



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EL RECURSO HONGOS  
COMO UNA ALTERNATIVA  
PARA EL MANEJO DE INSECTOS PLAGA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A :**

**ANDREA TORRES BARRAGÁN**



**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG**

**MÉXICO, DF**

**NOVIEMBRE, 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

A quienes creyendo que el futuro no esta hecho  
piensan, trabajan y viven en la construcción de  
un mejor mañana para ellos, su grupo y  
la humanidad entera  
en armonía con ésta y consigo mismos

---

---

Nuevamente a ti Jesús,  
Por TODO

A la memoria de mi madre  
quien siempre creyó en mí e hizo  
de mí gran parte de lo que ahora soy

A mi familia,  
mi papá y mis hermanos  
porque siempre me han apoyado  
e impulsado a seguir adelante

---

---

A mis sobrinos,  
Diana, Luis, Alejandro  
Georgina, Sebastián, Andrea  
Iván, Sandra, Daniela y Angélica  
para que nunca se detengan  
hasta alcanzar sus metas

A mis hermanos en la fe,  
especialmente a Margarita  
por su gran amistad

A Roch,  
por su apoyo y cariño,  
por su amistad siempre incondicional  
y por todo lo que me ha dado y hecho de mi  
Kocham ciebie

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

- A la clase trabajadora del pueblo de México, que con el pago de sus impuestos hicieron posible la realización de mis estudios
  - A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, por la beca otorgada para la realización de mis estudios
  - Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, por el financiamiento dado al proyecto Mx-AES-6 del cual forma parte este trabajo de tesis
  - A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, jefe del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM por su apoyo y motivación siempre incondicionales
  - A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ana Luisa Anaya, Dra. Conchita Toriello, Dra. Raquel Alatorre y Dra. Rachel Mata, por su apoyo y guía, porque de ellas aprendí no solo a hacer ciencia sino también una forma de ser mujer
  - A la Dra. Margarita Villegas Rios, Dra. Teresa Mier y al Dr. Francisco Espinosa por sus acertados comentarios que permitieron mejorar el presente trabajo
  - A mis compañeros del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, muy especialmente a Blanca, Rocío, Aurora, Tere y Tony cuyo apoyo y amistad hicieron más agradable mi trabajo
  - Al Dr. Jim Sims y a su asistente Sharon Midland, del Departamento de fitopatología de la Universidad de California, Riverside, por su apoyo y enseñanzas durante la fase química
  - A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización del presente trabajo
- 
-

# CONTENIDO

<b>1.- RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>2.- ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>3.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>4.- ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1 Los HONGOS</b> .....	<b>8</b>
<b>4.2 HONGOS E INSECTOS</b> .....	<b>9</b>
4.2.1 Los hongos entomopatógenos	
4.2.1.1 Desarrollo de la micosis en los insectos	
4.2.1.2 Papel de los compuestos químicos en la patogénesis del insecto	
<b>4.3 EL POTENCIAL DE LOS HONGOS COMO CONTROLADORES DE INSECTOS PLAGA</b> .....	<b>19</b>
4.3.1 Especificidad de los hongos hacia invertebrados	
4.3.2 Inocuidad de los hongos hacia vertebrados y plantas de importancia agrícola	
4.3.3 Virulencia	
4.3.4 Condiciones ambientales	
4.3.5 Factibilidad para la producción	
<b>4.4 LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS USADOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA</b> .....	<b>28</b>
4.4.1 Breve historia	
4.4.2 Situación actual de los hongos entomopatógenos utilizados como bioinsecticidas	
<b>4.5 MOSQUITA BLANCA</b> .....	<b>31</b>
4.5.1 El control de mosquita blanca y los hongos entomopatógenos	
<b>4.6.- BIBLIOGRAFÍA CITADA</b> .....	<b>35</b>
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
<b>5.1 ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM “EL EDEN” ECOLOGICAL RESERVE, QUINTANA ROO, MÉXICO</b> .....	<b>47</b>

<b>5.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS</b>	
FÚNGICOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO .....	58
<b>5.3 CONSIDERACIONES EN LA PLASTICIDAD MORFOLÓGICA DE <i>ACREMONIUM</i>, <i>LECANICILLIUM</i> Y <i>FUSARIUM</i> Y SU EFECTO EN SU CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA</b> .....	68
<b>5.4 POTENTIAL OF TWO SPECIES OF <i>FUSARIUM</i> AND <i>PAECILOMYCES MARQUANDII</i> (MITOSPORIC ASCOMYCETES) AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF THIRD-INSTAR NYMPHS OF THE WHITEFLY <i>TRIALEURODES VAPORARIORUM</i> (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)</b> .....	80
<b>5.5 FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SCHLECHT. ED322 Y <i>F. MONILIFORME</i> SHELDON ED29A UTILIZANDO COMO ORGANISMOS DE PRUEBA A LA PALOMILLA DE LOS APIARIOS (<i>GALLERIA MELLONELLA</i> LEPIDOPTERA: PYRALIDAE), EL ÁFIDO DEL MELÓN (<i>APHIS GOSSYPII</i> HOMOPTERA: APHIDIDAE) Y LA MOSQUITA BLANCA DE INVERNADERO (<i>TRIALEURODES VAPORARIORUM</i> HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)</b> .....	95
<b>5.6 FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE <i>PAECILOMYCES MARQUANDII</i> (MASSEE) S.J. HUGHES UTILIZANDO COMO ORGANISMOS DE PRUEBA A LA PALOMILLA DE LOS APIARIOS (<i>GALLERIA MELLONELLA</i> LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) Y A LA MOSQUITA BLANCA <i>TRIALEURODES VAPORARIORUM</i> (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)</b> .....	123
<b>6.- DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	137
<b>7.- CONCLUSIONES</b> .....	144
<b>8.- ANEXOS</b>	
<b>8.1 LA ZONA AGRÍCOLA ALEDAÑA A LA RESERVA ECOLÓGICA EL EDÉN</b> .....	146
<b>8.2 ENTREVISTA GENERAL PARA EL CONOCIMIENTO DE LAS PLAGAS EN LA ZONA AGRÍCOLA ALEDAÑA A LA RESERVA ECOLÓGICA EL EDÉN</b> .....	150
<b>8.3 MEDIOS PARA EL CULTIVO Y MONTAJE DE HONGOS</b> .....	152
<b>8.4 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS</b> .....	154
<b>8.5 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>Paecilomyces marquandii</i></b> .....	156
<b>8.6 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE ENZIMAS EN HONGOS</b> .....	157
<b>8.7 DIETA ARTIFICIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE UNA CRIA DE <i>Galleria mellonella</i> (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)</b> .....	161



---

---

**RESUMEN / ABSTRACT**

---

---

## 1. RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1. Aislar e identificar algunos hongos asociados a insectos de la selva mediana de la reserva ecológica El Edén, Quintana Roo, y de la zona agrícola aledaña a ésta; 2. Evaluar el potencial patogénico de alguno de estos hongos sobre insectos de importancia agrícola; y 3. Investigar si estos hongos producen, en medio de cultivo, algún metabolito tóxico a insectos. En la selva mediana, la compleja estructura de la comunidad es un factor determinante para mantener a las poblaciones de insectos por debajo de los umbrales de daño. Este control natural impide que se conviertan en plagas. En cambio en la zona agrícola, el ecosistema está altamente perturbado y por ello, la biodiversidad se ve significativamente disminuida; esto provoca la ausencia de los reguladores naturales de los insectos, lo que determina que algunas poblaciones de éstos se incrementen y se conviertan en plagas. Una de las más importantes en esta zona, resultó ser la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Se determinó que los estados anamórficos de algunos Ascomycetes fueron los mayoritariamente asociados a las poblaciones de insectos, principalmente del orden Homoptera. El género *Fusarium* sobresale sobre otros géneros de hongos, ya que fue aislado del 75% de los insectos colectados. La especie *F. oxysporum* resultó ser la más abundante. El aislamiento Ed322 de esta especie, el Ed29a de *F. moniliforme* y el Ed22 de *Paecilomyces marquandii*, mostraron el mayor potencial para ser evaluados como agentes de control biológico de la mosquita blanca de invernadero (*Trialeurodes vaporariorum*). De estas tres, *P. marquandii* fue la especie más virulenta ya que causó una mortalidad de 100% en este insecto en menos tiempo que las dos especies de *Fusarium*. En el presente trabajo, se puso en evidencia que *Paecilomyces marquandii* produce metabolitos tóxicos no proteicos en medio de cultivo, posiblemente involucrados en la patogenicidad de este hongo sobre el tercer estadio ninfal de esta especie de mosquita blanca y el cuarto estadio larval de la palomilla de los apiarios (*Galleria mellonella*). Los filtrados crudos de *F. oxysporum* y *F. moniliforme* lograron matar casi al 100% de las poblaciones de *G. mellonella* y *T. vaporariorum*. Sin embargo, después de la extracción orgánica, la mortalidad sobre *T. vaporariorum* y el áfido del melón (*Aphis gossypii*) disminuyó significativamente, lo que indica la necesidad de realizar estudios químicos más profundos. En estos tres hongos seleccionados se detectó la producción de enzimas de tipo proteasas, lipasas y quitinasas en medio de cultivo sólido, como se ha reportado para otros hongos entomopatógenos. Las especies de *Fusarium* evaluadas, mostraron grandes cambios morfológicos, dependiendo del manejo y condiciones de cultivo *in vitro*, lo que indica la importancia de realizar una minuciosa y correcta determinación taxonómica de las especies de este género en cualquier estudio sobre ellas. La presente investigación es una prueba más de la necesidad de conservar los ecosistemas naturales, ya que representan fuentes de recursos bióticos de gran valor y utilidad potencial.

---

## 2. ABSTRACT

The present study was performed in the ecological reserve El Eden, Quintana Roo, Mexico, and in an adjacent agricultural area. The main objectives of this were: 1. Isolate and identify some fungi associated with insects in the tropical forest of the reserve and in the agricultural zone. 2. Determine their pathogenicity on economically important insects, and 3. Investigate if the selected fungi produce, on culture, any toxic metabolite against insects. In the tropical forest the complex structure is a determinant factor to maintain insect populations below their damage threshold. This natural regulation avoid that they can become pests. On the other hand, in the agriculture zone, where natural conditions have been highly perturbed, there were numerous pest insects, due to the lack of natural predators. At the agricultural zone, the whitefly, *Bemisia tabaci* was one of the most important pests due to the production losses it causes in many crops. Anamorphic Ascomycetes were the fungi more isolated from the collected insects, especially in the Homoptera order. *Fusarium* spp. was the most outstanding genera since it was isolated from 75% of the collected insects, being the species *F. oxysporum* the most abundant. Isolate Ed322 of this species, Ed29a of *F. moniliforme* and Ed22 of *Paecilomyces marquandii* Hughes caused the highest mortality on the greenhouse white fly *Trialeurodes vaporariorum* while *P. marquandii* was the most virulent since it killed this host insect in less time than *Fusarium* species. We determined that *P. marquandii* produced non proteic toxic metabolites in culture media which could be involved in the pathogenicity of this fungus on third-instar nymphs of the greenhouse whitefly and fourth larval instar of wax moth (*Galleria mellonella*). The crude filtrates of *F. oxysporum* and *F. moniliforme* killed 100% of the test populations of *G. mellonella* and *T. vaporariorum*. However, after the bio-directed fractionation of the organic extract of blastospores of both fungi, the mortality on *T. vaporariorum* and on the melon aphid (*Aphis gossypii*) was decreased. These results make evident the importance of performing deeper chemical studies. The three fungal species studied produced proteases, lipases and chitinases on solid culture media as other entomopathogens. The culture conditions had a strong effect on the morphology of *Fusarium* species, pointing out the importance of a carefully and correct taxonomic characterization of this genus. The present investigation confirms the need to preserve natural ecosystems, since they are valuable sources of natural resources with a great value and profitable potential.

---

---

---

## INTRODUCCION

---

---

## LAS ÁREAS NATURALES COMO FUENTE DE RECURSOS

Los seres humanos, en su búsqueda hacia el desarrollo económico y el goce de las riquezas naturales, deben enfrentar el hecho de que los recursos naturales son limitados, y tienen una cierta capacidad de renovación que no puede rebasarse.

Uno de los instrumentos para conservar recursos naturales *in situ*, es el establecimiento y manejo de áreas naturales protegidas (ANP), entendidas como cualquier porción del territorio, ya sea terrestre o acuática, cuyas condiciones ambientales originales no han sido esencialmente alteradas por las actividades humanas, y en las que la protección y conservación de los recursos naturales y culturales, se considera de utilidad pública para beneficio de la calidad de vida de la población presente y futura (CNPPA, 1978).

Las ANP no son tierras ociosas, ni quedan aisladas de las actividades de desarrollo económico y social; por el contrario, se utilizan, entre otras cosas, para la conservación de actividades productivas, manteniendo las cuencas hidrológicas y la biodiversidad, para la recreación, la educación, la investigación y el desarrollo experimental.

La reserva ecológica El Edén es una de las primeras reservas privadas dedicadas a la investigación para la conservación biológica, se encuentra ubicada en la región noreste de la Península de Yucatán, y fue establecida en 1990. Con una extensión de 1492 ha, El Edén se localiza a los 21°13' N y 87°11' O a una altitud de 5 a 10 m, y a una distancia de 25 km al NNE de Leona Vicario, en el Municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo.

El Edén forma parte de la bio-región conocida como *Yalahau* (palabra Maya que significa: 'donde nace el agua') que abarca el extremo noreste de la Península de Yucatán. En este lugar se encuentran representados los principales ecosistemas de esta Península y del Caribe, incluidos los pastos marinos, manglares, dunas costeras, sabanas, selvas bajas y medianas entre otros. Los ambientes acuáticos de la región mantienen continuidad con los de Río Lagartos en Yucatán, y en conjunto constituyen un humedal considerado de gran importancia internacional. La porción continental de esta bio-región contiene más de 280,000 ha de asociaciones vegetales no fragmentadas. La zona, considerada como una de las de mayor diversidad biológica en la Península de Yucatán, contiene también el mayor número de endemismos. El

área es de suma importancia como sitio de hibernación para numerosas especies de aves migratorias. La región, rica en valores escénicos, eco-turísticos y arqueológicos, constituye una importante fuente de abastecimiento de agua y recursos forestales para el actual y futuro desarrollo de la entidad.

#### **LOS INSECTOS PLAGA: OPCIONES PARA SU CONTROL**

Los insectos son las formas más abundantes de vida animal sobre la tierra y se encuentran distribuidos en casi todas las partes del mundo (Ayala-Orduño, 1989; Miller y Miller 1986). El orden Insecta contiene casi un millón de especies (May, 2000) que comprenden aproximadamente el 67% de la flora y fauna descrita para todo el mundo. Los insectos son esenciales para el mantenimiento de muchos procesos ecológicos. Sin embargo, en su papel como herbívoros, pueden causar grandes daños a las plantas ya sea por consumo directo de de éstas o al transmitirles virus. A través de la historia, ciertos insectos herbívoros han llamado la atención al devastar periódicamente plantas de las cuales dependen las poblaciones humanas. En algunos casos, tales plagas han dejado marca en la historia. Estas interacciones son muy interesantes desde la perspectiva del conocimiento y preservación de la biósfera ya que las poblaciones de insectos pueden llegar a determinar la flora de un lugar (Altieri, 1992).

El termino plaga es un concepto creado por el hombre para referirse a cualquier organismo que perjudica su alimento, vivienda, vestido y salud. Las plagas sólo se encuentran en sistemas modificados por el hombre, como áreas urbanas, agro-ecosistemas, etc. La gran mayoría de los insectos no son perjudiciales, ya que se calcula que, sólo el 1% de todas las especies dañan de alguna manera lo que es útil para el hombre (Rodríguez del Bosque, 1992).

En la naturaleza no existen plagas, sólo consumidores que viven a expensas de productores. El análisis y comparación entre los ecosistemas naturales y los agro-ecosistemas es la base para explicar la presencia de plagas. La diferencia más obvia entre los dos sistemas es la estabilidad; mientras que los ecosistemas naturales son generalmente estables, los agro-ecosistemas son altamente inestables. Estos últimos dependen de energía externa para su sostenimiento (fertilizantes, irrigación, plaguicidas, etc.), mientras que, en general, los ecosistemas naturales son autosuficientes y autorregulables. Además, los agro-ecosistemas son sistemas simplificados con un número limitado de especies y por lo tanto contienen una baja variabilidad genética, lo

que los hace más susceptibles a la perturbación ambiental. Todos estos factores, individualmente o en conjunto, favorecen la inestabilidad de los agro-ecosistemas y los predispone al crecimiento incontrolado de plagas (Badii y colaboradores, 1997a).

A través de los siglos, el hombre en su constante búsqueda por controlar a los insectos plaga, ha desarrollado métodos para disminuir la densidad de población de éstos. Los objetivos del manejo y control de plagas de insectos están enfocados en la creación y mantenimiento de situaciones que impidan que estos animales causen problemas. Estos objetivos se pueden lograr evitando que se establezcan o diseminen los insectos, o bien, manteniendo las infestaciones a un nivel en que no provoquen daño. (Rodríguez del Bosque, 1992).

En la actualidad existe una gran cantidad de métodos para el control de insectos plaga. Dentro de los más empleados se encuentran el control mecánico y físico, el control cultural, el control legal, el control genético, el control químico y el control biológico. Cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas, por lo que se debe tener cuidado al seleccionarlos (Rodríguez del Bosque, A. 1992; Badii y colaboradores, 1997b).

Dadas las características de los compuestos químicos empleados para el control de insectos plaga (amplio espectro, acción letal rápida, larga vida en almacenaje, etc.) éstos han sido los más empleados en la agricultura. Sin embargo, han generado una serie de problemas que incluyen el desarrollo de resistencia, emergencia de nuevas plagas (debido a que se ha eliminado a los enemigos naturales), contaminación de los mantos acuíferos, disminución de la biodiversidad, riesgos para la salud humana y de los animales, entre otros. Debido a esto, se ha incrementado el interés en el manejo integrado de plagas. En el siglo XXI, la agricultura sustentable dependerá enormemente de alternativas para el manejo de plagas que sean ambientalmente seguras y que reduzcan el contacto humano con los plaguicidas químicos (Lacey y colaboradores, 2001).

Un sistema de control, que es altamente compatible con el manejo integrado de plagas es el control biológico, que hace referencia a la regulación de las poblaciones de plagas por medio de enemigos naturales, tales como parásitos, depredadores y patógenos (NAS, 1985).

De acuerdo con Huffaker (1985, citado por Barrera, 1997), la premisa del control biológico descansa en que bajo ciertas circunstancias, muchas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales. Este efecto se origina de la interacción de ambas poblaciones (plaga y enemigo natural), lo cual implica una supresión de tipo denso-dependiente, que se traduce en el mantenimiento de ambas poblaciones en equilibrio. Bajo este contexto, la conservación está directamente relacionada con el control biológico (Van Driesche y Bellows 1996a).

Existen varios ejemplos en los cuales los ecosistemas naturales han proporcionado al hombre de enemigos naturales potenciales para el control de plagas, un ejemplo de esto lo constituye el trabajo realizado por Ellison y Evans (1996), investigadores del National Institute of Biological Control, que consistió en una expedición al Amazonas Ecuatoriano para investigar a los hongos involucrados en el control natural de algunas plagas. Estos investigadores encontraron un gran número de hongos entomopatógenos afectando a insectos plaga, entre los que destacan varias especies del género *Cordyceps*, aisladas de la langosta de la selva (*Schistocerca* sp.), chapulines y hormigas del género *Componotus*. Otro hongo que se aisló en el 80% de las moscas blancas colectadas en la selva de Cuyabeno fue *Aschersonia* sp. Estos hongos están siendo evaluados como controladores potenciales de la langosta africana y mosquita blanca de invernadero.

El informe anual (1994) del Proyecto de Cooperación Regional S-240, realizado por investigadores de varios países, reporta el aislamiento de entomopatógenos de todo tipo, principalmente hongos, nematodos, bacterias y virus, a partir de colectas de insectos realizadas en ecosistemas naturales. Durante los 29 años que lleva el proyecto se han aislado, identificado y caracterizado a los entomopatógenos encontrados; además se han realizado pruebas de patogenicidad en organismos prueba y determinado dosis, especificidad y virulencia; se han realizado liberaciones de los organismos aislados y se ha monitoreado su actividad sobre las plagas tanto en ambientes naturales como agrícolas. Con estos datos, se han podido desarrollar modelos de simulación de epizootias. Durante la última etapa del proyecto se desarrollaron formulaciones y sistemas de liberación para los entomopatógenos, se condujeron experimentos de campo para determinar su eficacia, se evaluó su compatibilidad con las prácticas de producción y se establecieron criterios de decisión para su uso en sistemas de manejo de plagas.



Lo anterior demuestra que la biodiversidad promueve la presencia de enemigos naturales de plagas, y que, por lo tanto, la conservación de áreas naturales es primordial ya que éstas son fuente potencial para el descubrimiento de nuevos organismos que puedan ser utilizados en el control biológico de insectos plaga (Caltagirone y colaboradores, 1988; Palm y Chapela, 1997; Van Driesche y Bellows, 1996b). Por otro lado nos muestra también que el descubrimiento de estos organismos no es más que la fase inicial del trabajo, el cual requiere de muchos años de estudio e investigación.

A pesar de que más de 500 especies de hongos están regularmente asociadas con insectos y algunos de ellos causan serias enfermedades en éstos, aún son muy pocos los que han sido usados comercialmente como agentes de control biológico (Tamez-Guerra y colaboradores, 2001). La principal razón es que la infección ocurre principalmente a través de la cutícula del insecto y no a través del aparato digestivo, así que está marcadamente influenciada por las condiciones ambientales.

Se han realizado estudios para conocer a fondo los mecanismos de patogénesis de estos hongos sobre los insectos, con el fin de evaluar el efecto y el potencial de utilización de las toxinas o enzimas, algunas veces involucradas en la patogenicidad, como bio-insecticidas (Rojas, 1982; Gupta y colaboradores, 1991, 1995).

Por todo lo mencionado anteriormente y considerando que, las áreas naturales protegidas constituyen una fuente muy basta de recursos bióticos y de interacciones entre organismos; que los insectos son el grupo más diverso sobre la tierra, y que los hongos constituyen uno de los grupos biológicos que, dadas sus características nutricionales, establecen un gran número de interacciones con otros organismos, se pensó que en la Reserva Ecológica El Edén y una zona agrícola aledaña a la misma, podían existir hongos entomopatógenos que, ya sea ellos mismos o sus toxinas, tuvieran potencial para ser empleados como alternativa para el control biológico de insectos plaga. Para determinar esto, se plantearon tres hipótesis:

H<sub>1</sub>: En la selva mediana de la reserva ecológica El Edén y una zona agrícola aledaña a ésta, existen especies de hongos que son patógenos de insectos.

H<sub>2</sub>: Al menos uno de estos hongos tendrá potencial patogénico contra insectos de importancia agrícola.

H<sub>3</sub>: Los hongos que causen mortalidades mayores al 80% en los insectos prueba, producirán metabolitos tóxicos al ser cultivados *in vitro*

Con estas hipótesis en mente, surgió el presente proyecto cuyos objetivos generales fueron:

1. Aislar e identificar hongos asociados a insectos en la selva mediana de la reserva ecológica El Edén, Quintana Roo, y una zona agrícola aledaña a la misma
2. Evaluar el potencial patogénico de algunos de estos hongos sobre insectos de importancia agrícola
3. Investigar si estos hongos producen, en medio de cultivo, algún metabolito tóxico para los insectos

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

- 1).- Colectar insectos plaga en dos comunidades vegetales: selva mediana y zona agrícola.
- 2).- Aislar e identificar las especies de hongos que se encuentren causando enfermedad a los insectos colectados.
- 3).- Cultivar aquellos hongos que por el tipo de interacción que establecen con el hospedante, o por estar reportados como entomopatógenos, puedan ser considerados como agentes potenciales para el control biológico.
- 4).- Seleccionar las cepas patogénicas y realizar pruebas de virulencia sobre insectos de importancia agrícola.
- 5).- Realizar el fraccionamiento químico bio-dirigido preliminar de los filtrados y blastosporas de las cepas que hayan mostrado bioactividad relevante
- 6).- Evaluar, el potencial insecticida de algunos extractos aislados de las cepas seleccionadas durante los bioensayos sobre los insectos de prueba.
- 7).- Contribuir al conocimiento de la diversidad fúngica de esta reserva así como al de las relaciones hongo-insecto.

Dichas hipótesis se pusieron a prueba durante la fase experimental del presente trabajo la cual está conformada por 6 capítulos. El Capítulo 5.1 presenta los resultados del trabajo de campo y el aislamiento de los hongos asociados a los insectos, tanto en la selva como en la zona agrícola aledaña a la reserva. Por medio de éste, se pudo comprobar que, como se esperaba, en ambas zonas existen hongos causando enfermedad en algunos insectos. Se presentan además en este capítulo, las pruebas generales de patogenicidad sobre el tercer estadio ninfal de la mosquita blanca de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* West.

El Capítulo 5.2 contiene la descripción taxonómica de los aislamientos fúngicos más representativos y el Capítulo 5.3 algunas consideraciones sobre la morfología de *Fusarium* que hicieron que, primero lo clasificáramos dentro del género *Acremonium*, y después como *Verticillium*. Esto nos llevó a requerir el apoyo del Dr. Walter Gams quien realizó la determinación correcta del hongo como el género *Fusarium*.

El Capítulo 5.4 presenta el estudio sobre la determinación de la patogenicidad, expresada como porcentaje de mortalidad, dosis letal media y tiempo letal medio ( $LD_{50}$  y  $TL_{50}$ , respectivamente) de los aislados Ed22 de *Paecilomyces marquandii*, Ed 29a de *Fusarium moniliforme* y Ed322 de *F. oxysporum*, sobre el tercer estadio ninfal de la mosquita blanca de invernadero. El primero obtenido de un insecto colectado en la selva, y los dos últimos obtenidos de insectos colectados en la zona agrícola. Dichos aislados presentaron las características más viables para ser considerados como agentes de control biológico y corroboraron la segunda hipótesis planteada.

El trabajo realizado durante fraccionamiento químico biodirigido de las dos especies de *Fusarium* se presenta en el Capítulo 5.5 y en el Capítulo 5.6 el de *P. marquandii*. Los organismos prueba en ambos casos fueron la palomilla de los apiarios (*Galleria mellonella* L.), el áfido del melón (*Aphis gossypii*) y la mosquita blanca de invernadero. Ambos trabajos nos permitieron corroborar la hipótesis de que estos hongos, al causar mortalidades superiores al 80% en los organismos prueba, producirían algún tipo de metabolito tóxico al ser cultivados en medio de cultivo, lo cual resultó cierto.

---

---

## **4. ANTECEDENTES**

---

---

#### 4.1 LOS HONGOS

Los hongos son los agentes causales de gran parte de la desintegración de la materia orgánica que se encuentra a nuestro alrededor, esto los coloca en un lugar importante dentro de los ecosistemas y particularmente dentro de las cadenas tróficas y los ciclos biogeoquímicos. Junto con las bacterias, se han ocupado, a lo largo de millones de años, del reciclaje de muchos elementos químicos importantes que, si no fuera por su actividad, se habrían quedado bloqueados en la materia orgánica muerta. Pueden además destruir alimentos, tejidos, cuero y otros bienes de consumo fabricados o manufacturados a partir de materias primas susceptibles. (Herrera y Ulloa 1990).

Constituyen también, la base de muchos procesos industriales en los que interviene la fermentación, por ejemplo la del cacao y la elaboración de ciertos quesos. Son empleados en la producción comercial de muchos ácidos orgánicos, de algunas drogas (ergometina y cortisona) y de algunos preparados de vitaminas, y son responsables de la fabricación de antibióticos entre los que destacan la penicilina y la griseofulvina (Herrera y Ulloa 1990).

Son responsables de causar enfermedades en plantas, en animales y el hombre. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Sin embargo, más de 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas, causando daños que se estiman en centenas de millones de pesos (Agrios, 1991).

En cuanto a su papel como simbioses, las interacciones que los hongos establecen con otros organismos resultan de vital importancia, tal es el caso de las micorrizas, que ayudan a las plantas a absorber nutrimentos del suelo, particularmente fósforo, y agua, incrementando de este modo la productividad de los cultivos; además, las micorrizas pueden proteger a las plantas contra patógenos y muchos otros factores de estrés.

Finalmente, no podemos olvidar el papel de los hongos en la alimentación humana, ya que constituyen una fuente alternativa de nutrimentos. Indudablemente, muchos hongos han contribuido al bienestar de los seres humanos; algunos ya son conocidos pero muchos otros están aun por descubrirse (Alexopoulos y Mims, 1985).

## **4.2 HONGOS E INSECTOS**

Existen muchos tipos de asociaciones entre hongos e insectos que pueden ir desde el inquilinismo hasta el parasitismo obligado. Algunos insectos, especialmente representantes de los pequeños dípteros como los Sciaridae y Micetophilidae, se alimentan de hongos y tejidos vegetales invadidos por éstos. Muchas especies de escarabajos de la madera (Scolytidae) y otros miembros de los Siricidae cargan estructuras fúngicas o esporas en bolsas especializadas (micetangios, etc.). Éstos, son generalmente simbioses y proveen de alimento o hábitat para el crecimiento y desarrollo a sus insectos acarreadores. Algunos hongos levaduriformes o formas altamente especializadas como los Trichomycetes, ocupan el tracto digestivo de algunos insectos. Otros como los Laboulbeniales, están adaptados para sobrevivir en su cutícula (Murrin, 1996). Y otros, como algunas especies de hormigas, termitas y escarabajos, cultivan hongos como alimento (Mueller y Gerardo, 2002). Existen también hongos patógenos que dañan en algún grado a su hospedero y pueden atacar tanto insectos terrestres como acuáticos (Poinar y Thomas, 1984).

### **4.2.1 Los hongos entomopatógenos**

Estos hongos infectan a una gran diversidad de órdenes de insectos. Roberts y Yendol (1971), señalan que las enfermedades fúngicas son más comunes en ciertos grupos taxonómicos como Lepidoptera (mariposas y palomillas) cuyo estado susceptible es la larva; Homoptera (pulgones, chicharritas y escamas); Hymenoptera (abejas); Diptera (moscas y mosquitos) y Coleoptera (escarabajos barrenadores), entre otros.

Así por ejemplo, tenemos que algunos hongos infectan a los insectos en etapas particulares de su ciclo de vida, ya sea a los huevos, larvas, pupas o adultos; otros parasitan dos o más estadios biológicos de su hospedero. Sin embargo, las dosis

letales de un hongo son diferentes en las distintas etapas de desarrollo del insecto, lo que demuestra que, por un lado, el hongo es más virulento para ciertos estados biológicos del insecto y, por otro, que el insecto es más sensible en ciertas etapas de su crecimiento, mientras que en otras, se muestra más resistente a las infecciones. En general se ha encontrado que en insectos de ciclo biológico corto, las larvas de los primeros estadios son más sensibles a infecciones que los más avanzados, y en insectos de ciclo biológico largo, son los últimos estadios los más sensibles, aunque existen algunas excepciones (Gardner y Noblet, 1978).

La especificidad hacia el hospedero varía considerablemente, algunos hongos entomopatógenos infectan un amplio rango de hospederos mientras que otros están restringidos a pocas o a una sola especie (Shah y Pell, 2003). Dentro de los que afectan a un amplio rango de hospederos se encuentran una gran variedad de patotipos. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin infectan más de 100 diferentes especies de insectos de varios órdenes, pero los aislamientos de estos dos hongos tienen un alto grado de especificidad asociada con el estado fisiológico del hospedero, las propiedades del integumento del insecto y/o con los requerimientos nutricionales del hongo.

Se han reportado un gran número de hongos y algunos fungoides entomopatógenos; a continuación se presenta una lista de los principales géneros que se asocian con los insectos (Humber, 1998).

#### CHYTRIDIOMYCETES Y OOMYCETES

GÉNERO	HOSPEDEROS MAS FRECUENTES	PRINCIPALES ESPECIES FÚNGICAS
<i>Coelomomyces</i> Keilin	Mosquitos	<i>C. dodgei</i> Couch <i>C. indicus</i> Iyengar <i>C. psorophorae</i> Couch
<i>Myiophagus</i> Thaxter	Escamas Gorgojos y Lepidópteros	<i>M. ucrainicus</i> Thaxt. ex Sparrow
<i>Lagenidium</i> Schenk	Mosquitos	<i>L. giganteum</i> Couch

## ZYGOMYCETES, ENTOMOPHTHORALES

GÉNERO	HOSPEDEROS MAS FRECUENTES	PRINCIPALES ESPECIES FÚNGICAS
<i>Batkoa</i> Humber	Homópteros, Dípteros Diversos insectos	<i>B. apiculata</i> Humber <i>B. major</i> Humber
<i>Conidiobolus</i> Breyfeld	Áfidos y diversos insectos	<i>C. coronatus</i> Batko <i>C. obscurus</i> Remaud. & S. Keller <i>C. thromboides</i> Drechsler <i>E. aulicae</i> Humber
<i>Entomophaga</i> Batko	Lepidópteros y Ortópteros	<i>E. maimaga</i> Humber, Shimazu & R.S. Soper <i>E. grylli</i> Batko
<i>Entomophthora</i> Fresenius	Dípteros y áfidos	<i>E. culicis</i> Fresen. <i>E. muscae</i> Fresen. <i>E. planchoniana</i> Cornu
<i>Erynia</i> Nowak.	Dípteros Lepidópteros	<i>E. aquatica</i> Remaud. & Henn. <i>E. conica</i> Remaud. & Henn. <i>E. ovispora</i> Remaud. & Henn. <i>E. rhizospora</i> Remaud. & Henn.
<i>Furia</i> (Batko) Humber	Dípteros Lepidópteros	<i>F. americana</i> Humber <i>F. virescens</i> Humber
<i>Massospora</i> Peck	Cicadas	<i>M. cicadina</i> Peck
<i>Neozygites</i> Witlac.	Áfidos Trips Tetrácidos	<i>N. floridana</i> Remaud. & Keller <i>N. fresneii</i> Remaud. & Keller <i>N. parvispora</i> Remaud. & Keller
<i>Pandora</i> Humber	Lepidópteros Homóptera: Delphacidae, Áfidos	<i>P. blunckii</i> Humber <i>P. delphacis</i> Humber <i>P. neoaphidis</i> Humber
<i>Zoophthora</i> Batko	Áfidos Coleóptera: Curculionidae	<i>Z. phalloides</i> Batko <i>Z. phytonomi</i> Batko <i>Z. radicans</i> Batko

## ASCOMYCETES MITOSPÓRICOS

ESTADO CONIDIAL	ESTADO SEXUAL	HOSPEDEROS MAS FRECUENTES	PRINCIPALES ESPECIES FÚNGICAS
<i>Aschersonia</i> Mont.	<i>Hypocrella</i> Sacc.	Cóccidos y Aleyrodidos	<i>A. aleyrodidis</i> Webber
<i>Beauveria</i> Vuillemin	<i>Cordyceps</i> (Fries) Link	Coleópteros, Lepidópteros Himenópteros Homópteros	<i>B. bassiana</i> Vuill. <i>B. brongniartii</i> (Sacc.) Petch <i>B. amorpha</i> Evans
<i>Fusarium</i> Link.	<i>Nectria</i> Fries <i>Gibberella</i> Sacc.	Escamas y otros	Diversas
<i>Gibellula</i> Cavara	<i>Torrubiella</i> Boudier	Arañas	<i>G. pulcra</i> Cav. <i>G. leiopus</i> Cav.
<i>Hirsutella</i> Patouil	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i>	Gran diversidad de insectos	<i>H. citrifomis</i> Speare <i>H. rhossiliensis</i> Mister & Brady <i>H. thompsonii</i> Fisher
<i>Hymenostilbe</i> Petch	<i>Cordyceps</i>	Gran diversidad de insectos	<i>H. dipterigena</i> Petch
<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>Cordyceps</i>	Gran diversidad de insectos	<i>M. anisopliae</i> (Mets.) Sorokin <i>M. flovoviride</i> Gams & Rozsypal
<i>Nomuraea</i> Maunblanc	<i>Cordyceps</i>	(Lepidópteros: Noctidae) Arañas	<i>N. rileyi</i> (Farl.) Samson <i>N. atypicola</i> Samson
<i>Paecilomyces</i> Samson	<i>Byssochlamys</i> Westling	Homópteros Nemátodos	<i>P. farinosus</i> (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm. <i>P. fumosorozeus</i> (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm. <i>P. lilacinus</i> (Thom) Samson
<i>Tolypocladium</i> Gams	<i>Cordyceps</i>	Pequeños dípteros	<i>T. cylindrosporum</i> Gams <i>T. extinguens</i> Samson & Soares
<i>Lecanicillium</i> Gams (= <i>Verticillium</i> )	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i>	Escamas, áfidos y otros insectos	<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams <i>L. fusisporum</i> (W. Gams) Zare & W. Gams



#### 4.2.1.1 Desarrollo de la micosis en los insectos

Una infección exitosa sobre el hospedero por un microorganismo, depende de las propiedades y características que poseen ambos organismos. Debido a que las propiedades patogénicas del microorganismo se confrontan contra las propiedades de resistencia del insecto, las bases de la infección son difíciles de determinar. Los factores medioambientales también afectan incrementando o reduciendo las posibilidades de infección (Tanada y Kaya, 1993a).

El desarrollo de las enfermedades causadas por hongos, conocidas como micosis, pueden dividirse en las siguientes tres fases: 1) adhesión y germinación de la espora sobre la cutícula del insecto; 2) penetración dentro del hemocele y 3) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto.

