastosporas o conidios infectantes por gramo de sustrato, en medios líquidos o sólidos, respectivamente y la mayor seguridad por su inocuidad para el ambiente, el hombre y los animales (Mier, T. et al., 1994; Toriello et al., 1999). Para ello se ha integrado un equipo de investigadores de distintas universidades e instituciones de gobierno, que ha establecido un proyecto de grupo cuyo objetivo general consiste en abordar una metodología para optimizar la selección y producción de insecticidas biológicos, a través de la caracterización fenotípica y genotípica de hongos entomopatógenos provenientes de diferentes regiones del país, de manera que se obtengan cepas de máxima calidad para utilizarse como bioinsecti-

das. Por la acción de los hongos entomopatógenos ejercida en el control natural de plagas muy dañinas para la producción agrícola nacional como son: la mosquita blanca, que daña 700,000 ha de cultivos de hortalizas, frutas y plantas ornamentales; la mosca pinta que ataca 400,000 ha de caña de azúcar y pastizales para ganado, y la langosta, que afecta entre 20,000 y 1,000,000 ha de campos agrícolas y vegetación en general, en la República Mexicana, se podrá valorar la relevancia y pertinencia que representa el abordar una metodología basada en estudios para caracterización fenotípica y genética, a fin de llevar a cabo la selección de cepas idóneas de los hongos entomopatógenos que regulan estas plagas para que puedan ser usados como bioinsecticidas en el campo. En el presente trabajo, sobre virulencia y actividad enzimática, se presentan los resultados obtenidos exclusivamente, a partir del estudio de los hongos *M. anisopliae* var. *acidum* y *P. fumosoroseus*, parásitos de la langosta y la mosquita blanca, respectivamente.

Materiales y métodos

Hongos

Se reportan resultados a partir de aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* (EH-486, EH-488 y EH-500) y de *P. fumosoroseus* (EH-503, EH-504, EH-506, EH-509, EH-510, EH-511, EH-516, EH-518, EH-519, y EH-520), provenientes de diferentes regiones de México y aislados a partir de la langosta y la mosquita blanca, respectivamente; proporcionados por la colección de entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de la SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) en Colima, y depositados en los laboratorios de Micología Básica y de Microbiología del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y del departamento El Hombre y su Ambiente, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. La caracterización de los aislados se llevó a cabo a partir de cultivos monospóricos.

Cultivos monospóricos

Se realizó de acuerdo con el método de unidades formadoras de colonias (UFC) modificado (Mier et al., 2000). Se cultivó el hongo en agar de glucosa Sabouraud a 28°C, durante 7 días. Posteriormente se obtuvo una suspensión conidial, agregando 3 ml de Tween 80 al 0.05% y agitando con un vórtex. Se hicieron diluciones decimales y se ajustó una suspensión que contuviera 100 conidios/ml la cual, se pasó a través de papel filtro Whatman No. 1 para eliminar el micelio. Se aplicaron 200 ml de dicha suspensión en cajas de petri con un medio de agarosa 0.8%, dextrosa 2%, gelatina 1% y cloranfenicol al 0.05%. Se extendió la suspensión de manera que quedaran entre 20 y 30 conidios uniformemente distribuidos en la caja, todo se realizó por duplicado. A la par, en otra caja, se sembraron 200 ml de la suspensión conidial original como testigo positivo. Las cajas se incubaron a 28°C y se revisaron a las 24 y 48 horas. Para hacer la revisión se trazó un cuadrícula en el fondo de la caja de 1 cm² y la observación al microscopio se hizo colocando la caja de manera que el agar quedara hacia arriba. Se hicieron las observaciones a 4x y 10x. Los conidios con tubo germinativo fueron señalados con un punto en el lugar donde se encontraban. Al cabo de 96 horas, se extrajeron las colonias que se encontraban aisladas cortando el agar en torno a éstas con un bisturí y trasladándolas a agar de glucosa Sabouraud. Cada cultivo monospórico se conservó en agua destilada y en glicerol al 10%.

