



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización fenotípica del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams (syn. *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas) para la selección de los aislados idóneos en el control biológico de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL AYALA ZERMEÑO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MEXICO, D.F.

ENERO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Págs.

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

1

1. Antecedentes de la caracterización fenotípica de *Lecanicillium lecanii*

5

II. JUSTIFICACIÓN

8

III. HIPÓTESIS

9

IV. OBJETIVO GENERAL

9

V. OBJETIVOS PARTICULARES

9

VI. ESQUEMA DE TRABAJO

10

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

11

1. Hongos

11

2. Obtención de aislados monospóricos

11

3. Selección de aislados monospóricos

13

4. Otras caracterizaciones fenotípicas de los aislados de *Lecanicillium lecanii*

14

a) Pruebas de termotolerancia

14

b) Producción de biomasa en medio líquido

14

c) Pruebas de virulencia de los aislados en mosquita blanca

15

d) Método para la determinación de actividad de proteasas

18

e) Método semicuantitativo para determinar otras actividades

enzimáticas de los aislados fúngicos

18

5. Análisis estadístico

19

VIII. RESULTADOS	20
1. Selección de los aislados monospóricos	20
2. Otras caracterizaciones fenotípicas de los aislados de <i>Lecanicillium lecanii</i>	28
a) Pruebas de termotolerancia	28
b) Producción de biomasa	33
c) Bioensayos en <i>Bemisia tabaci</i>	33
d) Determinación de actividad de proteasas	38
e) Determinación semicuantitativa de otras actividades enzimáticas	38
IX. DISCUSIÓN	41
X. CONCLUSIONES	48
XI. BIBLIOGRAFÍA	49
XII. ANEXO	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Bemisia tabaci</i> .	2
Figura 2. Morfología de <i>Lecanicillium lecanii</i> . a) colonia de 15 días en agar de Sabouraud con extracto de levadura y peptona a 25 °C; b) conidióforos y conidios característicos.	3
Figura 3. Esquema general del mecanismo de penetración cuticular de los hongos entomopatógenos (Modificado de Charnley & St. Leger, 1991).	4
Figura 4. Obtención de los aislados monospóricos.	13
Figura 5. Descripción esquemática del método de producción de biomasa en medio líquido.	16
Figura 6. Adulto de <i>Bemisia tabaci</i> en el envés de una hoja de nochebuena.	17
Figura 7. Plantas de <i>Lantana</i> sp. en jaulas para conservar la población de mosquita blanca para los bioensayos.	17
Figura 8. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-348 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	21
Figura 9. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-457 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	22
Figura 10. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-458 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	23
Figura 11. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-459 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	25
Figura 12. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-460 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	26
Figura 13. <i>Lecanicillium lecanii</i> , polispórico EH-572 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.	27
Figura 14. Comparación de la tasa de crecimiento de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia del hongo <i>Lecanicillium lecanii</i> a 15, 25 y 30 °C.	29
Figura 15. Comparación de las colonias de <i>Lecanicillium lecanii</i> con mayor (ARSEF 1029, EH-572/7, EH-457/5, EH-458/2 y EH-459) y menor crecimiento (ARSEF	

1026) a 25 °C durante 15 días.	30
Figura 16. Comparación de las colonias de <i>Lecanicillium lecanii</i> con mayor (ARSEF 1029, EH-459, EH-459/1, EH460/1 y EH-457/5) y menor crecimiento (EH-348/2) a 15 °C durante 15 días.	31
Figura 17. Comparación de las colonias de <i>Lecanicillium lecanii</i> con mayor (ARSEF 1029, ARSEF4064, EH-572/7 y EH-572) y menor crecimiento (EH-348) a 30 °C durante 15 días.	32
Figura 18. Producción de biomasa en medio de cultivo líquido, de los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados.	34
Figura 19. Ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> infectadas por <i>Lecanicillium lecanii</i> EH-572, en agar agua a los 9 días de incubación a 25 °C, HR 96%, 4X.	35
Figura 20. Ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> infectadas por <i>Lecanicillium lecanii</i> EH-348, en agar agua a los 9 días de incubación a 25 °C, HR 96%, 4X.	35
Figura 21. Mortalidad acumulada diaria en porcentaje.	36
Figura 22. Tiempo letal medio (TL ₅₀) de los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados.	37
Figura 23. Verificación de la muerte de ninfas por <i>Lecanicillium lecanii</i> , aislado EH-458.	37
Figura 24. Verificación de la muerte de ninfas por <i>Lecanicillium lecanii</i> , aislado EH-458/2.	37
Figura 25. Producción de proteasas (UP/mL) en medio basal de sales adicionado de caseína de tres monospóricos de <i>Lecanicillium lecanii</i> .	38
Figura 26. Perfil enzimático del polispórico (P) y monospórico seleccionado (M) de los aislados EH-457 (izquierda), EH-458 (centro) y EH-459 (derecha).	40
Figura 27. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-348, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).	55
Figura 28. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-457, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).	55

Figura 29. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-458, como de sus respectivos monospóricos (2, 3, 5, 6, 7, y 8).

56

Figura 30. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-459, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

56

Figura 31. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-460, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

57

Figura 32. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polispórico (P) EH-572, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

57

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Características de los aislados de <i>Lecanicillium lecanii</i> .	12
Tabla 2. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-348 y sus monospóricos.	21
Tabla 3. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-457 y sus monospóricos.	22
Tabla 4. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-458 y sus monospóricos.	23
Tabla 5. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-459 y sus monospóricos.	25
Tabla 6. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-460 y sus monospóricos.	26
Tabla 7. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-572 y sus monospóricos.	27
Tabla 8. Monospóricos seleccionados considerando el análisis estadístico de los datos de la tasa de crecimiento (mm/día) y producción de conidios/mL.	28
Tabla 9. Tasa de crecimiento a 25 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.	30
Tabla 10. Tasa de crecimiento a 15 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.	31
Tabla 11. Tasa de crecimiento a 30 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.	32
Tabla 12. Producción de biomasa en medio de cultivo líquido de los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados.	34
Tabla 13. Mortalidad acumulada en % y TL ₅₀ en ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> .	36
Tabla 14. Producción de proteasas (UP/mL) <i>Lecanicillium lecanii</i> .	38
Tabla 15. Perfil enzimático de los aislados polispóricos y monospóricos de <i>Lecanicillium lecanii</i> , mediante el método semicuantitativo API ZYM™.	39

RESUMEN

La utilización de hongos entomopatógenos en el control biológico de plagas es una alternativa a la contaminación ambiental de insecticidas químicos. En este contexto se estudiaron diversos aislados del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams (\equiv *Verticillium lecanii* (Zimmerm.) Viégas) para seleccionar el más adecuado para el control de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Se utilizaron seis aislados de *L. lecanii* de insectos y de la roya del café en México (MX): EH-348, EH-457, EH-458, EH-459, EH-460 y EH-572, además de seis cepas de referencia de diferentes países. A partir de los aislados de MX se obtuvieron aislados monospóricos y se seleccionó uno de cada de cada aislado polispórico, con base en la mayor tasa de crecimiento y producción de conidios. Se estudió el efecto de diferentes temperaturas (15, 25, 30 y 35 °C) sobre la tasa de crecimiento (mm/día) en agar de glucosa Sabouraud, de los aislados originales (polispóricos) y monospóricos seleccionados. Se ensayó la producción de biomasa en medio líquido con insumos industriales (en g/L: azúcar estándar 10, glucosa industrial 5, extracto de levadura 5, peptona de gelatina 0.05). La producción de biomasa se calculó por peso seco. La determinación de la virulencia se llevó a cabo por bioensayos en ninfas de 2do y 3er estadio de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) durante 8 días a 25 °C y 96 % humedad relativa (HR) calculando la mortalidad acumulada y el tiempo letal medio (TL₅₀). También se determinó la actividad de proteasas en medio mínimo de sales [(g/L: KH₂PO₄ 1, MgSO₄ 7H₂O 0.5, 10 mL/L de la solución de minerales (g/100 mL: FeSO₄ 7H₂O 0.2, ZnSO₄ 1, NaMoO₄ 0.02, CuSO₄ 0.02, MnCl₂ 0.02)] adicionado de caseína al 1 %. Para la determinación de las proteasas se realizó el método de la azocaseína reportando el resultado en unidades de proteasa por mL (UP/mL). Se determinó el perfil de actividad enzimática por el método semicuantitativo API ZYM™. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para observar diferencias significativas y prueba de comparación múltiple de medias de Tukey HSD. Los datos se procesaron en el programa SPSS V. 12, 2001. En las pruebas de virulencia, los datos de mortalidad acumulada en porcentaje, se transformaron a arcoseno y el TL₅₀ se calculó con análisis Probit con el paquete POLO-PC (1987). Se seleccionaron los monospóricos EH-348/2, EH-457/5, EH-458/2, EH-459/1, EH-460/1 y EH-572/7 con base en la mayor producción de conidios y/o tasa de crecimiento. En general, las pruebas de termotolerancia mostraron que los hongos estudiados presentaron la mayor tasa de crecimiento a 25 °C, crecieron mejor a 15 que a 30 °C, y ninguno creció a 35 °C. Se encontraron diferencias significativas (P < 0.05) entre la tasa de crecimiento de los aislados polispóricos, monospóricos y cepas de referencia de este hongo a 15, 25 y 30 °C. En promedio, la tasa de crecimiento de los aislados monospóricos fue mayor que la de los polispóricos a 30 °C. La mayor producción de biomasa por peso seco se observó en EH-458 y 458/2 con 0.263 y 0.336 g, respectivamente. Los aislados con menor biomasa fueron EH-460 y EH-348/2 con 0.016 y 0.033 g, respectivamente. En general, los aislados monospóricos mostraron un mayor promedio del peso seco de la biomasa. En cuanto a la virulencia, los aislados más virulentos, EH-459/1, EH-458 y EH-458/2 mostraron una mortalidad acumulada de 97.3, 100 y 98.6 % y un TL₅₀ de 2.77, 2.14 y 2.76 días, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas (P < 0.05) entre la mortalidad acumulada solamente en los aislados EH-572 y EH-458. Los resultados no mostraron relación entre la producción de proteasas y la virulencia. En general, el perfil enzimático obtenido por el método API ZYM™ considerando una escala semicuantitativa, mostró que los aislados poli- y monospóricos presentaron una actividad destacada para las enzimas esterasa (C4) (alta a moderada), fosfatasa ácida (alta a moderada), naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (moderada), y β -glucosidasa (moderada). Considerando las pruebas de caracterización fenotípica realizadas se sugiere a los aislados monospóricos EH-457/5 y EH-458/2 como los candidatos idóneos para las pruebas de campo. El aislado monospórico EH-459/1 se sugiere como candidato para pruebas de invernadero, ya que este aislado no mostró una gran producción de conidios, pero fue uno de los más virulentos.

SUMMARY

The use of entomopathogenic fungi for the biological control of plant pests is an alternative to the environmental pollution caused by chemical insecticides. In this context, we studied diverse isolates from the fungus *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams (\equiv *Verticillium lecanii* (Zimmerm.) Viégas) to select the most appropriate for the control of the whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). We used six *L. lecanii* isolates from insects and from coffee rust in Mexico (MX): EH-348, EH-457, EH-458, EH-459, EH-460, and EH-572, as well as six reference strains from different countries. From the MX isolates, monospore cultures were obtained, and one monospore derived from each polypore culture was selected based on the highest growth and conidia production rates. We studied the effect of different temperatures (15, 25, 30, and 35 °C) on the growth rate (mm/day) of the original isolates (polyspores) and of the selected monospore cultures in Sabouraud-glucose-agar medium. On the other hand, we tested the biomass production in liquid medium supplemented with industrial products (in g/L: unrefined sugar, 10; industrial glucose, 5; yeast extract, 5; gelatin peptone, 0.05). Biomass production was calculated per dry weight. Virulence determination was assessed in 2nd and 3rd instar nymphs of the whitefly (*Bemisia tabaci*) during 8 days at 25 °C and 96 % RH (relative humidity), calculating the accumulated mortality and the median lethal time (LT₅₀). Proteases were also determined in minimum salt medium [g/L: KH₂PO₄ 1, MgSO₄ 7H₂O 0.5, 10 mL/L of the minerals solution (g/100 mL: FeSO₄ 7, H₂O 0.2, ZnSO₄ 1, NaMoO₄ 0.02, CuSO₄ 0.02, MnCl₂ 0.02)] supplemented with 1% casein. To determine proteases, the azocasein method was used, reporting the results in protease units per milliliter (PU /mL). The enzymatic activity profile was determined by means of the API ZYM™ semiquantitative method. The obtained data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and to Tuckey's HSD multiple mean comparison test. Data were processed with the SPSS V. 12, 2001 software. For virulence tests, accumulated mortality in percentage data were transformed to arcsin and the LT₅₀ was calculated with the Probit analysis using the POLO-PC (1987) package. Monospore isolates EH-348/2, EH-457/5, EH-458/2, EH-459/1, EH-460/1, and EH-572/7 were chosen based on the highest conidia production and/or growth rate. In general, thermotolerance tests revealed that the studied fungi depicted the highest growth rate at 25 °C, they grew better at 15 than at 30 °C, and none grew at 35 °C. Significant differences (P<0.05) were found between the polypore and monospore cultures and the reference strains at 15, 25, and 30 °C. In average, the growth rate of the monospore cultures was higher than that of the polypore cultures at 30 °C. The highest biomass production per dry weight was observed in EH-458 and 458/2 with 0.263 and 0.336 g, respectively. The isolates with the least biomass were EH-460 and EH-348/2 with 0.016 and 0.033 g, respectively. In general, monospore culture showed a higher average dry weight of biomass. Regarding virulence, the most virulent isolates, EH-459/1, EH-458, and EH-458/2 showed an accumulated mortality of 97.3, 100, 98.6 % and LT₅₀ of 2.77, 2.14, and 2.76 days, respectively. Significant differences (P<0.05) in the accumulated mortality were found only between isolates EH-572 and EH-458. Results revealed no relation between proteases production and virulence. In general, the enzymatic profile obtained with the API ZYM™ method in a semiquantitative scale, revealed that polypore and monospore cultures presented a marked enzymatic activity for: esterase (C4) (high to moderate) acid phosphatase (high to moderate), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (moderate), and β -glucosidase (moderate). Based on the performed phenotypic characterization tests, we suggest EH-457/5 and EH-458/2 monospore isolates as suitable candidates for field tests. Monospore isolate EH-459/1 would be a suitable candidate only for greenhouse tests due to its low conidial yield.

Se estudiaron diversos aislados del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams para seleccionar el más adecuado para el control de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Se utilizaron seis aislados colectados de insectos y de la roya del café en México EH-348, EH-457, EH-458, EH-459, EH-460, EH-572 y seis cepas de referencia de diferentes países. De los aislados de México se obtuvieron monospóricos y se seleccionó uno con base en la mayor tasa de crecimiento y producción de conidios. Se estudió el efecto de las temperaturas (15, 25, 30 y 35 °C) en la tasa de crecimiento, de polispóricos y monospóricos seleccionados. Se ensayó la producción de biomasa en medio líquido y se calculó por peso seco. La virulencia se llevó a cabo por bioensayos en ninfas de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) a 25 °C y 96 % humedad relativa (HR) calculando la mortalidad acumulada y el tiempo letal medio (TL₅₀). Se determinó la actividad de proteasas en medio mínimo de sales adicionado de caseína al 1 %. El perfil de actividad enzimática se determinó por el método API ZYM. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey. Se seleccionaron los monospóricos EH-348/2, EH-457/5, EH-458/2, EH-459/1, EH-460/1 y EH-572/7. En las pruebas de termotolerancia los hongos presentaron la mayor tasa de crecimiento a 25 °C, crecieron mejor a 15 que a 30 °C, y ninguno creció a 35 °C. La mayor producción de biomasa por peso seco, se observó en los aislados EH-458 y 458/2. Los aislados más virulentos fueron EH-459/1, EH-458 y EH-458/2. Los resultados no mostraron relación entre la producción de proteasas y la virulencia. El perfil enzimático por API ZYM, mostró que los aislados poli- y monospóricos presentaron una actividad destacada para esterasa (C4), fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, y β -glucosidasa. Las pruebas de caracterización fenotípica sugieren a los aislados EH-457/5 y EH-458/2 como los candidatos idóneos para las pruebas de campo.

I. INTRODUCCIÓN

Una alternativa alentadora para controlar de manera efectiva plagas devastadoras en cultivos de importancia económica es el desarrollar programas de control biológico incluyendo el uso de hongos entomopatógenos.

Uno de los programas de carácter regional y nacional contra insectos plaga de importancia económica del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (CNRCB-SAGARPA) en México, está enfocado al control del homóptero conocido como mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) que comprende, entre otras especies, *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Trialeurodes vaporariorum* (Westood) y *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring) (Biotipo B de *Bemisia tabaci*). Esta es una plaga cosmopolita que ataca una gran variedad de aislados de importancia económica como son sandía, melón, pepino, soya, frijol, algodón, tomate, tabaco, papa, girasol y plantas ornamentales cultivadas en invernadero (Romero, 1995; Hilje, 1994). El daño causado varía con respecto a la etapa de desarrollo de la plaga (Figura 1). Los estadios jóvenes y el adulto se alimentan succionando la savia del envés de la hoja causando defoliación, achaparamiento y bajos rendimientos. Asimismo, excretan una mielecilla que provoca el desarrollo de fumaginas, estas últimas se conforman de diversas especies de hongos que aprovechan las excreciones azucaradas (el daño ocasionado es la interferencia en los procesos de fotosíntesis y respiración), por lo que los frutos requieren lavado incrementando los costos de producción. El adulto, a su vez, transmite una gran variedad de virus y origina desórdenes fisiológicos en las plantas por las toxinas que excreta al alimentarse, como son la maduración irregular de frutos de tomate, la hoja plateada de la calabaza, la decoloración de la raíz en zanahoria y en el tallo de brócoli (Ramírez-Villapudua, 1996). En México, la mosquita blanca ha sido controlada con diferentes insecticidas químicos, entre ellos, metamidofós, diazinón, malatión y endosulfán (SARH, 1994), productos tóxicos para los seres vivos (incluido el hombre), y además interfieren en el funcionamiento adecuado de los agroecosistemas (Worthing y Hance, 1991). Aunado a esto la plaga ha desarrollado un aumento marcado de su resistencia a insecticidas químicos (Prabhaker *et al.*, 1985).