La ADHESIÓN de las esporas es un mecanismo pasivo favorecido por la presencia de un material mucilaginoso y/o ornamentaciones presentes en la superficie de las esporas. Los conidios de Entomophthorales, por ejemplo *Entomophthora muscae*, están cubiertos con un mucílago mientras que los de algunos Ascomycetes mitospóricos como *Lecanicillium lecanii* e *Hirsutella thompsonii* son pegajosos y se adhieren a cualquier sustrato, incluyendo la cutícula. Los conidios secos de otros hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizum*, pueden poseer microfibrillas (rodlets) hidrofóbicas que les evitan la desecación y les ayudan en su dispersión por las corrientes de aire. Además, estos conidios se unen a la cutícula del insecto por la hidrofobicidad de ésta y las setas (pelos tiesos o cerdas) (Shah y Pell, 2003).

En algunos casos la adhesión de las esporas está relacionada con la virulencia o especificidad de los hongos a su hospedero. Existen hongos donde el proceso de adhesión es no específico mientras que en otros sí lo es. Fuerzas electrostáticas e interacciones moleculares están involucradas en la adhesión. En las superficies de las esporas se han encontrado hemaglutininas, glucosa y N-acetilglucosamina. Estas sustancias se encuentran en el mucílago de algunos hongos y estructuras superficiales asociadas a las esporas. El reconocimiento del hospedero por el hongo está regulado en parte, por las propiedades fisicoquímicas de la epicutícula del insecto. Algunas glicoproteínas pueden servir como receptores específicos de las esporas, tal como se

ha comprobado en la interacción *Lagenidium giganteum* y *Coelomomyces psorophorae*. La superficie de la larva del gusano soldado del maíz *Pseudaletia unipuncta*, posee nutrimentos, principalmente aminoácidos que permiten la germinación y crecimiento de *Beauveria bassiana*. Rath y colaboradores (1996) mencionan además la existencia de antígenos de superficie presentes en las esporas de *Metarhizium anisopliae*, los cuales ayudan en el reconocimiento patógeno-hospedero y son, entre otros, determinantes en la especificidad del hongo hacia su hospedero.

La GERMINACIÓN de las esporas depende en gran medida de la humedad ambiental y de la temperatura, y en menor grado, de las condiciones de luz y de los nutrimentos. La espora germina y forma un tubo germinal que penetra al hospedero. El tubo germinal funciona como gancho de penetración; en algunos casos puede producirse también un apresorio. Madelin y colaboradores (1967) fueron los primeros en observar estructuras parecidas a apesorios en cultivos *in vitro* de *B. bassiana*. Ellos consideran que en la penetración del hongo al insecto, existe la formación de apesorios como en el caso de los patógenos de plantas. Esto ha sido confirmado posteriormente por varios estudios; Nadeau y colaboradores (1996) observaron la formación de apesorios y el desarrollo de puntos de penetración en el 79% de las esporas germinadas de *Erynia conica* a las 9 h de inoculación sobre *Simullium rostratum* (Díptera: Simullidae). Butt y colaboradores (1995) también observaron la formación de apesorios durante la penetración de áfidos por *Metarhizium anisopliae*, sin embargo, ellos determinaron que la formación de apesorios se ve influenciada por la composición de la cutícula del insecto, ya que al aplicar este mismo hongo sobre escarabajos no observaron la formación de apesorios aunque si hubo una penetración directa. Ellos concluyen que la composición de lípidos en la cutícula es un factor determinante para la formación de apesorios y el modo de penetración.

El hongo PENETRA al interior del insecto, principalmente, a través de las áreas intersegmentales, aunque también puede penetrar por el tracto digestivo, la tráquea o a través de heridas (St. Leger, 1993). Cuando penetran por los espiráculos les ocasionan un bloqueo respiratorio. Los hongos entomopatógenos que penetran a su hospedero vía cutícula, utilizan tanto procesos enzimáticos como mecánicos. La fuerza mecánica puede ser observada en la punta de la hifa invasora donde las capas cuticulares del insecto se observan distorsionadas por la presión (Samson y colaboradores, 1988).

Giard, (citado por Madelin, 1963), al estudiar el parasitismo de *B. bassiana* sobre algunos escarabajos, fue el primero en mencionar que la cutícula es penetrada con la ayuda de una enzima secretada por el ápice de las hifas durante el proceso de penetración. Samuels y Paterson (1995) mencionan que *Metarhizium anisopliae* produce una mezcla de proteasas para penetrar la cutícula de *Manduca sexta*. St. Leger y colaboradores (1996) investigaron el número y tipo de enzimas quitinolíticas producidas por *M. anisopliae*, *M. flovorivide* y *Beauveria bassiana*, encontrando que cada especie produjo una variedad de N-acetil-beta-D-glucosaminidasas y endoquitinasas.

Samsinakova y colaboradores (1971), evaluaron la acción del sistema enzimático de *B. bassiana* sobre la cutícula de larvas de la palomilla de los apiarios *G. mellonella*, y sugirieron que la secreción de las enzimas lipasa, proteasa y quitinasa facilitan la penetración del hongo a través de la cutícula del insecto infestado. Estos investigadores aplicaron enzimas comerciales en forma individual, obteniendo como resultado la desintegración de lípidos, proteínas o quitina, según la enzima específica; sin embargo, cuando se aplicó una mezcla de enzimas, ésta causó la desintegración total del integumento. Con base en esto, se señala que las lipasas y proteasas son las primeras que actúan, en tanto que la quitinasa actúa al final (Pearson y colaboradores 1984; Bidochka y Khachatourians, 1987).

Resumiendo, podemos decir que las enzimas detectadas en hongos con potencial entomopatógeno son proteasas, quitinasas, fosfolipasas, lipasas, esterasas, fosfatasas y enzimas productoras de metabolitos secundarios. Estudios *in vitro* indican que la digestión del integumento sigue un proceso de digestión secuencial, lipasa-proteasa-quitinasa. Las proteasas son las enzimas degradadoras de cutícula y su actividad parece preceder a la de las quitinasas. Las razas virulentas producen grandes cantidades de enzimas extracelulares, por ejemplo lipasas, elastasas, proteasas y  $\alpha$ -glucanasas. Freimoser y colaboradores (2005) reportan que las proteasas constituyen el 36% de las enzimas encontradas en *Metarhizium anisopliae* *fs. anisopliae* entre las que se encuentran tripsinasas, quimotripsinasas, metaloproteasas, aspartil proteasas, aminopeptidasas, X-pro-dipeptil aminopeptidasas y carboxipeptidasas, en ningún otro hongo se ha encontrado tanta diversidad de estas enzimas.

Las enzimas no sólo son importantes en el momento de la penetración al hospedero, St. Leger (1995) menciona que después de la solubilización de la cutícula viene la completa degradación de la misma, la cual involucra varios tipos de enzimas entre las que se incluyen proteinasas, semejantes a la tripsina, metaloproteinasas, varias aminopeptidasas y una carboxipeptidasa. Posteriormente, las exopeptidasas degradan los péptidos liberados por las endopeptidasas produciendo aminoácidos libres que son consumidos y metabolizados por el hongo. Asimismo, las proteasas degradadoras de cutícula liberan monómeros que pueden ser metabolizados por el tubo germinal para continuar su crecimiento dentro del integumento.

El éxito en la germinación y penetración no depende necesariamente del porcentaje de germinación, sino de la duración de la germinación, el modo de germinación y la agresividad del hongo, el tipo de espora fúngica y la susceptibilidad del hospedero, además de las propiedades del insecto como cutícula, su grosor, su esclerotización y la presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas (Tanada y Kaya, 1993b).

Un hongo patógeno se MULTIPLICA después de invadir a un insecto, el curso de la infección puede dividirse en tres periodos: a) incubación, que es el periodo entre la entrada del patógeno dentro del cuerpo del insecto hasta el desarrollo de signos y síntomas. b) El establecimiento de la enfermedad, durante la cual los microorganismos son más activos, las lesiones causadas son mayores y más extensas, los signos y síntomas se vuelven más severos y si se producen toxinas, éstas se presentan en mayores cantidades, y, c) la fase de terminación de la enfermedad involucra la recuperación del insecto debido a su respuesta inmune o la muerte del mismo. En casos donde el patógeno tiene baja virulencia, el insecto puede sufrir una infección crónica, sobrevivir y reproducirse (Tanada y Kaya. 1993<sup>a</sup>).

Cuando una espora ha germinado y su hifa ha penetrado a través del integumento del insecto, entra al hemocele donde produce cuerpos hifales parecidos a levaduras, esencialmente blastosporas, que se multiplican por gemación. Además, se desarrollan ovillos hifales y protoplastos carentes de pared. La dispersión a través del hemocele y la invasión de tejidos varía con la especie de hongo. Algunas especies de

hongos pueden formar tanto cuerpos hifales como protoplastos dependiendo del ambiente nutricional.

Posteriormente, si el hongo logra evadir los mecanismos de defensa del insecto, sobreviene la muerte de éste. El hongo crece entonces como saprobio en el hemocele y forma masas miceliales que se convierten en un duro esclerocio. Las estructuras reproductivas del hongo se producen entonces a partir del esclerocio o esporóforos, que pueden ser esporangióforos o conidios dependiendo de la especie fúngica. Si existen condiciones favorables, especialmente de temperatura y humedad, los esporóforos e hifas estériles emergen del cadáver para formar el crecimiento micelial característico en el integumento del insecto. El crecimiento se inicia y ocurre predominantemente en las regiones intersegmentales del hospedero. La esporulación ocurre principalmente en los cadáveres, pero puede también ocurrir en insectos vivos. Bajo condiciones desfavorables algunos hongos producen estructuras de resistencia.

Pendland y colaboradores (1995) reportan que durante el proceso de patogénesis de *Paecilomyces farinosus* sobre larvas de *Spodoptera exigua*, una vez que el hongo penetra en la cavidad corporal del insecto, las blastosporas son digeridas por hemocitos fagocíticos y no se observan células fúngicas sino hasta después de 36 horas post-inyección. Los cuerpos hifales generados de las blastosporas son reconocidos por los hemocitos e inducen la formación de nódulos hemocíticos multicelulares, pero ni la fagocitosis ni la formación de nódulos alrededor de los cuerpos hifales son capaces de detener el crecimiento fúngico. A las 72 h post-inyección se puede observar micelio emergiendo de los nódulos y a las 96 horas la larva empieza a ser momificada debido a la proliferación excesiva del hongo en los tejidos del hospedero.

Finalmente, ocurre la DISPERSIÓN de las esporas, la cual puede ser pasiva o activa dependiendo de las características del esporóforo y de las esporas. Algunos hongos forman conidios en estructuras mucilaginosas y se pegan a otro insecto o invertebrado para su dispersión. Las esporas de muchos hongos entomopatógenos son fuertemente dispersadas desde los esporóforos y acarreadas por el viento. Muchos esporóforos son fototróficos positivos y geotróficos negativos así que las esporas son producidas al aire libre.

Algunos hongos son patógenos obligados y no pueden completar su ciclo de vida fuera de insectos vivos. Sin embargo, la mayoría de los hongos entomopatógenos son facultativos, capaces de completar su ciclo sin un insecto hospedero. Algunos son más virulentos y matan al insecto en pocos días, otros producen infecciones crónicas o prolongadas (Tanada y Kaya, 1993b).

#### **4.2.1.2 Papel de los compuestos químicos en la patogénesis del insecto**

Una enfermedad puede ser más severa como consecuencia de las sustancias tóxicas producidas por el patógeno, por la destrucción mecánica de las células y tejidos, y/o por la combinación de estos dos efectos. Existen dos tipos de toxinas producidas por organismos entomopatógenos, las sustancias anabólicas y las catabólicas. Las toxinas catabólicas resultan de la descomposición de los tejidos del hospedero ó por la actividad del patógeno. Ellas se producen al ser degradado un sustrato o por la descomposición misma del patógeno. Por ejemplo el rompimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos por el patógeno puede producir alcoholes, ácidos, mercaptanos, alcaloides u otros compuestos tóxicos (Tanada y Kaya. 1993a).

Las toxinas anabólicas son sustancias que son sintetizadas por el patógeno. Estas pueden ser clasificadas en exotoxinas y endotoxinas. Las exotoxinas son toxinas solubles excretadas de las células del patógeno y han sido detectadas especialmente entre las bacterias y hongos (Tanada y Kaya. 1993a)

Las endotoxinas, producidas por el patógeno, son confinadas en la célula y liberadas cuando el patógeno muere o degenera, o como en el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, cuando esta esporula y la pared esporangial se desintegra. La endotoxina más ampliamente estudiada de un entomopatógeno es la  $\delta$ -endotoxina (endotoxina cristalina) de *Bacillus thuringiensis* (Tanada y Kaya. 1993a).

Los hongos sintetizan toxinas tanto en el hemocele del insecto como cuando se desarrollan en medios líquidos. Las especies de hongos entomopatógenos más estudiadas son *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Otras, menos estudiadas pero igualmente importantes por su importancia comercial son *L. lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Hirsutella* spp. (Vey y colaboradores, 2001).

La beauvericina es un hexadepsipéptido aislado de varias especies de *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Fusarium*, es estructural y funcionalmente similar a las eniantinas A, B y C, compuestos que dañan las membranas celulares. La beauvericina forma complejos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> que incrementan la permeabilidad de las membranas. Además, tiene un moderado efecto insecticida (Vey y colaboradores, 2001).

Gupta y colaboradores (1991, 1995) realizaron ensayos con las beauvericinas A y B sobre larvas del mosquito *Aedes aegypti* evaluando su toxicidad contra éstas. Ellos encontraron que la concentración letal media (LC<sub>50</sub> por sus siglas en ingles) fue de 26 ppm de beauvericina A y de 31 ppm para la beauvericina B. Rojas (1982) evaluó el efecto de la ingestión de toxinas producidas por *B. bassiana* sobre la mortalidad de adultos y larvas de la pulga saltona de la papa *Epitrix* sp. La máxima mortalidad de adultos alimentados con hojas de papa tratadas con solución de toxinas se observó a los 4 días; las larvas alimentadas con raicillas con toxina murieron a los dos días.

Otra toxina secretada por *B. bassiana* es el ciclo-octadepsipéptido llamado basianolido. Esta indujo inmovilidad en la larva del gusano de seda alimentada con dieta artificial a baja concentración pero fue letal a dosis de 13 ppm (Suzuki y colaboradores, 1977). Otras toxinas producidas por especies de *Beauveria* son los beauveriolidos y bauverolidos, además de basianina y tenellina, de las cuales existe muy poca información (Vey y colaboradores, 2001).

Las destruxinas, de las cuales existen más de 27 tipos (Vey y colaboradores, 2001), han sido aisladas de *Metarrhizium anisopliae*. Son depsipéptidos producidos tanto *in vivo* como *in vitro* y son determinantes de la patogenicidad del hongo sobre un amplio rango de insectos, entre los que destacan Lepidópteros y Dípteros. El efecto de estas toxinas en la hemolinfa de los insectos consiste en la reducción del movimiento de los componentes de la misma, lo que impide la rápida formación de granulocitos y permite la multiplicación del hongo dentro del hemocele. (Brousseau y colaboradores, 1996; Kaijank y Roberts, 1986). Otro grupo de toxinas aislado de este hongo son las citocalacinas (tres diferentes) que además causan parálisis al insecto.

---

La oosporeina, es un pigmento rojo producido por un gran número de hongos del suelo y por *Beauveria* spp. La oosporeina reacciona con las proteínas y los aminoácidos alterando los grupos SH y provocando el malfuncionamiento de las enzimas (Vey y colaboradores, 2001). Strasser y colaboradores (2000) determinaron que la oosporeina es el metabolito secundario mayoritariamente encontrado en razas comerciales de *Beauveria brogniartii*.

*Hirsutella thompsonii* produce una proteína extracelular con propiedades insecticidas, la hirsutelina A, que ha sido purificada de los filtrados del medio de cultivo en el cual se encuentra creciendo este hongo en fermentación líquida. Los filtrados obtenidos a las 21 h de crecimiento fueron altamente tóxicos a larvas de *G. mellonella* a 40 pmol. Se cree que esta toxina inhibe el crecimiento celular en sus hospederos (Vey y colaboradores, 2001).

Las toxinas provocan además alteraciones en varios organelos, paralizan las células o causan un mal funcionamiento del intestino medio, tubos de malpigio, tejido muscular y hemocitos. El efecto inhibitorio sobre los elementos celulares de la hemolinfa impide la actividad fagocítica de los plasmotocitos y la rápida multiplicación del hongo, reduciendo la habilidad del insecto para defenderse (Gillespie y Claydon, 1989; Samuels 1998).

#### **4.3 EL POTENCIAL DE LOS HONGOS COMO CONTROLADORES DE INSECTOS PLAGA**

Los hongos deben cumplir con ciertas características para poder ser considerados como agentes potenciales para el control de plagas. Entre éstas se encuentran las siguientes: deben ser específicos y virulentos sobre algún insecto plaga determinado; ser inocuos hacia vertebrados y plantas de importancia agrícola; y tener la capacidad de desarrollarse en medios de cultivo, entre otras. A continuación se describen algunas de las más importantes.

##### **4.3.1 Especificidad de los hongos hacia invertebrados**

Los hongos pueden ser considerados específicos o generalistas. Algunos presentan acción entomopatógena sobre un amplio rango de hospederos, por ejemplo



---

---

*B. bassiana* se ha reportado atacando a más de 500 especies de insectos de diferentes órdenes; *M. anisopliae* parásita del mismo modo a más de 200 especies de insectos; *N. rileyi* se caracteriza por atacar principalmente a larvas de lepidópteros; *Hirsutella* parasita principalmente a ácaros, homópteros y nemátodos; a *L. lecanii* se le ha encontrado acción entomopatógena sobre mosquitas blancas, trips, escamas, pulgones y royas; *Coelomyces* y *Lagenidium* son agresivos contra mosquitos y, por último, *Aschersonia* parasita principalmente mosquitas blancas.

No obstante lo anterior, se han detectado cepas de *M. anisopliae* aisladas de coleópteros, que son patógenos únicamente en la especie de insecto de donde fueron aisladas, y no presentan actividad patogénica sobre los otros, aun cuando las esporas se inyecten directamente al hemocele del insecto (Lezama, 1992). Debe considerarse también que algunos de estos hongos pueden tener efecto negativo sobre insectos benéficos, tal es el caso de *B. bassiana* sobre el depredador *Coleomegilla maculata* (Pingel y Lewis, 1996) o sobre los coleópteros depredadores *Anotylus rugosus* y *Gyrohyphnus angustatus* (Steenberg y colaboradores, 1995).

#### **4.3.2 Inocuidad de los hongos hacia vertebrados y plantas de importancia agrícola**

Es muy importante verificar que dentro del rango de hospederos de un hongo entomopatógeno, no estén incluidos los humanos y demás organismos homeotérmicos, especialmente el ganado y mascotas. Así mismo, que no causen daño tampoco a las plantas de importancia agrícola, ya que la pérdida del control de estos organismos provocaría gravísimos estragos (Cook y colaboradores, 1996).

Existen organismos tanto nacionales e internacionales que han desarrollado normas y medidas para evitar que esto ocurra. En México, Sanidad Vegetal (Tamez-Guerra y colaboradores, 2001) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, <http://senasicaw.senasica.sagarpa.gov.mx>) dependencia de la SAGARPA son los encargados de legislar y monitorear los requisitos establecidos para la liberación de agentes microbianos para el control biológico de plagas. En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés,

---

---

[www.epa.gov/opp00001/biopesticides](http://www.epa.gov/opp00001/biopesticides)) es la encargada de vigilar estas regulaciones y en Europa existe la Directiva 91/414/EEC [www.pesticides.gov.uk/approvals.asp?id=623](http://www.pesticides.gov.uk/approvals.asp?id=623)) que se encarga de esto no solo en la unión europea sino en todos los países miembros de la organización para la cooperación económica y el desarrollo, donde esta incluido México. A nivel internacional, la FAO tiene una norma de referencia que es conocida como Código de conducta para la importación y liberación de agentes de control biológico ([web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsv/mrni/Doc112/3exotconbiol.pdf](http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsv/mrni/Doc112/3exotconbiol.pdf)) (Tamez-Guerra y colaboradores, *op cit*).

A pesar de esto, se han detectado algunos casos, como el del hongo *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales), que es el agente etiológico de la rinoentomofotoromicosis humana y a pesar de ser un agente prometedor para el control de plagas no puede ser usado como tal (Mier, 1990; Lezama, 1992). Otro ejemplo es el de *B. bassiana* que ha sido detectada causando una infección pulmonar fatal en una tortuga importada de España a Cuba (Cabo y colaboradores, 1995) por lo cual su aplicación esta restringida a estrictas normas de seguridad en estos países.

### 4.3.3 Virulencia

En los últimos años los terminos patogenicidad y virulencia han sido el foco de una serie de discusiones, principalmente porque ellos son empleados en varias disciplinas relacionadas con la interacción “patógeno-hospedero”. Éstas incluyen la medicina, epidemiología, ecología evolutiva, microbiología, fitopatología y entomología. La definición de estos terminos varía de disciplina a disciplina y por lo tanto habían venido causando una serie de confusiones.

En un intento por clarificar estos terminos y llegar a un lenguaje comun entre todos los científicos involucrados en la relación patogeno-hospedero, Casadevall y Pirofski (2003), introdujeron el término marco de “daño-respuesta”. Ellos discuten como algunas investigaciones se realizan centradas en el microorganismo y otras centradas en el hospedero y que en realidad deben tomarse en cuenta ambos. Dentro del marco de “daño-respuesta” ellos definen la patogenicidad como la capacidad de un microorganismo para causar daño a un hospedero y la virulencia como como la capacidad relativa de un microorganismo para causar daño a su hospedero. La palabra

relativa se incluye porque la virulencia frecuentemente es medida en comparación con otro microorganismo. Ellos enfatizan el hecho de que un microorganismo solo puede ser patógeno en un hospedero susceptible y solo en éste se puede expresar la virulencia. Proponen una serie de curvas “daño-respuesta” dentro de las cuales se pueden categorizar las diferentes interacciones microorganismo-hospedero.

Thomas y Elkinton (2004) realizaron una revisión exhaustiva dentro del área de la patología de insectos y concluyeron que, para este grupo de científicos, quienes comúnmente usan los bioensayos de dosis-respuesta para determinar los parámetros de patogenicidad y virulencia, si se incluye el componente “transmisión”, se esta determinando la patogenicidad y si se incluye solamente a individuos infectados se esta determinando virulencia. Posteriormente Shapiro-Ilan y colaboradores (2005) definieron la patogenicidad como la habilidad para producir enfermedad y la virulencia como el poder de un organismo para producir enfermedad, el grado de patogenicidad en un grupo o especie. Para ellos, patogenicidad es un término cualitativo de “todo o nada”, mientras la virulencia es un término que cuantifica la patogenicidad y solo aplica a organismos que han sido infectados.

Para determinar la virulencia de hongos entomopatógenos, la técnica del bioensayo en el laboratorio es la forma más común. Esto se hace con base en dos parámetros conocidos: la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) que es aquella dosis que causa el 50% de mortalidad de los insectos tratados y el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) que es el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad de insectos infectados por el hongo a una dosis determinada. (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

En los últimos años, se han venido desarrollando técnicas de microscopía (Firstencel y colaboradores, 1990) y de biología molecular para determinar la virulencia de un gran número de microorganismos, entre ellos los hongos entomopatógenos. Estas técnicas se basan en análisis de isoenzimas (Reineke y Zebitz, 1996; Tigano-Milani y colaboradores, 1995) o del genoma de los hongos (Bidochka y colaboradores, 1995) y brindan una alternativa más rápida, aunque más costosa, para determinar si un hongo contiene los elementos necesarios para causar enfermedad en un insecto

determinado, aunque según la teoría de Casadevall y Pirofski (2003) esto es relativo, pues el desarrollo de la enfermedad depende no solo del microorganismo, en este caso el hongo entomopatógeno, sino también del hospedero y del medio ambiente, pues no hay que olvidar que la virulencia de un hongo se ve afectada a su vez por el estado fisiológico y edad del hospedero, la edad del hongo, las técnicas empleadas en la preservación del mismo, y factores abióticos como la temperatura, la humedad relativa, la luz, etc.

Se han hecho muchos intentos por aumentar la virulencia de los hongos en forma artificial, ya sea por medio de cruces entre hongos o por la producción de mutantes (St. Leger y colaboradores, 1995; Hegedus y Khachatourians, 1996); sin embargo deben ser tomados en consideración todos los factores involucrados en la producción de estas mutantes y realizar todas las pruebas pertinentes para el manejo seguro de las variantes así producidas.

Las técnicas empleadas para la preservación de los hongos y los métodos de producción del inoculante también afectan la virulencia de los mismos. Hajek y colaboradores (1990) determinaron que la virulencia de *Entomophaga maimaga* disminuye al cultivarlo continuamente y que después de 15 transferencias se tiene ya una disminución significativa en la virulencia del hongo.

Al analizar los métodos de preservación a largo plazo, se puede encontrar que existe una diferencia en la efectividad dependiendo del tipo de hongo, así por ejemplo, el almacenamiento de conidios de *B. bassiana* en nitrógeno líquido durante 4 años, no afectó ni la germinación ni la virulencia de los conidios (Sánchez-Peña y Thorvilson, 1995); sin embargo, empleando el mismo método para tres aislamientos de *Entomophaga maimaga* durante 7 años, la capacidad del hongo para producir conidios y azigosporas disminuyó, además, la virulencia hacia *Lymantria dispar* se vio reducida (Hajek y colaboradores, 1995a).

#### 4.3.4 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales juegan también un papel importante en la efectividad de los hongos entomopatógenos para ser considerados agentes potenciales para el control de insectos plaga, entre las más importantes se encuentran:

**HUMEDAD RELATIVA:** La mayoría de las especies de hongos entomopatógenos requieren una humedad relativa alta para poder germinar. Los conidios de *B. bassiana*, por ejemplo, no causan infección sobre *Cylas formicarius* si la humedad relativa no es superior a 43% (Yasuda y colaboradores, 1997); *Paecilomyces farinosus* requiere humedades superiores a 81% para germinar y *Entomophthora sphaerosperma*, necesita niveles mayores al 65%. Sin embargo, algunas cepas de *B. bassiana* son capaces de germinar y causar infección a regímenes de humedad de hasta el 40%. Las experiencias de investigación confirman que es mayor la infección cuando se tienen humedades relativas elevadas (Lezama, 1992).

**TEMPERATURA:** Afecta varios procesos importantes dentro del ciclo vital y patogénico de un hongo entomopatógeno. Dentro de éstos se encuentran, la germinación (Morgan y colaboradores, 1995), la reproducción (Magalhaes y Frazao, 1996), la longevidad de las esporas (Hong y colaboradores, 1997) y la patogenicidad de un hongo hacia su hospedero (Hegedus y Khachatourians, 1996), entre otros.

La mayor parte de los hongos entomopatógenos tienen como óptimo térmico entre 20 y 30°C, pero su crecimiento es todavía posible entre 0-4°C (Rath y colaboradores, 1995) y 32-35°C (Inglis y colaboradores, 1997). La mayoría de los hongos son más susceptibles a las temperaturas altas que bajas, al grado de que pueden resultar letales. Por ejemplo, temperaturas superiores a 40°C tienen un efecto negativo sobre la eficacia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para matar ninfas de *Melanoplus sanguinipes* (Inglis *op cit*).

Se sabe que *M. anisopliae* presenta un crecimiento óptimo a temperaturas comprendidas entre 25 y 30°C (Magalhaes y Frazao, *op cit*); *B. bassiana* lo presenta entre 20 y 23°C (Inglis, *op cit*) y *Erynia neoaphidis* entre 18 y 21°C. Sin embargo existen diferencias entre cepas en cuanto a su preferencia térmica, como es el caso de algunos

aislamientos de *M. anisopliae* que crecen mejor a 20°C que a temperaturas más elevadas.

**Luz:** Es un factor importante al evaluar el potencial de un hongo entomopatógeno como controlador biológico. El principal efecto que tiene la luz sobre estos hongos es que disminuye la viabilidad de las esporas, lo cual ha sido demostrado por varios autores (MorleyDavies y colaboradores, 1996; Smits y colaboradores, 1996a; 1996b; Fargues y colaboradores, 1997). Fargues y colaboradores (1996) determinaron la influencia de la exposición a la luz solar simulada sobre la sobrevivencia de los conidios de 4 especies de hongos entomopatógenos. Ellos evaluaron 65 aislamientos de *B. bassiana*, 23 de *M. anisopliae*, 14 de *M. flavoviride* y 33 de *P. fumosoroseus*, encontrando que existen diferencias de susceptibilidad de estas especies a la radiación solar; así pues *M. flavoviride* fue la especie más resistente a la radiación, seguida por *B. bassiana* y *M. anisopliae*; los conidios de *P. fumosoroseus* resultaron ser los más susceptibles. También se ha encontrado que *N. rileyi* disminuye el potencial de inóculo en un 50%, en solo 5.8 horas de exposición a la radiación solar directa.

Dada la importancia de la luz sobre la sobrevivencia de los hongos, ya que disminuye la aplicación práctica de los mismos como controladores biológicos, se han empezado a buscar vías para evitar la desecación de las esporas. Inglis y colaboradores (1995b) probaron un gran número de aceites y coadyuvantes mezclados con esporas de *B. bassiana* y evaluaron su efectividad como protectores de las esporas contra la luz solar; estos investigadores concluyen que el uso de protectores-UV en las formulaciones puede incrementar la sobrevivencia de los conidios e incrementar la eficacia de este tipo de hongos para el control de plagas de insectos voladores.

#### **4.3.5 Factibilidad para la producción**

La producción masiva de los hongos entomopatógenos susceptibles de ser utilizados como agentes de control biológico de plagas, es un factor que determina su potencialidad de uso dentro de programas de control integrado. La factibilidad tiene una íntima relación con el grupo taxonómico; por ejemplo, los hongos de la división Mastigomycota y Zygomycota requieren un complejo nutricional más específico que los Ascomycetes mitospóricos.

Hasta la fecha se cuenta con dos tipos de tecnologías para la producción masiva de hongos entomopatógenos: 1) producción *in vivo*, con el uso del insecto hospedero, y 2) producción *in vitro*, con el uso de medios de cultivo, sólidos, líquidos o semisólidos.

La producción *in vivo*, es decir sobre insectos, representa un potencial limitado y poco importante desde el punto de vista industrial. Hongos de los géneros *Entomophthora* y *Coelomomyces* han sido multiplicados exitosamente por este método. Debido a la potencialidad que presentan los hongos *Lagenidium giganteum* y *Coelomomyces punctatus*, se están haciendo intentos por multiplicarlos adecuadamente apoyándose en el uso de larvas de mosquitos y del hospedero intermedio *Cyclops vernalis* (Lezama, 1992).

Los medios sólidos normalmente empleados para la producción de hongos, contienen medios de cultivo definidos y agar (Sabouraud, Papa-Dextrosa, Czapeck-Dox). El hongo *Culicinomyces clavispurus* ha sido producido en un medio a base de extracto de carne (0.3%), peptona (0.5%) y agar (1.5%), en frascos de Roux de 1 litro. Después de 7 días de incubación se obtienen 500,000 conidios por mililitro. El hongo *Lagenidium giganteum* ha sido reproducido en un medio sólido a base de extractos de semillas trituradas de cáñamo o de soya donde se producen 5,000 zoosporas por ml de medio. En el caso de *Entomophthora*, éste se desarrolla en yema de huevo, Sabouraud-Dextrosa o maltosa-agar.

La producción de hongos en medios líquidos requiere de metodologías bien estandarizadas, que permiten la producción industrial de material fúngico. Muy pocas especies desarrollan conidios mediante este método, ellas son *B. bassiana* e *H. thompsonii*. Algunas especies como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. tenella*, *P. farinosus*, *L. lecanii* y *N. rileyi*, a menudo dan origen a blastosporas, con rendimientos altos de éstas. *P. fumosoroseus* es capaz de producir  $5.8 \times 10^8$  blastosporas en medio líquido de glucosa y aminoácidos y el 79% de estas blastosporas permanecen viables después de desecación (Jackson y colaboradores, 1997).

Existen reportes de que *B. bassiana* se multiplica satisfactoriamente en medios líquidos que contienen levadura y peptona, extracto de malta germinada y glucosa, con rendimientos de 10 a 20 kg de biomasa por m<sup>3</sup> de medio, obteniéndose hasta 15

billones de conidios viables por gramo, 72 horas después de la incubación. El hongo *H. thompsonii* var. *synnematosus* produce conidios en líquido de remojo de maíz (10 gr/l) y Tween 80 (0.2%). Entre los 6 y 11 días de incubación, el hongo produce de  $6.8 \times 10^5$  a  $9.7 \times 10^7$  conidios por ml de medio.

La fermentación semisólida o difásica (fermentación en medios líquidos para la producción de micelio seguida de una incubación en charolas para la producción de conidios) es el método más utilizado para la producción en gran escala de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *H. thompsonii*, *N. rileyi* y *L. lecanii*, con producciones de hasta un millón de conidios por gramo de micelio (Rosas-Acevedo, 1993, Jenkins, y colaboradores, 1998).

La producción en granos de cereales se implementó en Brasil para producir grandes cantidades de conidios de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *L. lecanii*, utilizando granos de arroz (crudo o precocido), en bolsas de plástico esterilizables, frascos o botellas de vidrio. Este es uno de los métodos más empleados para la producción masiva de algunos hongos, principalmente Ascomycetes mitospóricos, ya que tiene la ventaja de que se pueden emplear como base del sustrato, sustancias de desecho como residuos de cosecha o diversas semillas, es un método relativamente barato y la producción de conidios es buena. Algunos investigadores han probado diferentes sustratos con el fin de determinar cual es el mejor para la producción de conidios, algunos son: semillas de arroz, frijol, sorgo, trigo (Boas y colaboradores, 1996a, b); otros han empleado paja o fibra de coco (Rosas-Acevedo, op cit).

Existen aún muchas más características que deben ser tomadas en cuenta al proponer a un hongo como potencialmente útil para el control de insectos plaga; entre éstos podemos citar la compatibilidad de los hongos entomopatógenos con las prácticas de producción, lo cual incluye la evaluación del efecto de fertilizantes (Rosin y colaboradores, 1996), herbicidas (Poprawski y Majchrowicz, 1995) y fungicidas (Smith y Hardee, 1996), entre otros. Algunos otros factores ambientales son importantes de considerar, como la lluvia (Inglis y colaboradores, 1995c) e incluso el lugar geográfico donde el hongo fue aislado y en el que será aplicado (Vanninen, 1996), los modos de aplicación y las formulaciones (Cook y colaboradores, 1996).



#### 4.4 LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS USADOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA

##### 4.4.1 Breve historia

El ascomiceto *Cordyceps* fue el primer microorganismo que se describió causando una enfermedad letal a un insecto, en el siglo XVIII. En el mismo siglo, un fraile franciscano describe un hongo del mismo tipo en la Habana. Posteriormente, muchos hongos entomopatógenos fueron descritos hasta principios del siglo XIX. En esta época es cuando aparece el trabajo enciclopédico de William Kirby sobre Entomología, en el cual incluye un capítulo entero sobre enfermedades de insectos (Steinhaus, 1956).

Es también a principios del siglo XIX cuando se realizan los primeros experimentos patológicos que dan fundamento a la Teoría de la Biogénesis, a través de los trabajos de Agostino Bassi en 1835 (Ainsworth, 1956). Este investigador demuestra que la enfermedad del gusano de seda, conocida como muscardina, es causada por un agente infectivo de origen fúngico: el hongo que conocemos ahora como muscardina blanca, *B. bassiana*. Sus estudios etiológicos no sólo sentaron las bases para la derogación de la teoría de la generación espontánea, sino que determinaron las condiciones óptimas de propagación de la enfermedad, llegando incluso a proponer la idea de utilizar al hongo como un agente de control de plagas (Steinhaus, 1956).

En 1874 Pasteur y Le Conte (1882) pensaron en usar los hongos como agentes de control biológico, pero el verdadero iniciador del control biológico con hongos fue Metschnikoff (1879), quien produjo por primera vez en ese año, una epizotia artificial en el escarabajo del trigo *Anisoplia austriaca* Hbst., con el hongo *M. anisopliae*, además, experimentó y promovió la producción masiva del mismo hongo en medio artificial, con el propósito de obtener suficiente inóculo para las aplicaciones de campo; lo siguió Krassilitschik (1888), quien creó un laboratorio destinado a la producción masiva de este hongo para combatir la plaga del escarabajo del trigo y de la remolacha, *Cleonus puntiventris* (Ibarra, 1992; Mier, 1990).