Enzimas

Para medir la producción de las proteasas, *M. anisopliae* var. *acidum*, fue cultivado en medio H (Mier, 1990), adicionado con caseína al 1%, y *P. fumosoroseus* se cultivó en medio sintético (Cruz y Chávez, 1984) adicionado con desperdicio de camarón coloidal al 13-14%. En ambos casos la determinación de la actividad se realizó con el método de la azocaseína al 2% (Sarath et al., 1989), que se basa en la hidrólisis de ésta que libera péptidos coloreados de bajo peso molecular, los cuales alcanzan su máxima absorbencia a 440 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades, siendo una unidad la cantidad de proteasa (UP) que origina un cambio en la absorbencia de 0.010 a 440 nm.

La quitinasa fue producida también en medio sintético, pero adicionado de quitina coloidal teñida con azul brillante de remazol. Este método tiene como base la liberación del colorante unido a la quitina una vez que ésta ha sido hidrolizada por las quitinasas del hongo. Una unidad de quitinasa (UQ) es la cantidad de enzima que origina un cambio en la absorbencia de 0.010 a 595 nm (Gómez, 2000). Debido a que el colorante liberado en esta reacción tiene la misma absorbencia que el reactivo utilizado en la determinación de la proteína total de los sobrenadantes del cultivo, no fue posible determinar la actividad específica de las quitinasas detectadas.

El criterio de selección para los aislados de *P. fumosoroseus* utilizado en los bioensayos, fue la producción independiente de proteasas o de quitinasas, por lo que los aislados mencionados en los resultados no son los mismos para ambas enzimas.

Determinación de proteína total en los sobrenadantes

Para calcular la actividad específica de proteasa en los sobrenadantes de *P. fumosoroseus*, se determinó la cantidad de proteína soluble en los mismos, utilizando el método de Bradford (1976). El complejo colorante-proteína tiene su máxima absorbencia a 595 nm y las lecturas son proporcionales a la concentración de proteína. Los datos obtenidos son interpolados en una curva estándar de albúmina sérica bovina (0-22 mg/ml).

Bioensayos de *M. anisopliae* var. *acidum* con langostas (Modificado de Hernández et al., 2000).

Cada tratamiento consistió en inocular veinte insectos con cada uno de los aislados, en un diseño completamente al azar. La inoculación se realizó individualmente con 2 ml de la suspensión de conidios en el pronoto y colocados en recipientes de plástico cubiertos con tela de muselina con 4 insectos en cada uno.

Los recipientes se conservaron en el laboratorio a 26°C. Las langostas fueron alimentadas diariamente con hojas de yuca. La mortalidad fue registrada a diario; los insectos muertos se colocaron en cajas

Petri de plástico con papel filtro. Las variables registradas durante el experimento fueron: la mortalidad, la fecha de emergencia del micelio y el área infectada en el insecto, así como el tiempo y la zona del insecto donde se observa la esporulación. Se llevaron a cabo tres réplicas del experimento. La determinación del tiempo letal medio (TLM) se realizó con base en el registro del porcentaje de mortalidad diaria acumulada, según Bateman et al. (1996).

Bioensayos de *P. fumosoroseus* con ninfas de mosquita blanca

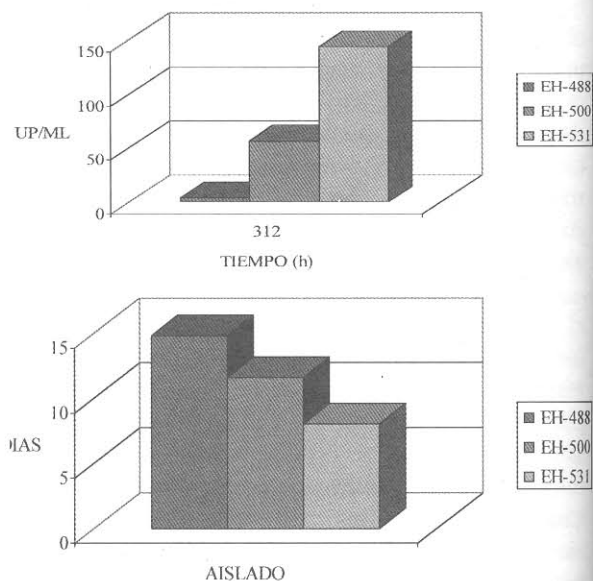
Se hicieron bioensayos con ninfas de segundo estadio de mosquita blanca (*T. vaporariorum*), de acuerdo con la metodología de Vidal et al. (1996). Se colectaron foliolos de frijol infestados con el insecto, seleccionando 25 ninfas sanas en el estadio dos; mismas que fueron identificadas por una marca de tinta indeleble sobre el foliolo.