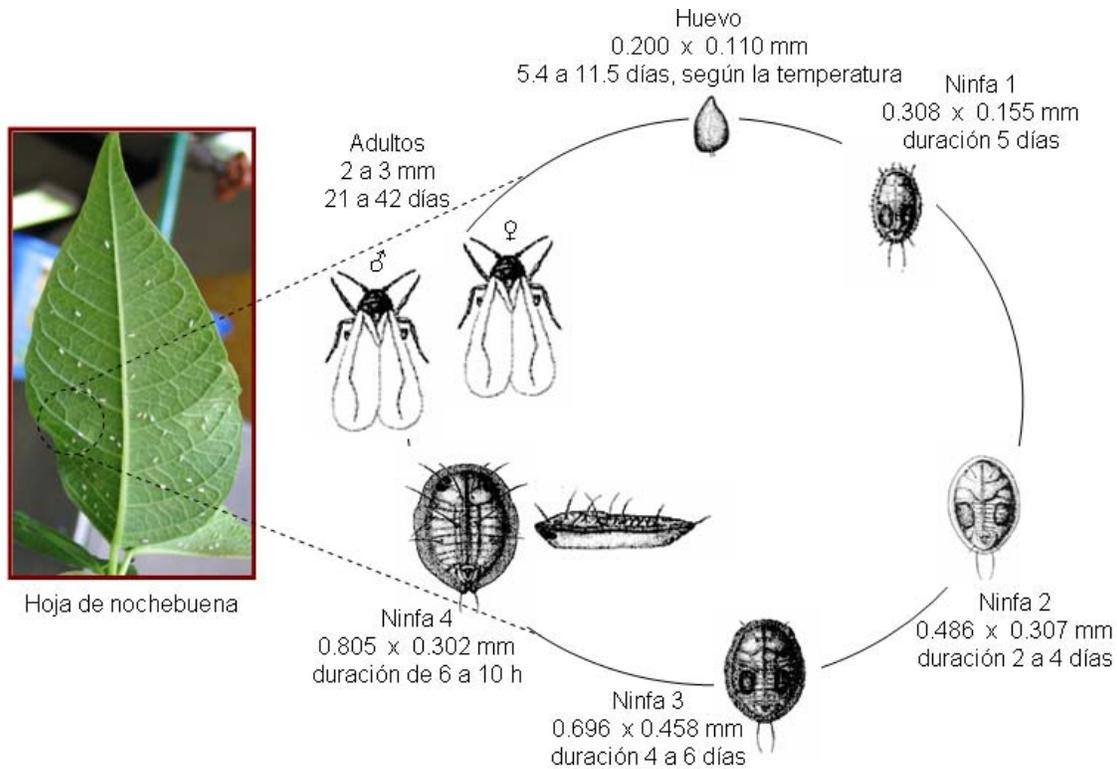


Figura 1. Ciclo biológico de *Bemisia tabaci*.

Una de las alternativas para la reducción del uso de los agroquímicos contra esta plaga, es el control biológico con hongos entomopatógenos. Entre ellos, *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams (\equiv *Verticillium lecanii* (Zimmerm.) Viégas) es un candidato ideal para ser usado como micoinsecticida. Este hongo tiene una amplia distribución en la naturaleza (se ha aislado en suelos no cultivados y pastos en la India y Holanda respectivamente, compostas de jardín en Alemania y suelos de tundra en Alaska) y puede provocar grandes epizootias en regiones de clima tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos de invernaderos (Domsch *et al.*, 1980). Ha sido descrito como patógeno de insectos, pertenecientes a diferentes órdenes como: Homoptera (áfidos y mosquita blanca), Orthoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera, Lepidoptera, incluyendo trips y ácaros eriófidios (Mier *et al.*, 1991; Domsch *et al.*, 1980). Además, también es descrito como agente de control biológico de royas como *Hemileia vastatrix* (Basidiomycota: Uredinales) (Carrión, 1988); *Uromyces dianthi* (Spencer, 1980); *Uromyces appendiculatus* (Grabski & Mendgen, 1986); *Puccinia recondita* (Spencer & Atkey, 1981); y otros hongos (mildiús pulverulentos) (Askary *et al.*, 1997).

El nombre científico de este hongo ha cambiado recientemente, *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas, constituye ahora un sinónimo nomenclatural, y el nombre científico válido utilizado es *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams (Zare & Gams, 2001), mismo que se utilizará en este trabajo. Este hongo presenta colonias cuya coloración varía de blanco a amarillo pálido, su apariencia es algodonosa y sus hifas son hialinas, amarillentas u ocráceas (Figura 2 a). Sus fiálides tienen un arreglo solitario o en escasos verticilos que surgen de conidióforos erectos o de hifas aéreas (Figura 2 b). Los conidios están dispuestos en cabezuelas, y presentan una forma cilíndrica con puntas redondeadas o elipsoidales, en un tamaño de 2.3-10 x 1.0-2.6 μm (Domsch *et al.*, 1980).

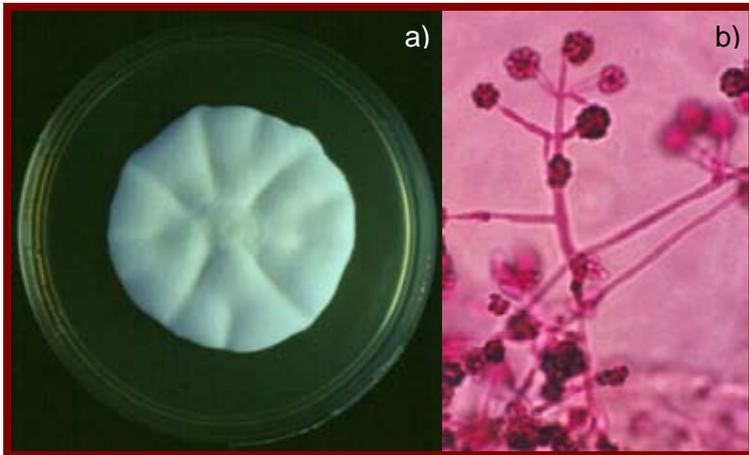


Figura 2. Morfología de *Lecanicillium lecanii*. a) colonia de 15 días en agar de Sabouraud con extracto de levadura y peptona a 25 °C; b) conidióforos y conidios característicos.

La caracterización fenotípica de los hongos entomopatógenos representa singular importancia ya que incide directamente, no sólo en la correcta identificación del mismo, sino también en la biología del microorganismo. Contempla el estudio de las condiciones óptimas para la producción de propágulos, consistentes en el ingrediente activo del micoinsecticida (Jenkins *et al.*, 1998), así como la virulencia del hongo hacia el insecto plaga (Arango *et al.*, 1994) y las enzimas fúngicas involucradas en el mecanismo de infección al insecto (Gupta *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1999).

El mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos incluye la adhesión, penetración y diseminación en el insecto hospedero (Figura 3). Además de la función mecánica que ejercen las estructuras morfológicas producidas durante la penetración, interviene en este proceso un complejo arsenal de enzimas como son las proteasas y quitinasas, que facilitan la penetración de las capas más externas (epicutícula), y la

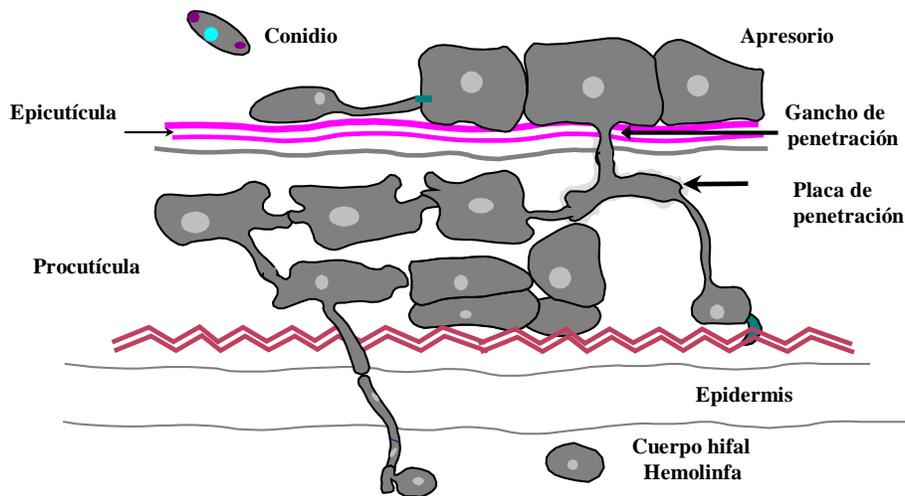


Figura 3. Esquema general del mecanismo de penetración cuticular de los hongos entomopatógenos (Modificado de Charnley & St. Leger, 1991).

degradación de las capas internas (procutícula, epidermis), hasta invadir el hemocele del insecto con la aparición de blastosporas. Una de las proteasas más activas es la Pr1, que modifica las proteínas, degradándolas a pequeños fragmentos (péptidos), que a su vez son utilizados para la nutrición del hongo mediante la intervención de otras proteasas (aminopeptidasas y carboxipeptidasas) (St. Leger, 1995).

En Europa, ya existen desde hace varios años micoinsecticidas comerciales con base en conidios de *V. lecanii*, incluyendo el Mycotal[®] contra la mosquita blanca y trips, y Vertalec[®] que se utiliza contra plagas de áfidos, ambos formulados son producidos por Koppert en los Países Bajos (Butt *et al.*, 2001). Estas cepas se han incluido como referencia en un número considerable de trabajos de caracterización fenotípica y genotípica (Mor *et al.*, 1996; Drummond & Heale, 1998; Gindin *et al.*, 2000; Bielikova *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2003).

Para la elaboración de insecticidas biológicos óptimos es primordial llevar a cabo una identificación apropiada y la selección de los aislados candidatos de hongos entomopatógenos utilizando, para ello, avances científicos que permitan su adecuada caracterización genotípica y fenotípica. Dichos avances deberán permitir, entre otras cosas, la búsqueda de aquellos especímenes virulentos que produzcan la mayor cantidad de propágulos (conidios y blastosporas) para ser usados en el combate de plagas, y que además sean los más seguros para la salud humana y animal (Mier *et al.*, 1994; Toriello *et al.*, 1999) por la ausencia de efectos dañinos para los numerosos componentes del ambiente.

1. Antecedentes de la caracterización fenotípica de *Lecanicillium lecanii*

Remaudière & Latgé (1985) reportaron por primera vez la existencia de 19 especies de hongos entomopatógenos en México entre ellos *V. lecanii*, colectado en la delegación Xochimilco, D.F. a 2200 m de altitud, infectando al áfido *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), en el mes de agosto, durante la época de lluvias. Mier *et al.* (1991) reportaron el aislamiento de *V. lecanii* a partir de ninfas estadios 2 y 3 de *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, en hojas colectadas de cultivos de frijol y jitomate, en el estado de Morelos, México.

Con respecto a la caracterización fenotípica de *V. lecanii*, López-Llorca & Carbonell (1999) caracterizaron ocho aislados de esta especie colectados en diferentes regiones de España, llevando a cabo estudios de termotolerancia, pH óptimo para el crecimiento, germinación, ensayos semicuantitativos de actividad enzimática, efecto de los fungicidas sobre el crecimiento y bioensayos de virulencia en larvas de *Galleria mellonella*. Mencionan, entre otras cosas, que la temperatura es el factor ambiental que más puede afectar el mecanismo de infección y refieren la capacidad de los hongos entomopatógenos de crecer en un amplio espectro de temperaturas. Estos investigadores sugieren que un estudio de caracterización de aislados fúngicos necesariamente debe contemplar la inclusión de pruebas de compatibilidad con productos agrícolas comúnmente utilizados en los agroecosistemas. Por último, proponen que cualquier caracterización de patógenos de insectos debe incluir estimaciones de su virulencia.

En otro estudio por Cortez-Madrugal *et al.* (2003), comparan morfológica y fisiológicamente siete aislados de *L. lecanii*, con cuatro monospóricos obtenidos de cada uno de ellos (los aislados fueron colectados en el estado de Tabasco, centro de la República Mexicana y Cuba). Estos autores estudiaron la apariencia del micelio y el tamaño de los conidios y lo relacionaron con la virulencia de los aislados; ensayaron además el tamaño y tiempo de germinación de 50 % de los conidios (Tiempo de Germinación Medio, GT₅₀). Los resultados sugieren que es posible mejorar el potencial de los hongos para el control de plagas, si se utilizan aislados monospóricos.

Mor *et al.* (1996) estudiaron por DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) la variabilidad genética de 36 aislados de *V. lecanii* y *Verticillium* sp. de diferentes hospederos y regiones del mundo. Los autores encontraron que *V. lecanii* mostró una gran variabilidad con

base en los estudios de RAPD's, y los patrones de DNA encontrados no mostraron relación con la virulencia.

Sugimoto *et al.* (2003) investigaron la variabilidad genética, virulencia y características de 46 aislados de *V. lecanii* de diversos hospederos y regiones geográficas del mundo. También encontraron variabilidad genética en *V. lecanii* y sugieren que existe relación entre las propiedades genéticas y la morfología conidial.

Los trabajos de caracterización enzimática de *L. lecanii* no son muy numerosos. St. Leger *et al.* (1986) realizaron un estudio por el método de API ZYM™ de esta y otras especies de hongos entomopatógenos. El perfil enzimático de *V. lecanii* mostró diferencias en comparación con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Estos investigadores indican que el método semicuantitativo API ZYM™ es rápido de realizar, reproducible y revela el potencial enzimático de los aislados. García-Juárez *et al.* (1999) investigaron el efecto de un insecticida sobre la producción de exoenzimas, utilizando el sistema API ZYM™, encontrando inhibición de las enzimas leucina arilamidasa (proteasa) y N-acetil-β-glucosaminidasa (quitinasa) por el insecticida. Bidochka *et al.* (1999) construyeron un dendrograma del género *Verticillium* considerando para ello el perfil de las enzimas extracelulares esterases, lipasas, proteasas, fosfatasas, y carbohidratasas obtenido por API ZYM™. Los resultados mostraron consistencia en el agrupamiento de los patógenos facultativos de plantas y de los patógenos facultativos de insectos; los patógenos oportunistas mostraron poca especificidad de hospederos y se dispersaron a lo largo del dendrograma.

En otro trabajo, Barranco-Florido *et al.* (2002) investigaron el proceso de fermentación en estado sólido para tres aislados de *V. lecanii* ATCC 26854, ATCC 46578 y un aislado silvestre (WS); los ensayos semicuantitativos de actividad enzimática indicaron una actividad proteolítica y quitinolítica abundante, para los aislados ATCC 26854 y WS. López-Llorca *et al.* (2002) encontraron que la hidrofobicidad, formación de apresorios y producción de proteasas, están involucrados en el proceso de infección temprana de patógenos fúngicos en huevos de nemátodos. Entre las especies estudiadas incluyeron aislados de *L. lecanii*.

Con respecto a ensayos sobre la virulencia de *L. lecanii* en insectos, Gindin *et al.* (2000) evaluaron la virulencia de 35 aislados de este taxón colectados de diferentes hospederos en diversas regiones geográficas del mundo, para ser utilizados contra la

mosquita blanca de la hoja plateada *Bemisia argentifolii* y encontraron una gran variabilidad entre todos los aislados. Yeo *et al.* (2003) investigaron el efecto de la temperatura en la germinación y virulencia, con el fin de seleccionar aislados con potencial para el control de áfidos. Los autores estudiaron dos micoinsecticidas comerciales, uno de *B. bassiana* y otro de *V. lecanii*, incluyeron además otros aislados como *B. bassiana*, *V. lecanii*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. Los autores concluyeron que el aislado de *V. lecanii* HRI 1.72 (que se comercializa como Vertalec®) fue el más prometedor para el control biológico de áfidos, basándose en los resultados de las pruebas de laboratorio.

II. JUSTIFICACIÓN

Para lograr mejores micoinsecticidas para el campo agrícola es necesario realizar una apropiada selección de aislados de hongos entomopatógenos adaptados a condiciones ambientales locales, con alta virulencia hacia la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) y buena producción de biomasa fúngica. La caracterización fenotípica de estos hongos entomopatógenos permitirá una mayor eficacia de los agentes microbianos para el control biológico de plagas.

III. HIPÓTESIS

Las diferencias en el grado de actividad enzimática (proteasas), virulencia, así como en la capacidad de producción de biomasa en medio líquido de diversos aislados de *L. lecanii*, muestran diferente potencial para ser empleados como agentes microbianos, en el control de la mosquita blanca.

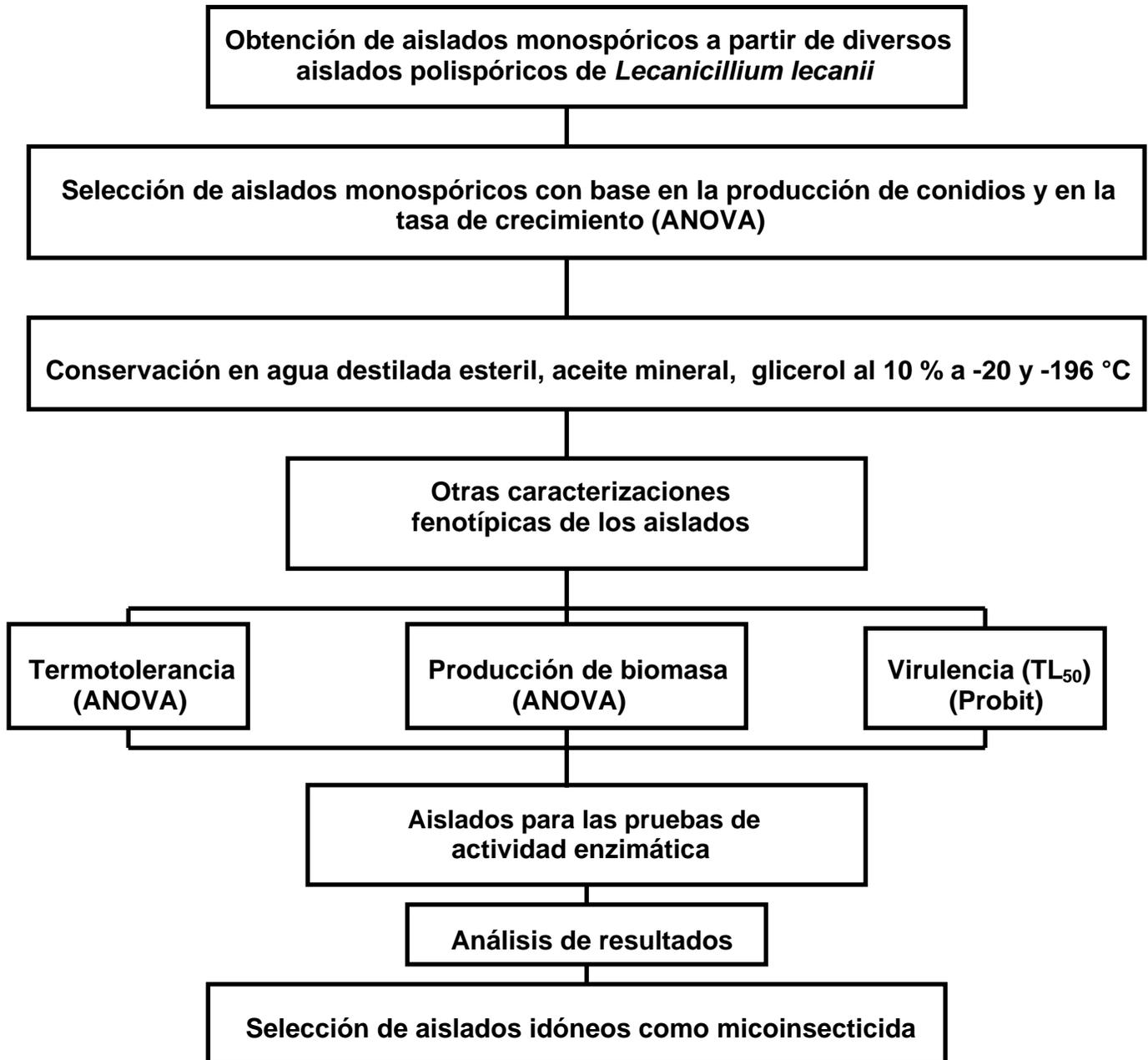
IV. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar el o los aislados idóneos de *L. lecanii* recolectados en México, a través de su caracterización fenotípica, para obtener aquel con la máxima calidad para utilizarse como agente microbiano para el control biológico de la mosquita blanca.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener aislados monospóricos a partir de diversos aislados polispóricos de *L. lecanii* recolectados en México.
2. Caracterizar los aislados de *L. lecanii* por medio de métodos fenotípicos: termotolerancia, virulencia hacia la mosquita blanca, actividad enzimática y producción de biomasa en medio líquido.
3. Con base en el análisis estadístico de los resultados de la caracterización fenotípica, elegir el o (los) aislado(s) ideal(es) de *L. lecanii* para el desarrollo de un agente microbiano.