Con el paso de los años se ha venido incrementando el número de estudios con este tipo de hongos, evaluando su potencial sobre insectos plaga. Solamente, por citar un ejemplo, en los años 1995 y 1996 se reportaron trabajos sobre los siguientes hongos relacionados con los siguientes órdenes y familias de insectos:

INSECTO	HONGO	REFERENCIA
Collembola <i>Sminthurus viridis</i> (Linnaeus)	<i>Neozygites</i> spp	Steenberg y cols., 1996
Orthoptera: Acrididae <i>Schistocerca gregaria</i> (Forsk.)	<i>Metarhizium</i> spp <i>Beauveria</i> spp	Bateman y cols., 1996
Orthoptera: Acrididae <i>Melanoplus sanguinipes</i> (Fabricius)	<i>B. bassiana</i>	Iglis y cols., 1995a
Orthoptera: Acrididae Langostas	<i>B. bassiana</i> ; <i>M. anisopliae</i> ; <i>M. flovoviride</i> ; <i>Sorospora</i> sp; <i>Entomophaga grylli</i>	Goettel y cols., 1995
Orthoptera: Acrididae <i>Zonocerus variegatus</i> (L.)	<i>M. flavoviride</i>	Thomas y cols., 1996
Coleoptera: Scarabidae <i>Adoryphorus couloni</i> (Burmeister)	<i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> <i>M. flovoviride</i>	Rath y cols., 1995a; 1995b
Coleoptera: Bruchidae <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabr.)	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Boas y cols., 1996
Coleoptera: Chrysomelidae <i>Dicladispa armigera</i> (Olivier)	<i>B. bassiana</i>	Hazarika y Puzari, 1995
Coleoptera: Chrysomelidae <i>Phyllotreta cruciferae</i> (Goeze)	<i>B. bassiana</i>	Miranpuri y cols., 1995
Coleoptera: Coccinellidae <i>Coleomegilla maculata</i> (De Geer)	<i>B. bassiana</i>	Torodova y cols., 1996
Coleoptera: Coccinellidae <i>Hippodamia convergens</i> (Guerin-Meneville)	<i>B. bassiana</i>	James y cols., 1995
Isoptera: Rhinotermitidae <i>Coptotermes formosanus</i> (Shiraki)	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	Delate y cols., 1995 Wells y cols., 1995 Jones y cols., 1996
Isoptera: Rhinotermitidae <i>Reticulitermes flavipes</i> (Kollar)	<i>M. anisopliae</i>	Zoberi, 1995
Lepidoptera: Lymntriidae <i>Lymantria dispar</i> (L.)	<i>Entomophaga maimaga</i>	Hajek, y cols., 1995a
Hymenoptera: Formicidae <i>Camponotus pennsylvanicus</i> (De Geer)	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	KelleyTurnis y cols., 1995
Thysanoptera: Thripidae <i>Thrips palmi</i> (Karny)	<i>B. bassiana</i> <i>P. fumosoroseus</i>	Castineiras y cols., 1996
Thysanoptera: Thripidae <i>Frankliniella occidentales</i> (Pergande)	<i>M. anisopliae</i> <i>L. lecanii</i>	Vestergaard y cols., 1995
Hemiptera: Pentatomidae <i>Plautia stali</i> (Scott)	<i>B. bassiana</i>	Tsuda y cols., 1996
Hemiptera: Miridae <i>Lygus lineolaris</i> (Palisot de Beauvois)	<i>B. bassiana</i>	Steinkraus y Tugwell, 1997
Hemiptera: Coreidae <i>Riptortus linearis</i> (Fabricius)	<i>B. bassiana</i>	Hu y cols., 1996
Homoptera: Aphididae <i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris)	<i>B. bassiana</i>	James y cols, op cit

---

---

Los trabajos realizados no se han centrado sólo en el control de plagas agrícolas, se ha evaluado también el potencial de estos hongos como controladores de insectos de granos almacenados (Adane y colaboradores, 1996), de plagas del suelo (Schwarz, 1995) e incluso de insectos de importancia médica para el hombre como son la mosca doméstica (Watson y colaboradores, 1995; 1996), la mosca tse-tse (Kaaya y Munyinyi, 1995), o el mosquito *Anopheles* (Kanzok y Jacobs, 2006; Scholte, 2005) transmisor de la malaria.

#### **4.4.2 Situación actual de los hongos entomopatógenos utilizados como bioinsecticidas**

Después de haber transcurrido más de 100 años de que se hicieran los primeros intentos para implementar un programa utilizando *B. bassiana*, éste es el hongo entomopatógeno más ampliamente usado; solamente la URSS a partir del año 1977, ha aplicado alrededor de 22 toneladas de la famosa “muscardina blanca” para controlar el escarabajo colorado de la papa (Freeman, 1981; Kononova, 1978).

En el mundo numerosos grupos de investigadores y empresas productoras se concentran en el desarrollo de productos comerciales a partir de hongos entomopatógenos ya sea en forma de granulos o de polvo humedecible. En países como Australia, Brasil, Checoslovaquia, Cuba, Estados Unidos, Francia, Holanda, Inglaterra, Israel, Polonia, República Popular China, Suecia, URSS, Colombia, Venezuela, Brasil y México se han realizado estudios para implementar programas con *Aschersonia*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii*, *N. rileyi* e *H. thompsonii* (Ekbon, 1979; Freeman, 1981; Hall, 1982; Latgé y colaboradores 1978; McCoy, 1978; McCoy, 1980 y Valenzuela-López, 1987, Tamez-Gómez y colaboradores, 2000).

Algunos hongos entomopatógenos están siendo comercializados hoy para su uso como agentes de control biológico. En la siguiente tabla se presenta un resumen de su uso en diferentes partes del mundo (Butt y Copping, 2000; Tamez-Gómez y colaboradores, 2001). Más información sobre los hongos autorizados puede ser encontrada en la página Web de la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos ([www.epa.gov/pesticides/biopesticides](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides)).

HONGO	NOMBRE COMERCIAL	HOSPEDEROS	PRODUCTOR
<i>Beauveria bassiana</i>	MYCOTROL BOTANICAL GARD	Mosca blanca, áfidos y trips	Mycotech, USA
<i>B. bassiana</i>	CORN GUARD	Barrenador del maíz	Mycotech, USA
<i>B. bassiana</i>	PROECOL	Gusano cogollero	Probioagro, Venezuela
<i>B. bassiana</i>	CONIDIA	Barrenador del café	Live systems tech. Colombia
<i>B. bassiana</i>	OSTRINIL	Barrenador del maíz	Natural Plant Protection, Fr.
<i>B. bassiana</i>	BOVERINA	Escarabajo colorado	Antigua URSS
<i>B. bassiana</i>	<i>B. BASSIANA</i>	Broca del café, mosquita blanca y chapulines	CNRCB <sup>1</sup> , Tecomán, MX
<i>B. bassiana</i>	BEASIN	Plagas de cultivos	Agrobionsa, Culiacán, MX
<i>B. bassiana</i>	BIO-FUNG	Chapulín en frijol y maíz	CESAPEG <sup>2</sup> , Irapuato, MX
<i>B. brogniartii</i>	ENGERLINGSPILZ	Mayates	Andermatt, Suiza
<i>B. brogniartii</i>	SCHWEIZER BEAUVERIA	Mayates	Eric Schweizer, Suiza
<i>B. brogniartii</i>	MELOCONT	Mayates	Kwizda, Austria
<i>Lecanicillium lecanii</i>	MYCOTAL	Mosquita blanca y trips	Koppert, Suiza
<i>L. lecanii</i>	VERTALEC	Áfidos	Koppert, Suiza
<i>L. lecanii</i>	APHIN	Áfidos	México
<i>Metarhizium anisopliae</i>	BIO-BLAST	Termitas y cucarachas	Eco Science, USA
<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridium</i>	GREEN MUSCLE	Langostas y chapulines	Sud-Africa
<i>M. anisopliae</i>	FITOSAN	Phyllophaga spp	Guanajuato, MX
<i>M. anisopliae</i>	BIOGREEN	Larvas de escarabajos	Bio-care Tech., Australia
<i>M. anisopliae</i>	METAQUINO	Salivazo	Brasil
<i>M. anisopliae</i>	COBICAN	Salivazo en caña de azúcar	Probioagro, Venezuela
<i>M. flavoviride</i>	GREEN MUSCLE	Langostas y chapulines	CABI-BioScience, UK
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR-97	Mosquita blanca	ECO-tek, USA
<i>P. fumosoroseus</i>	PAE-SIN	Mosquita blanca	Agrobionsa, México
<i>P. fumosoroseus</i>	AGO BIOCON PAECILOMYCES 50	Colepteros	Colombia
<i>Lagenidium giganteum</i>	LAGINEX	Larvas de mosquitos	AgraQuest, USA
<i>Nomurea rileyi</i>	AGO BIOCON NOMUREA 50	Lepidopteros	Colombia

<sup>1</sup> Centro Nacional de referencia de control biológico

<sup>2</sup> Comité estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato

#### 4.5 MOSQUITA BLANCA

Las mosquitas blancas (*Bemisia tabaci* Genn. y *Trialeurodes vaporariorum* West.) son pequeños insectos chupadores minúsculos y frágiles. No son moscas verdaderas puesto que son miembros del orden Homoptera que incluyen áfidos, “escamas” y psílidos. Estos insectos causan un daño directo al succionar la savia de las plantas, llegando a causarles un debilitamiento tal que llega a causar su muerte, sobre todo en sembradíos donde hay grandes poblaciones de estas mosquitas (Ortega y González, 1989).

Otro daño causado por la mosquita blanca es la presencia de la mielecilla que es un material azucarado que el adulto excreta al alimentarse en el envés de las hojas. Cantidades grandes de mielecilla pueden decolorar las hojas de las plantas. Un daño

asociado con la mielecilla es causado por una fungosis negra llamada “fumagina”, los hongos que la constituyen están identificados como *Meliola camelliali*, *Capnodium* sp e *Ichnea* sp. La fumagina impide el paso de la luz hacia las hojas, ya que cubre el follaje, ocasionando interferencia con la fotosíntesis, lo que reduce el vigor de la planta.

Sin embargo, la mayor peligrosidad de este insecto está relacionada con la transmisión de enfermedades de tipo viral, en cuyo caso, no es necesaria la incidencia de grandes poblaciones de mosquitas para que las virosis se manifiesten y destruyan un cultivo en unos cuantos días (*op cit.*). Cubillo y colaboradores (citados por Herrera y colaboradores, 1999) reportan que solo son necesarios 0.3 adultos de *B. tabaci*/planta de tomate son suficientes para la infección del cultivo.

En la literatura se registran varias especies de Aleyrodidae como vectores de virus, sin embargo Mound (1983) indica que solo tres especies pueden ser aceptadas como vectores: *B. tabaci*, *T. abutilonea* y *T. vaporariorum*. Tan solo *B. tabaci* transmite más de 30 diferentes agentes causales algunos ejemplos son: virus chino del tomate, virus venación amarilla del pepino, virus enrollamiento foliar de la calabaza, virus mosaico dorado del frijol y virus achaparramiento de la papa, entre otros (Markham, y colaboradores 1994).

En México, estos insectos se reportan en diversos estados de la República, en el bajío en los cultivos de algodón, melón y chile; en Veracruz se observan en calabaza, calabacita, melón, sandía, pepino, espinaca, acelga y frijol ejotero. En regiones como Baja California Sur, el Valle del Yaqui, la costa de Hermosillo, Sonora, Apatzingan, Mich., Tapachula, Chis., el sur de Tamaulipas y partes de Durango y Coahuila, es común encontrar además de *T. vaporariorum*, otras especies transmisoras de enfermedades como *B. tabaci*. La mosquita blanca es también considerada como una plaga importante del melón en Michoacán, Oaxaca, Coahuila y otras zonas meloneras del país (Urias-López y colaboradores, 2005).

En los últimos años se han registrado infestaciones severas de mosquita, particularmente en el Valle de Mexicali, ya que alrededor del 90% del área sembrada con sandía presentaba el ataque de esta plaga (Pacheco y Pacheco, 1998).

#### 4.5.1 El control de mosquita blanca y los hongos entomopatógenos

Dada la gran importancia que representa este insecto para la agricultura mundial, se han generado un gran número de estrategias para tratar de controlarlo, sin embargo, no existe hasta hoy una que sea 100% efectiva y, por lo tanto, técnicos y agricultores tienen que hacer uso de varias de ellas e incluirlas en una estrategia de manejo integrado.

Entre las alternativas empleadas para el control de la mosquita blanca se encuentran el uso de insecticidas, de sustancias reguladoras del crecimiento que ayudan a las plantas a defenderse del ataque del insecto, de medidas cuarentenarias para tratar de erradicarla, la destrucción de residuos de cosecha y malezas, el uso de semillas, tubérculos y órganos libres de virus, la generación de variedades resistentes, el uso de cubiertas de polipropileno, y sustancias y cubiertas repelentes al insecto; también se utilizan algunos extractos vegetales con propiedades insecticidas o repelentes (Ortega y González. 1989).

En la actualidad también se realizan una serie de pruebas en busca de agentes de control biológico. Dentro de éstas, los hongos están empezando a jugar un papel importante dado el potencial que muestran para el control de dicho insecto. *L. lecanii* tiene amplia distribución y puede provocar grandes epizootias en regiones de clima tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos de invernaderos. Sus hospederos más comunes son áfidos y mosquitas blancas, pero también ha sido encontrado en coleópteros, dípteros y ácaros eriófidios (Hall, 1981, 1982; Kanagaratnam y colaboradores 1982). En México, este hongo ha sido aislado a partir del hongo causante de la roya del café *Hemileia vastatrix*, donde actúa como hiperparásito (Carrión y Ruíz-Belin, 1988; Carrión y colaboradores 1989). Mier y colaboradores (1991), encontraron un 78.8% de parasitismo de este hongo sobre *T. vaporariorum*.

El hongo *Paecilomyces*, fue descubierto en 1971 por Nene, atacando a las ninfas de mosquita blanca. De entonces a la fecha se han realizado un gran número de investigaciones para determinar su potencial como controlador de mosquitas blancas en Cuba (Castineiras, 1995); en la República Checa (Landa y colaboradores 1994); en Francia (Kirk y colaboradores 1993), en Inglaterra (Smith, 1993) y en Estados Unidos

(Osborne y Landa, 1992; Osborne y colaboradores, 1994). En México, Ruiz y colaboradores (1995), mencionan que una cepa de *P. farinosus* mostró una eficiencia del 100% a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL, al evaluar la mortalidad de ninfas bajo condiciones controladas y a diferentes humedades relativas.

Fransen (1994), presenta una lista de hongos que fueron usados en Holanda para controlar mosquitas blancas en flores de ornato a nivel de invernadero. Ellos reportan buenos resultados al utilizar *A. aleyrodis*, *B. bassiana*, *P. farinosus* y *L. lecanii*. Meeke y colaboradores (2002), también reportan buenos resultados en el control de mosquitas blancas al emplear los hongos entomopatógenos *Encarsia formosa*, *L. lecanii*, *P. fumosoroseus* y *A. aleyrodis*.

Hoy se comercializan ya varias cepas de hongos entomopatógenos para el control de este insecto entre las que destacan MYCOTAL (*L. lecanii*, Koppert, Holanda); MYCOTROL y BOTANIGARD (*B. bassiana*, Mycotech, USA); PFR-97 (*P. fumosoroseus*, ECO-tek, USA); Pae-Sin (*P. fumosoroseus*, Agrobionsa, México).

---

---

**BIBLIOGRAFIA CITADA**

- Adane, K; D Moore y SA Archer. 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. JOURNAL OF STORED PRODUCTS RESEARCH 32(2):105-113
- Agrios, G.N. 1997. PLANT PATHOLOGY. 4<sup>th</sup> Ed., Academic Press, San Diego
- Ainsworth, GC. 1956. Agostino bassi, 1973-1856. NATURE 177:255-257
- Ainsworth, GC; FK Sparrow and A. Sussman. 1973. THE FUNGI: AN ADVANCED TREATISE. VOLS IV A Y IVB. Academic Press. New York
- Alexopoulos, CJ y CW Mims. 1985. INTRODUCCIÓN A LA MICOLOGÍA. Omega. Barcelona. 638 p.
- Alves, SB; RM Pereira, JL Stimac y SA Vieira. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above freezing temperatures. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 6(4):575-581
- Altieri, M. 1992. Biodiversidad, agroecología y manejo de plagas. CETAI Ediciones. 162 p.
- Annual Report of Cooperative Regional Project S-240 (Development of Entomopathogens as Control agents for insect pest). 1994
- Ayala-Orduño, JL.1989. Importancia económica de los insectos en las plantas. En: UACH. Notas para el curso de plagas agrícolas. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp.2-7
- Badii, MH; AE Flores, H Quiróz, J. Landeros y R Torres. 1997a. Diversidad Ecológica. Memoria del VII curso nacional de control biológico "Hacia un futuro sostenible". Universidad de Guadalajara. Hotel Villa Primavera. Guadalajara Jalisco, México. 10-12 Noviembre de 1997
- Badii, MH; AE Flores, H Quiroz, J Landeros y R Torres. 1997b. Control biológico y manejo integral de plagas. Memoria del VII curso nacional de control biológico "Hacia un futuro sostenible". Universidad de Guadalajara. Hotel Villa Primavera. Guadalajara Jalisco, México. 10-12 Noviembre de 1997
- Barnett, HL and BB Hunter. 1972. ILLUSTRATED GENERA OF IMPERFECT FUNGI. -3rd. Ed. Burgess Publishing. USA. 241 p.
- Barrera, JF. 1997. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. Memoria del VII curso nacional de control biológico "Hacia un futuro sostenible". Universidad de Guadalajara. Hotel Villa Primavera. Guadalajara Jalisco, México. 10-12 Noviembre de 1997
- Bateman, R; M Carey, D Batt, C Prior, Y Abraham, D Moore, N Yenkin y J Fenlon. 1996. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Forsk.). BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 6(4):549-560
- Bidochka MJ y GG Khachatourians. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 53(7):1679-1684



- 
- 
- Bidocka MJ; SRA Walsh, ME Ramos, RJ StLeger, JC Silver y DW Roberts. 1995. Pathotypes in the *Entomophaga grilli* species complex of grasshopper pathogens differentiated with random amplification of polymorphic DNA and cloned-DNA probes. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 61(2):556-560
  - Bland, CE; JN Couch y SY Newel. 1981. Identification of Coelomyces, Saprolegniales and Lagenidales. En: Burges, H.D. (Ed.) MICROBIAL CONTROL OF PESTS AND PLANT DISEASES. Academic Press. new York. pp. 129-162
  - Boas, AMV; RM Andrade y JV Oliveira. 1996. Diversification of culture media for production of entomopathogenic fungi. ARQUIVOS DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA 39(1):123-128
  - Boas, AMV; JV Oliveira, AL Campos, RM Andrade y RLX Silva. 1996. Pathogenicity of wild strains and mutants of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). ARQUIVOS DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA 39(1):99-104
  - Brousseau, C; G Charpentier y S Belloncik. 1996. Susceptibility of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, to destruxins, cyclodepsipeptidic mycotoxins of *Metarhizium anisopliae*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY. 68:180-182
  - Butt, TM; LGCopping. 2000. Fungal biological control agents. PESTICIDE OUTLOOK. Octubre: 186-191
  - Butt, TM; L Ibrahim, SJ Clark and A Beckett. 1995. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. MYCOLOGICAL RESEARCH 99:945-950
  - Cabo, JFG; JE Serrano y MCB Asensio. 1995. Mycotic pulmonary disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise- Case Report. MYCOSES 38(3-4):167-169
  - Caltagirone, LE; R García y AP Gutierrez. 1988. Biological control as a component of sustainable agriculture. En: Allen, P y D. Van Dusen (Eds.). Global perspectives on agroecology and sustainable agricultural systems. Vol 2. Agroecology program University of California. Santa Cruz. pp. 493-495
  - Carrión, G y F Ruíz-Belin. 1988. Inoculación en el laboratorio de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*) REVISTA MEXICANA DE MICOLOGIA 4:317-321
  - Carrión, G; F Ruíz-Belin y R Alarcón. 1989. Nuevos datos sobre el parasitismo de *Verticillium lecanii* sobre la roya del cafeto (*hemileia vastatrix*) REVISTA MEXICANA DE MICOLOGIA 5:217-224
  - Casadevall A y LA Pirofski. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. Nature 1:17-24
  - Castineiras, A. 1995. Natural enemies os *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cuba. FLORIDA ENTOMOLOGIST 78(3):538-540
  - Castineiras, A; JE Pena, R Duncan y L Osborne. 1996. Potential of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Tysanoptera: Thripidae). FLORIDA ENTOMOLOGIST 79(3):458-461
- 
-

- 
- 
- Charles, VK. 1941. A preliminary check list of the entomogenous fungi of North America. USDA. INSECT PEST BULLETIN 21:707-785
  - Cook, J; WL Bruckart, JR Coulson, MS Goettel, RA Humber, RD Lumsden, JV Maddox, ML McManus, L Moore, SF Meyer, PC Quimby, JP Stack y JL Vaughn. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. BIOLOGICAL CONTROL 7(3):333-351
  - Delate, KM; JK Grace y CHM Tome. 1995. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY 119(6): 429-433
  - Dowd, P. F. Insect interactions with mycotoxin-producing fungi and their host. En: Bhatnagar, D; E.B. Lillehoj and D.K. Arora (Eds.) MYCOTOXINS IN ECOLOGICAL SYSTEMS. Vol. 5 Marcel Decker Inc. USA. pp. 137-155
  - Duriez-Vaucelle, T; J Fargues, PH Robert y R Popeye. 1981. Etude enzymatique comparee de champignons entomopathogènes des genres *Beauveria* et *Metarrhizium*. MYCOPATHOLOGIA. 75:109-126
  - Ekbon, BS. 1979. Investigations on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) for biological control of the greenhouse white fly (*Trialeurodes vaporariorum*) SWED. J. AGRIC. RES. 9:129-138
  - Ellison, CA y HC Evans. 1996. Amazon-ingly useful fungi- A biological control cornupia? MYCOLOGIST 10(1): 11-13
  - Fargues, J; MS Goettel, N Smits, A Ouedraogo, C Vidal, LA Lacey, CJ Lomer y M Rougier. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. MYCOPATHOLOGIA 135(3):171-181
  - Fargues, J; M Rougier, R Goujet, N Smits, C Coustere y B Itier. 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 69(1):70-78
  - Firstencel, H; TM Butt y RI Carruthers. 1990. A fluorescence method for determining the viability of entomophthorean fungal spores. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 55:258-264
  - Fransen, JJ. 1994. *Bemisia tabaci* in the Netherlands; here to stay? PESTICIDE SCIENCE. 42:129-134
  - Freeman, TE. 1981. Use of conidial fungi on biological control. En: Cole, GT y B Kendrick (Eds.) BIOLOGY OF CONIDIAL FUNGI. Academic Press. New York. Vol. 2. pp. 143-161
  - Freimoser, FM, S Screen, S Bagga, G Hu y RJ St. Leger. 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarrhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect host. MICROBIOLOGY 149:239-247
  - Gardner, WA y R Noblet. 1978. Effects of host age, route of infection and quantity of inoculum on the susceptibility of *Heliothis virescens*, *Nomuraea rileyi* and *Nosema necatrix* on soybean foliage. ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY 6:616-618
- 
-

- 
- 
- Gillespie, AT y N Claydon, 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in patogenesis. PESTICIDE SCIENCE 27:203-215
  - Goettel, MS; DL Johnson y GD Inglis. 1995. The role of fungi in the control of grasshoppers. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY (SUPPLEMENT) 73:S71-S75
  - Gupta, S; SB Krasnoff, NL Underwood, JAA Renwick y DW Roberts. 1991. MYCOPATHOLOGIA 15:185
  - Gupta, S; C Montllor y YS Hwang. 1995. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 58(5):733-738
  - Hajek, AE; RA Humber y MH Griggs. 1990. Decline in virulence of *Entomophaga maimaga* (Zygomycetes: Entomophthorales) with repeated in vitro subculture. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 56:91-97
  - Hajek, AE; JAA Renwick y Roberts. 1995a. Effects of larval host plant on the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) fungal pathogen *Entomophaga maimaga* (Zygomycetes: Entomophthorales). ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY 24(5):1307-1314
  - Hajek, AE; M Shimazu y RA Humber. 1995b. Instability in pathogenicity of *Entomophaga maimaga* after long-term cryopreservation. MYCOLOGIA 87(4):483-389
  - Hall, RA. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as microbial insecticide against aphids and scales. En: Burges, HD (Ed.). MICROBIAL CONTROL OF PEST AND PLANT DISEASES. 1970-1080. Academic Press. Londres. 949 p.
  - Hall, RA. 1982. Control of white fly, *Trialeurodes vaporariorum*, and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glass house by two isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. ANN. APPL. BIOL. 101:1-11
  - Hazarika, LK y KC Puzari. 1995. White muscardine fungus (*Beauveria bassiana*) pathogenic to different stages of rice hispa (*Diuraphis armigera*). INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES 65(5):368-372
  - Hegedus, DD y GG Khachatourians. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. BIOTECHNOLOGY ADVANCES 13(3):455-490
  - Hegedus, DD y GG Khachatourians. 1996. The effects of temperature on the patogenicity of heat-sensitive mutants of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 68:160-165
  - Herrera, F, M Carballo y P Shannon. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS 54
  - Herrera, T y M Ulloa. 1990. EL REINO DE LOS HONGOS. FCE-UNAM. México. 552 p.
  - Hong, TD; RH Ellis y D Moore. 1997. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. ANNALS OF BOTANY 79(2):121-128
- 
-

- Hu, WJ; RFN Hou y NS Talekar. 1996. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Riptortus linearis* (Hemiptera: Coreidae) a pest of soybean. APPLIED ENTOMOLGY AND ZOOLOGY 31(2):187-194
- Humber, RA. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. November 8-12, Las Vegas, NV
- Ibarra, RJ 1992. Corta historia sobre la patología de insectos y el control microbiano. En: Leyva, V.J. e Ibarra, R.J. 1992. 1er. CURSO DE CONTROL BIOLÓGICO. Oct. 5-7 de 1992. FES Cuautitlan UNAM. pp. 116-118
- Inglis, GD; RP Feniuk, MS Goettel y DL Johnson. 1995a. Mortality of grasshoppers exposed to *Beauveria bassiana* during oviposition and nymphal emergence. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 65(2):139-146
- Inglis, GD; MS Goettel y DL Johnson. 1995b. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. BIOLOGICAL CONTROL 5(4):581-590
- Inglis, GD; DL Johnson, KJ Cheng y MS Goettel. 1997. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. BIOLOGICAL CONTROL 8(2):143-152
- Inglis, GD; DL Johnson y MS Goettel. 1995c. Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* conidia on leaves of alfalfa and wheat. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 5(3):365-369
- Jackson, MA; MR McGuire, IA Lacey y SP Wraright. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. MYCOLOGICAL RESEARCH 101:35-41
- James, RR; BT Shaffer, B Croft y B Lighthart. 1995. Field evaluation of *Beauveria bassiana*: its persistence and effects on the pea aphid and non-target coccinellid in alfalfa. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 5(4):425-437
- Jenkins, NE; G Heviefio, J Langewald, AJ Cherry y CJ Lomer. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. BIOCONTROL NEWS AND INFORMATION. 19(1):21N-31N
- Jones, WE; JK Grace y M Tamashiro. 1996. Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinitermitidae) ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY 25(2):481-487
- Kaaya, GP y DM Muniyini. 1995. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tse-Tse flies (*Glossina spp*) at developmental sites. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 66(3):237-241
- Kaijiang, L y DW Roberts. 1986. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *major*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY. 47:120-122

- 
- 
- Kanagaratnam, P; RA Hall y HD Burges. 1982. Control of glasshouse white fly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an 'aphid' strain on the fungus *Verticillium lecanii*. ANN. APPL. BIOL. 100:213-219
  - Kanzok SM y M Jacobs-Lorena. 2006. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. TRENDS PARASITOL 22(2):49-51
  - KelleyTunis, KK; BL Reid y M Andis. 1995. Activity of entomopathogenic fungi in free-foreging workers of *Camponotus pennsylvanicus* (Hymenoptera: Formicidae). JOURNAL OF ECONOMY ENTOMOLOGY 88(4):937-943
  - Kirk, AA; LA Lacey; N Roidakis y JK Brown. 1993. The status of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) and their natural enemies in Crete. ENTOMOPHAGA 38(3):405-410
  - Kononova, EV 1978. Selection of commercial strains of the fungus *Beauveria bassiana* En: Ignoffo CM (Ed.) Proceedings, 1st. joint US/URSS conference of production, selection and standarization of entomopathogenic fungi. pp. 172.191
  - Kornerup, A y JH Wanscher.1978. Methuen Handbook of Colour, 3a. Edition (Illustrated). 252pp.
  - Krassilitschik, JM 1888. La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. BULL. SCI. FRANCE 19:461-472
  - Lacey, LA; R Frutos, HK Kaya y P Vails. 2001. Insect pathogens as Biological Control Agents: Do they have a future? BIOLOGICAL CONTROL 21: 230-248
  - Lagunes-Tejeda, A y M Vázquez-Navarro. 1994. EL BIOENSAYO EN EL MANEJO DE INSECTICIDAS Y ACARICIDAS. Colegio de Postgraduados. México. 159 p.
  - Landa, Z; L Osborne; F López y J Eyal. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. BIOLOGICAL CONTROL. 4(4):341-350
  - Latgé, JP; G Remaudière y B Papierok. 1978. Un exemple de recherche en lutte biologique: les champignons *Entomophthora* pathogens de pucerons. BULL. SOC. PATHOL. EXOT. 71(2):196-203
  - Lezama, GR 13: Biología y aplicación de los hongos entomopatogenos. En: Leyva, V.J. e Ibarra, R.J. 1992. 1er. CURSO DE CONTROL BIOLÓGICO. Oct. 5-7 de 1992. FES Cuautitlan UNAM
  - Madelin, MF. 1963. Disease caused by hyphomycetous fungi. En: Steinhaus, E. (Ed.). INSECT PATHOLOGY AND ADVANCED TREATISE. Vol. 2. Academic Press. p. 233-264
  - Madelin, MF; RK Robinson y RJ Williams. 1967. Appresorium-like structures in insect-parasitizing Deutromycetes. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 9:404-412
  - Magalhaes, BP y HD Frazao. 1996. Effects of tempertaure, water content and substrate on conidial production of *Metarhizium flooviride*. REVISTA DE MICROBIOLOGIA 27(4):242-246
- 
-

- 
- 
- Markham, PG; ID Bedford; S Liu y MS Pinner. 1994. The transmission of geminivirus by *Bemisia tabaci*. PESTICIDE SCIENCE. 42:123-128
  - May, RM. 2000. The dimensions of Life in earth. En: PH Raven y T Williams (Eds.) Nature an human Society: the quest for a sustainable world. National Academy Press. Washington, DC. Pp. 30-45
  - McCoy, CW. 1978. Entomopathogens in arthropods pest control program for citrus. En: Allen, G; CM Ignoffo y RP Jaques (Eds.) FUTURE STRATEGIES ON PEST MANAGEMENT SYSTEMS. National Science Foundation. Institute of food and agricultural sciences. University of Florida
  - McCoy, CW. 1980. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. En: Burges, HD (Ed.). MICROBIAL CONTROL OF PEST AND PLANT DISEASES. 1970-1980. Academic Press. Londres. pp. 499-512
  - Meekes, ETM, JJ Fransen y JC Van Lenteren. 2002. Pathogenicity of *Aschersonia spp.* against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 81:1-11
  - Metschnikoff, E. 1879. Diseases of the larva of the grain weevil. Insects harmful to agriculture (series). Issue III. THE GRAIN WEEVIL. Published by the commission attached to the Odessa Zemstro office for the investigation of the problem of insects harmful to agriculture. Odessa, 32 p.
  - Mier, T, Rivera, F Bermúdez, JC, Domínguez, y, Benavides, C y Ulloa, M 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. REVISTA MEXICANA DE MICOLOGIA 7:149-156
  - Mier, T, F Rosete y I Garibay. 1992. Crecimiento y esporulación de *Hirsutella thompsonii* en medios naturales y conservación de su viabilidad en diferentes soportes. REVISTA MEXICANA DE MICOLOGIA 8:131-135
  - Mier, GT 1990. Estudio sobre patogenicidad, fisiología e identificación de hongos potencialmente utiles en el control biológico de plagas, Entomophthorales e *Hirsutella thompsonii* Fisher. TESIS DOCTORAL. ENCB. IPN132 p.
  - Miller, TA y JR Miller. 1986. Insect-Plant interactions. Springer Verlag USA. 342 p.
  - Miranpuri, GS y GG Khachatourians. 1995. Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* toward flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* Goeze (Coleoptera: Chrysomelidae). JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY 119(2):167.170
  - Morgan, LW; L Boddy, SJ Clark y N Wilding. 1995. Influence of temperature on germination of primary and secondary conidia of *Erynia neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 65:132-138
  - MorleyDavis, J; D Moore y C Prior. 1996. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria spp* conidia with exposure to simulated sunlighth and a range of temperatures. MYCOLOGICAL RESEARCH 100:31-38
  - Moore, D; RP Bateman, M Carey y C Prior. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flooviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 5(2):193-199
- 
-

- 
- 
- Mound, LA. 1983. Biology and identity of white fly vectors of plant pathogens. En: Plumb, RT y JM Tresh (Eds.) PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY. THE SPREAD AND CONTROL OF INSECT-BORNE VIRUS. Oxford. UK. Blackwell Scientific Publications. pp. 305-313
  - Mueller, UG y N Gerardo. 2002. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 99(24):15247-15249
  - Murrin, F. 1996. Fungi and insects. En: DH Howard and JD Miller (Eds.) The mycota Vol VI. Human and animal relationships. Springer Verlag. Germany. pp.365-388
  - Nadeau, MP; GB Dunphy, JL Boisvert. 1996. Development of *Erynia conica* (Zygomycetes: Entomophthorales) on the cuticle of the adult black flies *Simulium rostratum* and *Simulium decorum* (Diptera: Simuliidae). JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY. 68(1):50-58
  - Nakagawa, A. 1992. Chemical Screening. En: Omura, S (Ed.) THE SEARCH FOR BIOACTIVE COMPOUNDS FROM MICROORGANISMS. Springer-Verlag. New York. pp. 263-280
  - National Academy of Sciences. 1985. MANEJO Y CONTROL DE PLAGAS DE INSECTOS. Vol. 3. Limusa. México. 522 p.
  - Nene, YL. 1973. Viral diseases of some warm weather pulse crops in India. PLANT DISEASE REPORTER. 57: 463-467
  - Ortega, A L y H González. 1989. Mosquitas Blancas (Homoptera:Aleyrodidae) vectores de virus en hortalizas. En: Acosta, L.R. y F. Delgadillo (Eds.) ECOLOGÍA DE INSECTOS VECTORES DE VIRUS EN PLANTAS CULTIVADAS. Colegio de Postgraduados. México. pp. 46-59
  - Osborne, LS y Z Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. FLORIDA ENTOMOLOGIST 75(4):456-471
  - Osborne, LS y Z Landa. 1994. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato white fly, *Bemisia tabaci*. BULLETIN OILB/SROP 17(3):201-206
  - Pacheco, MF y JJ Pacheco (Eds.). 1994. Mosquita blanca en el noreste de México. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noroeste, Cd. Obregón, Sonora
  - Palm, ME e I Chapela. 1997, Mycology in sustainable development: Expanding concepts, vanishing borders. Parkway Publishers Inc. USA. 306 p.
  - Pearson, M; L. Hall y K Soderhall. 1984. Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 44:342-348
  - Pendland, JC; SY Hung, D Boucias. 1995. In vivo development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. MYCOPATHOLOGIA 30(3):151-158
  - Pingel, RL y LC Lewis. 1996. The fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in a corn ecosystem: its effect on the insect predator *Coleomegilla maculata* De Geer. BIOLOGICAL CONTROL 6(1):137-141
  - Poinar, GO y GM Thomas. 1984. LABORATORY GUIDE TO INSECT PATHOGENS AND PARASITES. Plentium Press. New York. 392 p.
- 
-

- 
- 
- Poprawski TJ y I Majchrowicz. 1995. Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. CROP PROTECTION 14(1):81-87
  - Rath, AC; PL Guy y WR Webb. 1996. *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. MYCOLOGICAL RESEARCH 100:57-62
  - Rath, AC; TB Koen, GC Anderson y D Worledge. 1995. Field evaluation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) as a biocontrol agent for the redheaded pasture cockchafer, *Adoryphorus couloni* (Coleoptera: Scarabaeidae). AUSTRALIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH 46(2):429-440
  - Rath, AC y D Worledge. 1995a. The effect of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) concentration and exposure time to the survival of the subterranean pasture pest, *Adoryphorus couloni* (Coleoptera: Scarabaeidae). ENTOMOPHAGA 40(1):35-45
  - Rath, AC y D Worledge, GC Andreson y CJ Carr. 1995b. Virulence of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) sorokin, *M. flooviride* gams and rozsygal and *Beauveria bassiana* (Ballsamo) Vuillemin to *Adoryphorus couloni* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). JOURNAL OF THE AUSTRALIAN ENTOMOLOGICAL SOCIETY 34:181-186
  - Regional Research Fund Hatch. 1994. Project S-240 (Development of entomopathogens as control agents for insect pest. Annual Report.
  - Reineke, A y CPW Zebitz. 1996. Protein and isozyme patterns among isolates of *Beauveria brongniartii* with different virulence to European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.). JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY 120(5):307-315
  - Reserva Ecológica del Edén. Quintana Roo, México.  
[http://www.cce.org.mx/cespedes/publicaciones/revista/revista\\_10/eden.pdf](http://www.cce.org.mx/cespedes/publicaciones/revista/revista_10/eden.pdf)
  - Roberts, DW y WG Yendol. 1971. Use of fungi for microbial control of insects. En: Burges, HD y NW Hussey (Eds.) MICROBIAL CONTROL OF INSECT AND MITES. Academic Press. p. 125-146
  - Rodríguez del Bosque, A. 1992. Teoría y bases ecológicas del control biológico. En: Leyva, V. J. y Ibarra, R. J. (Eds.) Memorias del III Curso de control biológico. FES Cuautitlan. UNAM, México.
  - Rojas, CJJ. 1982. Efecto de la ingestión de las toxinas producidas por el hongo *Beauveria* sp sobre la mortalidad de adultos y larvas de la pulga saltona *Epitrix* sp. TURRIALBA 32(1):93-95
  - Rosas-Acevedo, JL. 1993. Conidiogénesis de siete cepas de *Hirsutella thompsonii* Fisher y una cepa de *H. nodulosa* Petch en medios líquidos y sustratos sólidos y su agresividad frente a *Tetranynchus urticae* Koch. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 92 p.
  - Rosato, YB; CL Messias y JL Azevedo. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 38:1-3
  - Rosin, F; DI Shapiro and LL Lewis. 1996. Effects of fertilizers on the survival of *Beauveria bassiana*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 68:194-195
  - Ruíz, VJ.; JE Ibarra, y PR Pérez. 1995. Virulencia de varios hongos entomopatogenos de mosquita blanca a distintas humedades relativas. En: Memorias del XXII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara, Jal. México. Agosto 9-11
- 
-