Posteriormente, se cortó un disco del foliolo que contuviera las ninfas marcadas. Los discos se desinfectaron en alcohol, hipoclorito de sodio y agua, para luego secar al aire e infectar a los insectos con cinco concentraciones de conidios de cada aislado seleccionado. Las concentraciones fueron: 4.7×10^2 , 4.7×10^3 , 4.7×10^4 , 4.7×10^5 y 4.7×10^6 ; las ninfas estuvieron en contacto con éstas al hacer flotar el disco en la suspensión. Después los discos se colocaron en cajas de petri de 3.5 cm con medio KNOP (en gr/l de agua destilada: 0.25 de KCl, 0.25 de KH_2PO_4 , 0.25 de MgSO_4 , 0.02 de FeSO_4 , 10 de agar), se sellaron e incubaron por 24 h, después de las cuales la tapa de la caja se cambió por una con un orificio de 1 cm de diámetro cubierto con papel filtro estéril, incubada nuevamente por nueve días. Después del tiempo de incubación, se registraron las ninfas que habían cambiado de estadio y las que habían permanecido en estadio dos. Todas las ninfas seleccionadas fueron colocadas en medio de agar-agua para favorecer la germinación del hongo y verificar por la presencia de micelio encubriendo las ninfas, que éstas habían muerto por micosis. Cada concentración fue ensayada tres veces, con un testigo de ninfas sanas. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza simple (ANOVA) a un nivel de significancia del 5%. Las diferencias en promedios fueron analizadas a través de la prueba de Tukey (Dowdy y Wearden, 1983).

Resultados

La actividad de proteasa de *M. anisopliae* var. *acidum* se observó a partir de las 168 horas para todos los aislados. Para las 312 horas, el aislado EH-531 tuvo la actividad más alta (144 UP/ml) y una mortalidad del 100% a los 8 días (figura 1). El aislado con producción intermedia de proteasa fue el EH-500 con una actividad de 56.82 UP/ml y una mortalidad del 100% a los 11 días, mientras que para el aislado EH-488 (4.27 UP/ml) se presentó la actividad más baja con una mortalidad del 100% a los 14.8 días. El tiempo letal medio para los aislados EH-531, EH-500 y EH-488 fue de 6.2, 7.5 y 12 días, respectivamente.

Figura 1. Relación entre la actividad de Proteasa (UP/ml) y la virulencia, expresada como el tiempo para obtener el 100% de mortalidad de la langosta (*Schistocerca piceifrons piceifrons*) de los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*.