VI. ESQUEMA DE TRABAJO



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Hongos

En el presente trabajo se utilizaron seis aislados del hongo *L. lecanii* (Zimmerman) Zare & W. Gams, obtenidos a partir de tres hospederos, procedentes de cinco estados de la República Mexicana. Estos aislados se encuentran depositados en las colecciones CNRCB-SAGARPA de Colima, en el Laboratorio de Micología, Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM-Xochimilco y en la colección del Herbario de Jalapa, Veracruz (Tabla 1).

Para el desarrollo de las pruebas de termotolerancia se incluyeron además seis cepas de referencia de *L. lecanii* de la colección Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi (ARSEF-USDA) (Tabla 1). La cepa ARSEF 313 corresponde al producto Vertalec, marca registrada en Holanda.

Todos los aislados fueron conservados en agua destilada estéril, aceite mineral glicerol al 10 % a -196 °C, y se depositaron en la colección del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

2. Obtención de aislados monospóricos

Para contar con una población genéticamente homogénea se llevó a cabo la obtención de aislados monospóricos de cada aislado polispórico.

Los hongos fueron cultivados en tubos con Sabouraud dextrosa agar (SDA, Bioxón, México) a 28 °C durante 7 días. De estos aislados se preparó una suspensión conidial en 3 mL de Tween 80 al 0.05 %, ajustada a una suspensión de 100 conidios/mL (esta baja concentración de conidios permitió que al sembrarse los propágulos fúngicos estuvieran más dispersos y tener así la certeza de que no se tomaron dos conidios diferentes en vez de solamente uno). La suspensión conidial se filtró con papel Whatman No. 1 para eliminar cualquier hifa. Posteriormente, se dispersó 200 µL de la suspensión en cajas de Petri con medio de agarosa, gelatina y dextrosa (AGD) (en g/L: agarosa 8, dextrosa 20, gelatina 10, adicionado de cloranfenicol 0.5). El medio translúcido permitió localizar con facilidad los conidios, al realizar las observaciones en el microscopio óptico. En el reverso de la caja de Petri se trazó un cuadrículado con cuadrantes de 1 cm². Las cajas se incubaron a 28 °C, se

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

Clave UNAM	Clave Original	Hospedero	Plaga de cultivo	Origen
EH-348	Aislado C ¹	<i>Trialeurodes</i> sp. (Homoptera: Aleyrodidae)	Frijol	Morelos, MX
EH-457	IE-363 ²	<i>Hemilea vastatrix</i> (Basidiomycota: Uredinales)	Café	Veracruz, MX
EH-458	IE-397 ²	<i>H. vastatrix</i>	Café	Veracruz, MX
EH-459	IE-388 ²	<i>H. vastatrix</i>	Café	Edo. de México, MX
EH-460	IE-393 ²	<i>H. vastatrix</i>	Café	Puebla, MX
EH-572	V-262 ³	<i>Toxoptera aurantii</i> (Homoptera: Aphididae)	Limón	Colima, MX
Cepas de referencia (ARSEF)⁴				
EH-627	313	Aislado monospórico del micoinsecticida comercial Vertalec®.	- ⁷	Holanda
EH-628	972	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Invernadero	Polonia
EH-629	980	<i>Pulvinaria floccifera</i> (Homoptera: Coccidae)	-	Turquía
EH-630	1026	<i>Myzus persicae</i> (Homoptera: Aphididae)	-	India
EH-631	1029	<i>Saissetia oleae</i> (Homoptera: Coccidae)	Clavel	Israel
EH-633	4064	<i>Bemisia tabaci</i> (Homoptera: Aleyrodidae)	Tabaco	Dinamarca

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

²Herbario de Jalapa, Veracruz, México

³Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Tecomán, Colima

⁴Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, US

⁷- = cultivo desconocido

revisaron por el reverso cada 24 h al microscopio óptico a 4 y 10 X, para marcar el cuadrante donde hubiera solamente un conidio con tubo germinativo. Al cabo de 96 h las colonias provenientes de un solo conidio se cultivaron en tubos con SDA inclinado, cortando el agar en torno a éstas con un bisturí (Figura 4). Se obtuvieron aislados monospóricos a partir de aislados polispóricos que se conservaron en agua destilada estéril y glicerol al 10 % a -20 y -196 °C.

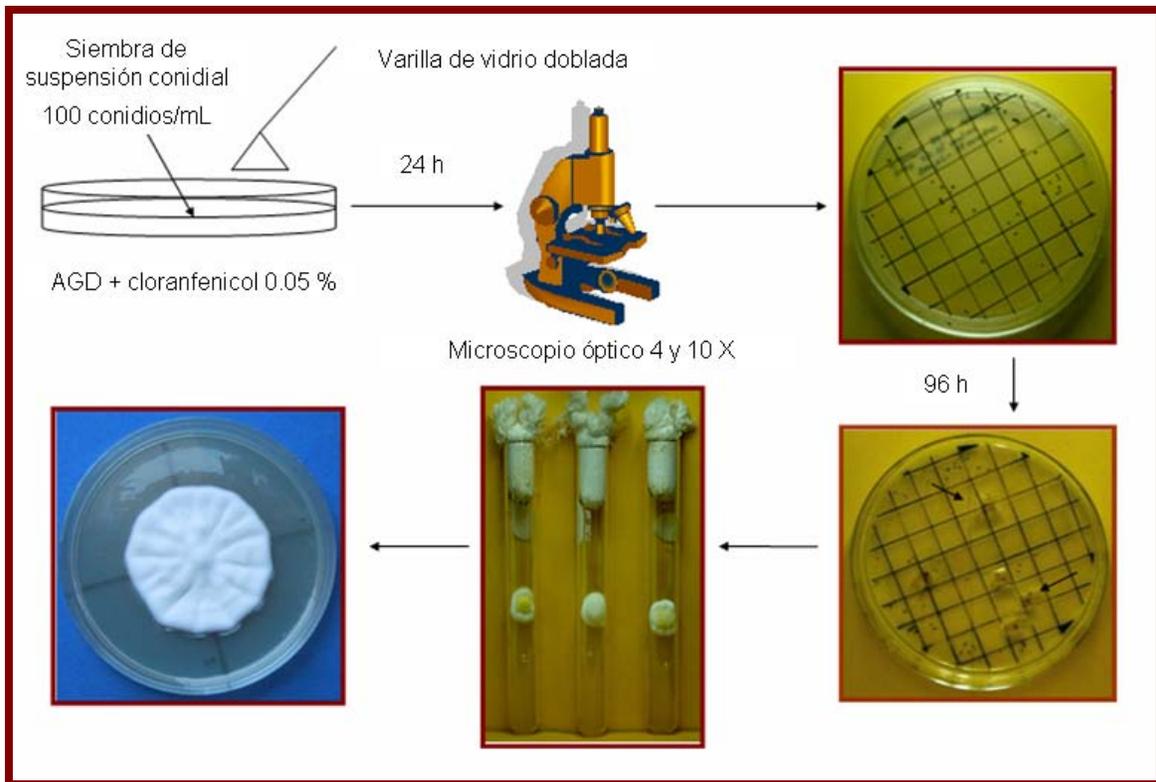


Figura 4. Obtención de los aislados monospóricos.

3. Selección de aislados monospóricos

Para el desarrollo de los estudios ulteriores, fue considerado sólo un aislado monospórico de cada polispórico. Éste fue seleccionado con base en su similitud al aislado polispórico original en cuanto a dos características fenotípicas principales: tasa de crecimiento, así como mayor producción de conidios.

Los hongos se sembraron en SDA y se incubaron a 28 °C durante 7 días a partir de estos, se prepararon suspensiones conidiales en Tween 80 al 0.05 %. Se depositaron 4×10^4

conidios en círculos de 5 mm de diámetro de papel filtro estéril, colocados en el centro de cajas de Petri de 100 mm con SDA, incubando a 28 °C durante 15 días. Se consideraron 10 réplicas por cada aislado para el análisis estadístico. El crecimiento de las colonias se midió diariamente con base en el promedio de dos diámetros perpendiculares trazados en el fondo de las cajas, durante 15 días, y al final del periodo de incubación se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final/15 días = mm/día). En todos los casos, al promedio final se le restó 5 mm correspondiente al diámetro del círculo del papel filtro. Mientras tanto, la producción de conidios, fue estimada al final del crecimiento (conidios/mL) al día 15, agregando un volumen de 5 mL de Tween 80 al 0.05 % y realizando la cuantificación de los mismos en una cámara de Neubauer. Se consideraron 10 réplicas para el análisis estadístico.

En todo el trabajo se empleó la clave asignada en la UNAM para los aislados originales polispóricos, por ejemplo, EH-348, mientras que para los monospóricos se agregó una diagonal con el número del monospórico obtenido, por ejemplo, EH-348/1.

4. Otras caracterizaciones fenotípicas de los aislados de *Lecanicillium lecanii*

a) Pruebas de termotolerancia

Se identificó la temperatura óptima de crecimiento para cada aislado, considerando su tasa de crecimiento (mm/día) a diferentes temperaturas.

Para estas pruebas se siguió el mismo procedimiento utilizado para la selección de aislados monospóricos, incubando a 15, 25, 30 y 35 °C durante 15 días. Se consideraron 10 réplicas por cada aislado para el análisis estadístico. El crecimiento de las colonias se midió diariamente con base en el promedio de dos diámetros perpendiculares trazados en el fondo de las cajas, durante 15 días, y al final del periodo de incubación se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final/15 días = mm/día). En todos los casos, al promedio final se le restó 5 mm del diámetro del círculo del papel filtro.

b) Producción de biomasa en medio líquido

Considerando el modelo de producción bifásico, según Jenkins *et al.* (1998) (una fase líquida, seguida de cultivo en sólido, para disminuir el tiempo de obtención de conidios) se determinó la biomasa de los aislados en medio líquido.

Los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados se cultivaron en botellas de Roux con 250 mL de medio SDEP [en g/L: sacarosa (productos químicos Monterrey) 10, dextrosa (J.T. Baker) 5, extracto de levadura (Bioxon) 5, peptona de gelatina (Bioxon) 0.05, agar (Merck) 15], a 25 °C por 8 días. Se preparó medio de cultivo líquido SDEP con insumos industriales [en g/L: azúcar estándar (Great Value, México) 10, glucosa industrial (Droguería Cosmopolita, México) 5, extracto de levadura YESTAL 250 (Universal Flavors, México) 5, peptona de gelatina (Bioxon) 0.05], distribuido en porciones de 50 mL en matraces Erlenmeyer de 200 mL. Se sembró el medio líquido con una suspensión conidial para tener una concentración final de 2×10^5 conidios/mL. Se colocó en agitación orbital (80 rpm), a 25 °C. Al cabo de 7 días, se tomó una muestra de 30 mL, para ser filtrada en un sistema Millipore de 47 mm, empleando un círculo de papel filtro doble (Whatman No. 50), previamente tarados. A continuación se colocó el papel filtro con la muestra en un crisol de 10 mL, también previamente tarado. Las muestras de biomasa húmeda tanto de los aislados polispóricos como de los monospóricos seleccionados se secaron a 75 °C, durante 48 h (Figura 5). Se determinó la biomasa utilizando el método del peso seco, según Mier *et al.* (2002). Se consideraron nueve réplicas de cada uno de los aislados ensayados para el análisis estadístico.

c) Pruebas de virulencia de los aislados en mosquita blanca

Se determinó la virulencia de los aislados estudiados mediante bioensayos en *B. tabaci*. Las mosquitas blancas (Figura 6) se mantuvieron en plantas de *Lantana* sp. y de *Euphorbia pulcherrima*, que se infestaron a partir de una población de adultos en hojas de nochebuena. Se colocaron en jaulas con armazón de alambre de las siguientes dimensiones 59 cm (l) x 35 cm (a) x 35 (a), cubiertas de malla de nylon y forradas con organza para evitar la entrada de ácaros (Figura 7). Las plantas se mantuvieron en el exterior del laboratorio de 59 cm (l) x 35 cm (a) x 35 (a), cubiertas de malla de nylon y forradas con organza para evitar la entrada de ácaros (Figura 7). Las plantas se mantuvieron en el exterior del laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco, y otras fueron mantenidas en el interior bajo las condiciones ambientales del laboratorio, durante los meses de febrero a julio de 2005. Se colectaron hojas de las plantas infestadas con ninfas de *B. tabaci*. Estas se recortaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5 %,

L. lecanii en botellas de Roux, a 25 °C, 9 días



Siembra de 1×10^7 conidios/mL, en 50 mL de medio SDEP



7 días, a 25 °C, 80 rpm



Muestra de 30 mL



Filtración de la muestra en sistema Millipore



Biomasa húmeda en crisoles tarados



Peso seco, 48 h, a 75 °C

Figura 5. Descripción esquemática del método de producción de biomasa en medio líquido

alcohol al 70 % y agua estéril. Se preparó una suspensión 1×10^7 conidios/mL de cada aislado en Tween 80 al 0.05 % a partir de los hongos cultivados en agar SDEP durante dos semanas a 25 °C. Las ninfas fueron infectadas sumergiendo el envés de las hojas en la suspensión conidial de 1×10^7 conidios/mL y agitando ligeramente durante 10 s, y luego dejándolas secar en papel filtro en la campana de flujo laminar. Cada hoja se colocó en cajas de Petri con medio KNOP (Vidal *et al.*, 1997b) (en g/L: KCl, 0.25; KH_2PO_4 , 0.25; MgSO_4 , 0.25; FeSO_4 , 0.02; agar, 10) por 24 h a 25 °C, a una humedad relativa (HR) del 97 % mantenida con K_2SO_4 al 11 % (Goettel & Inglis, 1997). A las 24 horas de incubación se seleccionaron ninfas 2 y 3 por experimento y se depositaron en cajas de Petri con agar (15 %) agua a 25 °C. Al testigo se le aplicó sólo la solución de Tween 80 al 0.05 %, y permitió constatar que las ninfas estuvieran libres de cualquier infección fúngica. Se seleccionaron 25 insectos por unidad experimental, con tres repeticiones por tratamiento. La virulencia se calculó con el tiempo letal medio (LT_{50}) a los 8 días, ya que en este tiempo se registró la última ninfa infectada del total de insectos utilizados. La mortalidad acumulada se registró diariamente hasta los 8 días, utilizando estos datos para calcular significancias entre aislados. Al final de los bioensayos, se verificó que las ninfas fueron infectadas por *L. lecanii*, tomando micelio de 16 ninfas elegidas al azar, sembrando en cajas de Petri con SDA e incubando a 25 °C durante 7 días.



Figura 6. Adulto de *Bemisia tabaci* en el envés de una hoja de nochebuena.



Figura 7. Plantas de *Lantana* sp. en jaulas para conservar la población de mosquita blanca para los bioensayos.

d) Método para la determinación de actividad de proteasas

Para determinar la actividad enzimática de proteasas se utilizaron los monóspóricos EH-458/2, EH-460/1 y 348/2 con virulencia alta, mediana y baja, respectivamente.

Se prepararon tubos de plástico de fondo plano con tapón de algodón de 40 mL, con 10 mL de medio basal de Paterson *et al.* (1994) [(g/L: KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 10 mL/L de la solución de minerales (g/100 mL: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, ZnSO_4 1, NaMoO_4 0.02, CuSO_4 0.02, MnCl_2 0.02)]. Al medio se le adicionó caseína al 1 %, previamente molida en un mortero adicionando medio basal de Paterson *et al.* (1994) a 100 °C; el pH = 7 se ajustó adicionando NaOH 1 N. Se preparó una suspensión conidial de los aislados monospóricos con Tween 80 al 0.05 % para una concentración final de 1×10^5 conidios/mL. El testigo fue solamente medio de cultivo estéril. Todos los tubos se incubaron en agitación orbital 15 días, a 25 °C a 150 rpm. Para determinar la actividad enzimática se tomaron muestras de 2.0 mL a las 0, 24, 48, 72, 120, 168, 216, 264, 312, 360 h. Se centrifugaron a 4 °C, 30 min a 4000 rpm y posteriormente el sobrenadante se colocó en tubos de plástico Eppendorf. Las muestras se congelaron hasta su uso. Para la determinación de la actividad enzimática se realizó el método de la azocaseína (Sarath *et al.*, 1989). La azocaseína al 2 % se disolvió en regulador de fosfatos pH 7.0 en baño María. El ensayo se llevó a cabo utilizando 250 μl de sustrato (azocaseína) y 150 μl de muestra e incubándose a 25 °C durante 1 h. Posteriormente, se detuvo la reacción agregando 1.2 mL de ácido tricloroacético (ATC) [25 g de ATC en 250 mL de agua], y se dejó reposar 15 min sobre una cama de hielo. Los tubos se centrifugaron a 4 °C, 30 min a 4000 rpm y se les agregó 1.4 mL de NaOH 1 M a 1.2 mL del sobrenadante. La absorbancia se leyó a 440 nm, considerando la estabilidad de la reacción de 1 hora. Los testigos se prepararon de la misma manera, pero el ATC se agregó antes que la muestra. La actividad enzimática se expresó en unidades, siendo una unidad de proteasa la cantidad de enzima que origina un cambio en la absorbancia de 0.010 a 440 nm. La actividad bajo las condiciones experimentales ensayadas se reportó en unidades de proteasa/mL (UP/mL).

e) Método semicuantitativo para determinar otras actividades enzimáticas de los aislados fúngicos.

Los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados se cultivaron en tubos de SDA inclinado a 25 °C por 4 semanas. Se prepararon suspensiones de conidios en un

volumen 3 mL de Tween 80 al 0.05 %. A partir de suspensiones de 1×10^7 conidios/mL, se determinaron los perfiles de actividad enzimática, utilizando el sistema API ZYM™ (BioMérieux, France). Se tomaron 50 μ L y colocaron en cada pozo de los 19 sustratos que poseen las tiras del método, estas se incubaron durante 4 horas a 26 °C. En la celda correspondiente al testigo sólo se agregó Tween 80 al 0.05 %. La actividad de las enzimas se leyó por la intensidad de color después de adicionar los reactivos A y B API ZYM™. Posteriormente fueron colocadas durante 5 s en una fuente de iluminación intensa. La actividad de las enzimas fue calculada en nanomoles (nmol) de acuerdo con las instrucciones del sistema. El criterio que se consideró para asignar el grado de actividad enzimática fue el siguiente: 5 y 4 se consideró como una alta actividad, 3 y 2 moderada, 1 baja, < 1 traza y 0 ausente.

5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas de selección de aislados monospóricos (tasa de crecimiento en mm/día y producción de conidios/mL) se sometieron a un análisis de varianza univariado (ANOVA). Este mismo análisis se aplicó para los datos obtenidos de las pruebas de caracterización fenotípica: termotolerancia (tasa de crecimiento en mm/día, a las temperaturas ensayadas), y producción de biomasa en medio líquido (gramos de biomasa de peso seco), y también en los datos de la mortalidad acumulada (el porcentaje fue transformado a arcoseno, para obtener una homogeneidad de varianzas y una distribución normal de los datos). Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey HSD (Montgomery, 1991). Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 12.0. La significancia considerada en los análisis estadísticos fue de $\alpha = 0.05$. El tiempo letal medio (TL_{50}) se calculó a los 8 días, utilizando análisis Probit (Finney, 1972) con el paquete POLO-PC (1987).

VIII. RESULTADOS

1. Selección de los aislados monospóricos

Se obtuvieron ocho aislados monospóricos de cada uno de los seis aislados polispóricos estudiados. El análisis estadístico de los datos de las tasas de crecimiento y producción de conidios mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los monospóricos y sus respectivos aislados originales, con algunas excepciones.