- 
- 
- Samsinaková, A; S Misikova y J Leopold. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of greater wax moth larvae *Galleria mellonella* JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 18:322-330
  - Samson, RA. 1981. Identification: Entopathogenic deuteromycetes. In: H.D. Burges (Ed.) MICROBIAL CONTROL OF PESTS AND PLANT DISEASES. Academic Press. New York. Pp. 93-106
  - Samson, RA, HC Evans y JP Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg, New York
  - Samuels, IR e IC Paterson. 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B- BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. 10(4):661-669
  - Samuels, IR. 1998. Bioactive compounds produced by entomopathogenic fungi. Anais VI Siconbiol 24-28 de mayode 1998. Rio de Janeiro, Brasil. pp. 211-215
  - Sánchez-Peña, S y HG Thorvilson. 1995. Effect of long-term cryogenic storage and conidial suspending agents on the virulence of *Beauveria bassiana* toward *Solenopsis invicta*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 65:248-252
  - Scholte, EJ. 2005. An entomopathogenic fungus for control an adult African malaria mosquitoes. SCIENCE 308 (5728): 1641-1642
  - Schwarz, MR. 1995. *Metarhizium anisopliae* for soil pest control. BIORATIONAL PEST CONTROL AGENTS 595:183-196
  - Shah, PA y JK Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. APPLIED MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY 61:413-423
  - Shapiro-Ilan, DI; JR Fuxa, LA Lacey, DW Onstand y HK Kaya. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in inertebrate pathology. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 88:1-7
  - Smith, MT y DD Hardee. 1996. Influence of fungicides on development of an entomopathogenic fungus (Zygomycetes: Neozygitaceae) in the cotton aphid (Homoptera: Aphididae). ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY 25(3):677-687
  - Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. BIOCONTROL NEWS AND INFORMATION 14(4):71N-78N
  - Smits, N; J Fargues, M Rougier, R Gaujet y B Itier. 1996a. Effects of temperature and solar radiation interactions on the survival of quiescent conidia of the entomothogenic Hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. MYCOPATHOLOGIA 135(3):163-170
  - Smits, N; M Rougier, J Fargues, R Goujet, R Bonhomme. 1996b. Inactivation of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia by diffuse and total solar radiation. FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY 21(3):167-173
  - Steenberg, T; J Eilenberg y J Bresciani. 1996. First record of a *Neozygites species* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting springtails (Insecta: Collembola). JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 68(2):97-100
- 
-

- 
- 
- Steenberg, T; V Langer y P Esbjerg. 1995. Entomopathogenic fungi in predatory beetles (Coleoptera: Carabidae and Staphylinidae) from agricultural fields. ENTOMOPHAGA 40(1):77-85
  - Steinhaus, EA. 1956. Microbial control: the emergence of an idea. HILGARDIA 26(2):107-151
  - Steinhaus, EA. 1985. Enfermedades microbianas de los insectos. En: De Bach, P. CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS DE INSECTOS Y MALAS HIERBAS. CECOSA. México. p. 607-643
  - Steinkraus, DC y NP Tugwell. 1997. *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Moniliales) effects on *Lygus lineolaris* (Hemiptera:Miridae). JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SCIENCE 32(2):79-90
  - St. Leger, RJ. 1993. 10: Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. En: PARASITES AND PATHOGENS OF INSECTS. Vol. 2. pp. 211-229
  - St. Leger, RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY (Suplement) 73:S1119-S125
  - St. Leger, RJ, S Shimizu, L Joshi, MJ Bidochka y DW Roberts. 1995. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electrophoration or using the gene gun to produce stable GUS transformants. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 131(3):289-294
  - St. Leger, RJ, L Joshi, MJ Bidochka, NW Rizzo y DW Roberts. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flovorivide* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 62(3):907-912
  - Suzuki, A, M Kanaoka, A Isogai, S Murakoshi, M Ichinoe y S Tamura. 1977. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. TETRAHEDRON LETTERS 25: 2167-2170
  - Tamez-Guerra, P; LG Galán-Wong, H Medrano-Roldan, C García-Gutiérrez, C Rodríguez-Padilla, RA Gómez-Flores y RS Tamez-Guerra. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. CIENCIA UANL 4(2):143-152
  - Tanada, Y and HK Kaya. 1993a. 3: Amicrobial and microbial agents. En: Tanada, Y and HK Kaya. INSECT PATHOLOGY. Academic Press Inc. pp. 52-82
  - Tanada, Y and HK Kaya. 1993b. 10: Fungal infections. En: Tanada, Y and HK Kaya. INSECT PATHOLOGY. Academic Press Inc. pp. 318-387
  - Thomas, SR y JS Elkinton. 2004. Pathogenicity and virulence. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 85:146-151
  - Thomas, MB; J Langewald y SN Wood. 1996. Evaluating the effects of a biopesticide on populations of the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY 33(6):1509-1516
  - Tigano-Milani, MS; RG Carneiro, MR DeFaria, HS Frasao y CW McCoy. 1995. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lillicianus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchida). BIOLOGICAL CONTROL 5(3):378-382
- 
-

- 
- 
- Todorova, SI; JC Cote y D Coderre. 1996. Evaluation of the effects of two *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin strains on the development of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae). JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY 120(3):159-163
  - Tsuda, K; T Yoshioka, T Tsutsumi y M Yamanaka. 1996. Pathogenicity of some entomogenous fungi to brown-winged green bug, *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). JAPANESE JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY 40(4):318-321
  - Urias-López, MA, KF Byerly-Murphy, JA Osuna-García y A García-Berber. 2005. Incidencia de mosquita blanca (Hemiptera: Aleyrodidae), áfidos (Hemiptera: Aphididae) y virosis del melón en Jalisco, México. FOLIA ENTOMOLOGICA MEXICANA 44(3): 321-337
  - Valenzuela-López, E. 1987. Microorganismos entomopatógenos. Su aprovechamiento en el control de insectos plagas. UACH. México. pp. 53-57
  - Van Driesche, RG y TS Bellows. 1996a. 7: Nature enemy conservation. En: Van Driesche, RG and TS Bellows. Biological Control. Chapman Hall. USA. pp.105-127
  - Van Driesche, RG y TS Bellows. 1996b. 21: Biological control in support of nature conservation. En: Van Driesche, RG y TS Bellows (Eds.). Biological Control. Chapman Hall. USA. pp. 424-443
  - Vanninen, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: Effect of geographical location, habitat type and soil type. MYCOLOGICAL RESEARCH 100:93-101
  - Vestergaard S; AT Gillespie, TM Butt, G Schreiter y J Eilenberg. 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 5(2):185-192
  - Vey, A, RE Hoagland y TM Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: TM Butt, C Jackson y N Magan (Eds.) FUNGI AS BIOCONTROL AGENTS. CAB International. pp. 311-345
  - Watson, DW; CJ Geden, SJ Long y DA Rutz. 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly (Diptera: Muscidae). BIOLOGICAL CONTROL 5(3):405-411
  - Watson, DW; DA Rutz y SJ Long. 1996. *Beauveria bassiana* and sawdust bedding for the management of the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in cair hutches. BIOLOGICAL CONTROL 7(2):221-227
  - Wells, JD; JR Fuxa y G Henderson. 1995. Virulence of four fungal pathogens to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SCIENCE 30(2):208-215
  - Yasuda, K; K Takayesu y K Uehara. 1997. Effects of temperature, humidity and conidial density of infection by *Beauveria bassiana* of adult sweet potato weevil *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). JAPANESE JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY 41(1):55-58
  - Zooberi, MH 1995. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). MYCOLOGIA 87(3):354-259
- 
-

---

**5.1 ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM "EL EDEN" ECOLOGICAL RESERVE,  
QUINTANA ROO, MEXICO**

(Artículo publicado)

---



## Entomopathogenic fungi from 'El Eden' Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico

Andrea Torres-Barragán<sup>1</sup>, Ana Luisa Anaya<sup>1</sup>, Raquel Alatorre<sup>2</sup> & Conchita Toriello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., 04510, México;

<sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, 56230, México; <sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., 04510, México

Received 17 July 2002; accepted in final form 8 September 2003

### Abstract

Entomopathogenic fungi were isolated and identified from insects collected from the tropical forest and an agricultural area at El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. These fungi were studied to determine their potential as biological control agents of greenhouse *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), and to contribute to the knowledge of biodiversity of this area. No pest insects were observed in the tropical forest. In contrast, all insects collected in the agricultural area were considered important pests by the local farmers, with the whitefly, as the most relevant, plentiful in Cucurbitaceae plants. From approximately 3400 collected insects in three different surveys, different anamorphic Ascomycetes were recovered. One isolate of *Aspergillus* sp., two of *Penicillium* sp., three of *Paecilomyces marquandii*, and three of *Verticillium* sp. out of 308 insects (2.9%) from three insect orders, Hymenoptera, Diptera and Isoptera in the tropical forest. In contrast, a higher number of fungal isolates were recovered from the agricultural area: three isolates from *Aspergillus parasiticus*, 100 of *Fusarium moniliforme*, one of *Aschersonia* sp., and 246 of *Fusarium oxysporum* out of 3100 insects (11.3%) from three insect orders, Homoptera, Coleoptera and Lepidoptera. The results of this study show *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum* as highly virulent to infected insects in the agricultural area, with 100 and 246 isolates respectively, out of 350 infected insects of 3100 studied specimens. Laboratory whitefly nymph bioassays with isolates Ed29a of *F. moniliforme*, Ed322 of *F. oxysporum*, and Ed22 of *P. marquandii* showed 96 to 97.5% insect mortality with no significant differences ( $P < 0.05$ ) among them. *F. oxysporum* Ed322 produced no mortality when inoculated on tomato, bean, squash and maize seedlings (with and without injuries) compared to the 100% mortality caused by phytopathogenic strains, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

**Key words:** ecological reserve, entomopathogenic fungi, pest insects, whitefly bioassays

### Introduction

Tropical biodiversity has figured prominently in the news of the past few years as a potential source of new foods, pesticides, and drugs, which in turn, might contribute to its preservation. Conservation of biodiversity includes the conservation of variety, interactions between species and processes in ecosystems [1]. The discovery of useful products in tropical ecosystems would remind the world of how valuable these resources are [2].

To achieve conservation of biological diversity it is usually necessary to establish natural protected areas

of land or water with the intention of permanently preserving certain ecosystems or critical habitats for individual rare, important species, and biotic interactions. In addition, these areas are sources of valuable and rich biological resources, which contain a great diversity of organisms, and shelter many kind of biotic interactions (probably most unknown). In these natural laboratories, the study of organisms, biotic interactions, and ecological processes, can produce useful knowledge that could be applied to solve a sort of ecological and practical problems [3].

Over 70,000 species of fungi and 800,000 species of insects have been described. The abundance of

both fungi and insects, and their contact in a variety of habitats, provide these organisms an opportunity for interaction and coevolution [4]. Relationships between fungi and insects may be mutualistic, through commensal to obligatory pathogenic [5]. Studies on microbiological antagonisms of pest insects in natural protected areas have been conducted in countries like Russia [6] and Ecuador [7], and have identified potential biological control micro-organisms. Detailed studies of mycoparasite population dynamics and their hosts are necessary in order to determine their potential use as biocontrol agents [8].

The use of microbial insecticides in integrated pest management reduces dependence on chemical pesticides [9]. In particular, the use of entomopathogenic fungi as biocontrol agents has several advantages. One such example is their relatively narrow host ranges by targeting specific pest populations while preserving natural predators and other beneficial insects [3].

The aim of the present investigation was to isolate and to identify entomopathogenic fungi in the tropical forest and agricultural areas of El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico, to determine their potential use against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, and to contribute to the knowledge of biodiversity of this area.

## Materials and methods

### Collection site

The study was conducted at El Eden Ecological Reserve in the State of Quintana Roo, Mexico. This reserve is located at the north-eastern portion of the Yucatan Peninsula, at 21°13' N and 87°11' W, and an altitude of 5–10 m. The dry season is from December to April and the rainy season from May to November. The major ecosystems present in the reserve include: (1) a semideciduous dry tropical forest dominated by trees (up to 15 m in height), mixed with various species of shrubs, herbs, vines, and epiphytes, (2) secondary plant communities of various higher plants, (3) wetlands that include swamp forest, palm stands, savannahs, cattail, sawgrass swamps, and lagoons, and (4) a poorly developed agricultural area, east of the reserve. The four ecosystems contain 186 species of invertebrates and 136 species of vertebrates [10]. There are 50 rural farms in the agricultural area, each with an additional ~3 ha home gardens. The area has been clear-cut and cultivated for over 15 years using traditional agricultural practices of slash and burn

system. As in much of the Yucatan Peninsula, the production of traditional crops such as maize, bean, squash, and vegetables in El Eden reserve is heavily dictated by the rainy season. Three insect surveys were conducted during the 1996 dry season and the 1997 dry and rainy seasons in the tropical and agricultural areas. The mean rainfall in December 1996 was 48 mm with maximum and minimum temperature of 29 and 8.5°C, respectively. July and November 1997 had mean rainfall of 122 and 107 mm, respectively, and maximum and minimum temperatures of 36, 33 and 16, 17°C, respectively. The 1997 rainy season was delayed due to the El Niño phenomenon.

### Insect sampling

In the tropical forest, live insect samples were taken along 500 m transects. Ten random transects per survey were sampled. Samples of foliage, soil (20 cm deep), humus and tree bark were taken every 100 m on both sides of the transect. Foliage samples were taken by shaking the plants or by the help of a net as described by Morris [11]. The ten soil samples taken along each transect were mixed, and 1 kg representative subsample was taken for analysis. The same procedure was applied to bark and humus samples. Soil, humus and crushed tree bark were sieved (5 mm sieve), and insects were collected. A minimum of one hundred live insects was randomly selected from each order/species, in each sampling date in the tropical forest for laboratory studies.

In the agricultural area, 32 interviews were randomly conducted with local farmers to help found the principal pest insects, in December 1996, July and November of 1997. Some farms had no crops at the time of the study and therefore were not surveyed. Local farmers assisted in the surveys and directed us to infestations. To avoid border effect, a 1-ha area in the centre of each farm was sampled. Leaves, soil, and fruit samples were taken every 10 m for a total of 100 m in a zigzag pattern according to Taylor [12]. Samplings of soil and of insects from soil were as described above for the tropical forest. For sampling of insects from plants, these were first shaken and fallen insects collected as described by Morris [11]. Fruits were also collected and searched for insects.

The insects collected were grouped by origin (plant parts or soil). Twenty live individuals per group were selected at random and fixed in 70% ethanol for taxonomic identification. A minimum of one hundred live

insects was randomly selected per species and per sampling date for laboratory studies. The insects were maintained in sterile plastic Petri dishes containing a fragment of host plant material. Dead insects showing mycosis symptoms (i.e., abnormalities in the morphology, colour variation, conspicuous position of appendages) were also collected at random in both areas, and transported to the laboratory in sterile paper bags.

In the laboratory, live insects along with host leaf, bark, or fruit section were placed in sterile plastic vials and incubated at 25–28 °C at a photoperiod of 12:12 (D:L). Plant materials were replenished as needed. Daily observations were made and dead insects were recorded. Insects that died within 4 weeks following collection were considered as initially infected by pathogens. The dead insects were surface-sterilised with 0.5% sodium hypochlorite solution for 60 sec, then rinsed three times in sterile distilled water and dried with sterile absorbent paper. The treated insects were then placed in a moist chamber and periodically examined for fungal growth. Dead insects collected from the field were washed for 60 sec each with 0.5% sodium hypochlorite, 0.02% streptomycin sulphate (Laboratorios Pisa, JC, Mexico) solution, and 0.03% rifampicin (Laboratorios Lepetit, MO, Mexico) solution and then rinsed three times in sterile water, dried and placed in a moist chamber as described above.

### **Insect identification**

Insects were identified by species using previously described methods and keys [13–20]. Some insects were identified by Juan Soria from the Departamento de Entomología, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Ministry of Agriculture, México. Voucher specimens were deposited with the Entomological Collection of this institution.

### **Isolation of fungi**

Fragments of mycelia and/or spores from sterilized insects were placed on Sabouraud dextrose agar (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) plates supplemented with 0.2% yeast extract (DIFCO) (SDAY medium), with or without antibiotics (0.005% chloramphenicol, La Campana, Cia. Medicinal, DF, Mexico) plus 0.03% rifampicin (Lepetit). Additional SDAY plates were

supplemented with 0.02% of rose Bengal (Hycel de Mexico, DF, Mexico). To further assess internal fungal pathogenicity, insects or insect fragments showing fungal growth were retreated with 0.5% sodium hypochlorite and antibiotics (0.02% streptomycin sulphate solution, and 0.03% rifampicin solution), and placed on SDAY plates with and without antibiotics. Plates were incubated at 25 °C in the dark. Fungi were transferred to fresh SDAY plates for colony isolation and identification.

### **Identification of fungi**

Fungi were identified according to previously described methods and keys, [21–25]. Isolates were preserved as spores in 10% glycerine (Baker, Mexico) and stored at 4 °C, or in liquid nitrogen at –196 °C. Vouchers of pure cultures established *in vitro* were deposited in the Laboratorio de Aleopatía, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and in the Laboratorio de Micología, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz. Two atypical *Fusarium* isolates were sent to Dr. W. Gams at the Centraalbureau Voor Schimmelcultures in the Netherlands for identification and were deposited with this institution.

### **Entomopathogenic potential of isolated fungi**

Criteria used to select potential microbial control agents among the fungal isolates included mainly, pathogenic interaction with the host by the isolation of the pathogen that caused the death of the insect (considering the pathogen as the fungus inside the insect that surfaces after the insect death according to the mechanism of infection of entomopathogenic fungi) [26]; frequency of isolation; speed of growth evaluated by measurements of the colony diameter in solid media (SDAY) after 15 d at 25 °C; conidial production on SDAY plates after 15 d at 25 °C; and literature review for entomopathogenicity [27]. Since microbial control agents should have an adequate growth in standard media with a high conidial production for future formulations [28], the isolates were evaluated by measurement of the colony diameter on solid media (SDAY) after 15 d at 25 °C; and conidial production on SDAY plates after 15 d at 25 °C. Conidial production was measured by pipetting 10 ml of sterile 0.1% Tween 20 (Sigma Co, St Louis, MO) in each

plate followed by scraping the culture with a sterile blade to harvest conidia. Conidial concentration was determined using a haemocytometer [27]. Determination of speed of growth and conidial production were done in four replicates in preliminary tests for all the isolates obtained (359), but repeated three times in different days for the seven isolates that showed faster growth and higher conidial production: Four isolates of *F. moniliforme*, two of *F. oxysporum* and one of *P. marquandii*. This last isolate was chosen because species of this genus are commonly entomopathogenic [29, 30].

### Whitefly bioassays

Three fungal isolates were finally selected for the whitefly bioassays: *F. moniliforme* Ed29a, *F. oxysporum* Ed322, and *P. marquandii* Ed22. A colony of greenhouse whiteflies (*T. vaporariorum*) was maintained on beans (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. Flor de Mayo) at the Instituto de Ecología greenhouse, UNAM. Leaves infested with third-instar nymphs were taken from plants on the day of the experiment, washed in deionized water, and dried with sterile absorbent paper. The sterile leaves infested with whitefly nymphs were examined under the stereomicroscope and third-instar ones were inoculated with  $5 \mu\text{l}$  of  $10^{-8}$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  suspension of each selected fungal isolate. Conidia suspensions were prepared in 0.1% Tween 20 (Sigma). Control nymphs were treated with sterile  $5 \mu\text{l}$  of 0.1% Tween 20. The experimental unit consisted of 20 whitefly nymphs arranged in a completely randomised design with five replicates and repeated three times. Assays were maintained at room temperature. Insect survival was evaluated 4 d after treatment, because in preliminary observations, one of the tested isolates achieved 100% mortality at day 4. Criteria for nymph mortality were insect mummification (nymph invasion and death by the fungus), and emergence of mycelia from the insect. Nymph's mortality by the fungus was verified by the microscopic observation of fungal specific sporulation from the mummified insects after their incubation in a humid chamber at room temperature. Mortality data were analysed by analysis of variance (ANOVA). When the overall F test was significant, means were separated by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

### Phytopathogenic potential of the most frequently isolated fungus, *Fusarium oxysporum*

Since *F. oxysporum* has been previously reported as a phytopathogenic fungus, we performed an experiment to test the phytopathogenicity of *F. oxysporum* isolate Ed322 against 3 week-old seedlings of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. c.v. Rio Grande), squash (*Cucurbita pepo* L.), bean (*Phaseolous vulgaris* L. c.v. Flor de Mayo) and maize (*Zea mays* L. c.v. Chinampero). The experimental unit was a 500-g pot containing four seedlings. The treatments assayed were: (1) *F. oxysporum* Ed322 microconidia, (2) *F. oxysporum* Ed322 macroconidia, (3) positive control, tomato seedlings inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (a tomato phytopathogenic strain), and squash, bean and maize seedlings inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (a phytopathogenic strain for these three crops), and (4) negative control, (seedlings inoculated with deionized sterile water). Within each treatment, two seedlings were injured and the other two were not. A 1-mm wide blade was used to make four injuries to the base of the seedlings. Stem bases or corresponding sites of injuries were inoculated with 1 ml of a  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  suspension. Care was taken to insure good and sustained contact of conidia suspension with the stem bases and at sites of injuries. Soil in pots was saturated to field capacity with sterilised water before inoculation to prevent absorption of the inoculae by the soil. Pots were maintained in the Instituto de Ecología, UNAM greenhouse, at 25 °C. Experiments were arranged in a completely randomised design with four replicates and repeated three times. Plant survival was evaluated 3 d after treatment.

## Results

### *Insects and fungi isolation*

In 1997 the rainy season was delayed due to the El Niño phenomenon and consequently few insects were collected during the July 1997 survey. In contrast, insects collected during the November 1997 survey (after the rainy season) were abundant. A total of approximately 3400 insects comprising 18 species (including two mummies) were collected from the two areas in the three surveys. Four species of insects were from the tropical forest and fourteen from the agricultural area.



From approximately 3400 collected insects in three different surveys, different anamorphic Ascomycetes were recovered. One isolate of *Aspergillus* sp., two of *Penicillium* sp, three of *Paecilomyces marquandii*, and three of *Verticillium* sp. out of 308 insects (2.9%) from three insect orders, Hymenoptera, Diptera and Isoptera in the tropical forest (Table 1). By contrast, numerous insects were collected in the agricultural area during the study period. Fourteen species comprising five orders were identified as pests of crops such as maize, beans and chilli but also of vegetables and fruits (Table 2). As a consequence, a higher number of fungal isolates were recovered from the agricultural area. Four mitosporic Ascomycetes were isolated with high frequency, three isolates from *Aspergillus parasiticus*, 100 of *Fusarium moniliforme*, one of *Aschersonia* sp., and 246 of *Fusarium oxysporum* out of 3100 insects (26.9% of total infected insects (350) or 11.3% of the total sampled insects). All fungi were isolated from 7 insect species in the agricultural area, from which four species belong to families of Homoptera (Membracidae, Cicadellidae, Aphididae and Aleyrodidae), two to Coleoptera (Nitidulidae, Chrysomelidae), and one to Lepidoptera (Noctuidae). The most frequently isolated fungal species was *F. oxysporum*, with 99 isolates out of 200 specimens of the treehopper, *Antianthe viridissima* (Homoptera: Membracidae) collected from chilli crops, 87 isolates out of 400 specimens of the chilli sap beetle, *Carpophilus lugubris* (Coleoptera: Nitidulidae), 30 isolates out of 100 specimens of *Aphis citricola* (Homoptera: Aphididae), and 30 isolates out of 100 specimens of *Dalbulus maydis* (Homoptera: Cicadellidae) (Table 2). *F. oxysporum* represented 70.2% of all fungal isolates from the agricultural area.

#### *Entomopathogenic potential of fungal isolates*

All the isolated fungi (Tables 1 and 2) had pathogenic relationship with their host insects, produced symptoms such as mummification, and have been previously reported as entomopathogens [23, 24, 28]. However, some species, such as *Aspergillus parasiticus* (anamorphic Trichocomaceae) and *Penicillium* sp. (anamorphic Trichocomaceae) are reported as phyto- and zoopathogenic, as well as human pathogens [31, 32]. For those reasons these species were not included in the present study. Also, *Aschersonia* sp. (anamorphic Clavicipitaceae), although reported as entomopathogenic [24], was not included in the study due to culture difficulties.

Two species of *Fusarium* (anamorphic Hypocreaceae), *F. moniliforme* and *F. oxysporum* were isolated as pathogens from 98.8% of the infected insects in the agricultural area. This high frequency suggested their role as natural enemies of insects. Both species were further tested for their entomopathogenic potential on *T. vaporariorum* whitefly. One species of *Paecilomyces marquandii* (anamorphic Trichocomaceae), isolated from *Solenopsis* sp. in the tropical forest was also selected as mentioned. Following the results of preliminary growth and conidia production tests, we chose four isolates of *F. moniliforme* (Ed134, Ed29a, Ed311a, and Ed313), two of *F. oxysporum* (Ed124 and Ed322), and one of *P. marquandii* (Ed22), to test for growth and conidia production. Table 3 shows the results of this bioassay. *F. moniliforme* Ed29a and *F. oxysporum* Ed322, two isolates with the highest sporulation, were selected for the whitefly pathogenicity assay. *P. marquandii* Ed22 was also selected because of previous reports on entomopathogenic *Paecilomyces* spp., e.g. *P. farinosus* and *P. fumosoroseus* have been reported as biological control agents of pest insects [29, 30].

Results of third-instar nymph *T. vaporariorum* bioassays showed a high insect mortality (96–97.5%) caused by the three isolates tested, with no significant differences ( $P < 0.05$ ) among them (Table 4). Infected nymphs showed different colour changes depending on the fungus, and when the emergent mycelium was again cultured, it showed the specific fungal sporulation of each species.

#### *Phytopathogenic potential of Fusarium oxysporum isolate (Ed322)*

Micro- and macroconidia of *F. oxysporum* Ed322 produced no mortality on inoculated tomato, bean, squash and maize seedlings (with and without injuries) compared to the 100% mortality caused by phytopathogenic strains, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (data not shown).

## **Discussion**

Complex communities, such as tropical forests, are considered stable. The impact of a sudden population change in one species will be cushioned by the large number of interacting species and will not produce drastic effects in the community as a whole. It has been suggested that such buffering mechanism

Table 1. Host insects and entomopathogenic fungi from the tropical forest at El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico

Insect species	Habitat sampled	Sample date <sup>a</sup>	Entomopathogenic fungi	% of infection isolates/100 <sup>b,c</sup>
<i>Musca</i> sp. <i>Diptera: Muscidae</i>	Mummy in soil forest	Dec. 1996 <sup>d</sup>	<i>Aspergillus</i> sp.	1/3 <sup>e</sup>
<i>Solenopsis</i> sp. [ants] <i>Hymenoptera: Formicidae</i>	Soil forest	Dec. 1996	<i>Penicillium</i> sp.	1
<i>Solenopsis</i> sp. <i>Hymenoptera: Formicidae</i>	Soil forest	July 1997 <sup>f</sup>	<i>Paecilomyces marquandii</i>	3
<i>Apis</i> sp. [bees] <i>Hymenoptera: Apidae</i>	Mummy in soil forest	Nov. 1997 <sup>g</sup>	<i>Penicillium</i> sp.	1/5 <sup>e</sup>
<i>Nasutitermes mexicanus</i> [termites] <i>Isoptera: Termitidae</i>	<i>Sabal</i> bark	Nov. 1997	<i>Verticillium</i> sp.	3

<sup>a</sup>Dec. = December; Nov. = November.

<sup>b</sup>Number of fungal isolates out of 100 insect individuals analysed, except mummies.

<sup>c</sup>Each fungal isolate corresponds to one individual insect.

<sup>d</sup>December 1996, dry season.

<sup>e</sup>Isolate/total number of mummies.

<sup>f</sup>In July 1997, because of "El Niño" phenomenon the rainy season had just started.

<sup>g</sup>November 1997, rainy season.

operates in tropical forest where insect outbreaks are unknown. This mechanism contrasts with cultivated communities where pest outbreaks are common [33]. In the present study no pest insects were observed in the tropical forest. Coley and Kursar [34] suggest that insect herbivores are rare in tropical forests because are highly regulated by the third trophic level. This fact may explain the lower number of insects found in El Eden tropical forest. In our study, whiteflies and fall armyworm eggs were found along the edge of the tropical forest near to the agricultural area, but none acting as a pest. Whiteflies sheltering in evergreen hosts and migration of adults, when no cultivated plants are present in the agricultural areas have been reported [35]; and may explain the presence of whiteflies and fall armyworm eggs in the tropical forest edge.

In contrast, pest insects were abundant in the agricultural area. The perturbed environmental conditions of this area are ideal for the proliferation of insects. The area has a low biodiversity and consequently pests' natural enemies are scarce. Whiteflies can cause a total loss of tomato and chili production, mainly due to virus infection transmission [36].

Anamorphic ascomycetes were the only entomopathogenic fungi found in insects collected in both study areas. Identified fungi genera were different in each area, except for *Aspergillus*. All of them

are first reports of insect pathogens from El Eden Ecological Reserve. *Paecilomyces marquandii* Ed22 isolated from *Solenopsis* sp., grows fast and causes a high nymph whitefly mortality in the bioassays performed. Different species in these genera have already been studied as mycoinsecticides [37, 38]. However, *P. marquandii* has been poorly studied. It has been investigated for its potential as a biological control agent of free living and plant-parasitic nematodes [39]; as a degrader of plastic materials [40]; and for its capability of producing leucinostatin, a peptide antibiotic with cytotoxic activity [41, 42]. Further studies on the isolated Ed22 *Paecilomyces marquandii* will show if this fungus could be a potential biological control agent against whiteflies.

The genus *Fusarium* was the most significant genus of fungi found in insects at El Eden agricultural area. It was isolated from 98.8% of the sampled insects that showed fungal infection (i.e. 350 infected specimens out of 3100 insects [11.3%] studied in this area). *F. oxysporum* was the most frequent species since it represented 70.3% of all fungal isolates (246 isolates out of 350 fungi). This species has received considerable attention from plant pathologists over the past 80 years because of its ability to cause vascular wilt or root rot diseases in a wide range of plants [43]. Despite the broad host range of the species

Table 2. Host plants, pest insect species, and entomopathogenic fungi from the agricultural area at El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico

Host plants	Pest insect species	Habitat sampled	Sample date <sup>a</sup>	Entomopathogenic fungi	% of infection isolates/100 <sup>b,c</sup>
–	infected insect (non-identified)	Soil	Nov. 1997 <sup>d</sup>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	3
<i>Carica papaya</i> (Papaya) <sup>e</sup> [ <i>Caricaceae</i> ] <sup>f</sup>	<i>Acanophora femoralis</i> (Treehoppers) [ <i>Homoptera</i> : <i>Membracidae</i> ]	Papaya leaves	Dec. 1996 <sup>g</sup>	<i>Fusarium moniliforme</i>	30
<i>Capsicum annuum</i> L. (Jalapeño chilli) [ <i>Solanaceae</i> ]	<i>Antianthe viridissima</i> (Treehoppers) [ <i>Homoptera</i> : <i>Membracidae</i> ]	Chilli leaves	Dec. 1996	<i>Fusarium oxysporum</i>	52
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Carpophilus lugubris</i> (Chilli sap beetle) [ <i>Coleoptera</i> : <i>Nitidulidae</i> ]	Chilli fruits	July 1997 <sup>h</sup>	<i>F. oxysporum</i>	18
<i>Capsicum frutescens</i> (Habanero Chilli) [ <i>Solanaceae</i> ]	<i>A. viridissima</i>	Chilli leaves	Nov. 1997	<i>F. oxysporum</i>	22
<i>Capsicum frutescens</i>	<i>C. lugubris</i>	Chilli fruits	Dec. 1996	<i>F. oxysporum</i>	47
<i>Cucurbita pepo</i> (Squash) [ <i>Cucurbitaceae</i> ]	<i>Acalymma trivittata</i> [ <i>Coleoptera</i> : <i>Chrysomelidae</i> ]	Chilli leaves	July 1997	<i>F. oxysporum</i>	23
<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Conotelus stenoides</i> [ <i>Coleoptera</i> : <i>Nitidulidae</i> ]	Chilli fruits	Nov. 1997	<i>F. oxysporum</i>	24
<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Bemisia tabaci</i> (Whitefly) [ <i>Homoptera</i> : <i>Aleyrodidae</i> ]	Squash leaves	Nov. 1997	NFI	–
<i>Cucumis melo</i> L. (Melon) [ <i>Cucurbitaceae</i> ]	<i>Conotelus stenoides</i>	Squash leaves	Nov. 1997	NFI	–
<i>Cucumis sativus</i> L. (Cucumber) [ <i>Cucurbitaceae</i> ]	<i>Bemisia tabaci</i>	Squash leaves	Nov. 1997	NFI	–
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato) [ <i>Solanaceae</i> ]	<i>B. tabaci</i>	Tomato leaves	July 1997	NFI	–
<i>Sickingia salvadorensis</i> (Palo de rosa) [ <i>Rubiaceae</i> ]	<i>B. tabaci</i>	Tomato leaves	Nov. 1997	NFI	–
<i>Sickingia salvadorensis</i> (Palo de rosa) [ <i>Rubiaceae</i> ]	<i>Aphis citricola</i> (aphid) [ <i>Homoptera</i> : <i>Aphididae</i> ]	Palo de rosa leaves	Dec. 1996	<i>F. oxysporum</i>	30

Table 2. Continued

Host plants	Pest insect species	Habitat sampled	Sample date <sup>a</sup>	Entomopathogenic fungi	% of infection isolates/100 <sup>b,c</sup>
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Bean) [ <i>Fabaceae</i> ]	<i>Zabrotes subfasciatus</i> (Bean grub) [ <i>Coleoptera</i> : <i>Bruchidae</i> ]	Bean fruits	July 1997	NFI	–
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>B. tabaci</i>	Bean leaves	July 1997 Nov. 1997	<i>Aschersonia</i> sp. NFI	1 –
<i>Zea mays</i> L. (Maize) [ <i>Poaceae</i> ]	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Fall armyworm) [ <i>Lepidoptera</i> : <i>Noctuidae</i> ]	Maize leaves	July 1997 Nov 1997	<i>F. moniliforme</i> <i>F. moniliforme</i>	17 13
<i>Zea mays</i>	<i>Dalbulus maydis</i> (Leafhoppers) [ <i>Homoptera</i> : <i>Cicadellidae</i> ]	Maize leaves	July 1997 Nov. 1997	<i>F. moniliforme</i> <i>F. oxysporum</i>	40 30
<i>Citrus</i> spp. (Citrus fruits: Orange, lemon, tangerine) [ <i>Rutaceae</i> ]	<i>Atta</i> sp. (Leaf-cutting ant) [ <i>Hymenoptera</i> : <i>Formicidae</i> ]	Citrus leaves	Dec. 1996 July 1997 Nov. 1997	NFI NFI NFI	– – –
<i>Citrus</i> spp.	<i>Anastrepha ludens</i> (Mexican fruit fly) [ <i>Diptera</i> : <i>Tephritidae</i> ]	Citrus fruits	July 1997 Nov. 1997	NFI NFI	– –
<i>Citrus</i> spp.	<i>Carphophilus humeralis</i> (Sap beetle) [ <i>Coleoptera</i> : <i>Nitidulidae</i> ]	Citrus fruits	July 1997 Nov. 1997	NFI NFI	– –
<i>Citrus</i> spp.	<i>Phyllocnistis citrella</i> (Citrus leaf miner) [ <i>Lepidoptera</i> :] <i>Gracillariidae</i>	Citrus leaves	Nov 1997	NFI	–

<sup>a</sup>Dec. = December; Nov. = November.

<sup>b</sup>Number of fungal isolates out of 100 insect individuals analysed.

<sup>c</sup>Each fungal isolate corresponds to one individual insect.

<sup>d</sup>November 1997, rainy season.

<sup>e</sup>Family/order in brackets.

<sup>f</sup>Common name in parenthesis.

<sup>g</sup>December 1996, dry season.

<sup>h</sup>Because of "El Niño" phenomenon the rainy season had just started.

NFI = no fungal isolates could be recovered from 100 processed individual insects.