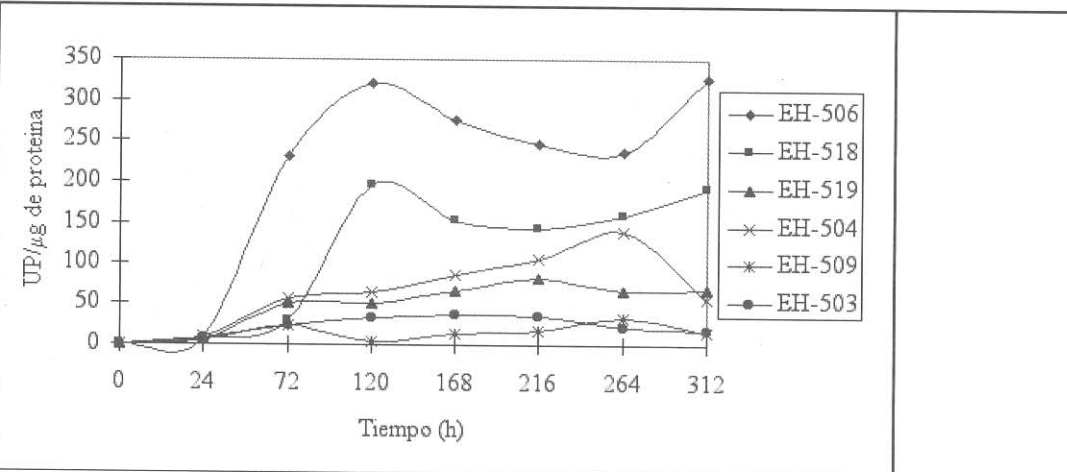
Fuente: Elaboración propia.

Los aislados de *P. fumosoroseus* con mayor actividad específica para proteasas fueron EH-506 (321 UP/mg de proteína) y EH-518 (197 UP/mg de proteína) a las 120 y 312 h de incubación, respectivamente. Los aislados con actividad intermedia fueron EH-519 (81 UP/mg de proteína) a las 216 h, y EH-504 (140

UP/mg de proteína) a las 264 h, este último mostró su actividad máxima más tardíamente. Los aislados con menor actividad de proteasa fueron EH-509 (33 UP/mg de proteína) y EH-503 (37 UP/mg de proteína), a las 264 h (figura 2). Las actividades volumétricas de quitinasa más altas se obtuvieron a las 264 h

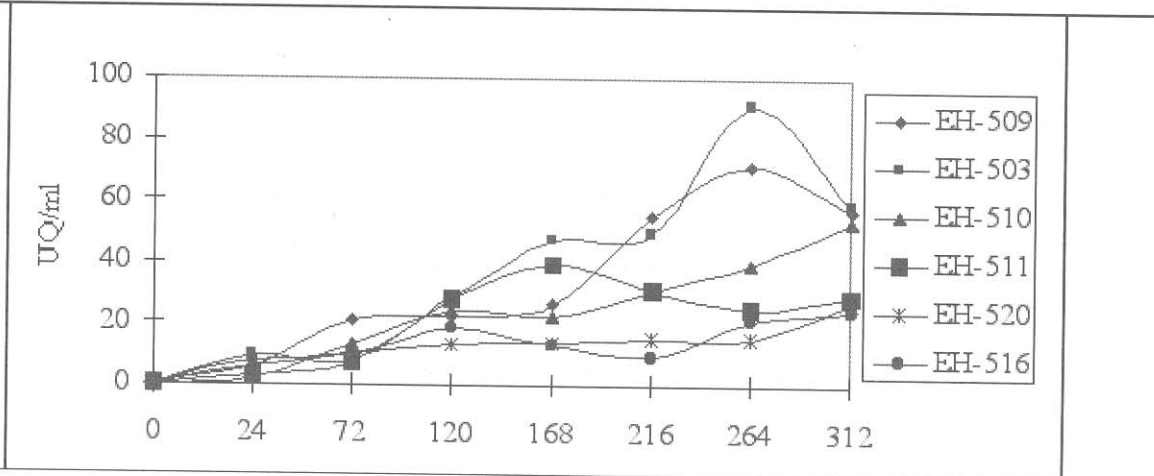
(figura 3) con los aislados EH-503 (71 UQ/ml) y EH-509 (91 UQ/ml), los aislados con actividad intermedia fueron EH-510 (53 UQ/ml) y EH-511 (39 UQ/ml), el cual presentó un máximo de actividad a las 168 h. Los aislados con actividad de quitinasa más baja fueron EH-520 (27 UQ/ml) y EH-516 (24 UQ/ml).