El aislado polispórico EH-348 y sus respectivos monospóricos (Tabla 2) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El monospórico EH-348/2 presentó el mayor valor promedio de la tasa de crecimiento con 2.05 mm/día, mientras que su correspondiente aislado polispórico, el menor valor (1.51 mm/día). El resto de los monospóricos presentaron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, los promedios de la tasa de crecimiento formaron cuatro grupos (Tabla 2). La producción de conidios/mL del mismo aislado, también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 2). El EH-348/2 presentó la mayor producción de conidios de 1.02×10^8 conidios/mL y los monospóricos EH-348/5 y EH-348/7, los menores valores de 4.03×10^7 y 3.03×10^7 conidios/mL, respectivamente. Los restantes exhibieron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al realizar la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, las medias de la producción de conidios formaron tres grupos (Tabla 2). Considerando los mayores valores con ambas características se seleccionó el monospórico 2 denominado EH-348/2. En la figura 8 se muestra la colonia del polispórico EH-348 y del monospórico EH-348/2. Ambas colonias mostraron color blanco con tonos amarillos, de aspecto extendido con pocas estriaciones y el envés de cada colonia mostró una pigmentación de color amarillo intenso.

También, el aislado polispórico EH-457 y sus respectivos monospóricos (Tabla 3) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El monospórico EH-457/3 presentó el mayor valor promedio de la tasa de crecimiento con 2.24 mm/día, mientras que el monospórico 457/6, el menor valor (2.03 mm/día). Los restantes exhiben valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, los

Tabla 2. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-348 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día ± DS*		Producción de conidios/mL ± DS*	
EH-348	1.51 ± 0.07d**	EH-348	5.00 x 10 ⁷ ± 1.55 x 10 ⁷ bc**
EH-348/1	1.55 ± 0.05cd	EH-348/1	9.81 x 10 ⁷ ± 4.79 x 10 ⁷ a
EH-348/2	2.05 ± 0.05a	EH-348/2	1.02 x 10 ⁸ ± 2.06 x 10 ⁷ a
EH-348/3	1.67 ± 0.05b	EH-348/3	5.65 x 10 ⁷ ± 1.45 x 10 ⁷ bc
EH-348/4	1.62 ± 0.06bc	EH-348/4	6.38 x 10 ⁷ ± 1.55 x 10 ⁷ b
EH-348/5	1.64 ± 0.04bc	EH-348/5	4.03 x 10 ⁷ ± 8.60 x 10 ⁶ bc
EH-348/6	1.67 ± 0.08b	EH-348/6	4.21 x 10 ⁷ ± 1.51 x 10 ⁷ b
EH-348/7	1.52 ± 0.06d	EH-348/7	3.03 x 10 ⁷ ± 5.94 x 10 ⁶ c
EH-348/8	1.65 ± 0.05b	EH-348/8	5.63 x 10 ⁷ ± 8.18 x 10 ⁶ bc
Promedio	1.66 ± 0.16	Promedio	5.92 x 10 ⁷ ± 2.97 x 10 ⁷
ANOVA α = 0.05 F = 63.115; g.l. 8, 81; P < 0.001		ANOVA α = 0.05 F = 14.975; g.l. 8, 72; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

**Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



Figura 8. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-348 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

promedios de la de tasa de crecimiento formaron tres grupos (Tabla 3). La producción de conidios/mL del mismo aislado, presentó diferencias significativas (P < 0.05), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 3). El aislado EH-457/ 5 presentó la mayor producción de conidios de 2.04 x 10⁸ conidios/mL y el monospórico EH-457/3, el menor valor de 1.18 x 10⁸ conidios/mL. Los restantes exhibieron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al realizar la prueba de Tukey, las medias de la producción de conidios formaron dos grupos (Tabla 3). Se seleccionó el monospórico 5 denominado EH-457/5, considerando el mayor valor de producción de conidios/mL. En la figura 9 se muestra la colonia del polispórico EH-457 y el monospórico

Tabla 3. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-457 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día ± DS*		Producción de conidios/mL ± DS*	
EH-457	2.09 ± 0.14bc**	EH-457	1.24 x 10 ⁸ ± 4.50 x 10 ⁷ b**
EH-457/1	2.11 ± 0.09abc	EH-457/1	1.21 x 10 ⁸ ± 2.36 x 10 ⁷ b
EH-457/2	2.20 ± 0.12ab	EH-457/2	1.22 x 10 ⁸ ± 3.32 x 10 ⁷ b
EH-457/3	2.24 ± 0.07a	EH-457/3	1.18 x 10 ⁸ ± 5.33 x 10 ⁷ b
EH-457/4	2.20 ± 0.06ab	EH-457/4	1.29 x 10 ⁸ ± 2.75 x 10 ⁷ b
EH-457/5	2.18 ± 0.12ab	EH-457/5	2.04 x 10 ⁸ ± 5.04 x 10 ⁷ a
EH-457/6	2.03 ± 0.10c	EH-457/6	1.22 x 10 ⁸ ± 3.98 x 10 ⁷ b
EH-457/7	2.21 ± 0.05ab	EH-457/7	1.72 x 10 ⁸ ± 4.77 x 10 ⁷ b
EH-457/8	2.22 ± 0.06ab	EH-457/8	1.97 x 10 ⁸ ± 2.05 x 10 ⁷ a
Promedio	2.17 ± 0.11	Promedio	1.47 x 10 ⁸ ± 5.08 x 10 ⁷
ANOVA α = 0.05 F = 4.871; g.l. 8, 81; P < 0.001		ANOVA α = 0.05 F = 7.401; g.l. 8, 75; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

**Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



Figura 9. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-457 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

seleccionado EH-457/5. Las colonias exhibieron color blanco, de aspecto extendido con estriaciones tanto las del original y como el monospórico, el envés no presentó pigmentación.

Para el aislado EH-458, las pruebas de selección sólo se efectuaron con seis de los ocho monospóricos, debido a que dos de ellos (los identificados como 1 y 4) no crecieron y fueron descartados. El aislado polispórico EH-458 y sus respectivos monospóricos (Tabla 4) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El polispórico presentó el mayor valor promedio de la tasa de crecimiento (2.10 mm/día), mientras que el monospórico EH-458/6 el menor valor (1.62 mm/día). Los demás presentaron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, los promedios de la tasa de crecimiento formaron cuatro grupos (Tabla 4). La producción de conidios/mL del mismo

aislado también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 4). El monospórico EH-458/2 presentó la mayor producción de conidios de 2.63×10^8 conidios/mL y el EH-458/8, el menor valor de 1.89×10^8 conidios/mL. Los restantes exhibieron valores intermedios. La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, no detectó diferencias. Considerando el mayor valor de producción de conidios/mL, se seleccionó el monospórico 2 denominado EH-458/2. En la figura 10 se muestra la colonia del polispórico EH-458 y su monospórico seleccionado EH-458/2. Las colonias mostraron color blanco, de aspecto extendido con pocas estriaciones tanto las del polispórico original como las del monospórico. El envés de la colonia no presentó pigmentación.

Tabla 4. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-458 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día \pm DS*		Producción de conidios/mL \pm DS*	
EH-458	$2.10 \pm 0.13a^{**}$	EH-458	$2.02 \times 10^8 \pm 6.12 \times 10^7$
EH-458/2	$1.86 \pm 0.13c$	EH-458/2	$2.63 \times 10^8 \pm 6.56 \times 10^7$
EH-458/3	$2.03 \pm 0.12ab$	EH-458/3	$2.03 \times 10^8 \pm 3.30 \times 10^7$
EH-458/5	$1.87 \pm 0.11c$	EH-458/5	$2.56 \times 10^8 \pm 7.54 \times 10^7$
EH-458/6	$1.62 \pm 0.10d$	EH-458/6	$2.33 \times 10^8 \pm 6.32 \times 10^7$
EH-458/7	$2.04 \pm 0.04ab$	EH-458/7	$1.97 \times 10^8 \pm 4.56 \times 10^7$
EH-458/8	$1.92 \pm 0.08bc$	EH-458/8	$1.89 \times 10^8 \pm 5.19 \times 10^7$
Promedio	1.92 ± 0.18	Promedio	$2.21 \times 10^8 \pm 6.22 \times 10^7$
ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 20.919 ; g.l. 6, 63; P < 0.001		ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 2.561; g.l. 6, 59; P < 0.028***	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

****Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)

***La prueba de ANOVA indica la existencia de diferencias significativas, sin embargo la prueba comparación múltiple de medias de Tukey, no logra detectar entre qué pares de medias se encuentran esas diferencias.



Figura 10. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-458 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

El aislado polispórico EH-459 y sus respectivos monospóricos (Tabla 5) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El monospórico EH-459/2 presentó el mayor valor promedio de la tasa de crecimiento con 2.23 mm/día, mientras que el monospórico EH-459/3 el menor valor (2.08 mm/día). Los restantes presentaron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de Tukey los promedios de la tasa de crecimiento formaron tres grupos (Tabla 5). La producción de conidios/mL del mismo aislado, también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 5). El aislado polispórico EH-459 presentó la mayor producción de conidios de 1.52×10^8 conidios/mL y el monospórico, EH-459/6, el menor valor de 6.28×10^6 conidios/mL. Los restantes exhibieron valores intermedios, observando diferencias significativas entre algunos de ellos. Al realizar la prueba de Tukey, las medias de la producción de conidios formaron dos grupos (Tabla 5). Considerando el mayor valor de producción de conidios/mL, se seleccionó el monospórico 1, denominado EH-459/1. En la figura 11 se muestra la colonia del polispórico EH-459 y el monospórico seleccionado EH-459/1. Las colonias mostraron color blanco, de aspecto extendido con estriaciones en mayor cantidad en el monospórico. El envés de la colonia no presentó pigmentación.

Con respecto al aislado polispórico EH-460 y sus respectivos monospóricos (Tabla 6) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El análisis realizado a los datos de tasa de crecimiento indica la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos. El monospórico EH-460/1 presentó el mayor valor promedio de la tasa de crecimiento con 2.32 mm/día, mientras que el monospórico EH-460/5 el menor valor (1.98 mm/día). El resto de los monospóricos presentaron valores intermedios, observando diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de Tukey, los promedios de la tasa de crecimiento formaron seis grupos (Tabla 6). La producción de conidios/mL del mismo aislado, también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 6). El monospórico EH-460/1 presentó la mayor producción de conidios 2.85×10^8 conidios/mL, mientras que EH-460/2 y EH-460/3 presentaron los menores valores de 1.08×10^7 y 1.09×10^7 conidios/mL, respectivamente. Los restantes exhibieron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al realizar la prueba de

Tabla 5. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-459 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día ± DS*		Producción de conidios/mL ± DS*	
EH-459	2.18 ± 0.07abc**	EH-459	1.52 x 10 ⁸ ± 3.33 x 10 ⁷ a**
EH-459/1	2.17 ± 0.05abc	EH-459/1	1.31 x 10 ⁷ ± 3.84 x 10 ⁶ b
EH-459/2	2.23 ± 0.04a	EH-459/2	6.36 x 10 ⁶ ± 1.41 x 10 ⁶ b
EH-459/3	2.08 ± 0.06c	EH-459/3	6.50 x 10 ⁶ ± 1.01 x 10 ⁶ b
EH-459/4	2.15 ± 0.09abc	EH-459/4	7.13 x 10 ⁶ ± 1.23 x 10 ⁶ b
EH-459/5	2.14 ± 0.13abc	EH-459/5	7.31 x 10 ⁶ ± 9.75 x 10 ⁵ b
EH-459/6	2.15 ± 0.05abc	EH-459/6	6.28 x 10 ⁶ ± 8.59 x 10 ⁵ b
EH-459/7	2.10 ± 0.06bc	EH-459/7	6.75 x 10 ⁶ ± 1.28 x 10 ⁶ b
EH-459/8	2.20 ± 0.06ab	EH-459/8	9.95 x 10 ⁶ ± 4.47 x 10 ⁶ b
Promedio	2.16 ± 0.08	Promedio	2.24 x 10 ⁷ ± 4.49 x 10 ⁷
ANOVA α = 0.05 F = 3.500; g.l. 8, 81; P < 0.002		ANOVA α = 0.05 F = 165.077; g.l. 8, 71; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

**Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



Figura 11. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-459 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

comparación múltiple de medias de Tukey, las medias de la producción de conidios formaron cuatro grupos (Tabla 6). Se seleccionó el monospórico 1 denominado EH-460/1 considerando ambas características con los mayores valores. En la figura 12 se muestra la colonia del polispórico EH-460 y el monospórico seleccionado EH-460/1. Las colonias mostraron color blanco, de aspecto extendido con estriaciones en mayor cantidad en el monospórico. El envés de la colonia no presentó pigmentación.

Finalmente, el aislado polispórico EH-572 y sus respectivos monospóricos (Tabla 7) mostraron diferencias significativas tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de conidios. El polispórico y el monospórico EH-572/7 presentaron los mayores valores promedio de tasa de crecimiento 2.45 y 2.44 mm/día, respectivamente. El monospórico EH-

Tabla 6. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-460 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día ± DS*		Producción de conidios/mL ± DS*	
EH-460	2.25 ± 0.03ab**	EH-460	1.23 x 10 ⁸ ± 2.97 x 10 ⁷ c**
EH-460/1	2.32 ± 0.05a	EH-460/1	2.85 x 10 ⁸ ± 8.69 x 10 ⁷ a
EH-460/2	2.06 ± 0.04ef	EH-460/2	1.08 x 10 ⁷ ± 2.48 x 10 ⁶ d
EH-460/3	2.10 ± 0.05de	EH-460/3	1.09 x 10 ⁷ ± 1.94 x 10 ⁶ d
EH-460/4	2.10 ± 0.05de	EH-460/4	1.78 x 10 ⁷ ± 4.44 x 10 ⁶ d
EH-460/5	1.98 ± 0.06f	EH-460/5	2.48 x 10 ⁷ ± 7.43 x 10 ⁶ d
EH-460/6	2.13 ± 0.04cde	EH-460/6	1.19 x 10 ⁷ ± 2.24 x 10 ⁶ d
EH-460/7	2.18 ± 0.04bcd	EH-460/7	2.79 x 10 ⁸ ± 1.15 x 10 ⁸ ab
EH-460/8	2.20 ± 0.09bc	EH-460/8	2.02 x 10 ⁸ ± 7.37 x 10 ⁷ b
Promedio	2.15 ± 0.11	Promedio	1.00 x 10 ⁸ ± 1.21 x 10 ⁸
ANOVA α = 0.05 F = 33.201; g.l. 8, 81; P < 0.001		ANOVA α = 0.05 F = 45.136; g.l. 8, 75; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

****Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



Figura 12. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-460 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

572/5 presentó el menor valor (2.17 mm/día). Los demás presentaron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al aplicar la prueba de Tukey, los promedios de la tasa de crecimiento formaron tres grupos (Tabla 7). La producción de conidios/mL del mismo aislado, también presentó diferencias significativas (P < 0.05), entre el polispórico y sus respectivos monospóricos (Tabla 7). El EH-572/7 presentó la mayor producción de conidios de 5.36 x 10⁷ conidios/mL y el monospórico EH-572/5, el menor valor de 1.12 x 10⁷ conidios/mL. Los restantes exhibieron valores intermedios, con diferencias significativas entre algunos de ellos. Al realizar la prueba de Tukey, las medias de la producción de conidios formaron tres grupos (Tabla 7). Se seleccionó el monospórico 7 denominado EH-572/7 considerando ambas características con los mayores valores. En la

figura 13 se muestra la colonia del polispórico EH-572 y su monospórico seleccionado EH-572/7. Las colonias mostraron color blanco, aspecto algodonoso con pocas estriaciones no aparentes en el monospórico. El envés de la colonia no presentó pigmentación.

Tabla 7. Tasa de crecimiento y producción de conidios del aislado EH-572 y sus monospóricos.

Tasa de crecimiento mm/día ± DS*		Producción de conidios/mL ± DS*	
EH-572	2.45 ± 0.05a**	EH-572	1.72 x 10 ⁷ ± 5.86 x 10 ⁶ c**
EH-572/1	2.39 ± 0.06a	EH-572/1	2.90 x 10 ⁷ ± 7.10 x 10 ⁶ b
EH-572/2	2.27 ± 0.05b	EH-572/2	1.33 x 10 ⁷ ± 3.94 x 10 ⁶ c
EH-572/3	2.19 ± 0.04bc	EH-572/3	1.21 x 10 ⁷ ± 4.09 x 10 ⁶ c
EH-572/4	2.38 ± 0.06a	EH-572/4	2.20 x 10 ⁷ ± 5.12 x 10 ⁶ bc
EH-572/5	2.17 ± 0.05c	EH-572/5	1.12 x 10 ⁷ ± 2.98 x 10 ⁶ c
EH-572/6	2.25 ± 0.07bc	EH-572/6	3.19 x 10 ⁷ ± 8.29 x 10 ⁶ b
EH-572/7	2.44 ± 0.04a	EH-572/7	5.36 x 10 ⁷ ± 1.73 x 10 ⁷ a
EH-572/8	2.25 ± 0.05bc	EH-572/8	1.34 x 10 ⁷ ± 2.34 x 10 ⁶ c
Promedio	2.31 ± 0.11	Promedio	2.30 x 10 ⁷ ± 1.14 x 10 ⁷
ANOVA α = 0.05 F = 32.879; g.l. 8, 81; P < 0.001		ANOVA α = 0.05 F = 28.978; g.l. 8, 73; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

**Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



Figura 13. *Lecanicillium lecanii*, polispórico EH-572 (izq.) y el monospórico seleccionado (der.) en agar Sabouraud, a los 15 días de incubación.

En la tabla 8 se muestran los aislados monospóricos seleccionados de cada aislado polispórico con base en la mayor tasa de crecimiento y/o producción de conidios.

Para una mejor visualización de los resultados anteriores, se muestran las figuras 27 a 32 correspondientes a las tablas 2 a 7 en el anexo al final del escrito.

Tabla 8. Monospóricos seleccionados considerando el análisis estadístico de los datos de la tasa de crecimiento (mm/día) y producción de conidios/mL.

Aislados Polispóricos	Aislados monospóricos seleccionados
EH-348	EH-348/2
EH-457	EH-457/5 ¹
EH-458	EH-458/2 ¹
EH-459	EH-459/1 ¹
EH-460	EH-460/1
EH-572	EH-572/7

Se seleccionó un sólo monospóricos de los 8 obtenidos, considerando para ello el análisis estadístico, tanto de la tasa de crecimiento como de la producción de conidios, a excepción de:

¹ = considerando sólo la producción de conidios/mL.