Table 3. Growth and conidial production of selected fungal isolates

Fungal isolate	Insect host	Habitat sampled	Growth <sup>a</sup> (cm) <sup>b</sup>	Sporulation <sup>a</sup> (conidia ml <sup>-1</sup> × 10 <sup>6</sup> ) <sup>b</sup>
<i>F. moniliforme</i> (Ed134) <sup>c</sup>	<i>Acanophora femoralis</i>	Papaya leaves	8.95 ± 0.3	5.35 ± 1.2
<i>F. moniliforme</i> (Ed 29a)	<i>Dalbulus maydis</i>	Maize leaves	8.98 ± 0.26	178 ± 11.23
<i>F. moniliforme</i> (Ed311a)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maize leaves	8.92 ± 0.21	150 ± 10.59
<i>F. moniliforme</i> (Ed313)	<i>D. maydis</i>	Maize leaves	8.98 ± 0.22	2.34 ± 0.56
<i>F. oxysporum</i> (Ed124)	<i>Antianthe viridissima</i>	Chilli leaves	8.89 ± 0.28	2.77 ± 1.06
<i>F. oxysporum</i> (Ed322)	<i>Carpophilus lugubris</i>	Chilli fruits	8.96 ± 0.27	192 ± 11.47
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Ed22)	<i>Solenopsis</i> sp.	Soil forest	8.19 ± 0.33	31.1 ± 8.61

<sup>a</sup>Each value represents the mean ± standard deviation of three different experiments. Four replicates were made in each experiment

<sup>b</sup>Growth measurement (colony diameter) and conidia ml<sup>-1</sup> are reported at 15 d incubation on SDAY medium at 25 °C.

<sup>c</sup>(Ed = El Eden; first number = date of collect; subsequent numbers=internal keys).

Table 4. Percentage of mortality in third-instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* caused by selected fungal isolates

Fungal isolates	Mortality (%) <sup>a,b</sup>
Control <sup>c</sup>	0
<i>F. moniliforme</i> (Ed29a) <sup>d</sup>	96.6 ± 3.84
<i>F. oxysporum</i> (Ed322)	97.5 ± 3.19
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Ed22)	95.94 ± 3.12

<sup>a</sup>Each value represents the mean ± standard deviation of three different experiments. Four replicates were made in each experiment.

<sup>b</sup>Evaluated with a suspension of 10<sup>8</sup> conidia ml<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup>Sterile 0.1% Tween 20.

<sup>d</sup>(Ed = El Eden; first number = date of collect; subsequent numbers = internal keys).

as a whole, host specialization of individual isolates is more circumscribed. Isolates with the same or similar

host ranges are assigned to special forms (f. sp.) and more than 70 f. sp. have been described for *Fusarium* [44]. More often, host range is restricted to a few plant species. For example, although many plants may be symptomless carriers of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, it causes disease only in plants of the tomato genus *Lycopersicon* [45]. However, some f. sp. have broader ranges, such as *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, which in greenhouses can cause disease in members of several plant families other than tomato [46]. For example, *F. oxysporum* f. sp. *orobanche* was developed in the URSS as a weed killer in the seventies [47]. One isolate of *F. oxysporum* has been evaluated as a *Striga* killer in the dryland zones of Africa where this parasitic plant causes losses of 70% in sorghum and maize. In 1995 the results were dramatic, 85% of the *Striga* were wiped out at the seedling stage by this *Fusarium* isolate with the added advantage that it is not toxic to humans and causes no harm to cereal crops [48].

A large number of *Fusarium* spp. are entomopathogenic; some are weak, facultative pathogens, especially of Lepidoptera and Coleoptera, and they

colonise their dead host as saprophytes. Kuruvilla and Jacob [49] found that in many cases all insect life stages (*Nilaparvata lugens*), including eggs, are susceptible to *Fusarium*. Highly entomopathogenic species are reported primarily from Homoptera and Diptera [50]. *F. moniliforme* is an extremely common species. Feng-Yan and Qing-Tao [51] reported that 21% of 180 *Fusarium* isolates from 150 dead insects were identified as *F. moniliforme*. *Fusarium oxysporum* is also very common. It has been reported to be highly virulent to larvae of the mosquito, *Aedes detritus*, to larvae of the rice green-horned caterpillar, *Melanitis leda*, and to eggs of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. It has been also isolated from the aphids *Brevicoryne brassicae*, whiteflies on citrus, and scarab larvae [51].

*Fusarium* isolates from El Eden were principally from homopteran hosts. Isolates *F. moniliforme* Ed29a and *F. oxysporum* Ed322 were highly virulent to third-instar nymphs of *T. vaporariorum* in the laboratory. Research on the adverse effects of this fungus on beneficial organisms (including mammals and plants) revealed both harmful as well as safe *Fusarium* isolates in nature [50]. In the present study we observed that Ed322 isolate of *F. oxysporum* was safe for tomato, squash, bean, and maize seedlings. Studies on the potential use of entomopathogenic *Fusarium* species as insect controllers are rare. We concur with previous reports [50] of a need for further studies of *Fusarium* species as potential microbial agents.

### Acknowledgements

This work is a part of the Ph.D. thesis of Andrea Torres-Barragán who thanks the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México for the scholarship granted during her studies. We also thank the United States Department of Agriculture for the support of this project (Mx-AES-6 grant FG-Mx-107), M.Sc. Gloria Carrión and Dr. Walter Gams for the identification of fungi, M.S. Juan Soria Morales for the identification of insects, Dr. Sira M. Dabo and Dr. Rocio Cruz Ortega for their revision and valuable comments of the manuscript.

### References

1. Mishra SC. Role of termites on decomposition process in agroforestry ecosystem and their non-toxic control strategy. *Indian Forest* 1997; 123: 851–859.
2. Balick MJ, Elisabetsky E, Laird SA. Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health. New York: Columbia University Press, 1996.
3. Van Driesche RG, Bellows TS. Biological control. New York: Chapman Hall, 1996.
4. Murrin F. Fungi and Insects. In: Howard DH, Miller JD, eds. *The Mycota*, Vol. VI, Human and animal relationships. Berlin: Springer Verlag, 1996: 365–388.
5. Charnley AK. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Wicklow DT, Söderström B, eds. *The Mycota*, Vol. IV. Berlin: Springer-Verlag, 1997: 185–201.
6. Allen GE, Ignoffo CM, Jacques RP. Microbial control of insect pests: future strategies in pest management systems. Selected papers from NSF-USDA-University of Florida workshop, held at Gainesville, Florida on January 10–12, 1978. *Gov Rep Announ & Index (GRA&I)*, 1980: Issue 05.
7. Ellison CA, Evans HC. Amazon -ingly useful fungi- a biological control cornucopia? *Mycologist* 1996; 10: 11–13.
8. Jeffries P. Mycoparasitism. In: Wicklow DT, Söderström B, eds. *The Mycota*, Vol. IV. Environmental and microbial relationships. Berlin: Springer-Verlag, 1997: 149–164.
9. Butt TM, Jackson CW, Magan N. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Bristol: Cabi Publishing, 2001.
10. Gómez-Pompa A. La vegetación en la zona Maya. In: Schmidt P, de la Garza M, Nalda E, eds. *Los Mayas*. México: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional de Antropología e Historia, 1998: 39–51.
11. Morris FF. Sampling insect populations. *Ann Rev Entomol* 1960; 5: 243–264.
12. Taylor LR. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. *Ann Rev Entomol* 1984; 29: 321–357.
13. Peterson A. Larvae of insects, Part I: Lepidoptera and plant infesting hymenoptera. Michigan: Edwards Brothers Inc., 1973.
14. Ramos de Mejía, A. Guía Ilustrada para la Identificación de Adultos de Moscas (Diptera-Tephritidae) que Afectan a la Fruta en México y de Especies Exóticas de Importancia Cuarentenaria. México: Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1975.
15. Coronado R, Márquez A. Introducción a la Entomología, Morfología y Taxonomía de Insectos. México: Limusa, 1982.
16. Thaw J. Pest identification notebook materials. USA: Professional Development Center, Plant Protection Quarantine, 1988.
17. Garham JR, ed. Insect and mite pest in food, an illustrated key. Agriculture handbook No. 655, Vols. 1 and 2. Washington, DC: United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service/United States Department of Health and Human Services/Public Health Service/Food and Drug Administration, 1990.
18. Urias-Morales C, Rodríguez-Montessoro R, Alejandro T. Áfidos como Vectores de Virus en México, Vol. II. Identificación de Áfidos de Importancia Agrícola. México: Colegio de Postgraduados, 1992.
19. Ortega-Arenas LD. Colecta, montaje y determinación de Aleyrodidae. *Fitofilo* 1995; 88: 53-70.

20. Domínguez RR, Ayala OJL, Rodríguez HC, Domínguez RB, Sánchez AH. Plagas Agrícolas. México: Universidad Autónoma de Chapingo, 1998.
21. Gams W. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1971.
22. Balazy S. A review of entomopathogenic species of the genus *Cephalosporium* Corda (Mycota, Hyphomycetales). Bull Soc Amis Sci Lettres Poznan Serie D 1973; 14: 101–137.
23. Poinar GO, Thomas GM. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. New York: Plenum Press, 1984.
24. Samson RA, Evans HC, Latgé JP. Atlas of entomopathogenic fungi. The Netherlands: Springer Verlag, 1988.
25. Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan Publishing, 1989.
26. St Leger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Can J Bot 1995; 73: S1119–S1125.
27. Goettel MS, Inglis D. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA, ed. Manual of techniques on insect pathology. San Diego, CA: Academic Press, 1997: 213–249.
28. Lacey LA. Manual of Techniques in insect pathology. San Diego, CA: Academic Press, 1997.
29. Osborne LS, Landa Z. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. Bulletin OILB/SROP 1994; 17: 201–206.
30. Pendland JC, Hung SY, Boucias D. *In vivo* development of the entomogenous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. Mycopathologia 1995; 30: 151–158.
31. Agrios GN. Plant pathology. San Diego, CA: Academic Press, 1997.
32. De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmecultures/Universitat Rovira i Virgili, 1995.
33. Mackenzie A, Ball AS, Virdee SR. Instant notes in ecology. New York: Bios Scientific Publishers, Springer-Verlag, 1998.
34. Coley PD, Kursar A. Herbivoría, defensas vegetales y enemigos naturales en bosques tropicales. In: Anaya AL, Espinosa-García FJ, Cruz-Ortega R, eds. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. México: Instituto de Ecología, UNAM, Plaza y Valdés, S.A. de C.V., 2001: 401–424.
35. Sorensen JT, Grill RJ, Dowell RV, Garrison RW. The introduction of *Siphoninus phillyreae* (Holiday) (Homoptera: Aleyrodidae) into North America: niche competition, evolution of host plant acceptance and prediction of its potential range in the Nearctic Pan-Pac. Entomology 1990; 66: 43–54.
36. Brown JK. An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin. FAO Plant Prot Bull 1991; 39: 5–23.
37. Osborne LS, Landa Z. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Fla Entomol 1992; 75: 456–471.
38. Smith P. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. Biocontrol News Inf 1993; 14: 71N–78N.
39. Esnard J, Marban-Mendoza N, Zuckerman BM. Effects of three microbial broth cultures and an organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. Eur J Plant Pathol 1998; 104: 457–463.
40. Brandl H, Bachofen R, Mayer J, Wintermantel E. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. Can J Microbiol 1995; 41: 143–153.
41. Rossi C, Tuttobello L, Ricci M, Casinovi CG, Radics L. Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. J Antibiot Tokyo 1987; 40: 130–133.
42. Crebelli R, Carere A, Conti G, Conti L, Rossi C, Tuttobello L. Evaluation on the mutagenic activity of leucinostatins, a novel class of antibiotic peptides produced by *Paecilomyces marquandii*, in the mold *Aspergillus nidulans*. Microbiology 1988; 11: 299–305.
43. Kistler HC. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathol 1997; 87: 474–479.
44. Armstrong GM, Armstrong JK. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ, eds. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1981: 391–399.
45. Katan J. Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. Phytopathol 1971; 61: 1213–1217.
46. Menzies JG, Koch C, Seywerd F. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Dis 1990; 74: 569–572.
47. Franz JM, Krieg A. *Biologische Schaedlingsbekaempfung*. Berlin: Parrey, 1976.
48. Ciotola M, Watson AK, Hallett SG. Discovery of an isolate of *Fusarium oxysporum* with potential to control *Striga hermonthica* in West Africa. Weed Res 1995; 35: 303–309.
49. Kuruville S, Jacob A. Comparative susceptibility of nymphs and adults of *Nilaparvata lugens* to *Fusarium oxysporum* and its use in microbial control. Agric Res J Kerala 1979; 17: 287–288.
50. Teetor-Barsh GH, Roberts DW. Entomogenous *Fusarium* species. Mycopathologia 1983; 84: 3–16.
51. Feng-Yan B, Quing-Tao C. *Fusarium* species on some insects from China. Acta Mycol Sin 1991; 10: 120–128.

*Address for correspondence:* Dr. Ana Luisa Anaya, Instituto de Ecología, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, AP 70-275, 04510, México D.F., México  
 Phone: (52 55) 5622-9032; Fax: (52 55) 5622-9043;  
 E-mail: alanaya@miranda.ecologia.unam.mx





---

---

## **5.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS CON POTENCIAL ENTOMOPATÓGENO**

---

---

A continuación se describen los aislamientos de los hongos que, por sus características culturales y su interacción con el insecto hospedero del que fueron aislados, se consideraron con potencial como agentes de control biológico. El muestreo de los insectos y el aislamiento y cultivo de los hongos se realizó como se describió en el capítulo anterior (Torres-Barragán y colaboradores, 2004).

### **MEDIOS EMPLEADOS PARA LA DESCRIPCIÓN**

Colonias de 7 y 15 días de crecimiento en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura (SDA-EL) más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomycin, 200 mg/L). En el caso de *Paecilomyces marquandii* se empleó también el medio de cultivo malta-agar. Las colonias fueron mantenidas a 25°C con un fotoperíodo de 12:12. Para la descripción microscópica se realizaron montajes semipermanentes en una gota de lactofenol blanco y azul de algodón. Se realizaron también montajes permanentes en alcohol polivinílico de acuerdo con el método propuesto por Humber (1997) (Anexo 8.3).

Se realizaron microcultivos en portaobjetos escavados con medio de cultivo SDA-EL según la metodología propuesta por Goettel e Inglis (1997), para observar el desarrollo de los hongos en el tiempo.

Los aislamientos se identificaron con base en las claves y metodologías propuestas por Barnett y Hunter (1989), Poinar y Thomas (1984), Samson y colaboradores (1988), Balazy (1973) y Gams (1971). Dos aislamientos atípicos fueron enviados al Dr. W. Gams del Centraalbureau Voor Schimmelcultures en Netherlands para su determinación. Se empleó la carta de colores de Kornerup, y Wanscher. (1978) para la descripción de las cepas.

## DESCRIPCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

### **Ed124: *Fusarium oxysporum*** (Schlechtend.)

Insecto del que fue aislado: Periquito del Chile (*Antianthe viridissima*, Homoptera: Membracidae).

**Colonia** en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomicina, 200 mg/L), 25°C. Aterciopelada cuando joven y algodonosa a farinácea a los quince días. De 73 mm de diámetro a los siete días, 82 mm a los quince. Blanca-rosácea con ligeras estrías que van del centro a la periferia, con secciones blanco rosáceo (11A2). Por el reverso las estrías son más evidentes y profundas. El centro es rosa grisáceo (12B3) y el resto blanco amarillento con secciones rojo grisáceo (7B3). Los cultivos maduros presentan gúttulas hialinas.

**Micelio** aéreo septado de 3-6  $\mu$  de ancho. Algunas hifas se encuentran fasciculadas formando estructuras semejantes a cordones miceliales. Gránulos cromofílicos de color rojo (11B1). **Celulas conidiógenas** fialídicas, semimacronematosas, cónicas a forma de botella, lisas, hialinas, simples o ramificadas en 2 o 3, con un septo basal perpendicular a la hifa que lo sostiene, de 3-4  $\mu$  de ancho por 6-15(21)  $\mu$  de largo. **Conidios** producidos simplemente o agregados en pequeñas cabezuelas, unicelulares, lisos, hialinos, ovales a elipsoidales, los más grandes son ligeramente curvados, de 3-5  $\mu$  de ancho por (4)7-10(15)  $\mu$  de largo. La formación de los conidios se observa después de 48 h en microcultivo, La primera célula conidial en formarse es mayor a las subsiguientes. **Clamidosporas** intercalares y terminales de 7-14  $\mu$  de diámetro. Gran cantidad de **blastosporas** globosas (3-11  $\mu$ ) en los cultivos más viejos.

### **Ed134: *Fusarium moniliforme*** (J. Sheldon)

Insecto del que fue aislado: Periquito de la papaya, (*Acanophora femoralis*, Homoptera: Membracidae).

**Colonia** en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomicina, 200 mg/L), 25°C. Algodonosa de 55 mm de diámetro en 7 días, 83 mm a los quince. Naranja pálido (5A3), con un halo rosáceo blanquecino en los bordes cuando joven, zonada, con el centro amarillo a verde amarillento y bordes de color blanquecino cuando madura. Revés zonado con el centro naranja café (5B8) hasta amarillo dorado (5B8), con un halo amarillo-claro (4A4) hacia

el borde y el límite translúcido. Al destapar la caja se desprende un olor semejante a vinagre o fermentado. **Micelio** septado, hialino, de 2  $\mu$  de ancho cuando joven hasta 3  $\mu$  (4  $\mu$ ) cuando madura. Algunas hifas fasciculadas formando estructuras semejantes a cordones miceliales. Con gránulos cromofílicos de color amarillento. **Células conidiógenas** filídicas simples, hialinas, con un collarete conspicuo en su ápice, en forma de botella cuando jóvenes, posteriormente cónicas y finalmente rectas, 2-3  $\mu$  de ancho por 7-14  $\mu$  (29  $\mu$ ) de largo. **Conidios** simples o agrupados en pequeñas cabezuelas, unicelulares, lisos, hialinos, de forma ovoide a elipsoide con un extremo angosto, y ligeramente curvados cuando más viejos, 3-4  $\mu$  de ancho por 4-13(18)  $\mu$  de largo. La formación del primer conidio se da a las 48 h en microcultivo y es ligeramente más grande que los subsiguientes. **Clamidosporas** intercalares y terminales de forma irregular presentes de 3-6(8)  $\mu$  de ancho por 13  $\mu$  de largo. **Blastosporas** de 2 a 7  $\mu$  de diámetro. Estructuras semejantes a ascas en la parte más vieja del micelio.

#### **Ed29a: *Fusarium moniliforme***

Insecto del que fue aislado: Chicharrita del maíz (*Dalbulus maydis*, Homoptera: Cicadellidae).

**Colonia** en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomycin, 200 mg/L), 25°C. Algodonosa de 53 mm de diámetro a los siete días, 81 mm a los quince. Blanco rosácea (9A2) cuando joven, zonada desde amarillo verdoso (1A7) al centro hasta amarillo claro (4A4) y el borde translucido cuando madura. Reverso amarillo naranja (4B7) con los bordes amarillo claro (4A4) cuando joven y de color naranja-oscuro (5A8) cuando madura. **Micelio** septado de 3  $\mu$  a 5  $\mu$  de ancho y hasta 7  $\mu$  cuando más vieja. Las hifas presentan gránulos cromofílicos de color amarillento cuando maduran. Hifas fasciculadas y enrolladas presentes. **Células conidiógenas** filídicas, cónicas, hialinas, lisas, simples o ramificadas en 2 ó 3, de 2-4  $\mu$  de ancho por 10-15  $\mu$  de largo, normalmente presentan un septo basal aunque en algunas no se observa. **Conidios** simples o producidos en una pequeña cabezuela, unicelulares, lisos, hialinos, los más pequeños tienden a ser ovoides y los más grandes elipsoides con un extremo angosto, de 2-4  $\mu$  de ancho por 6-10(15)  $\mu$  de largo. La formación del primer conidio ocurre a las 48 h en microcultivo el cual es mayor a los subsiguientes. **Clamidosporas** terminales e intercalares de 4 a 9  $\mu$  de diámetro. **Blastosporas** de 3 a 4  $\mu$  de diámetro en el micelio más viejo (Figura 5.2.1).

**Ed311a: *Fusarium moniliforme***

Insecto del que fue aislado: Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Nuctidae).

**Colonia** en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomina, 200 mg/L), 25 °C. Algodonosa de 63 mm de diámetro a los siete días, 83 mm a los quince. Blanca amarillenta con el centro naranja claro (5A4) y los bordes de la colonia blancos, cuando joven. Zonada con el centro amarillo claro (4B4) seguido de un halo morado y el límite lila cuando madura. Revés amarillento con el centro de color naranja (5B8) cuando joven. Zonada de color amarillo-naranja (4B7) al centro, seguida de un halo naranja oscuro (5B8), otro halo amarillo-naranja, otro halo café y el borde amarillo claro (4A4) cuando madura. **Micelio** septado, hialino, de 2.5  $\mu$  de ancho. Con algunas hifas fasciculadas formando estructuras semejantes a cordones miceliales. Gránulos cromofílicos de color amarillento. **Células conidiógenas** fialidicas, simples a ramificadas de 2-3  $\mu$ , lisas, hialinas, con un septo basal perpendicular a la hifa que las sostiene, ligeramente abotelladas cuando jóvenes, de cónicas a rectas cuando maduran, 3  $\mu$  de ancho y de 10-13  $\mu$  de largo cuando cónicas hasta 7-22(26)  $\mu$  de largo cuando rectas. **Conidios** simples o producidos en una pequeña cabezuela, unicelulares, lisos, hialinos, ovoides a elipsoides con un extremo afilado, de 2-3(4)  $\mu$  de ancho y de 4-12(16)  $\mu$  de largo. La formación del primer conidio ocurre a las 48 h en microcultivo el cual es mayor a los subsiguientes. Gran cantidad de *blastosporas* de 1-3  $\mu$  de diámetro.

**Ed313: *Fusarium moniliforme***

Insecto del que fue aislado: Chicharrita del maíz (*Dalbulus maydis*, Homoptera: Cicadellidae).

**Colonia** en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomina, 200 mg/L), 25°C. Algodonosa de 58 mm de diámetro a los siete días. Blanco-naranja (6A2) cuando joven, zonada con el centro lila, un halo de color grisáceo y el borde blanquecino cuando madura. Revés con el centro naranja-café (6C8) con halos intercalares de color naranja (6A7) cuando joven, naranja oscuro (5A8) cuando madura y el borde de la colonia translucido cuando joven y blanco naranja (6A2) cuando madura. **Micelio** septado de 3  $\mu$  de ancho cuando joven y hasta 6  $\mu$  de ancho cuando madura. Algunas hifas fasciculadas formando estructuras semejantes a cordones miceliales que presentan una gran cantidad de fialides a lo largo

de ellos (sinematoso). Granulos cromofílicos de color amarillento al madurar. **Células conidiógenas** fialídicas, simples, excepcionalmente pueden encontrarse ramificadas en dos, lisas, hialinas, con un septo basal y perpendicular a la hifa que las sostiene, de forma de botella cuando pequeñas, posteriormente toman una forma cónica llegando a ser rectas. Las de forma de botella miden 2-3  $\mu$  de ancho y 6-12  $\mu$  de largo, las fialides más largas y rectas miden 3  $\mu$  de ancho por 25-29(43)  $\mu$  de largo. **Conidios** simples o producidos en una pequeña cabezuela, unicelulares o con un septo transversal, lisos, hialinos, elipsoides con un extremo ligeramente agudo 3-4(6)  $\mu$  de ancho por 10-17(20)  $\mu$  de largo, los más grandes presentan una ligera curvatura. La formación del primer conidio ocurre a las 48 h en microcultivo el cual es mayor a los subsiguientes. **Clamidosporas** intercalares y terminales, irregulares de 4-5  $\mu$  de ancho por 14  $\mu$  de largo. **Blastosporas** de 2-4  $\mu$  de diámetro y estructuras semejantes a ascas de *Nectria* en la parte más vieja de la colonia.

#### **Ed322: *Fusarium oxysporum***

Insecto del que fue aislado: Barrenillo del chile (*Carpophilus lugubris*, Coleoptera: Nitidulidae).

**Colonia** de siete días de crecimiento en Sabouraud-dextrosa-agar más extracto de levadura más antibióticos (cloranfenicol, 50 mg/L, sulfato de estreptomycin, 200 mg/L), 25°C, de 60 mm de diámetro, 83 mm a los quince. Aterciopelada tendiendo a farinosa conforme madura, de color blanco rosáceo (11A2), rosa-grisáceo (12B3) cuando madura. Los bordes de la colonia permanecen translúcidos; con estrías profundas de color rosa-grisáceo (12B3) que parten del centro hacia la periferia. Revés de la colonia naranja pálido (5A3) con el centro ligeramente rosa-grisáceo cuando joven a amarillo dorado (5B7) cuando madura. El centro de la colonia se torna de color lila-rojizo (14C3) hasta magenta grisáceo (14E3). En colonias maduras se observa una gran cantidad de gúttulas. Aproximadamente a los 15 días de crecimiento, se forman estructuras semejantes a un estroma de color blanquecino y formadas por un tejido pseudoparenquimatoso que podrían indicar el inicio de la fase sexual (*Hypocrea*). **Micelio** de 3-4  $\mu$  de ancho, hialino, con hifas fasciculadas semejantes a cordones miceliales. Gránulos cromofílicos de color rojizo presentes. **Células conidiógenas** fialídicas, hialinas, de forma de botella, con un collarite y un septo basal no muy evidente; simples, ocasionalmente ramificadas de 2 a 4(6), de 3  $\mu$  de ancho por 8-15(27)  $\mu$  de largo. **Conidios** simples o agrupados en una pequeña cabezuela, lisos,

hialinos, ovoides a elipsoides con un extremo agudo, de 3-4  $\mu$  de ancho por 4-7(15)  $\mu$  de largo. La formación del primer conidio se da a las 64 h en microcultivo y es ligeramente más grande que los subsiguientes. **Clamidosporas** intercalares y terminales de 3 a 6  $\mu$  de diámetro. **Blastosporas** de 1  $\mu$  de diámetro en el micelio más maduro (Figura 5.2.2).

**Ed22: *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes**

Insecto del que fue aislado: Hormiga de fuego (*Solenopsis* sp, Hymenoptera: Formicidae).

**Colonias** en malta-agar crecen moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 5 a 7 cm en 2 semanas a 25 °C. En SDA-EL llegan a alcanzar un diámetro de 9 cm en el mismo tiempo. **Micelio** denso, aterciopelado, al principio blanco y se torna de color vino pálido a vino oscuro conforme madura. Reverso generalmente amarillo claro a amarillo-naranja. El borde de la colonia permanece translúcido-blanco. Olor ausente. **Hifas** vegetativas hialinas, de pared lisa, de 2.5 a 3.2  $\mu$  de ancho. **Estructuras conidiales** principalmente verticiladas, algunas veces sinematosas, especialmente en aislamientos frescos; **conidióforos** hialinos, de pared lisa, de 50-300  $\mu$  de largo por 2.5-3  $\mu$  de ancho y se originan de hifas sumergidas o lateralmente en hifas aéreas y consisten de ramificaciones verticiladas en grupos de 2 a 4 fiálides. **Fiálides** de 8-15  $\mu$  de largo por 1.5-2  $\mu$  de ancho, consisten de una porción basal corta de forma cilíndrica a elipsoidal, con un pequeño cuello en la punta (aproximadamente 1  $\mu$  de ancho). Los **conidios** se forman en cadenas divergentes secas, ligeramente elipsoidales a fusiformes, de pared suave a finamente rugosa, hialinos de color vino pálido cuando se encuentran en masa, de 3-3.5  $\mu$  de largo por 2-2.2  $\mu$  de ancho. Estructuras semejantes a *clamidosporas* generalmente presentes en el micelio sumergido, solitarias, de pared delgada, globosas a elipsoides de alrededor de 3.5  $\mu$  de diámetro (Figura 5.2.3).

### LEYENDAS A LAS FIGURAS 5.2.1-5.2.3

**FIGURA 5.2.1: CICLO BIOLÓGICO DE *FUSARIUM MONILIFORME* ED 29A.**

**0 h**, Conidios recién inoculados en un portaobjetos excavado con medio de cultivo SDA-EL. **20 h**, los conidios empiezan a germinar; posteriormente (**40 h**) la primera hifa se empieza a ramificar. **48 h**, se empieza a formar el micelio. **64 h**, se observa la formación de los primeros conidios en fiálides cónicas, hialinas y lisas. **72 h**, se observa que el hongo esta produciendo conidios unicelulares, lisos, hialinos, y de forma ovoide los cuales son producidos directamente sobre el micelio o en fiálides en algunos casos unidos por un mucílago que da la apariencia de una pequeña cabezuela.

**FIGURA 5.2.2: CICLO BIOLÓGICO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* ED 322.**

**0 h**, Conidios recién inoculados en un portaobjetos excavado con medio de cultivo SDA-EL. **20 h**, los conidios empiezan a germinar; posteriormente (**40 h**) el micelio se empieza a formar. **48 h**, micelio septado profusamente desarrollado. **64 h**, se observa la formación de los primeros conidios en células fialídicas, hialinas, de forma de botella. **72 h**, se observa que el hongo esta produciendo conidios unicelulares, simples o agrupados en una pequeña cabezuela, lisos, hialinos, ovoides a elipsoides con un extremo agudo los cuales pueden ser producidos directamente sobre el micelio o en fiálides simples y ocasionalmente ramificadas. Se observan también clamidosporas intercalares y terminales y la formación de blastosporas en el micelio más maduro.

**FIGURA 5.2.3: CICLO BIOLÓGICO DE *PAECILOMYCES MARQUANDII* ED 22.**

**0 h**, Conidios recién inoculados en un portaobjetos excavado con medio de cultivo SDA-EL. **20 h**, los conidios empiezan a germinar. **64 h**, el micelio se empieza a formar. **80 h**, se encuentran ya estructuras conidiales verticiliadas, los conidióforos son hialinos y de pared lisa, se originan de hifas sumergidas o lateralmente en hifas aéreas y consisten de ramificaciones verticiliadas en grupos de 2 a 4 fiálides. Las fiálides consisten de una porción basal corta de forma cilíndrica a elipsoidal, con un pequeño cuello en la punta. Los conidios se forman en cadenas divergentes secas, ligeramente elipsoidales a fusiformes.



**FIGURA 5.2.1: CICLO BIOLÓGICO DE *FUSARIUM MONILIFORME***

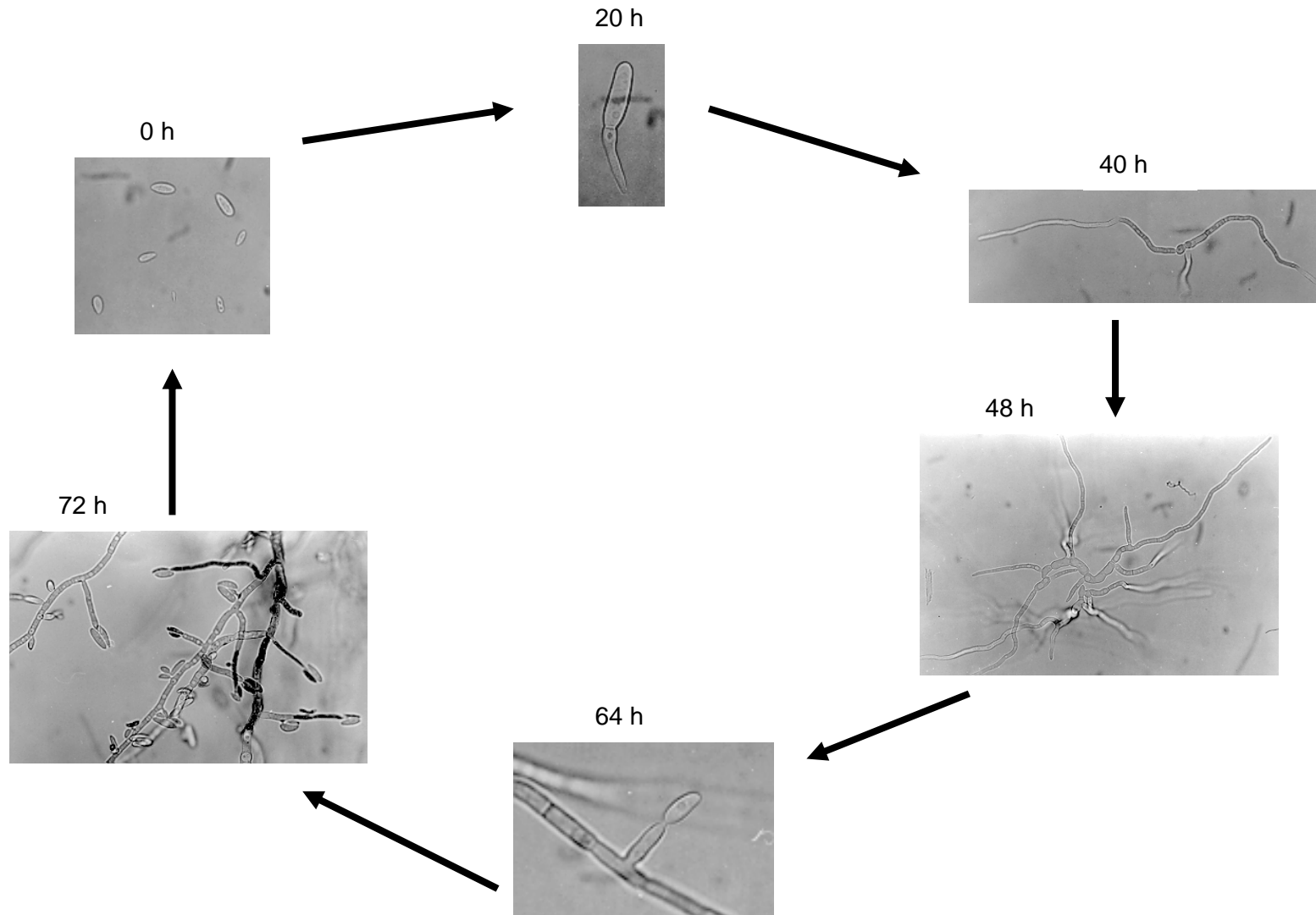
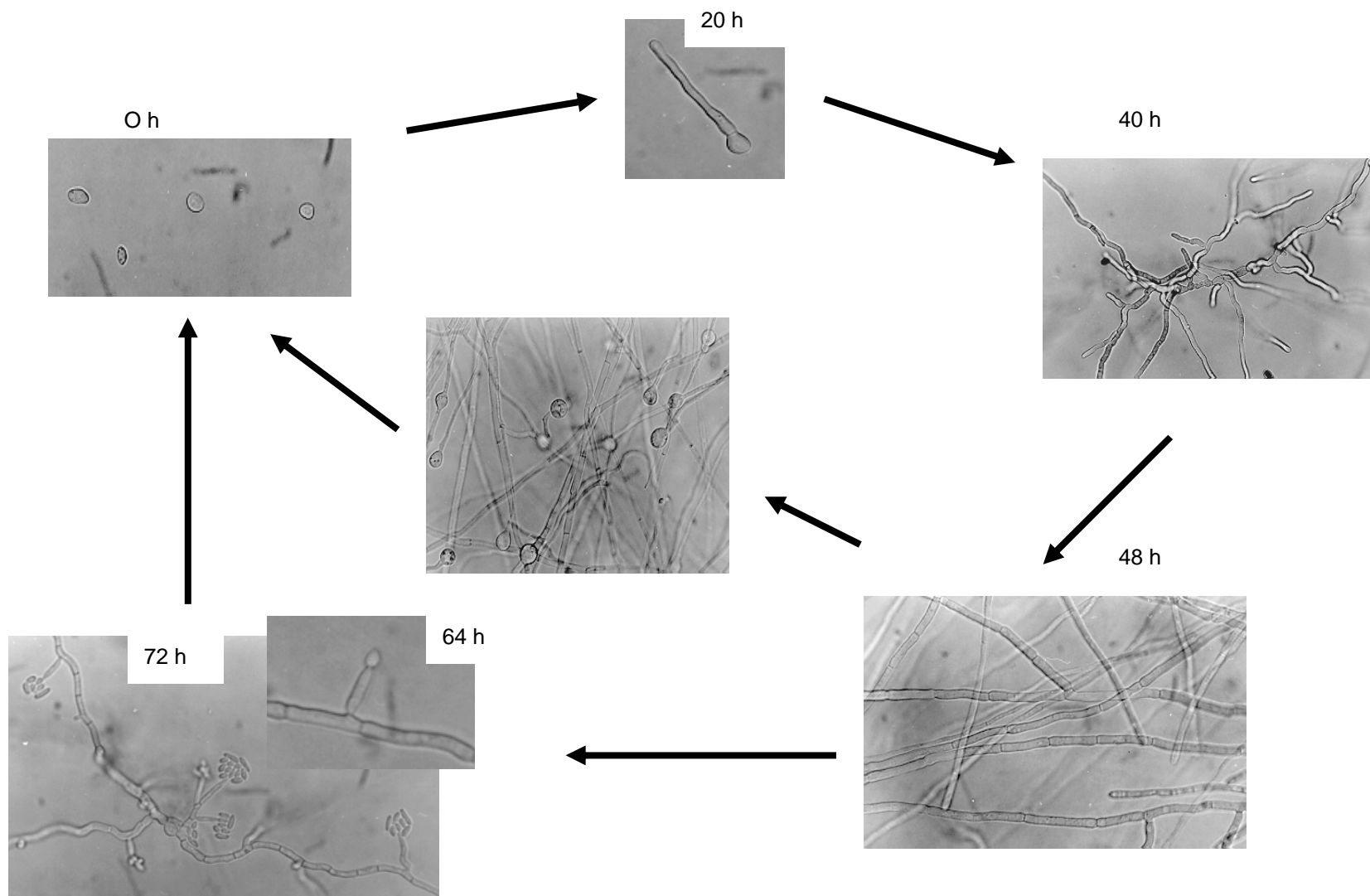
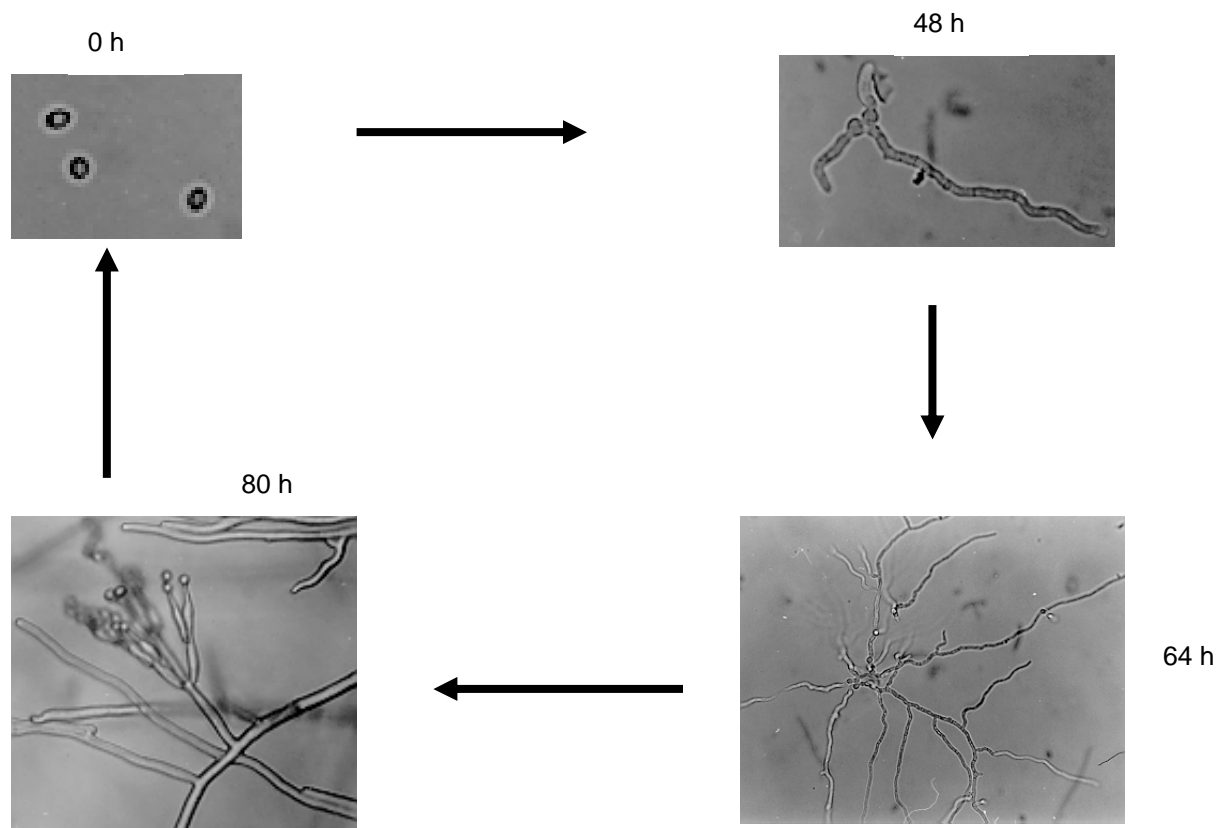


FIGURA 5.2.2: CICLO BIOLÓGICO DE *FUSARIUM OXYSPORUM*



**FIGURA 5.2.3: CICLO BIOLÓGICO DE *PAECILOMYCES MARQUANDII***



---

**5.3 CONSIDERACIONES EN LA PLASTICIDAD MORFOLÓGICA  
DE *ACREMONIUM*, *LECANICILLIUM* Y *FUSARIUM* Y SU EFECTO  
EN SU CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA**

---

Durante el transcurso de la presente investigación se observó que los aislamientos obtenidos de *Fusarium* no presentaban la morfología típica descrita para el género; en éstos se encontraron primordialmente microconidios y nunca se observaron macroconidios. Con base en los caracteres morfológicos observados, estos aislamientos se clasificaron primero dentro del género *Acremonium*; posteriormente, dentro del género *Verticillium*, y, finalmente, con ayuda del experto taxónomo, Dr. Walter Gams (Centraalbureau Voor Schimmelcultures, The Netherlands) dentro del género *Fusarium*.