Figura 2. Actividad específica de proteasa (UP/mg de proteína total en el sobrenadante del cultivo) de aislados de *P. fumosoroseus* con alta, media y baja producción enzimática.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Actividad de quitinasa (UQ/ml) de aislados de *P. fumosoroseus* con alta, media y baja actividad enzimática.



Fuente: Elaboración propia.

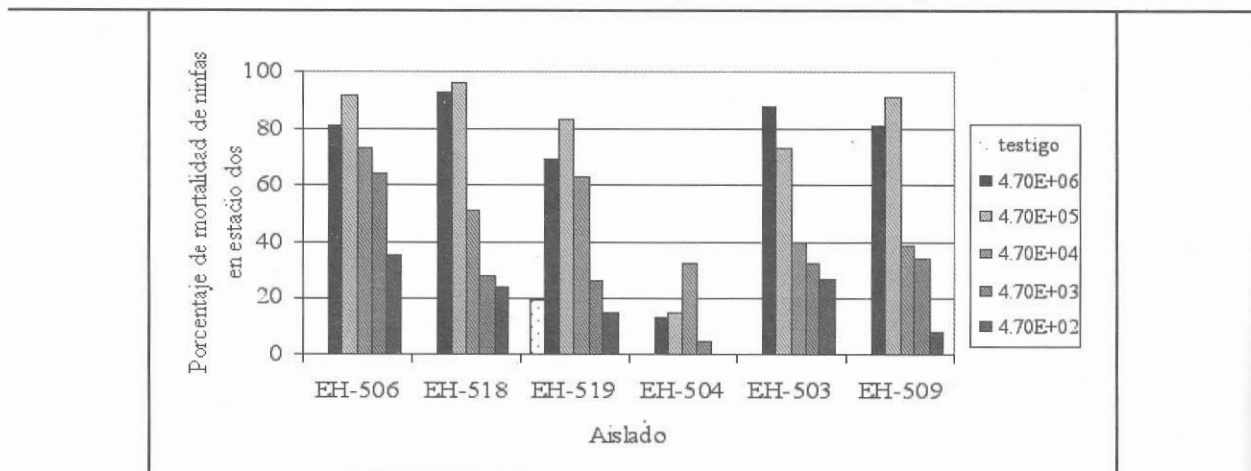
En los bioensayos de *P. fumosoroseus* con mosquita blanca, al cabo de 10 días de incubación, se cuantificaron las ninfas que habían quedado en estadio dos, así como aquellas que habían pasado a los estadios

tres o cuatro o alcanzaron a llegar al estadio adulto. Debido a que en el tiempo de incubación del bioensayo los testigos alcanzaron el estadio adulto, se consideraron ninfas muertas aquellas que per-

manecieron en estadio dos. Los insectos tratados con los aislados seleccionados por su actividad de proteasas, permanecieron en segundo estadio cuando las concentraciones de conidios eran altas (106 y 105) y conforme disminuía la concentración de conidios (103 y 102), disminuía la cantidad de ninfas que permanecían en ese estadio. Con excepción del

aislado EH-504, se observó una tendencia lineal en la relación dosis-respuesta al determinar el porcentaje de mortalidad (Figura 4). La diferencia de las ninfas en estadio dos encontradas para cada una de las concentraciones de conidios fue altamente significativa ($\alpha=0.05$) para todos los aislados.

Figura 4. Porcentaje de ninfas de mosquita blanca que permanecieron en estadio dos al ser infectadas con los aislados de *P. fumosoroseus* por su actividad de proteasa.