2. Otras caracterización fenotípicas de los aislados de *Lecanicillium lecanii*

a) Pruebas de termotolerancia

Se encontró variabilidad en termotolerancia entre los aislados estudiados de México y las cepas de referencia de *L. lecanii*, con respecto a la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas (Figura 14). Todos los aislados y cepas mostraron el mayor crecimiento a 25 °C se infiere que esta es la temperatura óptima de crecimiento. La mayor tasa de crecimiento la mostraron las cepas ARSEF 1029 y ARSEF 4064 (3.41 y 3.26 mm/día) y los aislados EH-572/7, EH457/5, EH-458/2, EH-459 y EH-457 (2.69, 2.68, 2.67, 2.66 y 2.64 mm/día, respectivamente). Mientras que el polispórico EH-348 y la cepa ARSEF 1026 los menores valores de 1.96 y 1.40 mm/día (Tabla 9). En la figura 15 se observan las colonias de *L. lecanii* correspondientes al mayor y menor crecimiento. En general, *L. lecanii* presentó una mayor tasa de crecimiento a 15 °C que a 30 °C. Con respecto a la temperatura de 15 °C los mayores valores fueron registrados por la cepa ARSEF 1029 de Israel (1.86 mm/día) y los aislados colectados en México EH-459, EH459/1, EH-460/1, EH-457/5 y EH-458 (1.73, 1.71, 1.70, 1.70 y 1.69 mm/día, respectivamente). La cepa ARSEF 1026 y el monospórico EH-348/2 mostraron la menor tasa a esta temperatura con valores de 1.07 y 1.06 mm/día (Tabla 10). La figura 16 muestra las colonias del hongo correspondientes al mayor y menor crecimiento. A la temperatura de 30 °C, *L. lecanii* muestra una disminución en el crecimiento

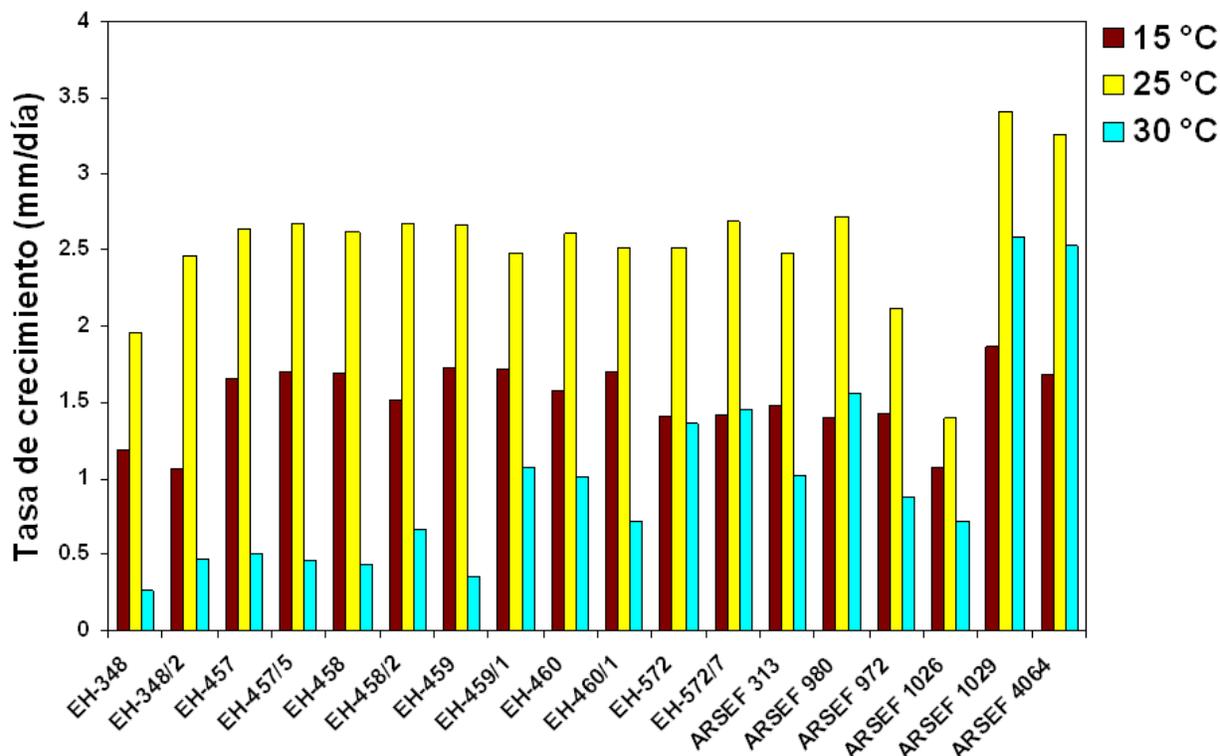


Figura 14. Comparación de la tasa de crecimiento de los aislados polisporicos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia del hongo *Lecanicillium lecanii* a 15, 25 y 30 °C.

con respecto a las temperaturas de 15 y 25 °C, con excepción de las cepas de referencia ARSEF 1029 y 4064. El mayor crecimiento se registró para las cepas ARSEF 1029 y 4064 (2.58 y 2.53 mm/día) y los aislados EH-572/7 y EH-572 (1.45 y 1.36 mm/día). La menor tasa de crecimiento la registraron los polisporicos EH-348 y EH-459 con valores de 0.26 y 0.35 mm/día (Tabla 11). En la figura 17 se muestran las colonias del hongo al mayor y menor crecimiento donde resalta la colonia muy pequeña del aislado EH-348. Ninguno de los aislados polisporicos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia creció a 35 °C. A 25 °C se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a la tasa de crecimiento entre todos los aislados. Al aplicar la prueba de Tukey, las medias de la tasa de crecimiento formaron ocho grupos (Tabla 9). Los polisporicos mostraron un promedio de 2.50 ± 0.019 , y los monospóricos de 2.58 ± 0.051 mm/día. El aislado EH-457, no mostró diferencias significativas con su respectivo monospórico. A la temperatura de 15 °C se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a la tasa de crecimiento entre todos los aislados. Al aplicar la prueba de Tukey las medias de la tasa de crecimiento formaron ocho

Tabla 9. Tasa de crecimiento a 25 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.

Aislado	Tasa de crecimiento mm/día ± DS*
EH-348	1.96 ± 0.081g***
EH-348/2	2.46 ± 0.047e
EH-457	2.64 ± 0.078c
EH-457/5	2.68 ± 0.042c
EH-458	2.62 ± 0.069cd
EH-458/2	2.67 ± 0.056c
EH-459	2.66 ± 0.047c
EH-459/1	2.48 ± 0.063e
EH-460	2.61 ± 0.070cd
EH-460/1	2.51 ± 0.052de
EH-572	2.51 ± 0.108de
EH-572/7	2.69 ± 0.048c
ARSEF** 313	2.48 ± 0.063e
ARSEF 972	2.72 ± 0.051c
ARSEF 980	2.12 ± 0.096f
ARSEF 1026	1.40 ± 0.096h
ARSEF 1029	3.41 ± 0.070a
ARSEF 4064	3.26 ± 0.115b
Promedio	2.55 ± 0.43
ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 353.659; g.l. 17,162; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas
 *DS = Desviación estándar
 **ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, US
 ***Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)

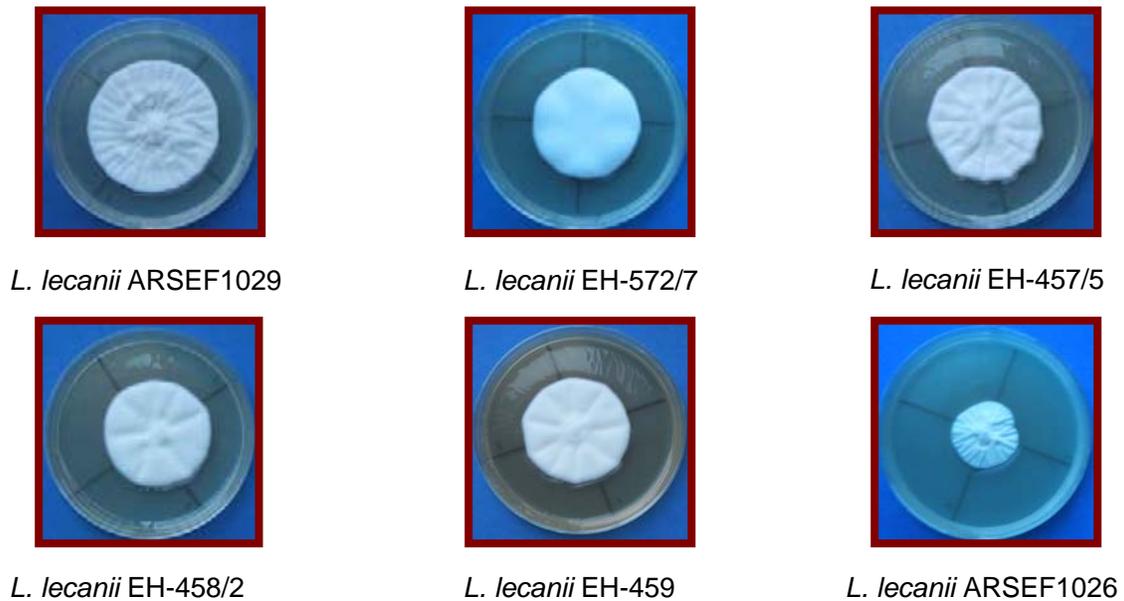


Figura 15. Comparación de las colonias de *Lecanicillium lecanii* con mayor (ARSEF 1029, EH-572/7, EH-457/5, EH-458/2 y EH-459) y menor crecimiento (ARSEF 1026) a 25 °C durante 15 días.

Tabla 10. Tasa de crecimiento a 15 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.

Aislado	Tasa de crecimiento mm/día ± DS*
EH-348	1.19 ± 0.048g***
EH-348/2	1.06 ± 0.133h
EH-457	1.66 ± 0.047bc
EH-457/5	1.70 ± 0.069b
EH-458	1.69 ± 0.082b
EH-458/2	1.51 ± 0.070de
EH-459	1.73 ± 0.048b
EH-459/1	1.71 ± 0.070b
EH-460	1.58 ± 0.042cd
EH-460/1	1.70 ± 0.069b
EH-572	1.41 ± 0.052ef
EH-572/7	1.42 ± 0.051ef
ARSEF** 313	1.48 ± 0.091def
ARSEF 972	1.40 ± 0.051f
ARSEF 980	1.43 ± 0.067ef
ARSEF 1026	1.07 ± 0.031h
ARSEF 1029	1.86 ± 0.000a
ARSEF 4064	1.68 ± 0.063bc
Promedio	1.52 ± 0.2338
ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 121.426; g.l. 17,162; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas
 *DS = Desviación estándar
 **ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, US
 ***Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)

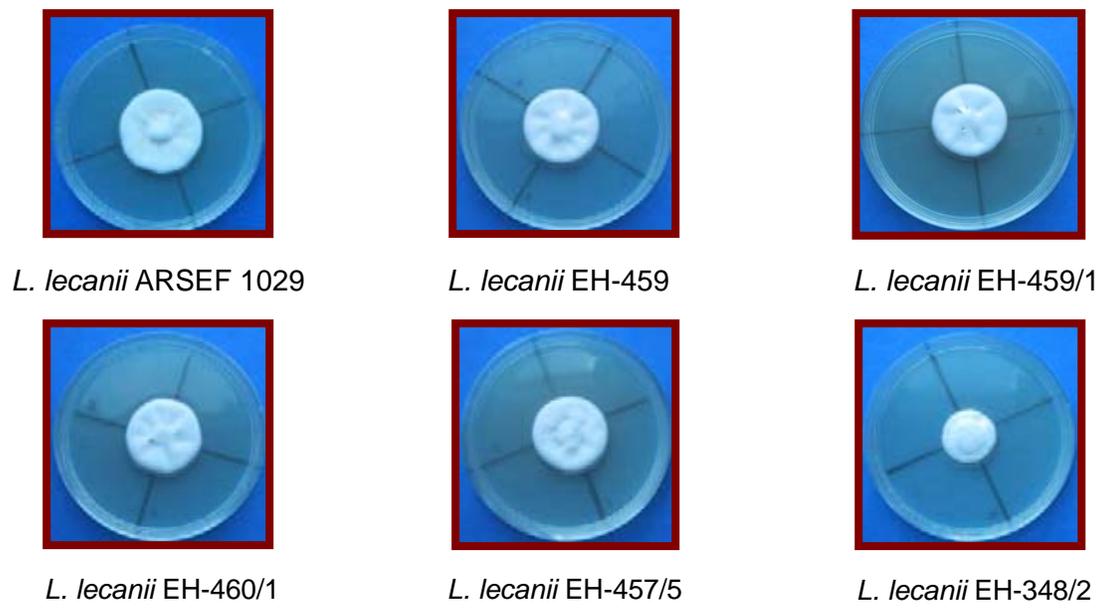


Figura 16. Comparación de las colonias de *Lecanicillium lecanii* con mayor (ARSEF 1029, EH-459, EH-459/1, EH460/1 y EH-457/5) y menor crecimiento (EH-348/2) a 15 °C durante 15 días.

Tabla 11. Tasa de crecimiento a 30 °C de los aislados polispóricos, monospóricos seleccionados y cepas de referencia.

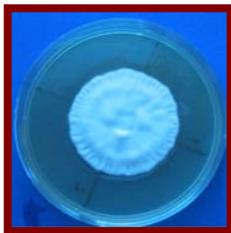
Aislado	Tasa de crecimiento mm/día ± DS*
EH-348	0.26 ± 0.000h***
EH-348/2	0.47 ± 0.080fgh
EH-457	0.50 ± 0.140efg
EH-457/5	0.46 ± 0.080fgh
EH-458	0.44 ± 0.080fgh
EH-458/2	0.66 ± 0.040def
EH-459	0.35 ± 0.080gh
EH-459/1	1.07 ± 0.060c
EH-460	1.01 ± 0.110c
EH-460/1	0.72 ± 0.090de
EH-572	1.36 ± 0.140b
EH-572/7	1.45 ± 0.240b
ARSEF** 313	1.02 ± 0.120c
ARSEF 972	1.55 ± 0.240b
ARSEF 980	0.88 ± 0.060cd
ARSEF 1026	0.72 ± 0.050de
ARSEF 1029	2.58 ± 0.100a
ARSEF 4064	2.53 ± 0.22a
Promedio	1.04 ± 0.70
ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 236.512; g.l. 17,129; P < 0.001	

Los resultados son el promedio de 10 réplicas

*DS = Desviación estándar

**ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, US

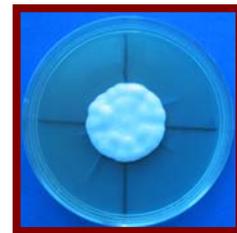
*** Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)



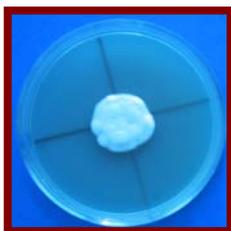
L. lecanii ARSEF 1029



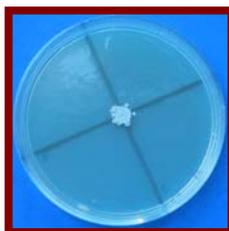
L. lecanii ARSEF 4064



L. lecanii EH-572/7



L. lecanii EH-572



L. lecanii EH-348

Figura 17. Comparación de las colonias de *Lecanicillium lecanii* con mayor (ARSEF 1029, ARSEF4064, EH-572/7 y EH-572) y menor crecimiento (EH-348) a 30 °C durante 15 días.

grupos (Tabla 10). Los aislados poli- y monospóricos mostraron una tasa de crecimiento promedio semejante entre ellos, para los polispóricos fue de 1.54 ± 0.014 , mientras que para los monospóricos fue de 1.51 ± 0.077 mm/día. Los aislados EH-459 y EH-572, no mostraron diferencias significativas con sus respectivos monospóricos.

Finalmente a 30 °C se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los aislados. La prueba de Tukey mostró que las medias de la tasa de crecimiento formaron ocho grupos (Tabla 11). Los polispóricos mostraron un promedio de tasa de crecimiento menor (0.65 ± 0.05 mm/día) con respecto a los monospóricos (0.80 ± 0.07 mm/día). El aislado EH-572, no mostró diferencias significativas con su respectivo monospórico.

b) Producción de biomasa

Se utilizaron los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados y los aislados que presentaron mayores valores de producción de biomasa en cultivo líquido fueron el polispórico EH-458 y su monospórico correspondiente EH-458/2 con 0.263 y 0.336 g, respectivamente. La menor producción de biomasa se observó en el polispórico EH-460 y EH-348/2 con 0.016 g y 0.033 g, respectivamente (Tabla 12). La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas ($P < 0.05$). Los aislados restantes exhibieron valores intermedios. Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey, los datos de producción de biomasa en g, formaron cinco grupos (Tabla 12). La figura 18 muestra la producción de biomasa en medio de cultivo líquido (g de peso seco), de los aislados polispóricos y monospóricos seleccionados. Se encontró que la producción de biomasa fue mayor para los aislados monospóricos, el valor obtenido para los polispóricos fue de 0.109 ± 0.024 g, mientras que para los monospóricos fue de 0.140 ± 0.029 g. Los aislados polispóricos EH-459 y EH-460 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con sus respectivos monospóricos.

c) Bioensayos en *Bemisia tabaci*

Todos los aislados poli- y monospóricos fueron capaces de infectar las ninfas de *B. tabaci*. En general, los primeros signos de infección fueron observados entre las 48 y 72 h después de la inoculación y se manifestó por la presencia de micelio en las ninfas. En las figuras 19 y 20 se muestran las ninfas cubiertas con micelio.

Tabla 12. Producción de biomasa en medio de cultivo líquido de los aislados polisporicos y monospóricos seleccionados.

Aislado	Producción de biomasa en gramos* \pm DS**
EH-348	0.036 \pm 0.008de***
EH-348/2	0.033 \pm 0.011de
EH-457	0.180 \pm 0.026b
EH-457/5	0.178 \pm 0.026b
EH-458	0.263 \pm 0.073a
EH-458/2	0.336 \pm 0.072a
EH-459	0.070 \pm 0.030cde
EH-459/1	0.128 \pm 0.040bc
EH-460	0.016 \pm 0.004e
EH-460/1	0.070 \pm 0.018cde
EH-572	0.092 \pm 0.019cd
EH-572/7	0.098 \pm 0.010cd
Promedio	0.137 \pm 0.106

ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 47.456; g.l. 11, 68; P < 0.001

Los resultados son el promedio de 9 réplicas
 *Gramos de peso seco
 **DS = Desviación estándar
 *** Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)

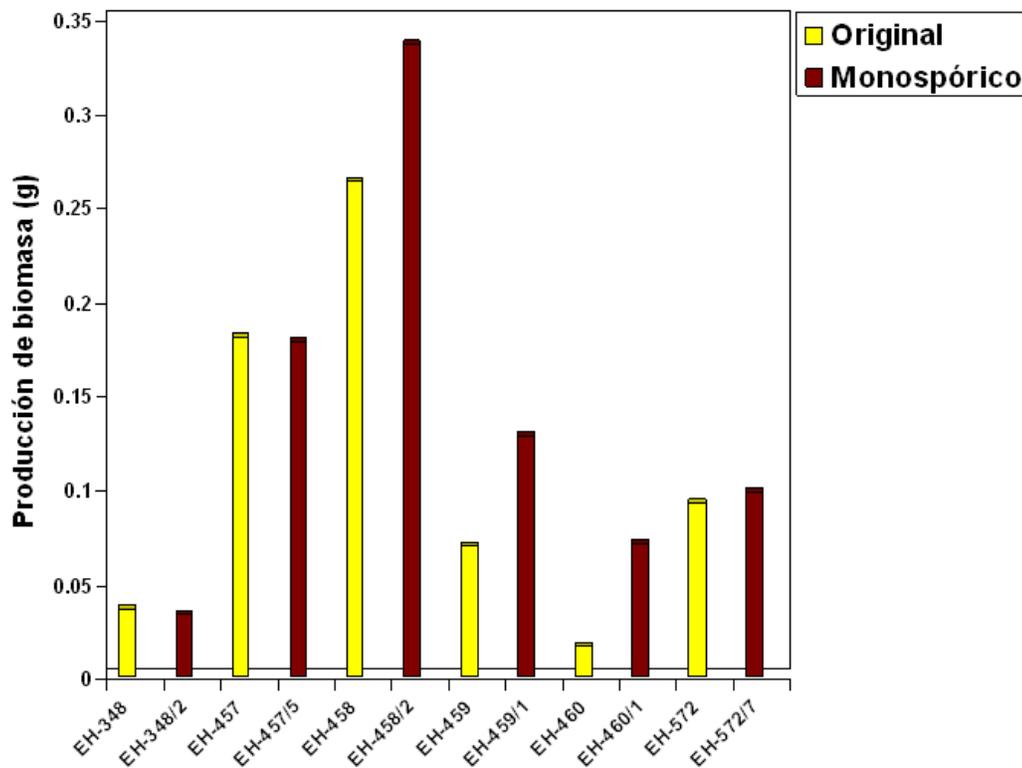


Figura 18. Producción de biomasa en medio de cultivo líquido, de los aislados polisporicos y monospóricos seleccionados.