Para ejemplificar las variaciones morfológicas observadas se eligió el aislamiento Ed322 de *Fusarium oxysporum*. En la Figura 5.2.1 (capítulo anterior) podemos observar la morfología de este aislamiento, el cual logra completar su ciclo de vida en 72 h. Es importante notar que la formación de los conidios se da a partir de células conidiógenas filídicas y, generalmente, agrupadas en pequeñas cabezuelas mucilaginosas, ésta fue la característica que nos causó mayor confusión.

En la Figura 5.3.1 podemos observar el ciclo patológico del aislamiento Ed322 de *F. oxysporum*. Dicho hongo fue aislado a partir del estadio inmaduro del barrenillo del chile (*Carpophilus lugubris*, Coleoptera: Nitidulidae) (5.3.1A). La Figura 5.3.1B muestra la morfología del hongo *in situ*, y la Figura 5.3.1C, un corte del insecto en donde se puede observar el interior de éste lleno de pequeñas esporas y blastosporas. Al realizar los postulados de Koch, se aisló a *F. oxysporum* del insecto, y al inocularlo sobre ninfas del tercer estadio de mosca blanca (*T. vaporariorum*) se obtuvo nuevamente la momificación de los insectos (Figura 5.3.1D). Estas ninfas se colocaron en cámara húmeda y se pudo observar nuevamente el desarrollo del mismo hongo que se inoculó, lo cual nos demostró la patogenicidad del aislamiento. Hasta este momento el aislamiento había sido clasificado dentro del género *Acremonium*, pero en vista de los caracteres morfológicos que presentaba y de su similitud con el género *Verticillium*, se decidió enviar el aislamiento con los expertos taxónomos, quienes en un principio lo determinaron como *Verticillium lecanii* y finalmente como *F. oxysporum*.

La Figura 5.3.2 muestra la morfología de *F. oxysporum* después de haber sido mantenido en almacenaje a 4°C por 2 años en su insecto hospedero. El aislamiento fue obtenido en medio de cultivo SDA+EL+antibióticos a una temperatura de 25-28°C y bajo luz constante. Como puede observarse, bajo estas condiciones el hongo desarrolla la morfología típica del género, particularmente los macroconidios, el micelio es mucho más grueso, al igual que las fiálides que dan origen a los microconidios, los cuales también son mayores. A pesar de esto, los aislamientos originales (primo) que fueron obtenidos del insecto, continúan, hasta la fecha, sin producir macroconidios, aún bajo luz constante. En conclusión, con base en los comentarios del Dr. Walter Gams, el hongo, al mantenerse almacenado, disminuye su tasa de desarrollo y con el tiempo llega a adquirir su morfología saprobia, lo cual, a falta de su hospedero primario, le permitirá sobrevivir en el suelo u otras condiciones. Esta es una de las ventajas adaptativas de todos los organismos parásitos facultativos, lo cual da una ventaja a *Fusarium* pues incrementa sus probabilidades de ser empleado como agente de control biológico.

### **CARACTERES DESCRIPTIVOS DE LAS ESPECIES EN CONFUSIÓN**

***Acremonium*** es un género cosmopolita que se consideró morfológicamente simple durante mucho tiempo, sin embargo, el género *Cephalosporium* había sido frecuentemente confundido con él pues sólo los diferenciaba el hecho de que el primero produce conidios en cabezuelas mucilaginosas. Gams (1971) concluyó que el poseer los conidios en cabezuelas o en cadenas no constituía un carácter genérico, por lo que unió a los dos géneros bajo el nombre de *Acremonium*. El género forma *Gliomatrix* y las especies monofialídicas de *Paecilomyces* también pasaron a formar parte de *Acremonium*, el cual ahora comprende especies de crecimiento lento o medianamente lento, con conidios hialinos o pigmentados, unicelulares y excepcionalmente bicelulares, en cadenas o cabezuelas mucilaginosas producidos en fiálides o conidióforos ramificados. Actualmente, *Acremonium* es percibido como un género 'forma' altamente heterogéneo debido a su gran variación morfológica tanto en teleomorfos como en anamorfos (Glenn y colaboradores, 1996). Con base en un análisis de máxima parsimonia, usando la subunidad 18S del ADN ribosomal, se determinó que este género

es un taxón polifilético que tiene afiliaciones al menos con tres órdenes de Ascomycetos: Hypocreaceae, Clavicipitaceae y Sordariales. Los miembros de la familia Clavicipitaceae (Hypocreales: Ascomycetos) son bien conocidos por ser patógenos de pastos, semillas, de otros Ascomycetos y de insectos.

La mayoría de los teleomorfos conocidos de *Acremonium* son especies de *Nectria*, aunque también se pueden encontrar entre *Hypocrea*, *Hypomyces*, *Thielavia*, *Pronectria*, *Nectriopsis*, *Epiclöe*, *Emericellopsis*, *Mycoarachis* y *Nigrosabulum* (Glenn y colaboradores, 1996).

Las especies de *Acremonium* que presentan micelio lanoso, blanco o amarillento con fiálides verticiladas acrótonas o mesótonas fueron transferidos a la nueva sección *Postrata* del género ***Verticillium***. La cual también contiene especies con conidios formados en cadenas (Gams, 1971). Este género fue descrito por Nees Von Esenbeck en 1816 con base en la morfología de sus conidióforos, los cuales eran erectos, septados y ramificados, con ramas más cortas arregladas en verticilos en forma de fiálides, generalmente con forma de botella, y muy afiladas en los ápices. Los conidios se forman simplemente en las puntas y llegan a formar pequeñas cabezuelas; son elípticos, ovados-oblongos o esféricos, unicelulares y hialinos o débilmente coloreados. Desde la época de Von Esenbeck, el género presentaba una gran cantidad de problemas debido a las variaciones morfológicas ocasionadas por el tipo y el tiempo de crecimiento en el medio de cultivo. Estas variaciones causaron grandes confusiones, al grado de que Petch (1925) había considerado a *V. coccorum* como *Cephalosporium coccorum*. *Verticillium lecanii* (= *Lecanicillium lecanii*) y *C. lecanii* fueron considerados como sinónimos por Viegas (1940) mientras que *V. amaranti*, *V. serrae* y *Cephalosporium serrae* fueron descritos como sinónimos por Van Beyma Thoë Kingma (1940). Casi todas las especies del género *Verticillium* representan anamorfos de Clavicipitaceae (Gams y Zaayen, 1982).

El género ***Fusarium*** produce típicamente dos tipos de conidios, los macroconidios que son multiseptados, largos y fusiformes y los microconidios que no son septados, uniseptados u ocasionalmente biseptados, de forma globosa, ovoide o elipsoide y en la mayoría de los casos menos de un tercio del tamaño de los macroconidios. Los macroconidios generalmente se forman en esporodoquios, aunque

también pueden formarse directamente del micelio aéreo como lo hacen los microconidios. La presencia o ausencia de micro o macroconidios ayuda a diferenciar a algunas especies de *Fusarium*, mientras que en otras se producen ambos tipos de conidios. Entre las especies patogénicas, ambos tipos de conidios pueden ser unidades infectivas. Además de los conidios se pueden presentar clamidosporas. Snyder y Hansen (1940) reconocieron los estados perfectos de *Fusarium* entre los Hypocreales: Ascomycetes, éstos son: *Hypomyces*, *Nectria*, *Calonectria* y *Giberella*. Sin embargo los estados periteciales son raramente observados en los aislamientos fitopatógenos y entomopatógenos de *Fusarium*.

El género *Fusarium* es uno de los más ampliamente distribuidos en la naturaleza; sus especies se pueden encontrar en el suelo, material vegetal en descomposición y alimentos. Muchas son conocidas por ser fitopatógenas; producen pudriciones radiculares y vasculares; existen también grupos asociados con animales: nemátodos, arácnidos, insectos, anfibios reptiles y mamíferos. Los insectos son los miembros del reino animal con los cuales las especies de *Fusarium* están mayormente asociadas, frecuentemente como parásitos y patógenos. *Fusarium* ha sido también aislada de la córnea del ojo humano (DHQP-USA. General Information about *Fusarium* Keratitis, 2006).

La especie *F. oxysporum* es un hongo común, ampliamente distribuido en el suelo, y que ha recibido considerable atención durante los últimos 80 años debido a su habilidad para causar pudriciones radicales y vasculares. Para su descripción, se ha utilizado la morfología de sus estructuras reproductivas asexuales a pesar de que existe una gran variabilidad en ellas. *F. oxysporum* fue colocada en la sección *Elegans* junto con otras nueve especies (Reiking, 1935), sin embargo, dado que las diferencias entre los caracteres morfológicos de las especies que conformaban esta sección eran muy pequeñas, altamente inconstantes y sujetas a cambios, dependientes de las condiciones ambientales (Nelson 1991), Snyder y Hansen (1940) unieron en una sola especie a las 9 especies presentes en la sección *Elegans*: *F. oxysporum* (Kistler, 1997). Las formas patogénicas de *F. oxysporum* son reconocidas en un nivel subespecífico como 'formas especiales' con base en su patogenicidad selectiva (Snyder y Toussoun, 1965); en estas formas especiales, el rango de hospederos está restringido a unas pocas especies vegetales.



## DISCUSIÓN

La taxonomía de hongos anamórficos ha sido siempre artificial ya que responde sólo a las necesidades prácticas de identificar y nombrar a organismos importantes. Ante la falta de caracteres indicativos o más naturales, solo se pueden reconocer con base en los caracteres morfológicos. A pesar de esto, es mejor integrar un género anamorfo a un teleomorfo que conservar ambos; sin embargo existen géneros como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Verticillium* y *Gliocladium* que carecen de fructificaciones teleomórficas y en este caso es más conveniente delimitar cada género de modo individual (Gams, W. 1995).

Es posible que las especies anamórficas que comparten un mismo teleomorfo puedan estar relacionadas evolutivamente; éste es el caso de los tres géneros que causaron confusión en el presente trabajo, *Acremonium*, *Verticillium* y *Fusarium*, ya que algunas de sus especies constituyen formas anamórficas de Ascomycetes. La mayoría de los teleomorfos conocidos de *Acremonium* son especies de *Nectria*, aunque también se pueden encontrar entre *Hypocrea*, *Hypomyces*, *Thielavia*, *Pronectria*, *Nectriopsis*, *Epiclöe*, *Emericellopsis*, *Mycoarachis* y *Nigrosabulum* (Glenn y colaboradores, 1996). Casi todas las especies del género *Verticillium* representan anamorfo de Clavicipitaceae (Gams y Zaayen, 1982). Snyder y Hansen reconocieron los estados perfectos de *Fusarium* entre los Hypocreales, *Hypomyces*, *Nectria*, *Calonectria* y *Giberella*. Esto nos habla de una morfología común a los tres géneros, lo que podría explicar el porqué pueden llegar a confundirse, sobretodo cuando no presentan los caracteres con los que comúnmente se describen.

En muchos estudios donde se trata de determinar taxonómicamente a un género anamórfico, se cae en confusiones. Estas confusiones no sólo se dan en los géneros *Acremonium* y *Verticillium* sino también en el género *Fusarium*. Un ejemplo lo constituye la especie *C. proliferatum* que fue determinada como tal por Matsushima. En 1982 Nirenberg lo determinó como *F. proliferatum* (Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin-Dahlem 209:309, 1982).

Hoy existe también sinonimia entre *Plectosporium tabacinum* (Van Beyma) M.E. Palm, W. Gams and Nirenberg; *Cephalosporium tabacinum* (Van Beyma); *Fusarium tabacinum* (Van Beyma) W. Gams y *Microdochium tabacinum* (Van Berma) Arx (Palm y colaboradores, 1995).

La taxonomía del género *Fusarium* es compleja debido al gran número y a los diferentes criterios empleados para diferenciar las especies, además de la gran variabilidad morfológica de los aislamientos en la naturaleza y en cultivo. Algunas veces las diferencias morfológicas entre las especies son muy pequeñas, lo que se presta a confusión, incluso cuando se emplean medios de cultivo que resaltan las diferencias. Kurchenko y colaboradores (1996) analizaron 210 aislamientos de *F. oxysporum* en diferentes zonas de Ucrania con base en diferentes condiciones climáticas y de suelo, determinando el tamaño de macro y microconidios. Estos autores concluyen que éste es justamente un carácter muy variable. Zhi-Gang y colaboradores (1998) reportaron que algunos aislamientos de *F. moniliforme* son capaces de producir colonias levaduriformes en Sabouraud agar adicionadas con NaCl al 9%, al incubarlas a 37°C y observaron además, que estas células se reproducían por gemación. Este es el primer reporte de un comportamiento dimórfico en este hongo. Así mismo, Kuruvilla y Jacob (1980) reportan que un aislamiento entomopatógeno de *F. oxysporum* sólo produce macroconidios en un medio a base de hojuelas de avena-agar y que la producción de micro y macroconidios sólo se da dentro del insecto hospedero, lo cual está en concordancia con lo observado en el presente trabajo.

Aunque la taxonomía de *Fusarium* puede ser confusa para un neófito, la nomenclatura actual está basada en un sistema común con referencia en los aislamientos depositados en colecciones de cultivo de reconocido prestigio como son el *Fusarium* Research Center, de University Park, Pennsylvania; el American Type Culture Collection; el Commonwealth Mycological Institute, Kew, England; Central Bureau Voor Schimmelkultures, Baarn, The Netherlands y el Insect Pathogen Culture Collection en Berkeley, California entre otros (Teetor-Barsh y Roberts, 1983).

Debido a las dificultades en aplicar criterios morfológicos para la identificación de las especies de *Fusarium*, se han desarrollado otras alternativas metodológicas como: pruebas de fertilidad cruzada, cariotipos electroforéticos, determinación de la habilidad

de los aislamientos para sintetizar metabolitos secundarios y sensibilidad a agentes antifúngicos como Benomyl o Higromicina. B. Wasfy y colaboradores (1987) han empleado el sistema Apy-Zym (un método rápido para la detección de enzimas) para caracterizar algunas especies de *Fusarium* (Castellá y colaboradores, 1999). Asimismo, para *F. oxysporum*, se han determinado los grupos de compatibilidad vegetativa, isoenzimas, marcadores de ADN, RFLPs, RAPDs, cariotipos electroforéticos y análisis de secuencias de DNA como base para la comparación de aislamientos individuales (Kistler, 1997). Sin embargo, hasta hoy, debido a que no se conoce su estado sexual, *F. oxysporum* no puede ser considerada como una especie biológica sino más bien como una unidad taxonómica diversa. Debido a la amplia variabilidad, en forma y tamaño, de sus conidios, de su esporulación y de su morfología en cultivo, muchos científicos consideran que se trata de especies morfológicas distintas. Estudios con la subunidad mayor de ADNr sugieren que *F. oxysporum* es un complejo de especies que consisten al menos de cinco especies filogenéticas distintas. Debido a que los caracteres genotípicos están normalmente correlacionados con un fenotipo patogénico, se podría esperar que las formas especiales sean monofiléticas y que *F. oxysporum* sea una especie con una reproducción completamente clonal. Sin embargo, éstas son hipótesis que aún no se comprueban de una manera convincente. La interpretación evolutiva resultante de esto sería que las formas especiales son monofiléticas y que los aislamientos que comparten un rango de hospederos derivan probablemente de un solo genotipo patogénico particularmente exitoso (Kistler, 1997).

Los futuros trabajos al respecto, deben concentrarse en determinar como cambian las poblaciones de *F. oxysporum* en el tiempo y cuales son los factores más importantes que influyen en este cambio. Indudablemente la presencia o ausencia del hongo y el genotipo de sus hospederos deben ser factores importantes a considerar.

Por otro lado, los mecanismos de variabilidad genética en *F. oxysporum* son escasamente conocidos. Se sabe que muchas especies de *Fusarium* mutan fácilmente, tanto en cultivo como en la naturaleza, y que uno de los sistemas asexuales por medio del cual las especies de este género obtienen variabilidad genética es la heterocariosis, sistema mediante el cual una hifa se fusiona con otra intercambiando núcleos y citoplasma (Teetor-Barsh y Roberts, 1983). Por otro lado, existen numerosas posibilidades de variación genética ligadas a la reproducción sexual y a la clonal. Se

sabe además, que el 5% del genoma de *F. oxysporum* posee elementos transposables (transposones) lo cual puede tener un enorme impacto en la estructura genética y el funcionamiento, así como en el maquillaje cromosómico de las especies. No obstante el análisis de EK de *F. oxysporum* indica mayores niveles de variación que los de otras especies de *Fusarium*.

Otros estudios sugieren que el grado de duplicación genética en las regiones nucleares contiene genes para rRNAs y aún secuencias dispersas. La evidencia genética sugiere que *F. oxysporum* posee una gran cantidad de mecanismos para la recombinación y producción de nuevos genotipos. Todos estos problemas demandan una amplia y profunda investigación con objeto de conocer como influyen estas características en la dinámica de la población y en la evolución de este hongo.

#### BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Castellá, G; MR Bragulat and FJ Cabañes. 1999. Extracellular enzymatic activity of *Fusarium* section *Liseola* isolates. MYCOPATHOLOGIA 144: 55-60
- DHQP-USA. General Information about *Fusarium* Keratitis Updated: May 10, 2006; Released: April 27, 2006. Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, U.S.A
- Gams, W. 1971. Cephalosporium-artige Schimmelpize (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 262 p.
- Gams, W. y AV Zaayen. 1982. Contributions to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. NETH. J. PL. PATH. 88:57-78
- Gams, W. 1995. How natural should anamorph genera be? CAN. J. BOT. 73(SUPPL. 1 SECT. E-H): S747-S753
- Glenn, AE; CW Bacon, R Price y RT Hanlin. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. MYCOLOGIA 88(3): 369-383
- Petch, T. 1925. Studies in entomogenous fungi. VI. *Cephalosporium* and associated fungi. TRANS. BRIT. MYCOL. SOC. 10: 153-182
- Kistler, HC 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. PHYTOPATHOLOGY 87(4): 474-479

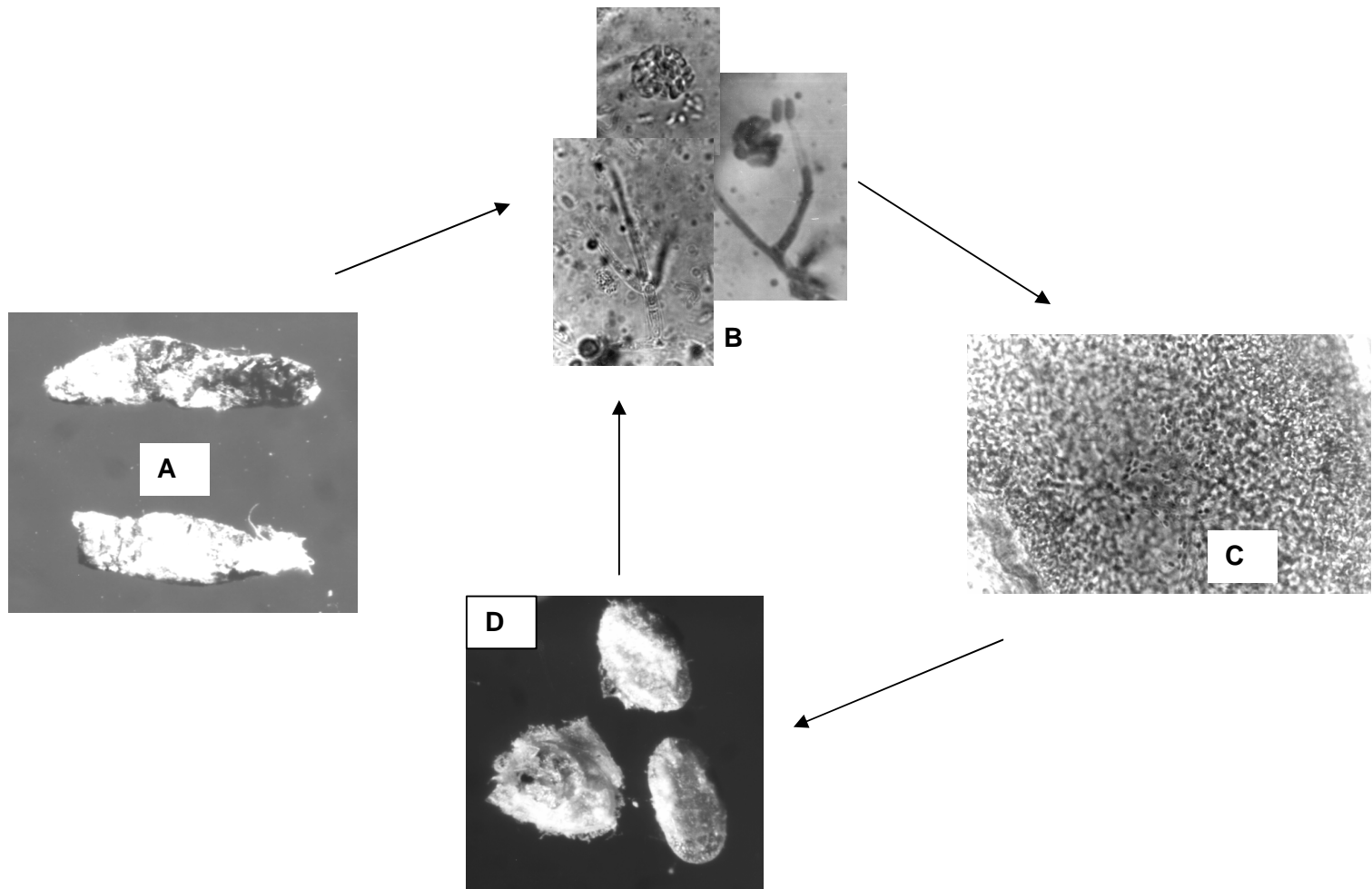
- Kurchenko IM; IO Ellans´ka y Sokolova OV. 1996. Variability of conidial spore formation of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder. Et Hans strains from different ecotopos. UKRAYINS´KYI BOTANICHNYI ZHURNAL 53(3): 207-214
- Kuruvilla, S. y A Jacob. 1980. Studies on *Fusarium oxysporum* Schlecht. Infecting rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*. Stal. AGR. RESEARCH J. KERALA 18:51-54
- Palm, E, W Gams, HI Nierenberg. 1995. Plectosporium, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. MYCOLOGIA 87(3):397-406
- Snyder WC y HN Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. AM. J. BOT. 27: 64-67
- Snyder, WC y TA Toussoun. 1965. Current status of Taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. PHYTOPATHOLOGY 55: 833-837
- Teetor-Barsh GH y DW Roberts. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. MYCOPATHOLOGIA 84: 3-16
- Viegas, AP. 1940. Un amigo do fazendeiro *Verticillium lecanii* (Zimm). N. Com., o causador do halo branco do *Coccus viridis* Green. REV. APPL. MYCOL. 19-91
- Van Beyma Thoë Kingma, FH. 1940. Über einige formen von *Verticillium dahliae* Kleb. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK J. MICROBIOL. SEROL. 6: 34-47
- Wasfy, EH, Bridge, PD and Brayford D. 1987. Preliminary studies on the use of biochemical and physiological test for the characterization of *Fusarium* isolates. MYCOPATHOLOGIA 99: 9-13
- Wollenweber, HW and OA Reinking. 1935. Die Fusarien, Ihre Besh reibung, Schadwirkung und Bekämpfung, P. Paery, Berlin.
- Zhi-Gang, W; C Li-Ming; L Xiu-Mei; T Zhe; Ch Su-Yung and G Su-Jun. 1998. Dimorphic fungus characteristic of fumonisin-producing strains of *Fusarium moniliforme* from Zhejiang. MYCOPATHOLOGIA 144(3): 165-167

### LEYENDAS A LAS FIGURAS 5.3.1 y 5.3.2

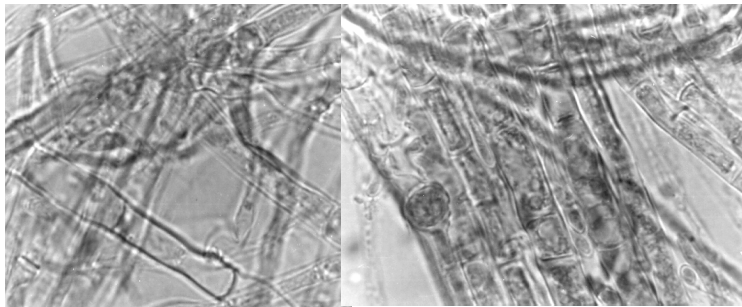
**Figura 5.3.1** CICLO PATOLÓGICO DEL AISLAMIENTO ED322 DE *F. OXYSPORUM*. **(A)** Estado inmaduro del barrenillo del chile del cual se aisló este hongo. **(B)** Morfología del hongo como se presenta en su insecto hospedero. **(C)** Corte transversal del insecto infectado. Se observa el interior de éste lleno de pequeñas esporas y blastosporas. **(D)** Apariencia del tercer estadio ninfal de mosca blanca (*T. vaporariorum*) después de 8 días post-inoculación con el hongo aislado del barrenillo del chile.

**Figura 5.3.2** Morfología de *F. oxysporum* después de haber sido mantenido en almacenaje a 4°C por 2 años en su insecto hospedero.

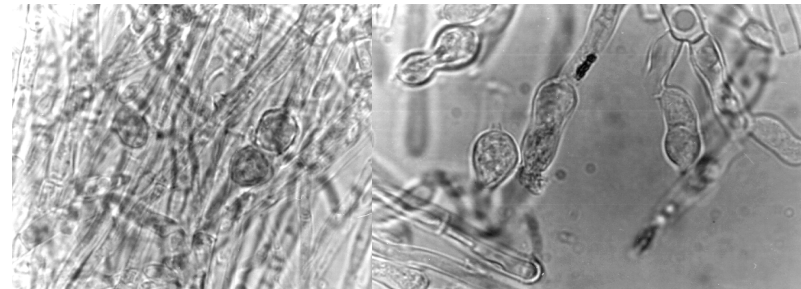
**FIGURA 5.3.1: CICLO PATOLÓGICO DE *FUSARIUM OXYSPORUM***



**FIGURA 5.3.2: MORFOLOGÍA DE *FUSARIUM OXYSPORUM* DESPUÉS DE 2 AÑOS DE ALMACENAJE**



Micelio septado 4 veces más grueso



Clamidosporas intercalares y terminales ligeramente deformes



Microconidios ligeramente curvados y con un septo



Deformación en algunas fiálides



Formación de macroconidios característicos del género



---

**5.4 POTENTIAL OF TWO SPECIES OF *FUSARIUM* AND  
*PAECILOMYCES MARQUANDII* (MITOSPORIC ASCOMYCETES)  
AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF THIRD-INSTAR NYMPHS  
OF THE WHITEFLY *TRIALEURODES VAPORARIORUM*  
(HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)**

(Capítulo a publicar)

---

**POTENTIAL OF TWO SPECIES OF *FUSARIUM* AND *PAECILOMYCES MARQUANDII* (MITOSPORIC ASCOMYCETES) AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF THIRD-INSTAR NYMPHS OF THE WHITEFLY *TRIALEURODES VAPORARIORUM* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)**

ANDREA TORRES-BARRAGÁN<sup>1</sup>, ANA LUISA ANAYA<sup>1</sup>, RAQUEL ALATORRE<sup>2</sup>  
AND CONCHITA TORIELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-275,

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Ciudad  
Universitaria, México D.F. 04510

<sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. De México, 56230

**ABSTRACT**

The virulence of the isolate Ed29a of *Fusarium moniliforme*, Ed322 of *F. oxysporum*, and Ed 22 of *Paecilomyces marquandii*, isolated from insects from El Eden Ecological Reserve, were evaluated on third-instar nymphs of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the three fungi were similar, however, *P. marquandii* was the most aggressive species since its median lethal time (LT<sub>50</sub>) was 67.5 h compared with 82 h for the two *Fusarium* species. The potential use of these fungi as biological control agents on greenhouse whitefly is discussed.

Key words: Pathogenic fungi, *Paecilomyces marquandii*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*

**INTRODUCTION**

Whiteflies have more than 500 plant host species, including crops and wild plants (Urias-Morales *et al.*, 1995). They cause yellowish, dwarfism, and low quality fruit production. An indirect damage caused by whiteflies is the production of honeydew, the sugary deposit on plant parts from the droppings of certain insects. Honeydew causes the invasion of some sooty molds as *Capnodium* and *Cladosporium* that live in this material (Ramirez-

Villapudua, 1996). The fungal growth is so abundant that interferes with the amount of light that reaches the plant diminishing or blocking photosynthesis (Agrios, 1997).

Whiteflies belong to the most important phytopathogenic virus vectors, particularly geminiviruses (Agrios, 1997) causing losses from 30-100% on the agricultural production. The main agronomical genus of whiteflies are: *Bemisia* Quaintance & Baker; *Trialeurodes* Cockerell; *Aleuracanthus* Quaintance & Baker; and *Dialeurodes* Cockerell (Homoptera: Aleyrodidae). From these only three species are known to transmit phytopathogenic viruses: *Trialeurodes vaporariorum* West. (greenhouse whitefly), *Dialeurodes citrifoli* (citric whitefly) and *Bemisia tabaci* Genn. (silverleaf whitefly).

*Trialeurodes vaporariorum*, the highly polyphagous greenhouse whitefly, has a great economical importance in horticultural, ornamental and fruit crops. For many years, chemical insecticides have been the main source of control of this insect. Chemical control has resulted in the development of resistant *T. vaporariorum* and *Bemisia tabaci* populations. Their negative environmental impact has encouraged the development of alternative pest management strategies, in which microbial control may play an important role (Elhag and Horn, 1984, 1985; Pacheco, 1986; Faria and Wraight, 2001). Whiteflies feed by piercing the tissues of plants and sucking sap directly from the vascular bundles, consequently, entomopathogenic fungi, which are the only insect pathogens infecting their hosts by direct penetration of the cuticle are promising agents for their control (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1997; Faria and Wraight, 2001).

In the world, some researchers and companies are devoted to the production of commercial products from entomopathogenic fungi as *Fusarium oxysporium* and *F. moniliforme*, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*, *Metarhizium flavoviride*, *M. anisopliae* and *M. verrucaria*, *Trichoderma* spp., *Nomuraea rileyi* and *Hirsutella thonsomii* (Rosset and Moore, 1998; Burges, 1998, 2000; Butt and Copping, 2000; Butt *et al.*, 2001). From these fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Zoophthora radicans* constitute a good alternative to control *Trialeurodes vaporariorum* (Gerling y Osborne, 1993; Garza-González, 1995; García-Solórzano, *et al.*, 1995; Sánchez-Peña, 2000; García-Valente *et al.*, 2003). These species can be included on integrated pest management programs (Pineda-Guillermo y Alatorre-Rosas, 1997).

---

In a previous study (Torres-Barragan *et al.*, 2004), three fungi, *Fusarium moniliforme* Sheldon, *F. oxysporum* Schlecht and *Paecilomyces marquandii* (Masse) S.J. Hughes were isolated from insects in the tropical forest and agricultural area at El Eden ecological reserve, Quintana Roo, Mexico. Some species of *Paecilomyces* Bainier genus have a high potential as biocontrol agents (Osborne and Landa, 1992, 1994; Smith, 1993), however, the potential of *P. marquandii* had not been evaluated. Some isolates of *Fusarium* species have been reported as phytopathogenic (Agrios, 1997), and others have been reported as pest insect pathogens (Feng-Yan y Qing-Tao, 1991; Teetor-Barsch y Roberts, 1983). In this study we evaluated the virulence *in vitro*, of these three isolates: *Fusarium moniliforme* Ed29a, *F. oxysporum* Ed322 and *Paecilomyces marquandii* Ed22, on the third-instar nymph of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*).

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal material:** Fungi were isolated from different insects collected at El Eden ecological reserve, Quintana Roo, Mexico. Isolate Ed22 of *Paecilomyces marquandii* was obtained from the ant *Solenopsis* (Westwood) (Hymenoptera: Formicidae). *F. moniliforme*, strain Ed29a was isolated from the Leafhopper *Dalbulus maydis* De L. and Wolcott (Homoptera: Cicadellidae); and *F. oxysporum* strain Ed322 from chili sap beetle, *Carpophilus lugubris* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). Isolates were preserved as a spore suspension in 10% glycerin (Baker, MC, MX) and stored at 4°C, and in liquid nitrogen at -196°C. Vouchers of pure cultures established *in vitro* were deposited in the Laboratorio de Ecología Química, Instituto de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and in the Laboratorio de Micología, Instituto de Ecología, Xalapa, VZ.. The fungi were cultured in Sabouraud-Dextrose-Agar medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 0.2% of yeast extract (Difco) (SDAY), at 25°C for ten days. Fifteen ml of sterile distilled water were added to the surface of fungi colony. The surface was scraped with a sterile spatula to obtain a stock spore suspension. The concentration of this suspension was determined using a Neubauer chamber (Goettel and Douglas, 1997). Different conidia dilutions ( $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  and  $10^2$  conidia/ml) from each fungus, were made from this stock suspension. All suspensions were made with 0.1% of tween 20 (Sigma Co. St. Louis, MO) as surfactant.

**Entomological material:** A colony of greenhouse whiteflies was maintained on beans (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. Flor de mayo) at the Instituto de Ecología, UNAM, greenhouse. Leaves infested with third-instar nymphs were taken from plants on the day of the experiment, washed in sterile deionized water, and dried with sterile absorbent paper. After been dried, infested leaves were examined under stereomicroscope and leaves with healthy third-instar nymphs were selected and placed in sterile Petri dishes.