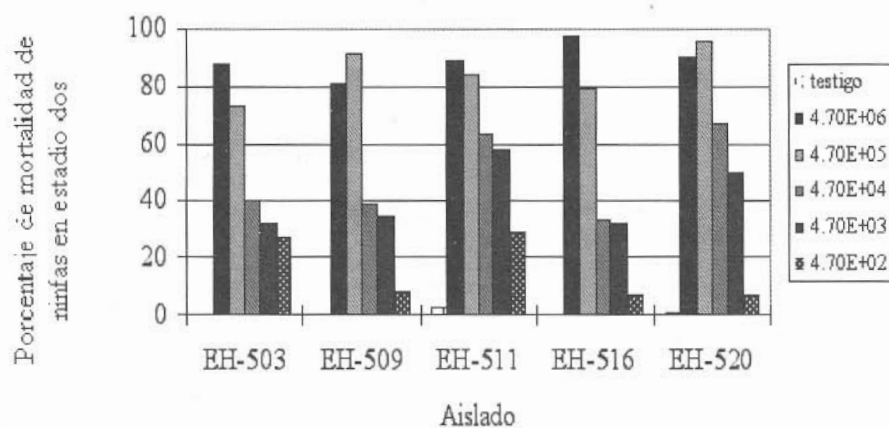


Fuente: Elaboración propia.

Los aislados seleccionados por su producción de quitinasa, mataron más rápidamente a las ninfas en estadio dos que tuvieron contacto con las concentraciones de conidios más altas (106 y 105), (Fig. 5) y las que fueron tratadas con las concentraciones más bajas lograron alcanzar los estadios tres o cuatro. En este caso, también pudo observarse una tendencia lineal dosis-respuesta en todos los aislados, dándose una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) para todas las concentraciones. En todos los casos, tanto de los aislados seleccionados por su producción de

proteasa como de quitinasa, la prueba de Tukey señaló que las concentraciones que limitaban más el cambio de estadio fueron 106 y 105 conidios/ml. Los aislados de *P. fumosoroseus* que causaron mayor mortalidad de ninfas en estadio dos, con todas las concentraciones de conidios probadas, fueron EH-506 (Fig. 2) y EH-511 (Fig. 3), que presentaron un máximo de actividad de proteasa a las 120 h de la cinética para el primer caso (Fig. 2) y un máximo de actividad de quitinasa a las 168 h para el aislado EH-511 (Fig. 3).

Figura 5. Porcentaje de ninfas de mosquita blanca que permanecieron en estadio dos al ser infectadas con los aislados de *P. fumosoroseus* por su actividad de proteasa.



Fuente: Elaboración propia.

Los aislados con mortalidad intermedia en todas las concentraciones probadas fueron EH-503, EH-509 y EH-518; los cuales tienen actividad de quitinasa alta, pero hasta las 312 h de la cinética enzimática. Los aislados con menor mortalidad de ninfas en estadio dos fueron EH-516 y EH-520, los cuales no tuvieron gran actividad de proteasas, sin embargo la actividad de quitinasa se elevó ligeramente a las 312 h de la cinética enzimática. El aislado EH-504 presentó una actividad de proteasa intermedia, pero hasta las 264 h de la cinética y en el bioensayo resultó prácticamente inocuo para las ninfas en estadio dos, probablemente por la aparición tardía del máximo de actividad de proteasas, que se alcanzó hasta las 312 h.

Discusión

Las diferencias entre las actividades enzimáticas observadas para las dos especies de hongos estudiados, pueden deberse probablemente a la presencia de varios tipos de proteasas en cada uno de estos hongos, como lo señalan St. Leger et al., (1997) para *M. anisopliae*, que tiene un cierto número y proteasas diferentes, dependientes de la cepa. Proteasas semejantes a las de *M. anisopliae* han sido descritas en otros hongos entomopatógenos y es probable que se encuentren en *P. fumosoroseus*; esto ha sido comprobado por Shimizu et al. (1993), quienes reportan que las proteasas de *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* y *M. anisopliae* comparten antígenos comunes.

En cuanto a las quitinasas, Chul et al. (1998) señalaron que *M. anisopliae* produce las actividades más altas al final del crecimiento cuando el hongo se cultiva en presencia de quitina coloidal como única fuente de carbono y nitrógeno. Jackson et al. (1985) publicaron que existe una correlación entre la producción de quitinasas extracelulares y virulencia de *Vorticillium lecanii* hacia el áfido *Macrosiphoniella sanbornii*, lo que coincide con lo observado para *P. fumosoroseus*.