Figura 19. Ninfas de *Bemisia tabaci* infectadas por *Lecanicillium lecanii* EH-572, en agar agua a los 9 días de incubación a 25 °C, HR 96%, 4X.



Figura 20. Ninfas de *Bemisia tabaci* infectadas por *Lecanicillium lecanii* EH-348, en agar agua a los 9 días de incubación a 25 °C, HR 96%, 4X.

Los aislados más virulentos fueron EH-459/1, EH-458/2 y EH-458 con una mortalidad acumulada de 97.30, 98.66 y 100 % (Tabla 13). El monospórico EH-459/1 mostró la mayor mortalidad acumulada de ninfas entre las 72 y 96 h, mientras el EH-458/2 entre 96 y 120 h y en el polispórico EH-458 a las 72 h (Figura 21). Los aislados EH-459/1, EH-458/2 y EH-458 mostraron un TL_{50} de 2.77, 2.76 y 2.14 días, respectivamente (Tabla 13 y Figura 22). Los aislados menos virulentos fueron el EH-348/2 y el pólispórico EH-572 que mostraron una mortalidad acumulada de 76 y 68 %, respectivamente (Tabla 13). En este monospórico EH-348/2 se observaron la mayoría de las infecciones a las 96 h y en el EH-572 entre 120 y 144 h (Figura 21). Los aislados EH-348/2 y EH-572 mostraron un TL_{50} de 3.64 y 4.96 días, respectivamente (Tabla 13 y Figura 22). La prueba de ANOVA mostró la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los aislados. Al aplicar la prueba de Tukey las medias de mortalidad acumulada (%) formaron dos grupos. El promedio de mortalidad acumulada (%) fue mayor para los monospóricos con 87.99 ± 5.01 % que para los polispóricos con 85.11 ± 5.69 %. Los aislados que mostraron diferencias significativas entre poli- y monospóricos fueron sólo EH-458 y EH-572. Los aislados más virulentos hacia *B. tabaci* en los bioensayos fueron aquellos provenientes de la roya del café *H. vastatrix*, mientras que los menos virulentos provenían de insectos. La verificación de la muerte de las ninfas por *L. lecanii* se muestra en las figuras 23 y 24 donde se observa la colonia característica del hongo aislado de diversas ninfas.

Tabla 13. Mortalidad acumulada en % y TL₅₀ en ninfas de *Bemisia tabaci*.

Aislado	Mortalidad total en porcentaje ± DS*	TL ₅₀ (días)
EH-348	80.00 ± 16.0ab**	3.83
EH-348/2	76.00 ± 16.0ab	3.64
EH-457	92.00 ± 13.85ab	3.48
EH-457/5	90.66 ± 8.32ab	2.69
EH-458	100 ± 0.00a	2.14
EH-458/2	98.66 ± 2.30ab	2.76
EH-459	80.00 ± 10.58ab	3.60
EH-459/1	97.33 ± 4.61ab	2.77
EH-460	90.66 ± 10.06ab	2.89
EH-460/1	80.00 ± 10.58ab	3.50
EH-572	68.00 ± 14.42b	4.96
EH-572/7	85.30 ± 4.61ab	2.71
Promedio	86.55 ± 13.08	

ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 2.641; g.l. 11, 24; P < 0.023

Los resultados son el promedio de 3 replicas con 25 ninfas cada una. Cada bioensayo duró 8 días.

*DS = Desviación estándar

** Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa (P > 0.05) (con la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey)

TL₅₀ = Tiempo letal medio

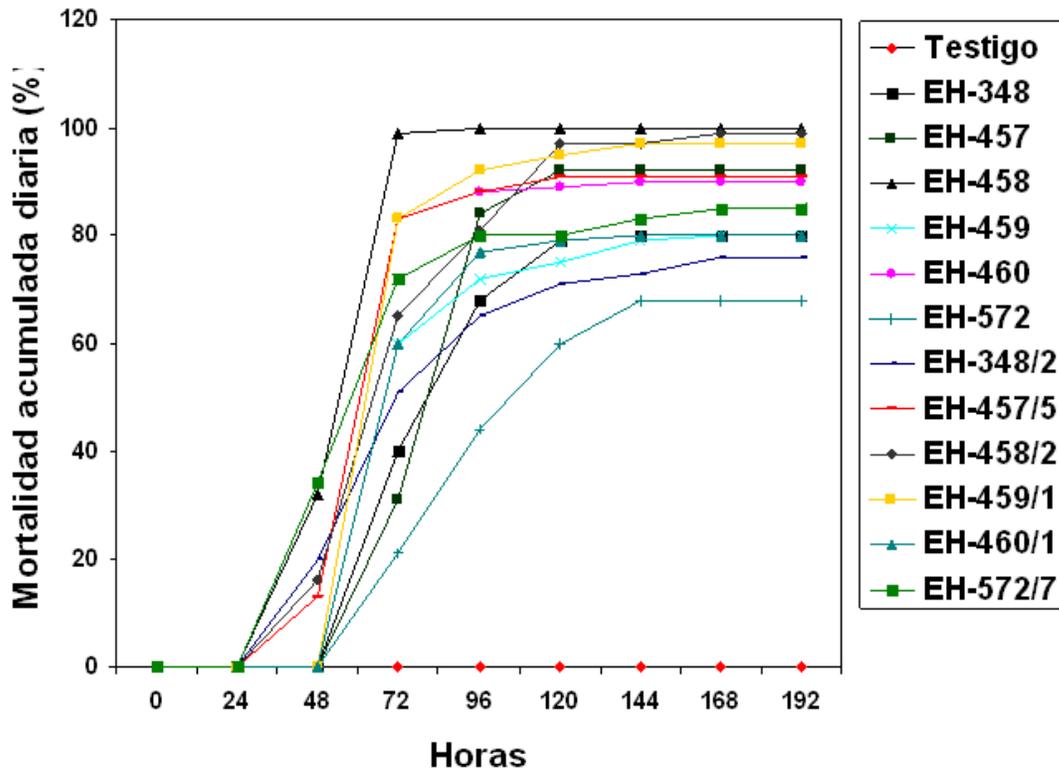


Figura 21. Mortalidad acumulada diaria en porcentaje.

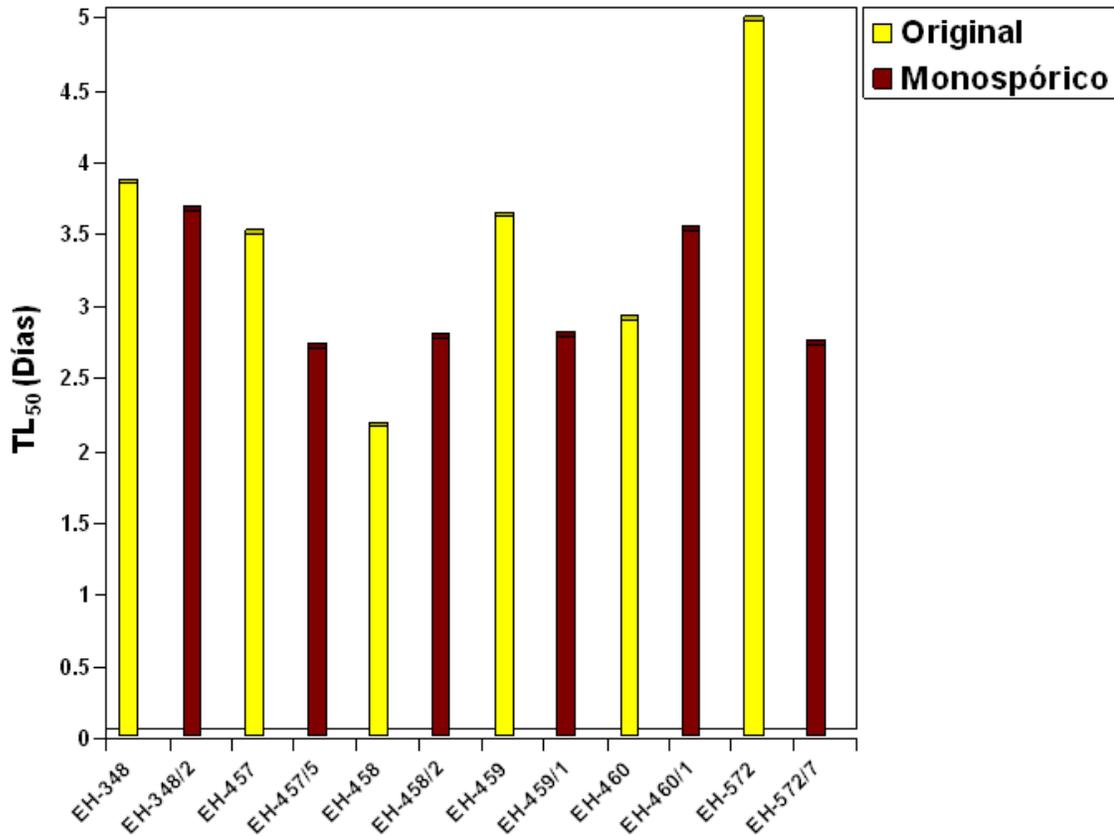


Figura 22. Tiempo letal medio (TL₅₀) de los aislados polisporicos y monospóricos seleccionados.



Figura 23. Verificación de la muerte de ninfas por *Lecanicillium lecanii*, aislado EH-458.



Figura 24. Verificación de la muerte de ninfas por *Lecanicillium lecanii*, aislado EH-458/2.

d) Determinación de actividad de proteasas

Se realizó la determinación de proteasas en cultivo sumergido con tres aislados monospóricos de alta, media y baja virulencia. Los resultados no mostraron relación entre la producción de proteasas y la virulencia (Figura 25). Se aplicó un análisis de varianza para los tres aislados seleccionados a las 72 h, punto en el cuál se observó la mayor producción de UP/mL, la prueba no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) (Tabla 14).

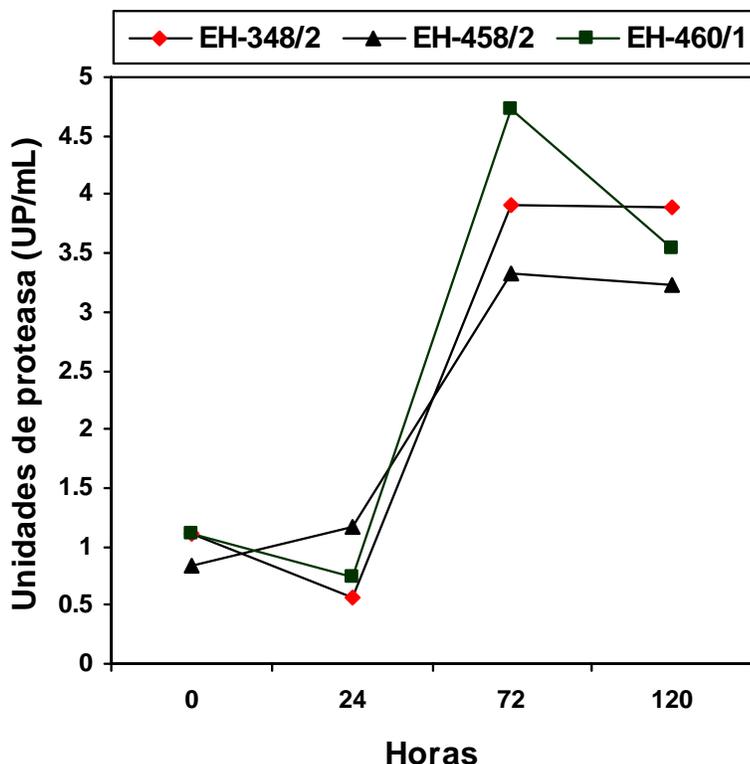


Tabla 14. Producción de proteasas (UP/mL) *Lecanicillium lecanii*.

Aislado	Unidades de proteasa (UP/mL) a las 72 h \pm DS*
EH-348/2	3.91 \pm 1.21a**
EH-458/2	3.32 \pm 1.14a
EH-460/1	4.73 \pm 2.63a
Promedio	3.84 \pm 1.53

ANOVA $\alpha = 0.05$ F = 1.167; g.l. 2, 18; $P > 0.334$

*DS = Desviación estándar

**Letras iguales representan que no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) (con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey)

Figura 25. Producción de proteasas (UP/mL) en medio basal de sales adicionado de caseína de tres monospóricos de *Lecanicillium lecanii*.

e) Determinación semicuantitativa de otras actividades enzimáticas

Se obtuvo el perfil enzimático de los aislados poli- y monospóricos (Figura 26). Todas las exoenzimas ensayadas se encuentran descritas en la tabla 15. En ésta se muestran los resultados encontrados en la suspensión de conidios utilizada. En general, se encontró que los aislados poseen una mayor producción de fosfatasa ácida (alta a moderada) que de fosfatasa alcalina (moderada a baja). Se encontró una mayor actividad de esterasa (alta a moderada) que de esterasa lipasa (moderada a baja). Se encontró actividad moderada para

Tabla 15. Perfil enzimático de los aislados polisporicos y monospóricos de *Lecanicillium lecanii*, mediante el método semicuantitativo API ZYM™.

Enzima	Actividad enzimática (substrato hidrolizado, nmol)*											
	Aislados											
	EH-348	EH-348/2	EH-457	EH-457/5	EH-458	EH-458/2	EH-459	EH-459/1	EH-460	EH-460/1	EH-572	EH-572/7
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa alcalina	2	2	<1	1	1	1	<1	1	1	<1	1	2
Esterasa (C 4)	1	2	3	5	4	3	4	3	2	3	2	2
Esterasa lipasa (C 8)	1	2	<1	<1	1	1	<1	<1	1	2	1	1
Lipasa (C14)	<1	1	<1	1	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Leucina arilamidasa	1	1	<1	1	1	1	<1	<1	1	1	<1	<1
Valina arilamidasa	<1	<1	<1	1	1	1	<1	<1	1	1	<1	<1
Cistina arilamidasa	<1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<1	<1
Tripsina	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
α -quimotripsina	<1	<1	1	1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
Fosfatasa ácida	5	5	4	2	4	3	3	4	2	3	3	2
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	2	2	2	3	2	3	2	2	1	2	<1	<1
α -galactosidasa	<1	<1	1	<1	1	1	<1	<1	1	1	1	<1
β -galactosidasa	2	3	1	<1	1	1	1	1	<1	<1	1	1
β -glucuronidasa	<1	<1	<1	<1	<1	<1	0	0	0	0	<1	<1
α -glucosidasa	<1	<1	<1	1	1	1	1	1	<1	<1	<1	<1
β -glucosidasa	2	1	3	3	3	3	2	3	1	2	2	3
N-acetil- β -glucosaminidasa	3	4	1	1	1	1	1	1	3	1	<1	<1
α -manosidasa	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	0	0
α -fucosidasa	<1	<1	<1	0	1	1	<1	<1	1	1	1	<1

*Nanomeles de sustrato hidrolizado después de un periodo de incubación de 4 h, a 26 °C. Los valores numéricos indican la actividad enzimática como un incremento en la intensidad de color, de acuerdo con la carta de colores provista en el sistema de pruebas API ZYM™.

**Escala: < 1 menos de 5 nanomoles, 1 corresponde a 5 nanomoles, 2 a 10 nanomoles, 3 a 20 nanomoles, 4 a 30 nanomoles y 5 a 40 o más nanomoles.

la enzima β -glucosidasa. También mostraron una moderada actividad enzimática de naptol-AS-BI-fosfohidrolasa (fosfoamidasa). Se observó una actividad aminopeptidasa baja a traza para leucina arilamidasa (proteasa), valina arilamidasa y cistina arilamidasa. Se encontraron niveles de actividad semejantes entre α -quimotripsina y de tripsina (baja a traza). Y en general, una baja actividad de N-acetil- β -glucosaminidasa (quitinasa), bajo las condiciones estudiadas.

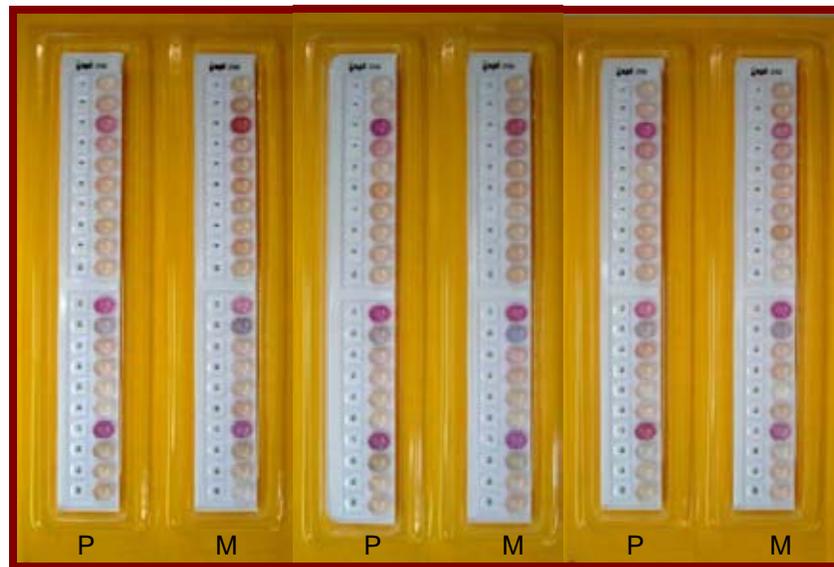


Figura 26. Perfil enzimático del polispóric (P) y monospóric seleccionado (M) de los aislados EH-457 (izquierda), EH-458 (centro) y EH-459 (derecha).

IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de la caracterización fenotípica de aislados de hongos entomopatógenos es el de sentar las bases para seleccionar aquellos con las características más apropiadas para que puedan desempeñarse de manera óptima como agentes de control biológico, bajo las condiciones que imperan en los agroecosistemas.

El punto de partida para realizar esta investigación fue la obtención de aislados monospóricos, lo cual permitió contar con poblaciones genéticamente homogéneas y una mayor estabilidad en sus características. Para cumplir con este objetivo se realizaron ensayos preliminares para encontrar el método adecuado para la obtención de estos aislados. Inicialmente, se utilizó el método de Goettel & Inglis (1997) que consistió en colocar agarosa sobre un portaobjetos y sembrar una suspensión diluida para buscar los conidios individuales con la ayuda de un microscopio óptico. Sin embargo, el uso de este método no fue satisfactorio, pues el tamaño de los conidios dificultó una rápida localización y el calor generado por los mecheros secaba con rapidez la agarosa. Además, *L. lecanii* es sensible a temperaturas mayores de 35 °C lo que resultaba en una muy baja viabilidad de los conidios obtenidos con este procedimiento. Se utilizó entonces el método modificado de unidades formadoras de colonias (UFC) con la ventaja de obtener aislados monospóricos sin necesidad de abrir las cajas de Petri, durante el proceso de localización de los conidios; éstas sólo fueron abiertas hasta el momento de tomar las colonias y trasladarlas a SDA, lo que garantizó la prevención de contaminación. La localización de conidios individuales se vio facilitada por la presencia de los tubos germinales observados después de 24 h de incubación. Cortez-Madrigal *et al.* (2003) también dejaron transcurrir 24 h para localizar los conidios por de la presencia de tubos germinales, para la obtención de aislados monospóricos de *L. lecanii*.

El proceso de selección de los aislados monospóricos mostró que los aislados polispóricos fueron superados en algunos casos por sus respectivos monospóricos, en ambas características estudiadas. Resultados similares obtuvieron Cortez-Madrigal *et al.* (2003) en cuanto a la mayor producción de conidios de los aislados monospóricos con respecto a su aislado polispórico de procedencia. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que los aislados monospóricos pueden superar las características de los

aislados polispóricos, sin embargo, también se encontraron excepciones, pues algunos polispóricos superaron los monospóricos en la tasa de crecimiento y producción de conidios.