**Pathogenicity test:** To determine the pathogenicity of the three fungi on the third-instar nymphs of *T. vaporariorum*, twenty nymphs, in their respective bean leaves, were utilized as experimental unit. Each nymph was topically inoculated by dripping 2  $\mu$ l of  $10^8$  conidia/ml suspension. Conidial suspensions were prepared in 0.1% of Tween 20 (Sigma). Control nymphs were treated only with this solution. A second control with sterile distilled water was used. Petri dishes, containing their respective experimental units and humid sterile paper, functioned as a moist chamber; they were maintained at room temperature with a 12:12 (dark:light) photoperiod in a completely randomized design with 5 replicates. All experiments were repeated three times. Mortality of nymphs was evaluated 4 days after inoculation. Insects were considered dead and infected, when the inner fungi emerged from the dead body. Nymph's mortality was verified by microscopic observation.

Mummified insects were disinfected with a 0.05% Na Hypochlorite solution and incubated in moist chamber at room temperature. All fungi inoculated were re-isolated in this way and the typical fungal sporulation was observed. The fungi that emerged from dead nymphs were cultured on SDAY medium, isolated and taxonomically determined. Results were analyzed by ANOVA. When the overall F test was significant, means were separated by Tukey test ( $P < 0.05$ ).

**Determination of minimum and maximum mortality doses.** In this bioassay, twenty third-instar nymphs of *T. vaporariorum* in their respective bean leaves were utilized as experimental unit. Nymphs were topically inoculated by dripping 2  $\mu$ l of four conidial suspensions ( $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  y  $10^2$  conidia/ml). Petri dishes with their respective experimental unit and treatment were used as moist chambers as described in the above section. Bioassays were maintained at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  with a 12:12 photoperiod in a completely randomized design with 4 replicates. Bioassays were repeated 4 times for each fungus.

Mortality of nymphs was evaluated 4 days after inoculation. Mortality and real infection by fungus were verified as described above.

**Determination of mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) and mean lethal time (LT<sub>50</sub>).** The results obtained from the minimum and maximum doses bioassay were used to determine the theoretical doses to obtaining a mortality of 25, 50, 75 and 85% from each of the three fungi. These, and the concentration limits (those to kill 0% and 100% of the population) were used to determine the mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) and mean lethal time (LT<sub>50</sub>) for each fungi. In this way, bioassays with 6 doses for each fungus (Table 1) and one control were performed. All conidial suspensions were made with 0.1% of tween 20 (Sigma) as surfactant.

Bioassays to evaluate LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub> were performed as those described in the previous section. To determine LT<sub>50</sub>, observations for mortality were made every 12-h; to determine LD<sub>50</sub>, observations were made 114 h after inoculation. Bioassays were repeated 4 times. Results were analyzed using a PC Probit program (Throne, JE et al, 1995; Camacho, 1990). With this program we obtained the equation for straight lines logarithm concentration-mortality by maximum probability (credibility), fiduciary's limits (95% of probability) and a goodness of fit test by the X<sup>2</sup> model (Infante-Gil & Calderón-Aragón, 1994). On the other hand, a T-test was used to determine significant statistical differences between the slopes of the lines of both LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub> between the three fungi species. Fungi disease development was followed by macroscopic and stereomicroscopic observations (Reichert dissecting microscope, American Optical Corporation).

## RESULTS

The three fungi species showed killed third-instar nymphs of *T. vaporariorum* (Tables 1 and 2). All of them caused 100% mortality in 4 days at 1 x 10<sup>8</sup> conidia/mL. The mortality caused by the three fungi was verified isolating each fungi from 100% of inoculated nymphs.

The minimum dose determined was  $10^2$  conidia/mL since this concentration caused no mortality on the test insect. The LD<sub>50</sub> determination (Table 3) showed that *F. moniliforme* Ed29a, *F. oxysporum* Ed322 and *P. marquandii* Ed22 have the same virulence to the third-instar nymphs of *T. vaporariorum* since statistical analysis did not show significant differences ( $P < 0.05$ ) between the three species. Values of LT<sub>50</sub> (Table 3) showed that *P. marquandii* could be considered more aggressive than *Fusarium* species since it killed 50% of whiteflies in 67.5 h whereas *Fusarium* species did it in 82 h.

### Fungi disease development

*Fusarium moniliforme*. An abundant and soft mycelium was observed on the insects after 24 h of inoculation. After this, nymphs change their color from white to greenish, and then to brownish to completely dark brown and covered by a white spore's dust (Figure 1). This spore dust and nymphs were cultivated and *F. moniliforme* was obtained (Figure 2).

*Fusarium oxysporum*: Twenty-four hours after inoculation a scarce farinaceous mycelium was observed on the nymphs. After this the color of nymphs changed from green to brown, and finally *F. oxysporum* mummified them (Figure 3). Mummies presented a white spore dust over them; microscope observations confirmed that they match with the characteristic microconidia of the species (Figure 4). Pure strains of this species could be obtained from culturing spores or mummies.

*Paecilomyces marquandii*: Twenty-four hours after inoculation, a soft-farinaceous mycelium was observed growing on the whitefly nymphs. After this, it changed to brown and a whitish mycelium emerged from the surface of the nymphs (Fig. 5). Finally they take the characteristic violaceous color of the fungus' spores. Pure strains of this species could be obtained from culturing spores or mummies (Figure 6).

## DISCUSSION

In the present study, the pathogenicity of *Paecilomyces marquandii*, *Fusarium moniliforme*, and *Fusarium oxysporum* on the third-instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* was demonstrated. The three fungi species had a high virulence and killed more than 90% of whitefly population. A large number of *Fusarium* spp. are entomopathogenic; some are weak, facultative pathogens, especially of Lepidoptera and

---

Coleoptera, and they colonize their dead host as saprophytes. Highly pathogenic species are reported primarily from Homoptera and Diptera (Teetor-Barsh and Roberts, 1983). The two *Fusarium* species studied have been previously reported as insect pathogens (Feng-Yan and Qing-Tao, 1991). *F. moniliforme* infect insects such as *Bombyx mori* and *Ostrinia nubilalis*. *F. oxysporum* is a pathogen of a great variety of insects with economical importance as *Bemisia tabaci*, *Brevicorine brassicae*, bugs larva, coccides, spiders, and also has been reported to infect mosquito *Aedes detritus* larva, *Melanitis leda* caterpillars, and *Ostrinia nubilalis* eggs.

Some *Fusarium* isolates clearly possess a high potential for infect insects. Kuruvilla & Jacob (1979a, 1980) reported 100% mortality of one isolate of *F. oxysporum* on rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), in a field-cage test. They sprayed spore suspensions with dose levels from  $1.5 \times 10^6$  to  $6.25 \times 10^6$  conidia/mL on the plants. First and second instar nymphs were most susceptible, but all other life stages of the insect also died due to the mycosis.

Although it is well known that isolations of *Fusarium* species have a very limited potential as biological control agents for pest, since their high potential as phytopathogens on several crops, some have been tested as mycoherbicides (Tioureaev, *et al.* 2001) and some more have been studied because they are very specialized species that can infect other fungi and insects (Zemankova, *et al.* 2001).

Studies on the adverse effects of this fungus on beneficial organisms (including mammals and plants) revealed both harmful as well as safe *Fusarium* isolates in nature (Teetor-Barsh and Roberts, 1983). Kuruvilla & Jacob (1979b), tested the insect host range of one isolate of *Fusarium oxysporum* on eight rice pests. They found that six of the eight rice pests were highly susceptible to this isolate. Furthermore, extensive testing of this isolate on rice, cotton and tomatoes showed no infection in the plants, revealing that this isolate was safe to the tested plants. In a previous study (Torres-Barragán, *et al.* 2004) the Ed322 isolate of *F. oxysporum* was probed to be safe for tomato, squash, bean and maize seedlings.



The present study shows the potential of *F. oxysporum* Ed322 as insect pathogen. Its role as bioregulator of insects in natural conditions and the role of insects as vectors of this fungus must be studied in detail.

Since *Paecilomyces marquandii* kill test insects in 67.49 h, it was considered the most virulent of the studied fungi. Other species of *Paecilomyces* have been studied for insect control, e.g. *Paecilomyces fumosoroseus* (Osborne & Landa, 1994; Smith, 1993). *P. marquandii* can be also considered as a potential biocontrol agent of *T. vaporariorum* because it grows fast, it has a high viability and high virulence. However, further studies in the laboratory, greenhouse and field are necessary to assure that it is innocuous to other organisms before it can be recommended as whitefly biological control agent.

Fargues *et al.* (2005) tested the control potential of a *Lecanicillium muscarium*-based formulation against *Trialeurodes vaporariorum* in Mediterranean greenhouses under a climate and ventilation heterogeneity. Authors conclude that entomopathogenic Hyphomycetes have a strong potential for microbial control of whitefly larvae infesting tomato crops at moderate environmental humidity in spite of windy periods. In the greenhouses studied, non-stressed tomato crops provide unexpected favorable conditions for mycoinsecticide use against a phyllophagous insect.

After a selection based on spore production and infection, the virulence of 31 isolates of *Aschersonia* spp. was evaluated on third instar nymphs of silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* and greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* on poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). Whitefly infection levels varied between 2 and 70%, and infection percentages of *B. argentifolii* correlated with that of *T. vaporariorum*. However, mortality was higher for *T. vaporariorum* than for *B. argentifolii*, as a result of “a higher mortality due to unknown causes” (Meekes *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006).

Second instars larvae of *Bemisia argentifolii* reared on three vegetable species (cucumber, cabbage, and tomato) were sprayed with  $5 \times 10^4$  conidia/cm<sup>2</sup> of *Pfr* 97, a *Paecilomyces fumosoroseus* strain, used as a microbial control agent for whiteflies. Larval susceptibility to fungal infection was high (85-90% two weeks after treatment) and not significantly affected by the host plant (Vidal *et al.*, 1998; Osuna-Paez *et al.*, 2003). In addition, *Beauveria bassiana* and *P. fumosoroseus* sprayed at rate of  $5 \times 10^{13}$  conidia in

180 liters water/ha, infected more than 90% of *Bemisia argentifolii* nymphs (third and fourth-instar) on cucumbers, cantaloupe melons, and zucchini squash. Effects against adult whiteflies were minimal (Wraight *et al.*, 2000).

**Acknowledgments.** This work is part of the Ph.D. thesis of Andrea Torres-Barragán who thanks the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México for the scholarship granted during her studies. We also thank the United States Department of Agriculture for the support of this project (Mx-AES-6 grant FG-Mx-107).

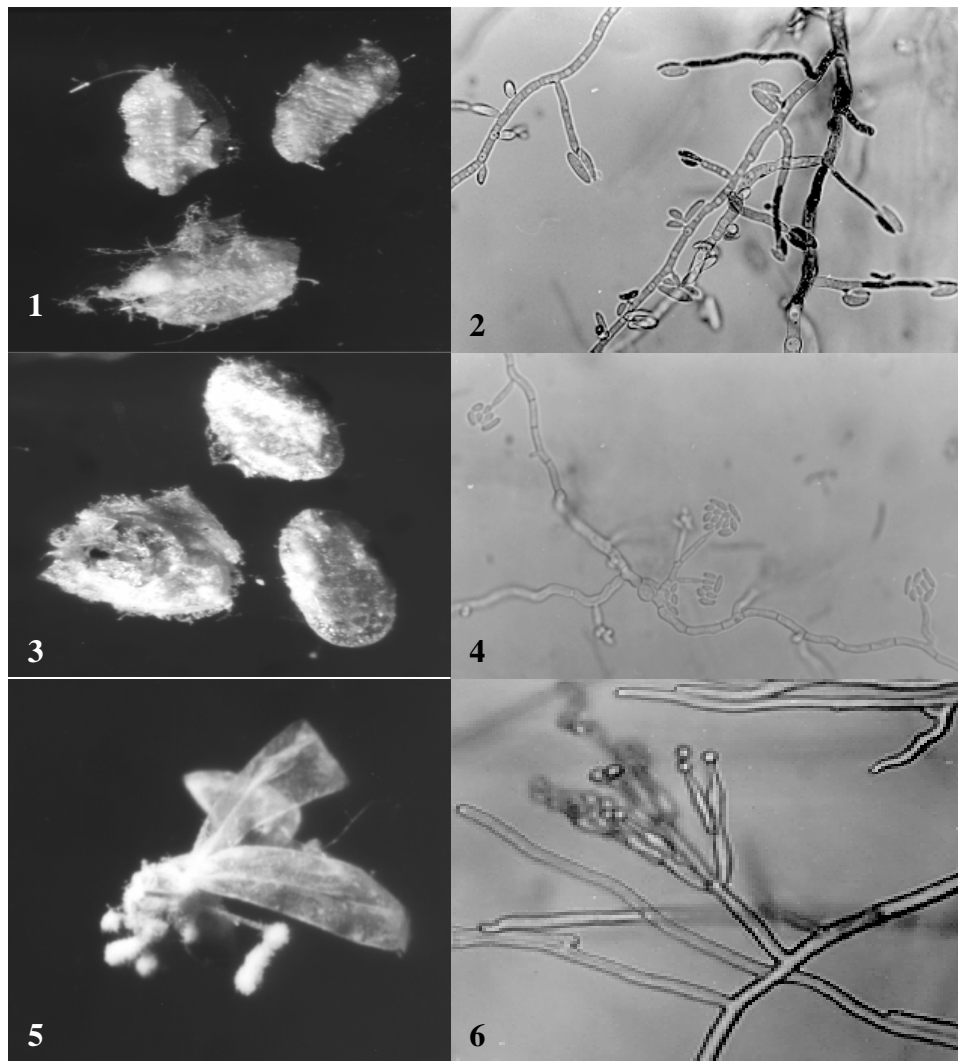
## REFERENCES

- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> Ed., Academic Press, San Diego.
- Burges, H.D. 1998 Formulation of Microbial Pesticides. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Holanda.
- Burges, H.D. 2000 Techniques for testing microbial for control of arthropod pests in greenhouse. In: Lacey L.A., Kaya HK (eds) Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pest. Kluwer Academic, Dordrecht, Holanda, pp 505 - 526
- Butt, T.M. y L.Copping. 2000. Fungal biological control agents. Pesticide Outlook 11, 186 - 191
- Butt, T.M.; C. Jackson y Magan, N. 2001. Introduction - Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (pag 1 - 8)
- Camacho, C.O. 1990. PCPROBIT. Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Elhag, E.A. y D.J. Horn, 1984. Laboratory selection of whitefly for resistance to malathion. Entomol. Exp. Appl. 35: 21-26.
- Elhag, E.A. & D.J. Horn, 1985. Resistance of greenhouse whitefly (Homoptera:Aleyrodidae) to insecticides in selected Ohio greenhouses. J. Econ. Entomol. 76: 945-948.

- Fargues, J., N. Smits, M. Rougier, T. Boulard, G. Ridray, J. Lagier, B. Jeannequin, H. Fatnassi, y M. Mermier. 2005. Effect of microclimate heterogeneity and ventilation system on entomopathogenic hyphomycete infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean greenhouse tomato. *Biological Control* 32: 461-472.
- Faria, M. y S.P. Wraight, 2001. Biological Control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protect.* 20, 767-778.
- Feng-Yan B. & C. Qing-Tao, 1991. *Fusarium* species on some insects from China. *Acta Mycol. Sinica* 10:120-128.
- García-Solórzano, R., G. Sesma-Espinosa, Y. Domínguez-Rubio y T. Mier. 1995. Efectividad de *Verticillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum* West.) sobre frijol ejotero, en Villa Guerrero, Estado de México. Memoria XVIII Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Tapachula, Chiapas, México. 6-10 de Nov. pp. 95-96. UAM, MÉXICO.
- García-Valente, F., L. D. Ortega-Arenas, H. González-Hernández, F. Tamayo-Mejía y A. W. Guzmán-Franco. 2003. Compatibilidad de los hongos *Paecilomyces fumosoroseus* (WISE) Brown y Smith y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hiphomycetes), con el parasitoide *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae), en el control de la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae). Memoria XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guadalajara, Jalisco, México. 3-8 de Nov. pp. 196-199. CP, MÉXICO.
- Garza-González, E. 1995. Control microbiológico de mosquitas blancas. *Fitofilo* 88: 89-100.
- Gerling, D. y L. Osborne (Eds.), 1993. *Bemisia*. Newsletter 7.
- Goettel, M.S. y I. Douglas., 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In*: L.A. Lacey (ed.), *Manual of Techniques on Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, pp. 213-249.
- Hernández-Velázquez, V.M. y A.M. Berlanga-Padilla, 1997. Selección de aislamientos de *Paecilomyces spp* y su interacción con otros agentes de control de *Bemisia tabaci*. XVIII Congreso Nacional de Control Biológico, 1er. Congreso Americano de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, 6-9 Noviembre de 1995, Tapachula, Chiapas.
- Infante-Gil, S. y L.C. Calderón-Aragón., 1994. *Manual de Análisis Probit*. Centro de Estadística y Cálculo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Kuruvilla, S. y A. Jacob, 1979a. Comparative susceptibility of nymphs and adults of *Nilaparvata lugens* to *Fusarium oxysporum* and its use in microbial control. *Agr. Research J. Kerala* 17: 287-288.

- Kuruville, S. y A. Jacob, 1979b. Host range of the entomogenous fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht. and its safety to three crop plants. *Curr. Sci.* 48: 603.
- Kuruville, S. y A. Jacob, 1980. Studies on *Fusarium oxysporum* Schlecht. Infecting rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*. *Stal. Agr. Research J. Kerala* 18: 51-54.
- Meeke, E.T.M., Fransen, J.J. y Van Lenteren, J.C. 2002. Pathogenicity of *Aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 81:1-11.
- Osborne, L.S., y Z. Landa, 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Flor. Entomol.* 75: 456-471.
- Osborne, L.S., & Z. Landa, 1994. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Bulletin OILB/SROP* 17: 201-206.
- Osuna-Paez G., .F. Estrada-Ramírez, P. Caro-Macías, B. Galván-Piña, H. Cárdenas-Cota (2003) Virulencia de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith contra ninfas de *Bemisia* (Gennadius) spp. en un cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.). *Rev Mex Fitopatol* 21:292–299.
- Pacheco, M.F. 1986. Plagas de los Cultivos Agrícolas en Sonora y Baja California. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Pineda-Guillermo, S. y R. Alatorre-Rosas, 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* sobre la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. 1er. Congreso Americano de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, 6-9 Noviembre de 1995, Tapachula, Chiapas.
- Quesada-Moraga, E., E.A.A. Maranhao, P. Valverde-Garcia y C. Santiago-Alvarez. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control* 36 (2006) 274–287
- Ramírez-Villapudua, J. 1996. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía, Culiacan, SL, México.
- Rosset, P. y Mónica Moore (1998) La seguridad alimentaria y la producción local de biopesticidas en Cuba Boletín del ILEIA Junio. 18-19 p.
- Sánchez-Peña, S. R. 2000. Infectivity of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) towards *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) nymphs. *Florida Entomologist* 83(1): 101-105. UAAAN, MEXICO

- Smith, P., 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information* 14: 71N-78N.
- Smornoff, W.A., 1970. Fungus diseases affecting *Adelges piceae* in the fir forest of the Gaspé Peninsular, Quebec. *Can. Ent.* 102: 799-805.
- Teetor-Barsch, G.H. y D.W. Roberts, 1983, Entomogenous *Fusarium* species. *Mycopathologia* 84: 3-16.
- Throne, J.E., D.K. Weaver, V. Chef, J.E. Baker. 1995. Probit analysis Correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol* 88(5):1510-1512.
- Tiourebaev, K.S., G.V. Semenchenko, M. Dolgovskaya, M.K. McCarty, T.W. Anderason, L.D. Carsten, A.L. Pilgeram, y D.C. Sands. 2001. Biological control of infestations of ditchweed (*Canavis Sativa*) with *Fusarium oxysporum f. sp. Cannabis* in Kazakhstan. *Biocontrol Science and Technology* 11(4):535-540.
- Torres-Barragan, A., A.L. Anaya, R. Alatorre and C. Toriello. 2004. Entomopathogenic fungi from 'El Eden' ecological reserve, Quintana Roo, México. *Mycopathologia* 158(1):61-71
- Urias-Morales, C., R. Rodríguez-Montesoro y S. Silva, 1995. Mosquita blanca (Homoptera:Aleyrodidae) como vector de virus. *Fitofilo* 88: 25-52.
- Vidal, C., L.S. Osborne, L.A. Lacey, y Fargues, J. 1998. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in Greenhouses. *Biological Control* 12: 191-199.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A. Garza, C.J. y Galaini-Wraight, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* 17: 203-217.
- Zemankova, M. y A. Lebeda. 2001. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. *Plant Protection Science* 37:25-42.



**Figs. 1-6,** 1: Third-instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* inoculated with *F. moniliforme* (96 h posttreatment). 2: *Fusarium moniliforme* microconidia. 3: Third-instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* inoculated *F. oxysporum* (96 hrs posttreatment). 4: *Fusarium oxysporum* microconidia. 5: *T. vaporariorum* from a nymph infected with *P. marquandii*. 6: *Paecilomyces marquandii* conidia and conidiophores.

**TABLE 1**

Theoric doses used to determine LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub> of two species of *Fusarium* and *Paecilomyces marquandii*.

MORTALITY	DOSES (conidia/mL)		
	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. marquandii</i>
100%	1 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>
85%	3 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>
75%	2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>
50%	3 x 10 <sup>4</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>
25%	1 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>
0%	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>

**TABLE 2**

Percentage of mortality in third-instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* caused by two species of *Fusarium* and *Paecilomyces marquandii*

Fungal Isolates	Mortality (%) <sup>a,b</sup>
Control <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0
<i>Fusarium moniliforme</i> (Ed29a)	96.6 ± 3.84
<i>F. oxysporum</i> (Ed 322)	97.5 ± 3.19
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Ed22)	99.94 ± 3.12

<sup>a</sup>Each value represents the mean ± standard deviation of three different experiments. Five replicates were made in each experiment.

<sup>b</sup>Evaluated with a suspension of 10<sup>8</sup> conidia/ml.

<sup>c</sup>Sterile 0.1% Tween 20.

**TABLE 3**

LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub> for two species of *Fusarium* and *P. marquandii* on third-instar nymphs of *T. vaporariorum*

Fungus Isolate	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (conidia/mL)	LT <sub>50</sub> <sup>a</sup> (h)
<i>Fusarium moniliforme</i> Ed29a	9.82 x 10 <sup>4</sup> A <sup>b</sup>	82.403 B <sup>b</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i> Ed322	1.51 x 10 <sup>5</sup> A	82.339 B
<i>Paecilomyces marquandii</i> Ed22	1.33 x 10 <sup>5</sup> A	67.496 A

<sup>a</sup>Each value represents the mean of four different experiments. Four replicates were made in each experiment.

<sup>b</sup>Values with the same letter by column are not significantly different (Tukey  $\alpha=0.05$ )



---

**5.5 FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHLECHT. ED322 Y *F. MONILIFORME* SHELDON ED29A UTILIZANDO COMO ORGANISMOS DE PRUEBA A LA PALOMILLA DE LOS APIARIOS (*GALLERIA MELLONELLA* LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) EL ÁFIDO DEL MELÓN (*APHIS GOSSYPHII* HOMOPTERA: APHIDIDAE) Y LA MOSQUITA BLANCA DE INVERNADERO (*TRIALEURODES VAPORARIORUM* HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)**

---

## METODOLOGIA

### PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS

Debido a que la producción de toxinas está directamente relacionada con la producción de blastosporas (espora de reproducción asexual que se origina por gemación), se realizó un ensayo para determinar el cultivo y tiempo de producción máxima de estas estructuras por *F. oxysporum* Ed322, aislado de *Carpophilus lugubris*, y *F. moniliforme* Ed29a, aislado de *Dalbulus maydis*. Para esto se utilizaron los medios líquidos denominados, Medio "Acremonium", Medio 1, Medio 2, Medio 3 y Medio 4 (Anexo 8.4). Estos medios se inocularon con una suspensión de esporas de  $10^8$  conidios/mL en proporción de 1:100. Se mantuvieron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en agitación constante a 120 rpm y un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad). Se evaluó la producción de blastosporas cada 24 h por medio de una cámara de Neubauer hasta determinar el tiempo máximo de producción de éstas.

### DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE TOXINAS

Una vez determinados el medio de cultivo y el tiempo necesario para obtener la máxima producción de blastosporas, se llevo a cabo un ensayo para conocer si en los filtrados crudos de los cultivos existía la presencia de toxinas. Se denominó filtrado crudo, al medio de cultivo en el cual crecieron los hongos después de haberlo separado de las blastosporas por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min.

Los organismos empleados para los bioensayos fueron larvas del cuarto estadio de la palomilla de los apiarios (*G. mellonella* L.) y el tercer estadio ninfal de la mosca blanca de invernadero (*T. vaporariorum* Westwood). La cría de la palomilla de los apiarios fue obtenida en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, y mantenida en una dieta artificial (Anexo 8.7) en el laboratorio de Ecología Química, del Instituto de Ecología, UNAM. La mosca blanca fue obtenida de la cría mantenida en plantas de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. "Flor de Mayo"), en el invernadero del Instituto de, UNAM.

Para el caso de *G. mellonella* la unidad experimental consistió de un recipiente de plástico con dieta artificial en el cual se colocaron 10 larvas del cuarto estadio. Las larvas fueron inyectadas en el cuarto intersegmento dorsal con 10  $\mu$ l del filtrado crudo. El tratamiento testigo fue inyectado con la misma cantidad del medio de cultivo estéril que se mantuvo bajo las mismas condiciones del cultivo de los hongos pero sin la inoculación de los mismos. La inyección se llevó a cabo empleando una jeringa de insulina (1 mL). Después de inyectadas las larvas, los tratamientos se mantuvieron a 30°C y 80% de humedad relativa en un cuarto de ambiente controlado, dispuestos en un diseño completamente al azar con diez repeticiones. Se determinó la mortalidad de las larvas 48 h después de aplicados los tratamientos. Los resultados obtenidos se analizaron por análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ) cuando así se requirió.

En el caso de los ensayos con mosca blanca, los folíolos infestados con el tercer estadio ninfal fueron tomados de las plantas el día del experimento, lavados con agua desionizada y secados con papel absorbente estéril. Después de esto, los folíolos fueron examinados bajo el estereomicroscopio seleccionándose aquellos que presentaban ninfas sanas. La unidad experimental consistió de 30 ninfas por folíolo, las cuales se inocularon tópicamente con 10  $\mu$ L del filtrado crudo. El tratamiento testigo también fue inoculado con 10  $\mu$ L del medio de cultivo estéril, como se describió para el caso de *G. mellonella*. Después de la inoculación, los insectos se colocaron en cámara húmeda en cajas de Petri las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente arregladas en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Setenta y dos horas después de la inoculación, se determinó la mortalidad de las ninfas. Los resultados obtenidos se analizaron por análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

### **CULTIVO FÚNGICO**

*Precultivo:* Con el fin de incrementar el inóculo a ser empleado en el cultivo masivo, los hongos se cultivaron en el medio líquido denominado “medio Acremonium”, a una temperatura de 25°C con agitación constante (120 rpm) durante 8 días. Los hongos fueron obtenidos de los cultivos de esporas en glicerina al 10% mantenido a 3°C en el laboratorio de Ecología Química del Instituto de Ecología, UNAM.

*Cultivo masivo*: Matraces de 1 y 2 L que contenían la mitad de su capacidad del medio “Acremonium”, fueron inoculados con una suspensión de esporas de  $1 \times 10^8$  conidios por mililitro en una proporción de 1:100 y se incubaron en agitación constante (120 rpm) a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 12:12 durante diez días, condiciones bajo las cuales los hongos alcanzaban su máxima producción de blastosporas.

#### **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES**

Transcurridos los 10 días de incubación, se separó la masa de blastosporas del medio de cultivo en el cual estuvo creciendo cada uno de los hongos (filtrado). Esta separación se realizó pasando todo el cultivo a través de un embudo buchner y papel filtro (Whatman no. 2) al vacío. El filtrado se centrifugó a 6000 rpm durante diez minutos. El botón que contenía las blastosporas se incorporó a la masa previamente separada. Se realizó entonces la extracción del filtrado y de la masa de blastosporas a los que se llamó ‘extractos totales’.

A la masa de blastosporas se le agregó el mismo volumen de acetato de etilo (EtoAc) y se dejó extraer por tres días. Se decantó el acetato de etilo con lo extraído y se repitió la extracción dos veces más. El extracto así obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad al vacío en un rotavapor ( $45\text{-}50^\circ\text{C}$ ).

El extracto del *filtrado* se obtuvo mezclando partes iguales de éste con acetato de etilo y separando la fase orgánica de la acuosa en un embudo de separación. El filtrado se lavó así tres veces, se puso en agitación y se le agregó sulfato de sodio anhidro para absorber el agua que pudo pasarse al separar las fases. Finalmente el extracto se llevó a sequedad al vacío en un rotavapor. El esquema número 1 muestra la obtención de los extractos de manera resumida.

#### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS TOTALES**

Los ensayos para evaluar la actividad insecticida de los extractos totales se realizaron usando como organismos prueba adultos ápteros del áfido del melón (*A. gossypii*) y el tercer estadio ninfal de la mosca blanca *T. vaporariorum*.

Los áfidos fueron mantenidos en el invernadero del Departamento de Entomología de la Universidad de California, Riverside, en plantas de crisantemo (*Chrysanthemum* sp. var. *white diamond*). La unidad experimental consistió en 20 áfidos adultos ápteros sobre una hoja de crisantemo, los cuales fueron inoculados tópicamente con 1  $\mu$ L de una suspensión de 500 ppm de cada uno de los extractos obtenidos. El tratamiento testigo fue inoculado con una mezcla de Metanol (MeOH)-agua al 10%. A todas las soluciones se les agregaron 10  $\mu$ L de X77 como surfactante (Dow AgroSciences). Los ensayos se mantuvieron a temperatura ambiente arreglados en un diseño en bloques al azar con cinco repeticiones. La mortalidad se evaluó 24 horas después de aplicados los tratamientos. Los resultados se analizaron por medio de análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Duncan  $\alpha=0.05$ ).

Las ninfas de mosca blanca fueron obtenidas como se mencionó anteriormente. En este caso la unidad experimental consistió en 30 ninfas de tercer estadio por foliolo, las cuales se inocularon tópicamente con 1  $\mu$ L de una solución de 500 ppm de cada uno de los extractos a evaluar. Un tratamiento testigo fue inoculado con una mezcla de MeOH-agua al 10% y otro sólo con agua. Todas las soluciones se prepararon con una suspensión de Tween 20 al 1%. Después de la inoculación los foliolos se colocaron en cámara húmeda sobre la base de una caja de Petri y se mantuvieron a temperatura ambiente arreglados en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Setenta y dos horas después de la inoculación, se determinó la mortalidad de las ninfas. Los resultados obtenidos se analizaron por análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Se consideraron 'extractos activos' todos aquellos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el tratamiento testigo.

#### **FRACCIONAMIENTO QUÍMICO PRIMARIO**

Los extractos crudos fueron fraccionados por cromatografía al vacío en columna (Coll y Bowden, 1986) conteniendo Silica gel H (Brinkman Instruments Inc.) y empleando un gradiente de separación cloroformo-metanol ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH). Se obtuvieron diez fracciones de cada uno de los extractos. La actividad insecticida de cada una de las

fracciones fue evaluada sobre el áfido del melón y la mosca blanca de invernadero como se describió anteriormente.

De las fracciones evaluadas se eligieron las dos más activas para cada insecto. Estas fueron las fracciones 4-5 (que en adelante será llamada sólo fracción 4) y 7 de la masa de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322.

#### **INCREMENTO DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* ED322**

Debido a que la cantidad de extracto que era obtenida con el medio de cultivo empleado era muy reducida, (150 mg/20 L de medio) se evaluaron 8 diferentes medios de cultivo líquidos con el fin de incrementar la producción de las fracciones 4 y 7 de la masa de blastosporas. Estos 8 medios fueron modificaciones del medio de cultivo inicial (medio "Acremonium" = glucosa, 80 g;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.48 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g; agua, 1 L) con dos factores cada uno (con agitación y sin agitación) los cuales influían en la concentración de oxígeno que recibía el hongo. Esto nos dio 16 diferentes tratamientos. Se agregó el medio sólido Sabouraud-Dextrosa-Agar adicionado con 2% de extracto de levadura (SDA+EL) el cual constituyó el tratamiento número 17 (Cuadro 1).

Todos los medios líquidos (500 mL) fueron inoculados con 1 mL de una suspensión de esporas de  $10^8$  conidios/mL obtenida a partir del medio *Acremonium*. El medio sólido se vació en cajas de Petri (10 cajas=100 mL). Las cuales se inocularon con 0.1 mL de la misma suspensión. Todos los medios se mantuvieron a una temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  a un fotoperíodo de 12:12. Para determinar cual era el mejor medio para incrementar las fracciones 4 y 7 se tomo en cuenta el volumen del filtrado, la biomasa de la masa de blastosporas, en el caso de los medios líquidos, y biomasa del micelio, en el caso del medio sólido; la cantidad de extracto total obtenida de cada medio, la cantidad de las fracciones 4 y 7 y la similitud cromatográfica de éstas (cromatografía en placa fina de aluminio (Silica-gel 60 F<sub>254</sub>)) con las fracciones originales.

Cuadro 1. Tratamientos empleados para incrementar las fracciones 4 y 7 de *F. oxysporum* Ed 322

Número de Tratamiento	Variaciones al medio inicial
1 <sup>a,b</sup>	Glucosa 40 g + tapón de aluminio
2 <sup>a,b</sup>	Glucosa 40 g + tapón algodón
3 <sup>a,b</sup>	Glucosa 40g + EL + aluminio
4 <sup>a,b</sup>	Glucosa 40 g + EL + algodón
5 <sup>a,b</sup>	Glucosa 80 g + (0.5)NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + aluminio
6 <sup>a,b</sup>	Glucosa 80 g + (0.5)NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + algodón
7 <sup>a,b</sup>	Glucosa 80 g + (0.5)MgSO <sub>4</sub> + aluminio
8 <sup>a,b</sup>	Glucosa 80 g + (0.5)MgSO <sub>4</sub> + algodón
9	Sabouraud-Dextrosa-Agar +EL

(<sup>a</sup>) Con agitación; (<sup>b</sup>) Sin agitación

#### PURIFICACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES ACTIVAS

La fracción 4 fue purificada utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Waters Associates Inc.) en fase reversa, empleando una columna Partisil 5-ODS-3 de 25 x 0.46 cm. La fracción fue eluída con un gradiente de agua-metanol (H<sub>2</sub>O-MeOH) a un flujo de 1 mL/min durante 45 min. La detección de las subfracciones fue hecha monitoreando la absorción al UV a 254 nm (0.5 AU) (Waters Associates Absorbance detector, model 440). De esta purificación se obtuvieron 5 fracciones las cuales se evaluaron sobre el áfido del melón, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La fracción 4-4 resultó ser la más activa y fue re-purificada utilizando HPLC en fase reversa con la misma columna y eluyendo con 70% MeOH/H<sub>2</sub>O-95% MeOH, a un flujo de 0.8 mL/min durante 65 min. Los análisis del cromatograma y del H<sup>1</sup>NMR mostraron que dicha fracción era aún una mezcla de al menos nueve compuestos, por lo cual la purificación se realizó colectando muestras para cada pico presente en el cromatograma. De ésta se obtuvieron 14 fracciones que fueron probadas en áfidos del melón.

Los picos 2, 3 y 14 resultaron ser los más activos. Ellos fueron analizados por H<sup>1</sup>NMR para tratar de determinar la estructura química de los compuestos presentes en ellas.

La fracción 7 fue analizada por  $H^1$  y  $C^{13}$ NMR. Se determinó que contenía una gran cantidad de glucosa la cual fue removida de la fracción pasándola a través de una columna Sep-pak cartridge (Waters C18), utilizando agua y MeOH como eluyentes. Por medio de este proceso se obtuvieron dos fracciones, una acuosa que presentaba la glucosa y una metanólica con el resto de la fracción. Ambas fracciones fueron evaluadas en áfidos del melón y en el tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum*; la fracción metanólica resultó ser la activa, y por ello, fue purificada por medio de HPLC (Waters Associates Inc.) en fase reversa empleando una columna Partisil 5-ODS-3 de 25 x 0.46 cm. La fracción fue eluída con un gradiente de  $H_2O$ -MeOH a un flujo de 1 mL/min durante 45 min. La detección de las fracciones se realizó monitoreando la absorción al UV a 254 nm (0.5 AU) (Waters Associates Absorbance detector, model 440). De esta purificación se obtuvieron 3 fracciones que fueron probadas en áfidos del melón y mosca blanca.

La fracción 7.2 fue también re-fraccionada empleando una columna Sep-pak cartridge (Waters C18) y un gradiente de agua-MeOH-EtoAc- $CHCl_3$ . El potencial insecticida de las fracciones obtenidas se evaluó sobre el tercer estadio ninfal de la mosca blanca.

#### **DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD DE LA FRACCIÓN 7 SOBRE LA MOSCA BLANCA**

Con el fin de determinar la razón por la cual las sub-fracciones de la fracción 7 perdían actividad sobre la mosca blanca se realizó un ensayo sometiendo a esta fracción a los siguientes tratamientos; 1) Fracción 7 sin alterar, 2) Fracción 7 sumergida en agua-metanol durante 24 h, 3) Fracción 7 sometida 24 h a MeOH. Transcurridas las 24 h de los tratamientos, los solventes se retiraron de las muestras empleando gas nitrógeno. Después de esto se evaluó la actividad de cada una de las fracciones sobre el tercer estadio ninfal de la mosca blanca.