En este estudio se demuestra la aparición de las dos enzimas relevantes para el establecimiento de las primeras fases del mecanismo de patogenicidad de los hongos estudiados, cuya máxima actividad se presenta a tiempos diferentes, lo que ya ha sido observado en *Metarhizium* y *Beauveria* (Bidochka y Kachaturians, 1988; Charnley y St. Leger, 1991; Smith y Gula, 1983). Estos resultados sugieren la importancia de la aparición temprana de un máximo de actividad de proteasa y más tardíamente, una alta actividad de quitinasa en la virulencia de *P. fumosoroseus* sobre la mosquita blanca.

Conclusión

Los resultados obtenidos tanto con aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* como con *P. fumosoroseus*, sugieren que los aislados que provocan el 100% de mortalidad en el menor tiempo y la mayor mortalidad por dosis, respectivamente, son los que presen-

tan una mayor actividad de proteasas. En el caso de *P. fumosoroseus*, una actividad de quitinasa alta, al comienzo de la cinética enzimática, corresponde con una alta mortalidad. En los modelos de virulen-

cia estudiados en ambos hongos, se observó una relación entre la actividad enzimática y la mortalidad ocasionada por estos hongos en la langosta y la mosquita blanca.

Referencias

- Adkisson, P. 1987. Beneficios económicos y ambientales del manejo integrado de plagas. *Problemas de Contaminación en México*, 2(4):2-7.
- Aguirre, L. 1995. *La situación actual de la mosquita blanca en México*. Simposio sobre control biológico de mosquita blanca. SAGARH. Tapachula, Chis, 9 nov.
- Albert, L. 1989. Residuos de plaguicidas en alimentos en México. *Problemas de contaminación en México*, 3(5):2-3.
- Barrientos, L. 1995. The present state of the locust and grasshopper problem in Brazil. *J. Orth., Res.*, 4:61-64.
- Barrientos, L., Astacio, O., Álvarez, F. y Poot, R. 1992. *Manual técnico sobre la langosta voladora (Schistocerca piceifrons piceifrons Walker 1970) y otros acridoideos de Centro América y Sureste de México*. FAO-AIRSA. 162 pp.
- Bateman, R., Carey, M., Butt, D., Prior, C., Abraham, I., Moore, D., Jenkins, N. y Felon, J. 1996. Screening for virulents isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biocontr. Sci Technol*, 6:549-560.
- Bidochka, M. y Khachatourians, J. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2699-2704.
- Bidochka, M., St. Leger, R., Stuart, A. y Gowanlock, K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145:955-963.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Charnley, A. y St. Leger, R. 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En: Cole, G.T. y H.C. Hoch (eds.). *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press. New York, pp. 267-286.
- Chávez, G. y Cruz C. 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Rev Lat Microbiol.*, 26:203-215.
- Chul, K., Park, S. y Gyu-Lee, D. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarbizium anisopliae*. *FEMS. Microbiol. Letts*, 165:267-271.
- Chul, K., Park, S. y Gyu-Lee, D. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarbizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 73:276-281.
- Deshpande, M. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3):229-243.
- Dowdy, S. y Wearden, S. 1983. *Statistics for research*. John Wiley and Sons. USA, 573 p.
- Driver, F., Milner, R. y Trueman, J. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 104:134-150.
- Fegan, M., Manners, J., Maclean, D., Irwin, J., Samuels, K., Holdon, D. y Li, D. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarbizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.*, 139:20075-2081.
- García J., M., Ramírez, C., Rivera, F. y Mier, T. 1999. Evaluación en campo de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas para el control del *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homoptera: Aleirodidae) en una cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Mex. Mic.*, 15:1-9.
- Garza, E. 1995. *Técnicas de reproducción masiva de hongos entomopatógenos. Memorias del II Taller de Producción Masiva de Hongos Entomopatógenos*. CNRCB-SAGAR, DGSV, DCNRF. México, pp. 23-29.
- Gillespie, J., Baetman, P. y Charnley K. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:128-137.
- Glare, T. y Milner, R. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. En: Arora, D., Ajello, L., Mukerji, K., (eds.), *Handbook of Applied Mycology, Vol. 2. Humans, Animals and Insects*. Marcel Dekker. USA, pp. 547-612.
- Goettel, M., Hajek, A., Siegel, J. y Evans, H. 2001. Safety of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W. y Magan, N., (eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Oxon, U.K.
- Gómez, M. 2000. *Selección y caracterización de una cepa quitinolítica de Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría en CQB. ENCB-IPN.
- Hall, R. 1982. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.*, 101:1-11.
- Hernández, V., Garza, E. y Berlanga, A. 1995. *Control microbial de mosquitas blancas con Paecilomyces spp. en México*. Simposio sobre control biológico de la mosquita blanca. SAGAR. Tapachula, Chis., 9 nov.