Una vez seleccionados los monospóricos se realizaron las pruebas de caracterización fenotípica. La temperatura óptima de crecimiento de los aislados estudiados es fundamental, ya que esta variable al igual que la humedad, se relaciona con la capacidad del hongo para infectar al insecto (Vidal *et al.*, 2003). La diferencia entre los aislados poli- y monospóricos con respecto a su crecimiento a diferentes temperaturas pudiera deberse a la condición de homocariosis del conidio a partir del cual se origina el aislado monospórico, en comparación con el carácter heterocariótico de los aislados polispóricos (Webster, 1986). En otros estudios de *L. lecanii* (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003) también encontraron diferencias entre aislados poli- y monospóricos al analizar otras características como la morfología de la colonia, tamaño, producción y tiempo de germinación de conidios.

La variabilidad fenotípica intraespecífica encontrada entre los aislados de México y las cepas de referencia de *L. lecanii* puede manifestarse como expresión de la variabilidad genética existente en la especie (Steenberg & Humber, 1999). Debido a la relevancia de la sensibilidad a la temperatura ambiente en la eficiencia de los agentes microbianos en los agroecosistemas, se ha estudiado la variabilidad inter e intraespecífica de los hongos entomopatógenos en cuanto a su crecimiento a diferentes temperaturas (Fargues *et al.*, 1992; Ouedraogo *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1997a). En el presente estudio, el crecimiento de *L. lecanii* a diferentes temperaturas sugirió que éste es un hongo mesofílico, debido a que la mayoría de los aislados se desarrollaron de manera óptima a una temperatura de 25 °C. Este dato coincide con lo observado por varios autores (López-Llorca & Carbonell, 1999; Monteiro *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1991) para aislados de *V. lecanii* de España, Brasil y China, así como para aislados provenientes de los Estados Unidos de Norteamérica, Reino Unido, Dinamarca y Alemania (Yeo *et al.*, 2003). Esta temperatura se encuentra dentro del espectro óptimo para la mayoría de los hongos entomopatógenos mesofílicos (Ferron *et al.*, 1991). Todos los aislados de *L. lecanii* estudiados mostraron crecimiento a 30 °C lo que coincide con lo reportado por López-Llorca & Carbonell (1999), donde sólo uno de los aislados que estudiaron no mostró crecimiento a esta temperatura. Por otro lado, las cepas de referencia provenientes de Israel (1029), el cual presenta un clima generalmente subtropical, y asimismo las de Dinamarca (4064) y Polonia (972), países donde predominan las

temperaturas bajas, se desarrollaron mejor a 30 °C, hecho que puede deberse al lugar de origen del hospedero a partir del cual se obtuvo el hongo, es decir, que pudiera tratarse de un hospedero que ha emigrado de una región con características climáticas diferentes a donde fue colectado (Vidal *et al.*, 1997a).

La temperatura climática de la región donde se utilice *V. lecanii* como agente de control biológico es decisiva para el éxito del hongo en campo (López-Llorca & Carbonell, 1999) debido a que este factor afecta no sólo el crecimiento sino también su eficacia como agente de control biológico, al incidir en la esporulación y germinación de conidios (Luz & Fargues, 1997), en la tasa de invasividad (Xu *et al.*, 2002) y en la virulencia (Liu *et al.*, 2000). Las interacciones hospedero-parásito son diversas y complejas razón por la cual extrapolar los datos obtenidos en el laboratorio para predecir la respuesta del hongo en condiciones de campo no siempre es válido (Vidal *et al.*, 1997a). Sin embargo, como prerrequisito para la selección de aislados, los estudios en el laboratorio de los factores que rigen el crecimiento y la infección de los hongos tienen que ser considerados, dado que proporcionan información valiosa para la caracterización de los aislados.

La investigación y optimización de parámetros como la nutrición, pH, temperatura óptima para el crecimiento micelial, humedad, conidiación, luz, aireación, periodo de incubación, etc., son aspectos experimentales fundamentales para la producción masiva de un micoinsecticida. Sin embargo, es necesario realizar pruebas a pequeña escala antes de asumir su validez en la escala de producción masiva. La mayoría de las unidades de producción fúngica industrial han implementado un método de producción bifásico en el cual la primera fase se produce en cultivo líquido (obtención de micelio o cuerpos hifales) y posteriormente una segunda fase en la cual estos propágulos son sembrados en sustrato sólido para la obtención de conidios (Jenkins *et al.*, 1998). Además, este modelo de producción bifásica presenta algunas ventajas como las siguientes: 1) La competitividad del hongo aumenta, reduciendo el riesgo de la invasión del sustrato por microorganismos contaminantes; 2) La formación de micelio y esporulación son más rápidas, así se reduce el tiempo de incubación y economía de espacio; 3) El cultivo líquido podría indicar una contaminación del cultivo original ocurrida durante el crecimiento en agar inclinado; 4) Garantiza una cobertura total del sustrato resultando en un crecimiento homogéneo (Jenkins *et al.*, 1998). En México, la producción actual de algunos micoinsecticidas se lleva a cabo por

este método bifásico (Hernández-Velázquez *et al.*, 2003) y por lo tanto es de relevancia el conocer la biomasa fúngica producida en medio líquido por el hongo estudiado. Estas pruebas de producción de biomasa se realizaron con insumos de tipo industrial lo que resulta en una reducción de los costos de producción en un modelo de producción bifásico. En general, los monospóricos fueron los que presentaron un mayor valor promedio total de biomasa con respecto a los polispóricos. Es interesante que los aislados que presentaron la mayor producción de biomasa en cultivo líquido fueron también los que exhibieron mayor virulencia.

En cuanto a los ensayos de virulencia en mosquita blanca de los hongos estudiados, solamente en un caso (EH-459 y EH-459/1) se observó notoriamente que el aislado monospórico presentó una mayor mortalidad 97.3 % que el polispórico (80.0 %), aunque esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). Este aislado tiene la particularidad de tener una mayor tolerancia a las temperaturas de 15 y 30 °C que los otros monospóricos de alta virulencia. Otros aislados, como el EH-572/7 procedente de Colima mostró una tasa de crecimiento aceptable a las temperaturas de 15 y 30 °C, pero no así una alta virulencia. Los resultados en las pruebas de virulencia indican un mejor desempeño de los aislados procedentes de *H. vastatrix* (roya del café) que de los recolectados a partir de insectos. En cambio, Domsch *et al.* (1980) mencionan que no encontraron diferencias en la virulencia a áfidos en aislados procedentes de insectos y de royas. En nuestro estudio, las características de los aislados estudiados coinciden con las afirmaciones de varios autores en relación a que algunos aislados de *L. lecanii* son particularmente versátiles (Strasser *et al.*, 2000; Uziel & Sikora, 1992; Blakeman & Fokkema, 1982; Hall, 1980), pues no sólo se conocen por su capacidad como entomopatógenos, sino también como patógenos de nemátodos y de otros hongos (micopatógenos). En particular, con respecto a la capacidad de *V. lecanii* como hiperparásito, no reviste riesgo para especies de hongos inocuas a plantas, ya que hasta el momento sólo se ha reportado como hiperparásito de royas, (Carrión, 1988; Spencer, 1980; Grabski & Mendgen, 1986; Spencer & Atkey, 1981) y otros hongos (mildíus pulverulentos) que afectan plantas de invernadero (Askary *et al.*, 1997). La caracterización y selección de aislados versátiles, podrían brindar ventajas adicionales en el control biológico simultáneo de plagas.

Mucho de los trabajos en los cuales se evaluó la virulencia de *V. lecanii* en insectos, coinciden en utilizar una serie de condiciones, como una temperatura de 25 °C, manejo del fotoperiodo y una HR cercana al 100 %. La manera de infectar los insectos puede variar, algunos utilizan la inmersión de las hojas con ninfas en suspensiones de conidios (Gindin *et al.*, 2000; Rodríguez Dos Santos & del Pozo, 2003; Mor *et al.*, 1996); otros realizan la infección de los insectos colocando una gota con una determinada cantidad de conidios (López-Llorca & Carbonell, 1999); mientras que otros trabajos son realizados infectando a los insectos por aspersión (Yeo *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2003). De acuerdo con la revisión de la literatura, la temperatura es el factor más importante al realizar pruebas de virulencia en laboratorio. Los estudios de virulencia que nosotros realizamos se llevaron a cabo por inmersión, pero siempre a una temperatura ambiente cercana 25 °C. Yeo *et al.* (2003) mencionan que a pesar de que la especificidad de un aislado a un hospedero es importante, las condiciones de temperatura influyen de manera relevante en los resultados del bioensayo. Asimismo, sugieren que las pruebas de termotolerancia ligadas a los resultados obtenidos en las pruebas de virulencia, permiten una adecuada selección de un aislado bajo determinadas condiciones climáticas. El TL₅₀ que mostraron los aislados más virulentos de *L. lecanii* en el presente estudio, fueron semejantes a los reportados por diversos autores. Entre ellos, López-Llorca & Carbonell, (1999) quienes encontraron un TL₅₀ entre 2.66 y 2.73 días, en larvas de *Galleria mellonella*; Gindin *et al.* (2000) señalaron un TL₅₀ a las 96 h entre 3.2 y 3.8 días, en ninfas 3 de *B. argentifolii*; y Yeo *et al.* (2003) reportaron un TL₅₀ de 2.79 y 3.39 días, en los áfidos *Aphis fabae* y *Myzus persicae*.

A pesar de que los estudios de proteasas, sobre todo en *M. anisopliae* (St. Leger, 1995) muestran relación entre las proteasas y la virulencia del hongo, en nuestro estudio con *L. lecanii*, no se observaron diferencias significativas entre la máxima producción de proteasas a las 72 h entre los aislados de alta, media y baja virulencia. Estudios de determinación de proteasas en medio de cultivo líquido como el de St. Leger *et al.* (1987) mencionan que al menos tres proteasas (quimoelastasas Pr1, proteasas ligadas a tripsina Pr2 y proteasas cisteína ligadas a tripsina Pr4) son producidas en cultivo líquido cuando se utiliza cutícula de insecto como única fuente de carbono y nitrógeno. Charnley (2003) menciona que proteasas como la Pr1 son producidas por aislados de *V. lecanii* en igual magnitud tanto en cutículas de langosta como de áfidos, lo que sugiere que no existen

diferencias respecto al tipo de cutícula utilizada para inducir la producción de proteasas. Sin embargo, en los ensayos preliminares de la presente investigación se utilizaron cutículas de *Tenebrio molitor* como inductor en el medio de cultivo sólido, pero ninguno de los aislados mostró la capacidad de degradar este sustrato (halo de degradación), como lo hizo el hongo con la caseína. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una baja actividad de proteasas UP/mL utilizando caseína al 1 %. Esto último podría ser un indicio que durante el proceso de infección en insectos por *V. lecanii* las quitinasas juegan un papel más destacado que las proteasas (Jackson *et al.*, 1985). Estos autores reportaron un amplio espectro de germinación, esporulación y producción de quitinasas extracelulares correlacionadas con la virulencia de *V. lecanii* al áfido *Macrosiphoniella sanborni*. Los resultados encontrados con el API ZYM indican, en general, que la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (quitinasa) fue ligeramente mayor a la actividad aminopeptidasa (proteasas), bajo las condiciones estudiadas.

El método semicuantitativo de API ZYM™ es considerado como un procedimiento rápido y reproducible capaz de revelar la actividad enzimática de microorganismos (El-Sayed *et al.*, 1992). En hongos entomopatógenos se han realizado estudios con este método, entre otros, El-Sayed *et al.* (1992) investigaron las enzimas expresadas durante la germinación de conidios de *Nomuraea rileyi* mostrando diferencias entre las especies y aislados estudiados. Hsiao (1998) obtuvo el perfil enzimático de *V. lecanii* y en subcultivos posteriores del mismo aislado, encontró que el hongo disminuyó la actividad para las enzimas leucina arilamidasa (proteasa), valina arilamidasa, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa (quitinasa). En un aislado virulento de *V. lecanii* (ATCC44615), Lin & Liu (2004) reportaron altos niveles de leucina arilamidasa (proteasa), valina arilamidasa, tripsina, β -glucosidasa y β -glucosaminidasa, por el mismo método de API ZYM. En general, los resultados del perfil enzimático de los aislados de México estudiados no coinciden con los encontrados por estos autores, pues presentan una actividad baja a traza para esas enzimas. Sin embargo, el perfil enzimático de los aislados que estudiamos presentaron algunas semejanzas con el trabajo de St. Leger *et al.* (1986) como el de una mayor actividad de fosfatasa ácida que de alcalina. Actividad traza para las aminopeptidasas (leucina arilamidasa (proteasa), valina arilamidasa y cistina arilamidasa). Ausencia de actividad β -galactosidasa. Y alta actividad de N-acetil- β -glucosaminidasa (quitinasa). Sin embargo, en

nuestro estudio, si se observó actividad de β -galactosidasa, bajos niveles de N-acetil- β -glucosaminidasa (quitinasa). Las diferencias encontradas pueden deberse a las características inherentes (genotipo) de cada aislado y a las condiciones de cultivo. Por ejemplo, St. Leger et al. (1986) utilizaron cultivo líquido y nosotros obtuvimos una suspensión de conidios a partir de cultivos sólidos.

De todos los datos obtenidos se concluye que en general los aislados monospóricos presentaron mejores características que el aislado original polispórico. Por otro lado, el rango de tolerancia a las temperaturas ensayadas sugieren que *L. lecanii* podría tener una mejor eficiencia en el campo para el control de la mosquita blanca en regiones de clima templado. Entre los aislados estudiados se sugieren los monospóricos EH-457/5 y EH-458/2 como candidatos para su uso en pruebas de campo por su excelente desempeño en cuanto a su crecimiento, esporulación y virulencia. El monospórico EH-459/1 que no presentó una producción de conidios satisfactoria, si mostró un amplio espectro de tolerancia a las temperaturas ensayadas y una alta virulencia, por lo que se sugiere como candidato para pruebas de invernadero.

X. CONCLUSIONES

- ▽ Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron los aislados monospóricos EH-457/5 y EH-458/2 como candidatos para el control de la mosquita blanca.
- ▽ Durante el proceso de selección, se observó que la mayoría de los aislados monospóricos mostraron valores superiores a los de los aislados polispóricos en su tasa de crecimiento y producción de conidios, por lo que se sugiere utilizarlos como tales en todas las pruebas.
- ▽ La temperatura óptima de crecimiento para *L. lecanii* fue de 25 °C; crece mejor en la mayoría de los casos a 15 °C que a 30 °C; y no se observó crecimiento a 35 °C en ninguno de los aislados estudiados.
- ▽ El aislado que más biomasa produjo fue el polispórico EH-458 y su respectivo monospórico EH-458/2.
- ▽ Los aislados más virulentos para la mosquita blanca (*B. tabaci*) fueron los polispóricos EH-457, EH-458 y los monospóricos EH-457/5, EH-458/2, EH-459/1, todos ellos provenientes de la roya del café *H. vastatrix*.
- ▽ No se observó relación con respecto a la producción de proteasas y la virulencia de los aislados utilizados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- ◇ Arango GL, Torres C, Lapointe SL. 1994. Patogenicidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae). Rev Colom Entomol 20: 43-46.
- ◇ Askary H, Benhamou N, Brodeur J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. Phytopathology 87:359-368.
- ◇ Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme Microb Technol 30: 910-915.
- ◇ Bidochka MJ, Burke S, Ng L. 1999. Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: adaptations for pathogenesis. Can J Microbiol 45: 856–864.
- ◇ Bielikova L, Landa Z, Osborne LS, Curn V. 2002. Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique. Plant Protect Sci 38: 1-12.
- ◇ Blakeman JP, Fokkema NJ. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann Rev Phytopathol 20: 167-192.
- ◇ Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction—Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Butt T, Jackson C, Magan N (Eds.). Fungi as Biological Agents. CAB International, Nueva York. pp. 1-8.
- ◇ Carrión G. 1988. Estudio sobre el control biológico de la roya del cafeto mediante *Verticillium lecanii* en México. Mic Neotrop Aplic 1: 79-86.
- ◇ Cortez-Madrigal H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo-Mojica H, Ortiz-García CF, Aceves-Navarro LA. 2003. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. BioControl 48: 321–334.
- ◇ Charnley AK, St. Leger RJ. 1991. The Role of Cuticle Degrading Enzymes in Fungal Pathogenesis in Insects. In: Cole TG, Hoch CH. (Eds.). The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, New York. pp. 267-286.

- ◇ Charnley AK. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Botanical Res* 40: 267-286.
- ◇ Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
- ◇ Drummond J, Heale JB. 1998. Genetic studies on the inheritance of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against *Trialeurodes vaporariorum*. *J Invertebr Pathol* 52: 57-65.
- ◇ El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD, Gupta SC. 1992. Use of a colorimetric system to detect enzymes expressed by germinating conidia of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia* 118: 29-36.
- ◇ Fargues J, Maniania NK, Delmas JC, Smits N. 1992. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie* 12: 557-564.
- ◇ Ferron P, Fargues J, Riba G. 1991. Fungi as Microbial Insecticides Against Pests. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.). *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 2. Marcel Dekker, New York. pp. 665-706.
- ◇ Finney DJ. 1972. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ◇ García-Juárez M, Toriello C, Mier T. 1999. Effect of the insecticide fenprothrin on exoenzymes production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Rev Lat-Amer Microbiol* 41: 215-216.
- ◇ Gindin G, Geschtovt NU, Raccah B, Barash I. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 28: 1-11.
- ◇ Goettel MS, Inglis D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Chapter V-3. Academic Press, London. pp. 213-248.
- ◇ Grabski GC, Mendgen K. 1986. Die parasitierung des bohnenrostes *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* durch den hyperparasiten *Verticillium lecanii*: Untersuchungen zur wirt-erkennung, penetration und abbau der rostpilzsporen. *J Phytopathol* 115: 116-123.
- ◇ Gupta SC, Lathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1991. Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle. *Exp Mycol* 15: 310-315.

- ◇ Hall RA. 1980. Laboratory infection of insects by *Verticillium lecanii* strains isolated from phytopathogenic fungi. *Trans Br Mycol Soc* 74: 445-446.
- ◇ Hernández-Velázquez VM, Hunter DM, Barrientos-Lozano L, Lazama-Gutiérrez R, Reyes VF. 2003. Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) laboratory and field trials. *J Orthoptera Res* 12: 89-92.
- ◇ Hilje, L. 1994. Aspectos Bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamérica. In: Mata M, Dardón AD, Salguero NVE (Eds.). *Biología y Manejo del Complejo Mosca Blanca-Virosis*, Memorias del III Taller Centroamericano y del Caribe sobre Mosca Blanca. Septiembre 19-23, Antigua Guatemala. pp. 53-71.
- ◇ Hsiao WF. 1998. Enzymatic characterization of three entomopathogenic fungi with the API ZYM system. *Chinese J Entomol* 18: 203-206.
- ◇ Jackson CW, Heale JB, Hall RA. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann Appl Biol* 106: 39-48.
- ◇ Jenkins NE, Heviefo G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform* 19: 21N-31N.
- ◇ Kang SC, Park S, Lee DG. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 73: 276-281.
- ◇ Li G, Yuhua Y, Liying W. 1991. Influence of temperature and nutrition on growth of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Beijing strain). *Chinese J Biol Control* 7: 115-119.
- ◇ Lin SF, Liu SD. 2004. The effect of 4 entomopathogenic fungi on aphid control in the greenhouse and enzymes synthesized by these fungi. *Plant Prot Bull* 46: 143-154.
- ◇ Liu YQ, Feng MG, Liu SS. 2000. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* against *Myzus persicae*. *Chinese J Biol Control* 16: 56-60.
- ◇ López-Llorca LV, Carbonell T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Rev Iberoam Micol* 16: 136-142.
- ◇ López-Llorca LV, Olivares-Bernabeu C, Salinas J, Jansson HB, Kolattukudy PE. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol Res* 106: 499-506.