- Hernández, V., Berlanga, A. y Barrientos, L. 2000. *Vegetable and mineral oil formulations of Metarhizium anisopliae var. acridum to control the Central American locusts (Schistocerca gregaria gregaria Walker)* (Orthoptera: Acrididae). *J. Orthoptera Res.*, 9:223-227.
- Inglis, G., Goettel, M., Butt, T. y Strasser, H. 2001. *Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests*. En: Butt, T.M., Jackson, C. y Magan, M. (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CAB International, UK. pp. 23-69.
- Jackson, C., Heale, J. y Hall, R. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanbornii* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.*, 106:39-48.
- Khachatourians, G. 1992. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En: Arora, D., Ajello, L. y Mukerji, K. (eds.), *Handbook of Applied Mycology, Vol.2. Humans, Animals and Insects*. Marcel Dekker, USA, pp 613-663.
- Macías, C. y Ramírez, J. 1998. *Importancia de la langosta y el chapulín en México. I Simposio de langosta y chapulín*. En: XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Noviembre 5-6, Río Bravo, Tamaulipas, pp. 1-2.
- Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W. y Magan, N., (eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Oxon, U.K.
- Mier, T. 1990. *Estudio sobre patogenicidad, fisiología e identificación de hongos potencialmente útiles en el control biológico de plagas, Entomophthorales a Hirsutella thompsonii Fisher*. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.
- Mier, T., Rodríguez-Ponce, M., Carrillo-Farga, J. y Toriello, C. 1994. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 36:107-111.
- Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. 2000. *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio*. División CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco e Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Osborne, L. y Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla. Entomol.*, 75:456-471.
- Prabhaker, N., Coudried, D. y Meyerdirk, D. 1985. Insecticide resistance in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.*, 78:748-752.
- Quimby, P., King, L. y Grey, W. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88:147-152.
- Restrepo, I. 1988. *Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México*. Editorial Andrómeda. México.
- Sarath, G., De La Motte, R. y Wagner, F. 1989. Protease assay methods. En: Benyon, R.J. y J. S. Bond (eds.) *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 25-55.
- Screen, S., Hu, G. y St. Leger, R. 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78:260-266.
- Shimizu, S., Tsuchitani, S. y Matsumoto, T. 1993. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. *J. Invertebr. Pathol.*, 61:192-195.
- Smith, R. y Grula, E. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 42:319-326.
- St. Leger, R., Charney, A. y Cooper, R. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 47:295-302.
- St. Leger, R., Cooper, M. y Charnley, A. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:1371-1382.
- St. Leger, R., Bidochka, M. y Roberts, D. 1994. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313:1-7.
- St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M., Rizzo, N. y Roberts, D. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:907-912.
- Toriello, C., Navarro-Barranco, H. y Mier, T. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. *Rev. Mex. Micol.*, 15:123-125.
- Venezia, M., Gerson, J. y Tal, S. 1983. A laboratory method for estimating survival of tobacco whitefly nymphs after insecticide treatment based on honeydew excretion. *Phytoparasitica*, 11(1):25-32.
- Vidal, C., Lacey, L. y Fargues, J. 1996. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J. Econ. Entomol.*, 90(3):765-771.