- ◇ Luz C, Fargues J. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138: 117-125.
- ◇ Mier T, Rivera F, Bermúdez JC, Domínguez Y, Benavides C, Ulloa M. 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. *Rev Mex Mic* 7: 149-156.
- ◇ Mier T, Rivera F, Rodríguez-Ponce MP, Carrillo-Farga J, Toriello C. 1994. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. *Rev Lat-Amer Microbiol* 36: 107-111.
- ◇ Mier T, Toriello C, Ulloa M. 2002. Métodos para Estudiar Características Fisiológicas de Hongos Microscópicos. In: *Hongos Microscópicos Saprobios y Parásitos: Métodos de Laboratorio*. UAM-Xochimilco, UNAM-Instituto de Biología. México DF. p. 35.
- ◇ Monteiro AC, Camargo-Barbosa C, Bracelos-Correa AC, Pereira GT. 2004. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sobre diferentes fatores ambientais. *Pesq Agropec Bras* 39: 561-565.
- ◇ Montgomery DC, 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F.
- ◇ Mor H, Gindin G, Ben-Ze'ev IS, Raccach B, Geschtovt NU, Ajtkhozina N, Barash I. 1996. Diversity among isolates of *Verticillium lecanii* expressed by DNA polymorphism and virulence towards *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica* 24: 111-118.
- ◇ Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137: 37-43.
- ◇ Paterson IC, Charnley AK, Cooper RM, Clarkson JM. 1994. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- ◇ Prabhaker N, Condried DL, Meyerdisk DE. 1985. Insecticide resistance in the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol* 78: 748-752.
- ◇ Ramírez-Villapudua, J. 1996. *Manejo Integrado de la Mosquita Blanca de la Hoja Plateada*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

- ◇ Remaudière G, Latgé JP. 1985. Importancia de los hongos patógenos de insectos (especialmente Aphididae y Cercopidae) en México y perspectivas de uso. Bol Serv Plagas 11: 217-225.
- ◇ Rodríguez Dos Santos A, del Pozo NA. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. Agrociencias 2: 71-78.
- ◇ Romero MA. 1995. Aspectos Básicos de la Mosquita Blanca. In: Sagar. Fitófilo. Desafíos Fitosanitarios: Mosquita Blanca. pp. 11-23.
- ◇ Sarath G, De la Motte RS, Wagner FW. 1989. Protease Assay Methods. In: Benyon RJ, Bond JS (Eds.), Proteolytic Enzymes, a Practical Approach. IRL Press, Oxford. pp. 25-55.
- ◇ SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1994. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. Subdirección de Agricultura. Dirección General de Sanidad Vegetal, México.
- ◇ Spencer DM. 1980. Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecanii*. Trans Br Mycol Soc 74: 191-194.
- ◇ Spencer DM, Atkey PT. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. Trans Br Mycol Soc 77: 535-542.
- ◇ St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the API ZYM system. J Invertebr Pathol 48: 375-376.
- ◇ St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Arch Biochem Biophys 253: 221-232.
- ◇ St. Leger RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Can J Bot 73 (Suppl. 1): S1119-S1125.
- ◇ Steenberg T, Humber RA. 1999. Entomopathogenic potential of *Verticillium lecanii* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J Invertebr Pathol 73: 309-314.
- ◇ Strasser H, Vey A, Butt TM. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. Biocontrol Sci Technol 10: 717-735.

- ◇ Sugimoto M, Koike M, Hiyama N, Nagao H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. J Invertebr Pathol 80: 176-187.
- ◇ Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez JA, Mier T. 1999. Seguridad de ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en *Metarhizium anisopliae*. Rev Mex Mic 15: 123-125.
- ◇ Uziel A, Sikora, RA. 1992. Use of non-target isolates of the entomopathogen *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas to control the potato cyst nematode, *Globodera pallida* (Stone). Nematologia 38: 123-130.
- ◇ Vidal C, Fargues J, Lacey LA. 1997a. Intra-specific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. J Invertebr Pathol 70: 18-26.
- ◇ Vidal C, Lacey LA, Fargues J. 1997b. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. J Econ Entomol 90: 765-772.
- ◇ Vidal C, Fargues J, Rougier M, Smits N. 2003. Effect of air humidity on the infection potential of hyphomycetous fungi as mycoinsecticides for *Trialeurodes vaporariorum*. Biocontrol Sci Technol 13: 183-198.
- ◇ Webster, J. 1986. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, Cambridge. 669 p.
- ◇ Worthing RC, Hance JR. 1991. The pesticide manual. A world compendium. British Crop Protection Council (BCPC), London.
- ◇ Xu ST, Feng MG, Ying SH. 2002. Time-specific infection rate of *Beauveria bassiana* on *Myzus persicae* after topical inoculation of conidial suspension. Chinese J Appl Ecol 13: 701-704.
- ◇ Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ, Pye BJ. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Manag Sci 59: 156-165.
- ◇ Zare R, Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. Nov. Nova Hedwigia 73: 10-13.

XII. ANEXO

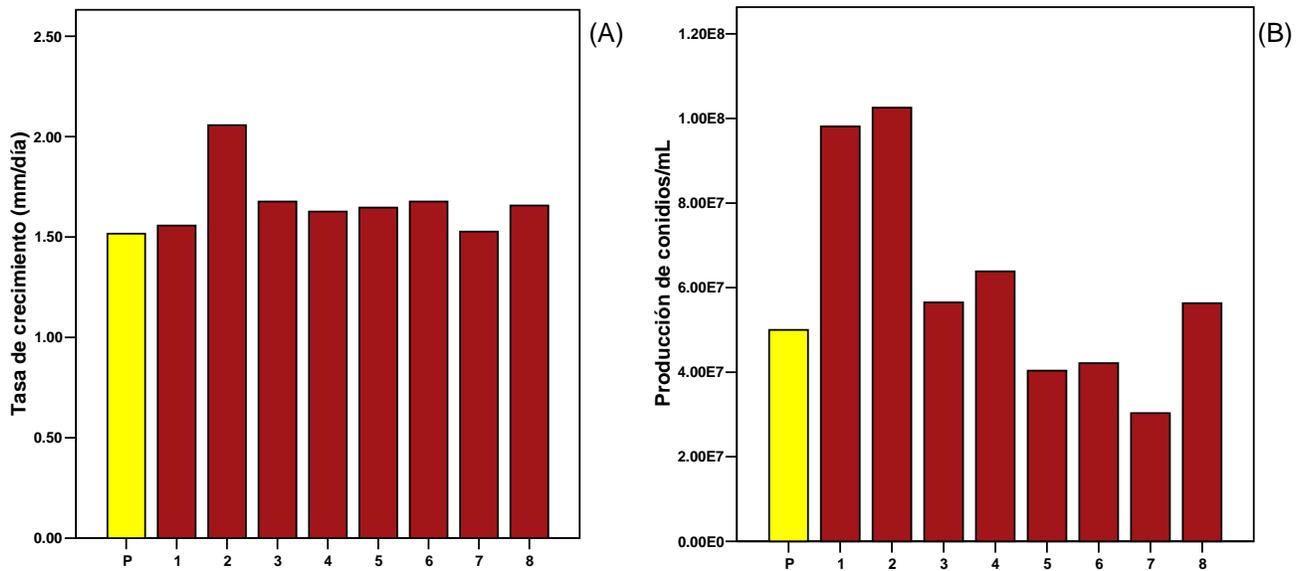


Figura 27. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-348, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

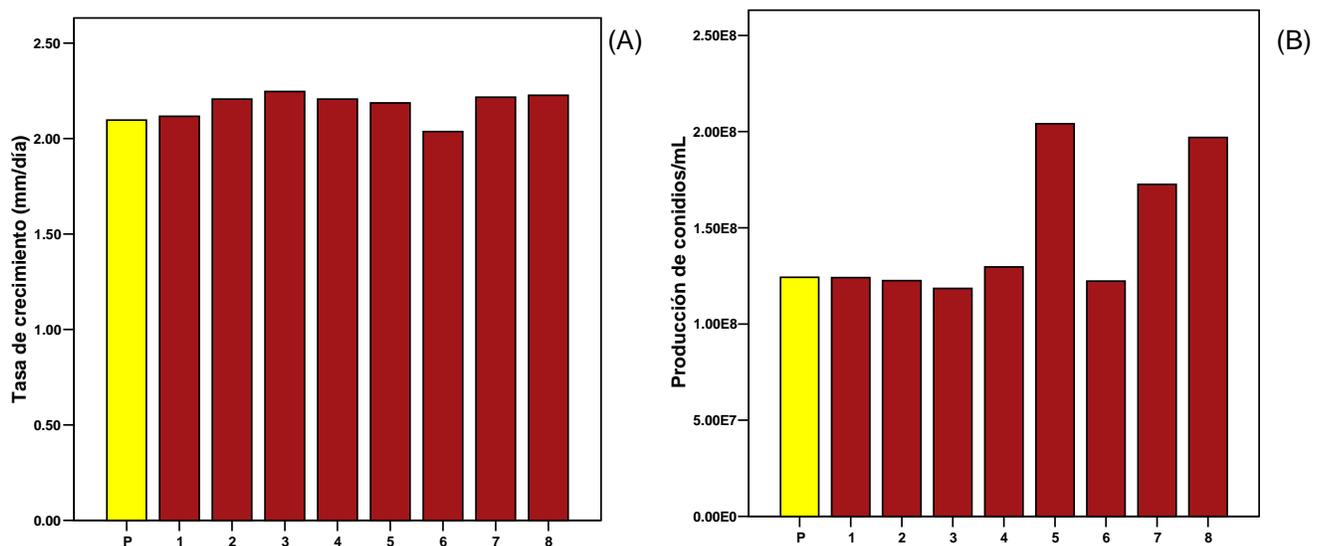


Figura 28. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-457, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

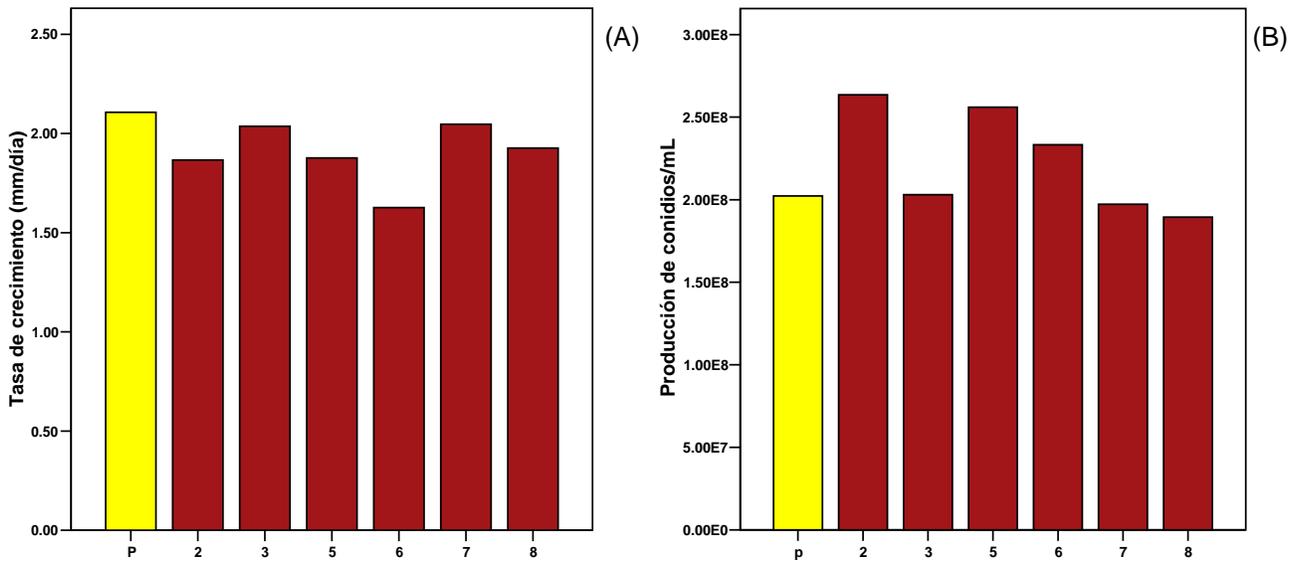


Figura 29. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-458, como de sus respectivos monospóricos (2, 3, 5, 6, 7, y 8).

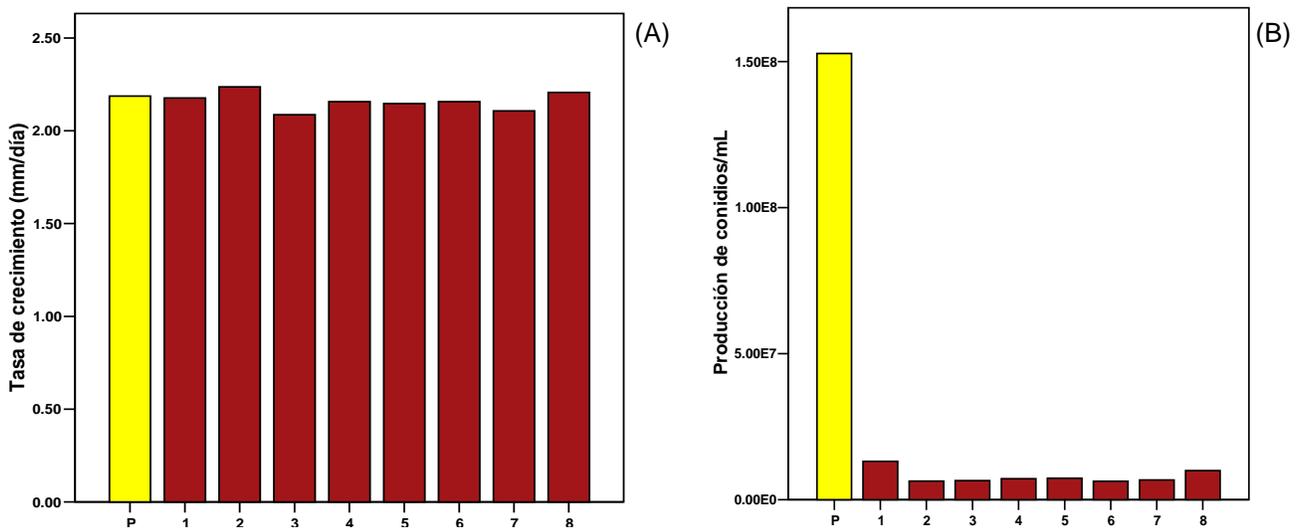


Figura 30. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-459, como de sus respectivos monospóricos (1 a 8).

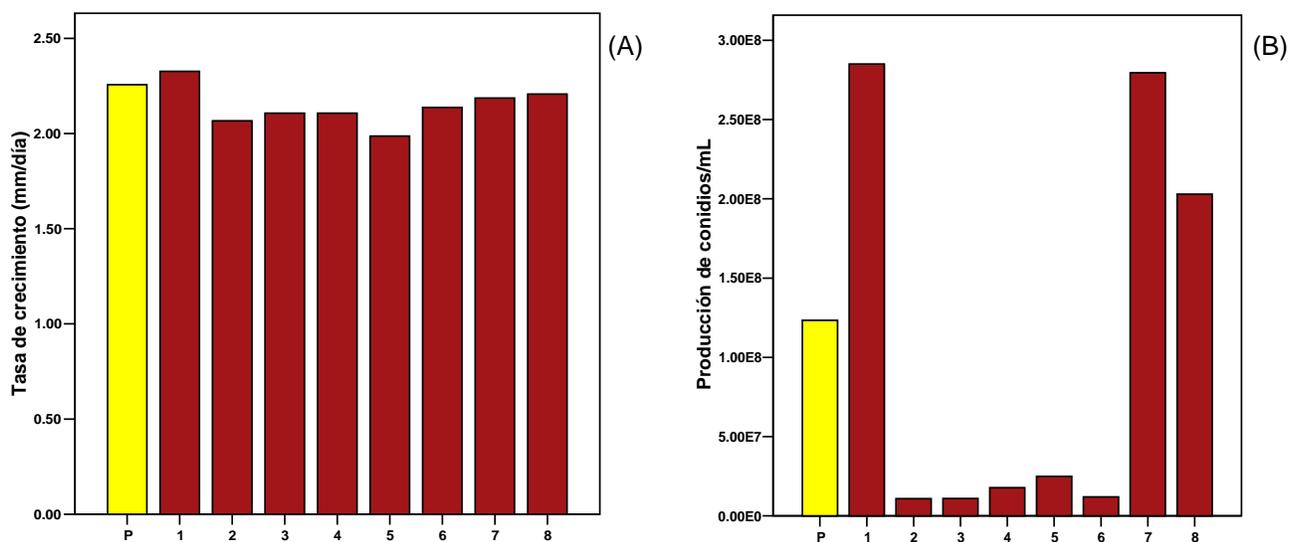


Figura 31. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-460, como de sus respectivos monosporicos (1 a 8).

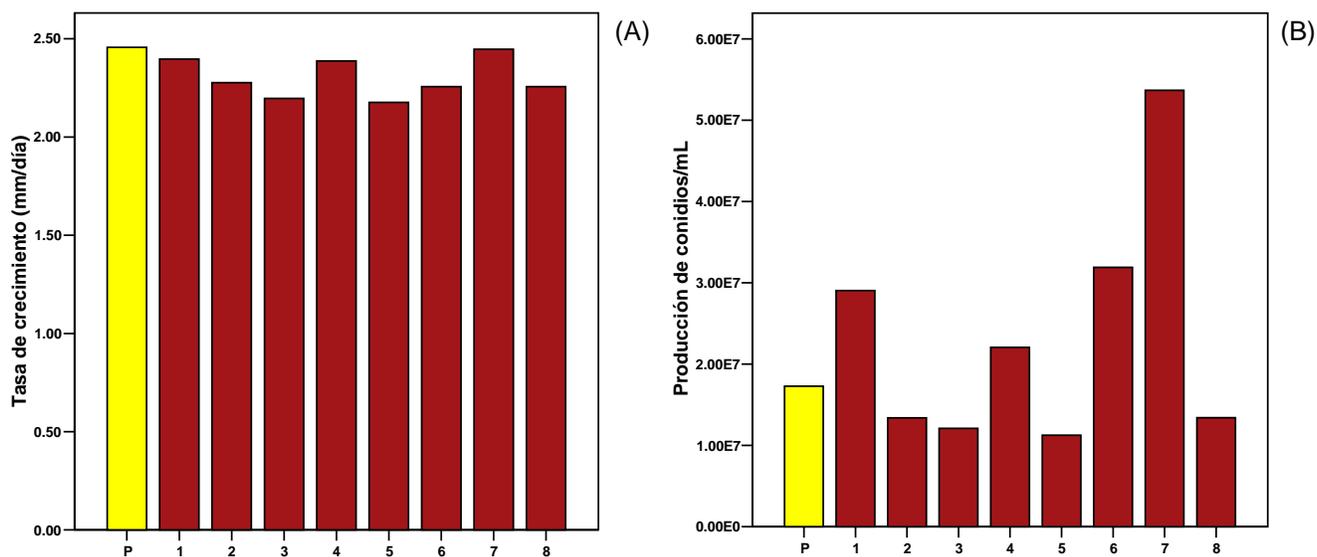


Figura 32. Medias de la tasa de crecimiento (mm/día) (A) y producción de conidios/mL (B), del aislado polisporico (P) EH-572, como de sus respectivos monosporicos (1 a 8).