#### **DETECCIÓN DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EN *F. OXYSPORUM* Y *F. MONILIFORME***

Durante el desarrollo de la investigación pudimos darnos cuenta que las toxinas de origen no proteico, posiblemente involucradas en el mecanismo de patogénesis de los hongos evaluados, no jugaban un papel determinante en éste. Por lo anterior, se realizaron pruebas para detectar si *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a

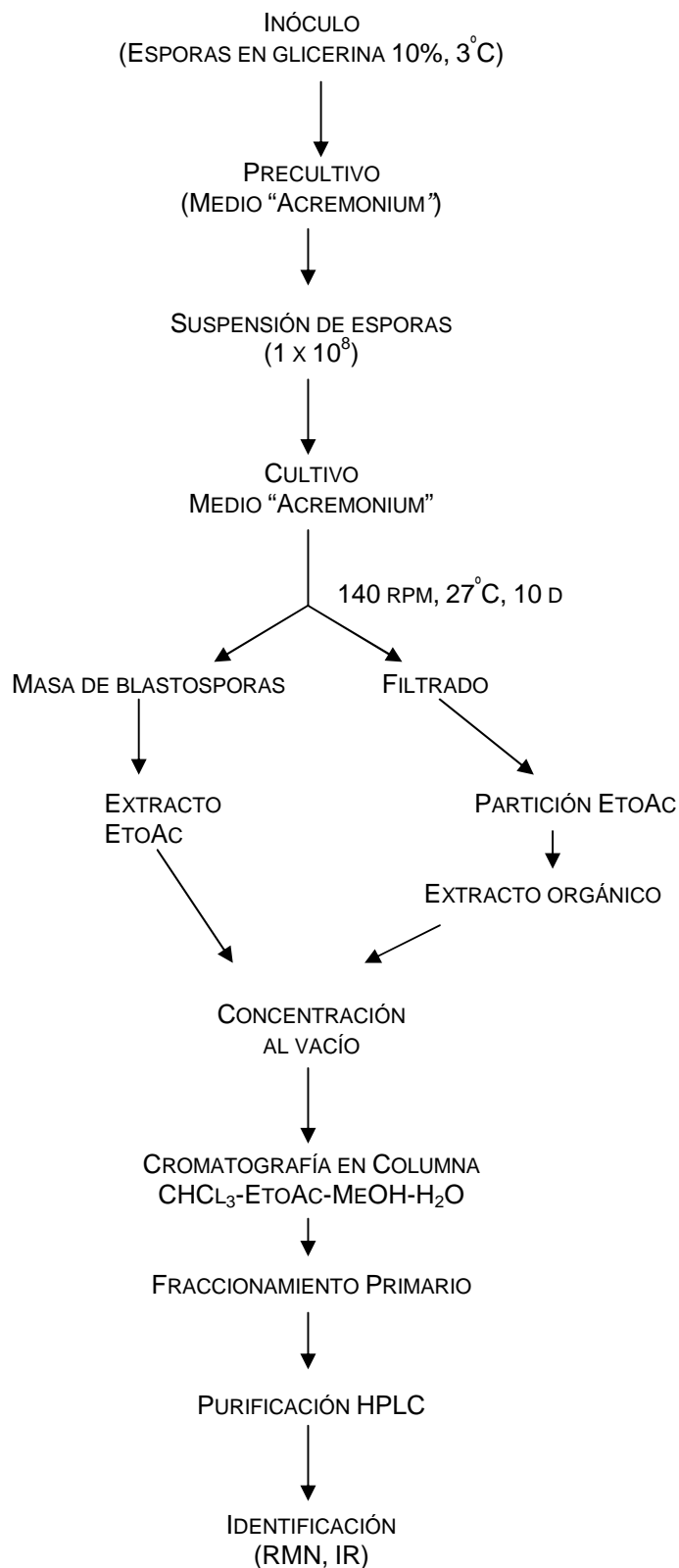


producían pectato-liasas, poligalacturonasas, lipasas, quitinasas y/o proteasas, enzimas previamente reportadas como determinantes en la penetración de los hongos entomopatógenos en su insecto huésped.

La producción de pectato-liasa se detectó empleando el medio descrito por Hanking y Agnanostakis (1975) a pH 7 y el mismo medio a pH 5 para la detección de actividad poligalacturonasa. El medio descrito por Sierra (1957) fue usado para detectar la producción de enzimas lipolíticas. Un medio a base de gelatina como substrato proteico, descrito en “Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria” (Society of American bacteriologist, 1951), fue usado para detectar la producción de enzimas proteolíticas. Finalmente, la actividad quitinasa fue determinada por el método descrito por Campbell y Williams (1951). Los detalles acerca de la metodología específica para cada enzima se encuentran en el anexo 8.6 de este trabajo.

Los ensayos se realizaron en placas prevaciadas, inoculando puntualmente 5 discos de micelio, crecido en SDA+EL, en cada caja. Cada disco tenía 0.5 cm de diámetro. Todas las placas se incubaron a 25°C y las evaluaciones realizadas cuando las colonias alcanzaron 10 mm de diámetro. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo.

**ESQUEMA NO. 1:**



## RESULTADOS

### PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS

El análisis de los diferentes medios para determinar el tiempo y la máxima producción de blastosporas por los dos hongos evaluados, nos indicó que el medio líquido "Acremonium" a los 10 días de crecimiento con agitación constante y a 27°C, resultó ser el mejor para la producción de estas estructuras que están directamente relacionadas con la producción de toxinas (Cuadros 2 y 3).

CUADRO 2. Medios de cultivo empleados para determinar el tiempo de máxima producción de blastosporas producidas por *F. oxysporum* Ed322

TIEMPO (Días)	PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS (x 10 <sup>6</sup> )				
	MEDIO "Acremonium"	MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3	MEDIO 4
1	0.0	0.04	0.03	0.0	0.0
2	80.0	0.05	0.05	45.0	0.04
3	105.0	0.07	0.07	70.0	0.11
4	162.0	0.14	0.13	103.0	0.22
5	160.0	0.15	0.16	125.0	0.25
6	182.0	0.21	0.23	146.0	0.28
7	232.0	1.75	0.31	162.0	0.12
8	608.0	2.0	5.0	187.0	0.05
9	648.0	4.0	32.0	208.0	0.03
10	650.0	4.75	40.0	209.0	0.028

CUADRO 3. Medios de cultivo empleados para determinar el tiempo de máxima producción de blastosporas producidas por *F. moniliforme* Ed29a

TIEMPO (Días)	PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS (x 10 <sup>6</sup> )				
	MEDIO "Acremonium"	MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3	MEDIO 4
1	0.85	0.09	0.04	0.06	0.0
2	2.25	0.17	0.07	1.2	0.0
3	80.0	0.19	0.10	3.50	0.04
4	120.0	0.21	0.11	7.2	0.05
5	125.0	0.26	0.17	45.1	0.11
6	187.0	0.50	0.24	87.6	0.13
7	256.0	1.0	2.0	123.2	0.14
8	325.4	3.5	6.25	192.7	0.23
9	353.0	6.2	8.32	235.4	0.56
10	355.0	10.4	15.46	241.2	0.61

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE TOXINAS EN FILTRADOS CRUDOS**

Se determinó la presencia de toxinas en filtrados crudos (medio de cultivo en el cual crecieron los hongos después de haberlo separado de las blastosporas por centrifugación) de *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a que habían crecido durante 10 días en el medio "Acremonium". Al inocular los filtrados por inyección en *G. mellonella* y tópicamente en *T. vaporariorum*, se obtuvieron mortalidades mayores al 90%, siendo más evidente el efecto en la palomilla de los apiarios donde los dos hongos evaluados lograron matar al 100% mientras que los organismos inyectados con el medio de cultivo estéril no sufrieron ningún daño. A pesar de lo anterior, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los dos insectos evaluados por lo cual podemos decir que es probable que en ambos hongos se encuentren presentes toxinas capaces de matar hasta al 100% de los organismos prueba (Cuadro 4).

CUADRO 4. Efecto de los filtrados crudos de *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a sobre el tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum* y el cuarto estadio larvario de *G. mellonella*

Filtrado crudo	MORTALIDAD (%)	
	<i>G. mellonella</i>	<i>T. vaporariorum</i>
Medio estéril	0.0 <sup>a</sup> A	0.0 <sup>b</sup> a
<i>F. oxysporum</i> Ed322	100 B	97 b
<i>F. moniliforme</i> Ed29a	100 B	100 b

<sup>a</sup> Promedio de 10 repeticiones. <sup>b</sup> Promedio de 4 repeticiones. Medias con la misma letra por columna no mostraron diferencias estadísticamente significativamente (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS TOTALES**

La actividad biológica de los extractos orgánicos totales, tanto de la masa de blastosporas como del medio de cultivo, fue menor que la de los filtrados crudos, lo cual nos indicó que posiblemente, los metabolitos responsables de la alta toxicidad observada en estos filtrados, no estaban siendo extraídos en su totalidad por los solventes orgánicos. Los mayores efectos los produjeron el extracto de blastosporas y del filtrado de *F. oxysporum* sobre la mosca blanca (75% y 40% respectivamente) (Cuadro 5).

CUADRO 5. Mortalidad de *A. gossypii* y *T. vaporariorum* ocasionada por los extractos totales de la masa de blastosporas y del filtrado de *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a

INSECTO PRUEBA	MORTALIDAD %			
	<i>F. oxysporum</i> Ed322		<i>F. moniliforme</i> Ed29a	
	<i>Ex. blastosporas</i>	Ex. filtrado	<i>Ex. blastosporas</i>	Ex. filtrado
Testigo	0.0 A	0.0 A	0.0 A	0.0 A
<i>A. gossypii</i>	24.0 <sup>a</sup> A	32.0 AB	28.0 AB	24.0 A
<i>T. vaporariorum</i>	<b>75.0<sup>b</sup> c</b>	<b>40.0 b</b>	20.0 a	15.0 a

<sup>a</sup> Promedio de 5 repeticiones. <sup>b</sup> Promedio de 4 repeticiones. Medias con la misma letra por renglón no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

#### FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *FUSARIUM MONILIFORME* ED29A

Los extractos totales de *F. moniliforme* Ed 29a resultaron ser muy complejos y presentaban una gran cantidad de glucosa. Debido a esto fue muy difícil realizar el fraccionamiento primario, sin embargo, se decidió llevarlo a cabo, a pesar de que se invirtieron un gran número de horas de trabajo.

El cuadro 6 nos presenta la actividad insecticida de las fracciones primarias de los extractos de *F. moniliforme* Ed29a evaluadas sobre el áfido del melón. La fracción 9, eluída con metanol (MeOH), fue la más activa de las fracciones del filtrado ya que causó un 52% de mortalidad en el insecto, mientras que las fracciones 4 y 5 de la masa de blastosporas, eluídas con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>): acetato de etilo (EtoAc), 2:8, la primera, y con EtoAc, la segunda, fueron las fracciones más activas de este extracto matando hasta el 46% de la población de *A. gossypii*. En este caso, si comparamos la actividad insecticida de las tres fracciones más activas de ambos extractos, podemos notar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas pues las tres causan alrededor de un 50% de mortalidad en el insecto prueba.

CUADRO 6. Mortalidad de *A. gossypii* ocasionada por las fracciones del filtrado y de las blastosporas de *F. moniliforme* Ed29a (24 h post-tratamiento)

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)
<i>Filtrado</i>	
Testigo	27.0 DC
F1	34.0 ABCD
F2-6	35.0 ABCD
F7-8	<b>42.0 ABC</b>
F9	<b>52.0 A</b>
Fx	40.0 ABCD
<i>Blastosporas</i>	
Testigo	27.0 CD
F1-3	28.0 BCD
F4	<b>45.0 ABC</b>
F5	<b>46.0 AB</b>
F7-8	22.0 D
F9	39.0 ABCD

Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones. Medias con la misma letra por bloque (Filtrado, blastosporas) no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Duncan  $\alpha=0.05$ )

A pesar de que se encontró una toxicidad significativa en fracciones del filtrado y de las blastosporas de *F. moniliforme* Ed29a, debido a la complejidad del extracto, nos vimos forzados a dejar el fraccionamiento de *F. moniliforme* Ed29a para estudios posteriores y continuar el trabajo con las fracciones activas de *F. oxysporum* Ed322.

#### FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* ED 322

El análisis de la actividad biológica de las fracciones primarias de *F. oxysporum* Ed322 nos mostró que las fracciones 4-5 y 7 del extracto de la masa de blastosporas de este hongo, eluidas con una mezcla de cloroformo  $\text{CHCl}_3$ :EtoAc, 2:8, la primera, y EtoAc:MeOH, 5:5, la segunda, causaron una mortalidad del 45% y 44% respectivamente, sobre el áfido del melón; estas dos fracciones fueron las más activas (Cuadro 7). En cambio, la fracción 6 del filtrado eluida con una mezcla de EtoAc:MeOH 8:2, causó sólo el

19% de mortalidad sobre este áfido. Si comparamos el efecto de las fracciones del filtrado y de las blastosporas sobre el áfido, vemos que las fracciones F4-5 y F7 de la masa de blastosporas causaron 2.3 a 3.1 veces más mortalidad que las fracciones F6 y F9 del segundo.

CUADRO 7. Mortalidad de *A. gossypii* ocasionada por las fracciones primarias del filtrado y masa de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322 (24 h post-tratamiento).

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)	
	Filtrado	Blastosporas
Testigo	2.0 DE	23.0 BC
F1	9.0 ABC	19.0 C
F2	7.0 BCD	
F3	0.0 E	
F4	10.0 ABC	<b>45.0 A</b>
F5	4.0 CDE	
F6	<b>19.0 A</b>	38.0 AB
F7	10.0 ABC	<b>44.0 A</b>
F8	3.0 CDE	22.0 C
F9	<b>14.0 AB</b>	16.0 C
F10	5.0 CDE	24.0 BC

Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones. Medias con la misma letra por columna no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Duncan  $\alpha=0.05$ )

La evaluación de la mortalidad ocasionada por las fracciones primarias de la masa de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322 sobre el tercer estadio ninfal de mosca blanca, nos indicó que las fracciones 6 y 7 fueron las más activas (Cuadro 8). También pudimos notar que este insecto es más resistente que el áfido del melón ya que ninguna de las fracciones causó más del 40% de mortalidad en él. Ninguna de las fracciones del filtrado tuvo un efecto significativo sobre este insecto (Resultados no mostrados).

**INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DE LA MASA DE BLASTOSPORAS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* Ed322**

El análisis de los 17 tratamientos empleados para incrementar la producción del extracto total y de las fracciones 4 y 7 de la masa de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322, nos indicó que el tratamiento 4 con agitación y el medio sólido Sabouraud-Dextrosa-Agar suplementado con extracto de levadura (SDA+EL) fueron los mejores para incrementar el extracto total y las fracciones 4 y 7, ya que en ellos se produjeron mayores cantidades de éstas (Cuadro 9).

CUADRO 8. Mortalidad de *T. vaporariorum* ocasionada por las fracciones primarias de la masa de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322 (72 h post-tratamiento)

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)
Testigo	5.4 A
F1	0.0 A
F2	0.0 A
F3	5.8 A
F4	0.0 A
F5	5.8 A
<b>F6</b>	<b>21.05 B</b>
<b>F7</b>	<b>36.53 C</b>
F8	0.0 A
F9	12.12 AB

Cada cifra representa el promedio de 4 repeticiones. Medias con la misma letra por columna no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ )

El medio sólido produjo un rendimiento de 1346 mg de extracto total comparado con los medios líquidos y la similitud cromatográfica de las fracciones 4 y 7 presentes en éste fue idéntica a la obtenida inicialmente. De estos 1346 mg, 152 correspondieron a la fracción 4 y 271.2 a la fracción 7 (Cuadro 10), por lo cual se decidió continuar con el cultivo masivo en este medio de cultivo.



Fraccionamiento químico de dos especies de *Fusarium*

CUADRO 9. Parámetros evaluados para determinar el mejor medio para incrementar las fracciones 4 y 7 de *F. oxysporum* Ed322

Tratamientos	Volumen del medio (mL)	Biomasa de blastosporas ó micelial (g)	Extracto total (mg)	Similitud en TLC
1	500	0.1552	3.9	++
2	500	0.1658	52.1	++
3	500	0.8474 (1.75)	23.5	++
<b>4</b>	<b>500</b>	<b>4.1776 (8.36)</b>	<b>94.6</b>	<b>+++</b>
5	500	0.1395	3.9	++
6	500	0.1740	2.3	++
7	500	0.2072	5.5	++
8	500	0.1305	63.8	++
<b>Medio sólido</b>	<b>100</b>	<b>170.0</b>	<b>269.2</b>	<b>+++</b>

Números entre paréntesis representan la biomasa de la masa de blastosporas sin agitación. En donde no se presentan significa que el crecimiento fue nulo. (++) Muy similar (+++) Idéntico

CUADRO 10. Biomasa obtenida del fraccionamiento primario del extracto total del micelio de *F. oxysporum* Ed322 a partir de 50 cajas de medio sólido (SDA+EL)

Fracción	Biomasa (mg)
Extracto total	1346
F1	37.7
F2	224.5
F3	<b>391.2</b>
F4	152.5
F5	141.2
F6	60.3
F7	<b>271.2</b>
F8	87.9
F9	59.6

#### PURIFICACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES ACTIVAS

Al realizar la purificación de la fracción 4 del micelio de *F. oxysporum* por medio de HPLC en fase reversa, se obtuvieron 5 sub-fracciones. Estas se evaluaron sobre el áfido del melón y se encontró que la fracción 4-4 fue la más activa ocasionando un 51.66 % de mortalidad en el insecto prueba. El análisis del cromatograma y espectro H<sup>1</sup>NMR mostraron que dicha fracción era una mezcla de compuestos, por lo cual, la purificación de ésta fracción se realizó separando cada uno de los picos presentes en el cromatograma mediante HPLC en fase reversa. De ésta se obtuvieron 14 subfracciones cuya actividad insecticida fue evaluada en áfidos del melón. El pico 2 (F4-4.2) fue el que causó una mayor mortalidad (58.33%). Las subfracciones 4-4.6-8, 4-4.11 y 4-4.12 causaron mortalidades de alrededor del 50%. Éstas fueron analizadas por H<sup>1</sup>NMR para tratar de determinar la estructura química de los compuestos presentes en ellas. Se determinó que aun necesitaban ser purificadas y al tratar de hacerlo, todas ellas se descomponían mostrando cromatogramas de numerosos picos. La purificación y el efecto de las fracciones activas en cada paso están representados en las figuras 5.5.1-5.5.3.

Debido a la descomposición de las fracciones, se decidió continuar el trabajo con la fracción 7 de *F. oxysporum* Ed322 que tuvo un efecto significativo tanto en el áfido del melón como en la mosca blanca de invernadero.

Al analizar la fracción 7 (la más activa sobre la mosca blanca) se obtuvieron dos fracciones, una acuosa que presentaba la glucosa y una metanólica con el resto de la fracción. Ambas fracciones fueron evaluadas en áfidos del melón y en el tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum* a 500 ppm. La fracción acuosa (F7.1) no tuvo ningún efecto sobre los insectos prueba. La fracción metanólica (F7.2) mostró cierta actividad sobre el áfido del melón causándole una mortalidad del 28 %. Esta fracción 7.2 fue purificada por HPLC en fase reversa. De esta purificación se obtuvieron 3 sub-fracciones que fueron probadas en áfidos del melón y mosca blanca a 500 ppm. La fracción 7.2.3 fue la más activa para los áfidos (Figuras 5.5.4-5.5.6). En las gráficas se puede apreciar que a medida que avanzaba la purificación de la fracción 7, la mortalidad sobre el áfido del melón aumentaba hasta llegar a un 65% con la fracción 7.2.3. (Cuadro 11), sin embargo no existía diferencia estadísticamente significativa entre ésta y el tratamiento testigo.

CUADRO 11. Mortalidad de *A. gossypii* ocasionada por las sub-fracciones de la fracción 7.2, obtenidas por HPLC en fase reversa (24 h post-tratamiento)

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)
Testigo	30.0 A
F7.2-1	43.3 A
F7.2-2	50.0 AB
F7.2-3	64.7.0 AB

Cada cifra representa el promedio de 4 repeticiones. Medias con la misma letra no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ )

La evaluación de la actividad insecticida de las sub-fracciones de la fracción 7.2, obtenidas por cromatografía en columna Sep-pak cartridge, sobre la mosca blanca, mostró que ninguna de ellas tuvo un efecto significativo sobre este insecto (Cuadro 12). Lo anterior demostró que en esta etapa de la separación de los compuestos se perdía la bioactividad de esta fracción sobre la mosca blanca.

CUADRO 12. Mortalidad del tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum* ocasionada por las sub-fracciones de la fracción 7.2, obtenidas por Sep-pak cartridge (Waters C18) en fase reversa (72 h post-tratamiento)

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)
Testigo	0.0 A
F7.2-1	0.33 A
F7.2-2	2.33 A
F7.2-3	0.66 A
F7.2-4	0.66 A
F7.2-5	0.0 A
F7.2-6	0.0 A
F7.2-7	0.0 A

Cada cifra representa el promedio de 4 repeticiones. Medias seguidas por la misma letra no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ )

**PÉRDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA FRACCIÓN 7 SOBRE MOSCA BLANCA**

El ensayo para determinar dónde y porqué perdía su actividad la Fracción 7.2 sobre la mosca blanca, mostró que la actividad presentada por esta fracción se perdía al agregarle agua (Cuadro 13). Lo anterior nos hace suponer que los azúcares que son eliminados al agregar el agua, son necesarios para el funcionamiento de las moléculas tóxicas o que posiblemente al agregar el agua se llevan a cabo una serie de reacciones en los compuestos presentes en la fracción, posiblemente de hidrolización, que hacen que la parte activa de la fracción pierda totalmente su actividad insecticida.

CUADRO 13. Mortalidad del tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum* ocasionada por la fracción 7.2 sometida a diferentes tratamientos (72 h post-tratamiento)

FRACCIÓN	MORTALIDAD (%)
Testigo	0.0 A
F7.2 sola	37.5 B
F7.2 MeOH	34.2 B
F7.2 H <sub>2</sub> O	0.0 A

Cada cifra representa el promedio de 4 repeticiones.

Medias seguidas por la misma letra no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ )

**DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EN *FUSARIUM OXYSPORUM* Y *F. MONILIFORME***

La pérdida de bioactividad durante la purificación de las fracciones en el fraccionamiento químico biodirigido, determinó que se investigara en ambas especies de *Fusarium* la producción de enzimas de tipo proteolítico y quitinolítico, las cuales han sido relacionadas con la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre sus insectos hospederos (Khachatourians, 1996). En ninguna de las dos especies se detectó la producción de lipasas, pero sí la producción de pectato-liasa y poligalacturonasa en *F. oxysporum* y sólo de poligalacturonasa en *F. moniliforme* (Cuadro 14).

CUADRO 14. Detección de la producción de enzimas por *Fusarium oxysporum* Ed 322 y *F. moniliforme* Ed29a.

Enzima detectada	<i>F. oxysporum</i> Ed322	<i>F. moniliforme</i> Ed29a
Pectato-liasa	+++	---
Poligalacturonasa	+	+++
Lipasa	---	---
Proteasas	++	++
Quitinasas	++	++

(+++) Muy evidente; (++) Evidente; (+) Ligeramente evidente; (---) Ausencia

## DISCUSIÓN

Khachatourians (1996) reporta que para que un hongo entomopatógeno sea capaz de causar una enfermedad en un insecto es necesario que se produzca una interacción favorable entre el patógeno y los tejidos de su insecto hospedero. En este sentido, la patogénesis involucra: 1) el crecimiento del tubo germinal en la cutícula del insecto y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares del tipo de las proteasas, quitinasas y lipasas, 2) la producción de sustancias mucilaginosas adhesivas, 3) la formación de apresorios en la superficie cuticular, 4) la penetración del apresorio dentro de las capas de la epicutícula, procutícula, epidermis y finalmente su introducción al hemocele y a la hemolinfa, lo cual resulta de la combinación de presión mecánica y degradación enzimática. Dentro del hemocele y la hemolinfa el hongo crece y se multiplica y produce cuerpos hifales o blastosporas. Estos cuerpos se distribuyen a través del hemocele, producen metabolitos tóxicos que interactúan o evaden los mecanismos de defensa del insecto y contribuyen en poca o gran medida a la muerte del hospedero.

Khachatourians (1991) menciona, con base en el criterio de estructura y función, que los hongos entomopatógenos son capaces de producir dos tipos de toxinas, las conformadas por grupos peptídico y las conformadas por grupos no peptídicos. Los resultados del presente trabajo nos indican que en el mecanismo de patogénesis de las especies de *Fusarium* estudiadas, posiblemente están involucradas ambos tipos.

Las especies de *Fusarium* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios. Algunos de éstos son tóxicos tanto para plantas como para animales, incluyendo vertebrados (Willie and Morenhouse, 1997). *Fusarium moniliforme* ha sido extensamente estudiado por su capacidad de producir compuestos químicos en una gran variedad de condiciones (Bruckner y colaboradores, 1989). Este hongo sintetiza diferentes metabolitos bioactivos y es bien conocido por su habilidad para producir ácido giberélico y otras giberelinas que son empleados en la agricultura y horticultura para promover el crecimiento y la producción de diversos cultivos. *F. moniliforme* produce además micotoxinas, fitotoxinas, estrógenos y enzimas extracelulares. También es capaz de producir dos tipos de pigmentos: los carotenoides y las bikaverinas que tienen actividad antibiótica contra *Leishmania brasiliensis*. La producción de todos estos metabolitos depende de las condiciones de cultivo y la especificidad de la cepa (Bruckner y colaboradores, 1989).

Otras especies de *Fusarium* han sido estudiadas por su toxicidad hacia insectos y se ha demostrado su actividad insecticida (Claydon y colaboradores, 1977, 1979; Teetor-Barsh y Roberts, 1983). Actualmente, en varios países del mundo, se comercializa una cepa insecticida no patogénica de *F. oxysporum* como *Biofox C* o *Fusaclean* (APS Biological Testigo Committee, USDA-ARS, 2005) que son cepas muy específicas hacia sus hospederos.

Claydon y colaboradores (*op. cit.*) reportan que al evaluar la actividad insecticida de metabolitos secundarios extraídos de *F. solani* y *F. larvarum* sobre *Calliphora eritrocephala*, se obtuvieron mortalidades del 40 al 70% por inyección y del 20 al 40% por aplicación tópica sobre este insecto. Nuestros resultados nos indican que las toxinas de naturaleza no proteica, posiblemente involucradas en los mecanismos de patogénesis de *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a, podrían ser responsables del 40 al 70% de la mortalidad observada en el áfido del melón y del 40% en mosca blanca debido a que fueron las mortalidades obtenidas con los extractos orgánicos. En algunos casos, como el de *M. anisopliae*, la producción de toxinas de naturaleza no proteica, las destruxinas, puede ser responsable de hasta un 100% de la mortalidad de los insectos prueba (Wahlman y Davidson, 1993).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que al realizar la inoculación de los filtrados crudos, se obtuvieron mortalidades cercanas al 100%, tanto en *G. mellonella* como en *T. vaporariorum*. Sin embargo, después de realizar la extracción orgánica, mediante la cual se extrajo una porción de los compuestos tóxicos, desechándose los compuestos más polares, la mortalidad sobre estos insectos y el áfido del melón disminuyó significativamente. Estos resultados reflejan la importancia de realizar estudios químicos a mayor profundidad sobre los compuestos químicos de naturaleza no proteica y proteica que pudieran estar involucrados en el mecanismo de patogénesis de ambas especies de *Fusarium*, ya que ellas, seguramente, están desempeñando un papel importante en la mortalidad causada por estos hongos sobre sus insectos hospederos.

Por otro lado es importante mencionar que las fracciones que resultaron activas para ambos insectos fueron siempre las más polares e inestables, lo cual impidió determinar su estructura química. Lo que ocurrió, posiblemente pudo ser lo que reportan algunos autores (Sibilia y Sibilia, 1996; Harvey, 1999) sobre algunos productos naturales cuya actividad se debe a un sinergismo entre varios compuestos puros. Se han reportado casos en los cuales incluso la conformación de las moléculas puede cambiar al quitarles uno u otro radical; en nuestro caso, pudiera tratarse de los azúcares, los cuales pudieran facilitar la entrada de las toxinas a las células o su transporte dentro del organismo prueba. Aunque también pudiera ser que, siendo tan polares, se desnaturalicen fácilmente o se eliminen los compuestos activos, lo que se demostró al tratarlas con agua durante la purificación en fase reversa. Posiblemente, los compuestos activos se hidrolizaron, perdieron su actividad o se desecharon en el proceso.

Quesada-Moraga y Vey (2003) reportan tres aislamientos de *B. bassiana*, cuyos filtrados fueron tóxicos a *Locusta migratoria* por inyección. Los metabolitos tóxicos secretados fueron macromoléculas y la única forma de retenerlas durante el proceso de aislamiento fue por diálisis. Ellos lograron aislar las moléculas bio-activas presentes en los filtrados crudos precipitándolas por saturación al 90% con sulfato de amonio. La actividad insecticida fue detectada en la fracción de alto peso molecular después de pasarla por un gel de Sephadex G-25. La actividad insecticida de esta fracción se redujo significativamente después de exponerla por 2 h a 60°C y 20 min a 120°C, lo que sugirió que la naturaleza de los metabolitos insecticidas en los filtrados crudos era proteica.

Durante el proceso de extracción nosotros utilizamos varias veces agua y sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua de nuestros extractos orgánicos. Es muy posible que durante este proceso nosotros hayamos eliminado las moléculas mayoritariamente responsables del efecto insecticida que obtuvimos con los filtrados crudos y que se vio disminuido en los extractos orgánicos. Existen reportes (Gupta y colaboradores, 1991) que indican que el ciclodepsipéptido beauvericina ha sido aislado de *F. semitectum* y *F. moniliforme* var. *subglutinans* por lo cual, existe la posibilidad de que compuestos de este tipo estén presentes en los hongos estudiados en nuestro trabajo y los cuales, nosotros pudimos haber eliminado en el proceso. De cualquier forma, es claro que hace falta aún más investigación química sobre cómo aislar y hacer más estables los compuestos responsables de la actividad insecticida para que puedan ser identificados.

La detección de la producción de enzimas de tipo proteasa y quitinasa en ambas especies de *Fusarium*, nos sugiere que este tipo de compuestos también puede estar involucrados en el mecanismo de patogénesis de estos hongos sobre sus insectos hospederos, ya que, posiblemente, facilitan su penetración a través de la cutícula del insecto, como sucede en otros hongos entomopatógenos (St. Leger, 1995).

Lo anterior nos hace estar de acuerdo con Mollier y colaboradores (1994), y nos lleva a pensar que la mortalidad observada en *A. gossypii* y el tercer estadio ninfal de *T. vaporariorum*, ocasionada por nuestros dos aislamientos de *Fusarium*, pudo haber sido también ocasionada por un efecto aditivo en donde podrían estar involucradas tanto la fuerza mecánica como la química (enzimas y toxinas) que, aunadas al desarrollo del hongo dentro del insecto, constituyen la causa de la mortalidad (100%) observada al inocular el hongo.

Por último, es importante hacer énfasis en la necesidad de llevar a cabo ensayos en los cuales se determinen los mejores medios de cultivo para el desarrollo de los hongos y la producción de sus metabolitos bioactivos. Esto hará más eficiente la producción de éstos y disminuirá los costos de producción de estos microorganismos y sus metabolitos secundarios con potencial de aplicación. Por otro lado, el estudio y determinación de la estructura de los metabolitos tóxicos de los hongos, involucrados en los mecanismos de patogénesis, es vital para entender mejor su modo de acción y así poder aprovechar este conocimiento.



### BIBLIOGRAFIA CITADA

- APS Biological Testigo Committee, USDA-ARS, 2005. Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens. ([www.ippc.orst.edu/biocontrol/biopesticides](http://www.ippc.orst.edu/biocontrol/biopesticides); [www.epa.gov/pesticides/biopesticides](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides); [pestdata.ncsu.edu/ir-4/apps/news/BioCompanies.htm](http://pestdata.ncsu.edu/ir-4/apps/news/BioCompanies.htm))
- Bruckner, B; D Blechschmidt y B Schubert. 1989. *Fusarium moniliforme* Sheld. A fungus producing a broad spectrum of bioactive metabolites. ZENTRALBL MIKROBIOL. 144(1):3-12
- Campbell LL Jr. y OB Williams. 1951. A study of the chitin decomposing microorganisms of marine origin. J. GEN. MICROBIOL. 5:894-905
- Claydon, N, JF Grove y M People. 1977. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium solani*. J. INVERT. PATHOL. 30:2216-223
- Claydon, N, JF Grove y M People. 1979. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium larvarum*. J. INVERT. PATHOL. 33:364-367
- Coll, JC y BF Bowden, 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. J. NAT. PROD. 49(5): 934-936
- Gupta, S, SB Krasnoff, NL Underwood, JAA Renwick y DW Roberts. 1991. Isolations of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. MYCOPATHOLOGIA 115(3):185-189
- Hankin L y SL Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. MYCOLOGIA 67:597-607
- Harvey, AL. 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? Proceedings of the Royal Society of Medicine: Medicines from nature. Vol. 20: 196-198
- Khachatourians, GG. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: DK Arora, L Ajello y KG Mukerji (Eds.) Handbook of Applied Mycology. Vol 2, Human, animals and insects. Marcel Dekker, New York, pp.613-661
- Khachatourians, GG. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En: DH Howard y JD Miller (Eds.) The Mycota, Vol VI: Human and animal relationships. Springer Verlag, Berlin.
- Mollier P, J Lagnel, B Fournet, A Aiouna y G Riba. 1994. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. J. INVERT. PATHOL. 64(3): 200-207
- Quesada-Moraga, E y A Vey. 2003. Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro pasaje on these factors. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY. 13(3): 323-340

- Sibia, JP y A Sibia. 1996. A guide to materials characterization and chemical análisis. Wiley- VCH. 408 pags.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. ANTONIE VAN LEEUWENHOCK NED. TIJDSCHR. HYG. 23:15-22
- Society of American Bacteriologist. Committee on bacteriological technique. 1951. Manual of methods for pure culture study of bacteria. Geneva, NY
- St. Leger, RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY (Suplement) 73:S1119-S125
- Teeter-Barsh, GH y DW Roberts. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. MYCOPATHOLOGIA 84:3-16
- Wahlman M y BS Davidson. 1993. New dextruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. NAT. PROD. 56:643-647
- Willie TD y LG Morehouse. 1997. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses. Vol 1. Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins, Marcel Dekker, USA.

## LEYENDAS A LAS FIGURAS 5.5.1-5.5.6

**Figura 5.5.1** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES PRIMARIAS DEL EXTRACTO TOTAL DE BLASTOSPORAS DE *F. OXYSPORUM* ED322. La fracción 4 tuvo el mayor efecto en el insecto prueba causando una mortalidad del 45.0 %.

**FIGURA 5.5.2.** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES SECUNDARIAS DE LA FRACCIÓN 4. Se observa que la fracción 4-4 tuvo el mayor efecto sobre este insecto ocasionando una mortalidad del 51.66 %.

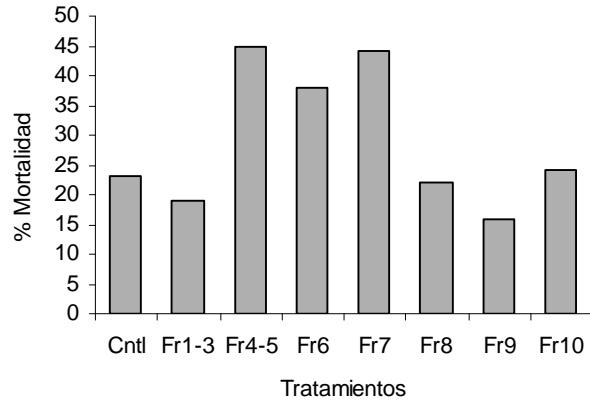
**FIGURA 5.5.3.** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES TERCARIAS DE LA FRACCIÓN 4-4. El pico 2 (F4-4.2) fue el que causó una mayor mortalidad (58.33%). Las sub-fracciones 4-4.6-8, 4-4.11 y 4-4.12 causaron mortalidades de alrededor del 50%.

**FIGURA 5.5.4.** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES PRIMARIAS DEL EXTRACTO TOTAL DE BLASTOSPORAS DE *F. OXYSPORUM* ED322. La fracción 7 tuvo el segundo lugar en efecto sobre el insecto prueba causando una mortalidad del 44.0 %.

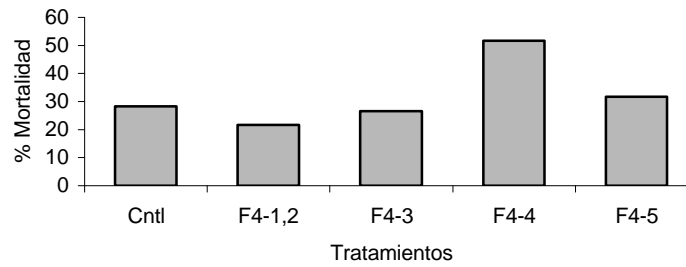
**FIGURA 5.5.5** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES SECUNDARIAS DE LA FRACCIÓN 7. La sub-fracción metanólica 7.2 causó una mortalidad del 28% en el áfido del melón.

**FIGURA 5.5.6.** MORTALIDAD DE *A. GOSSIPII* OCACIONADA POR LAS FRACCIONES TERCARIAS DE LA SUBFRACCIÓN F7.2. La fracción 7.2.3 fue la más activa logrando matar hasta un 65 % de los insectos prueba, sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ésta y el tratamiento testigo.

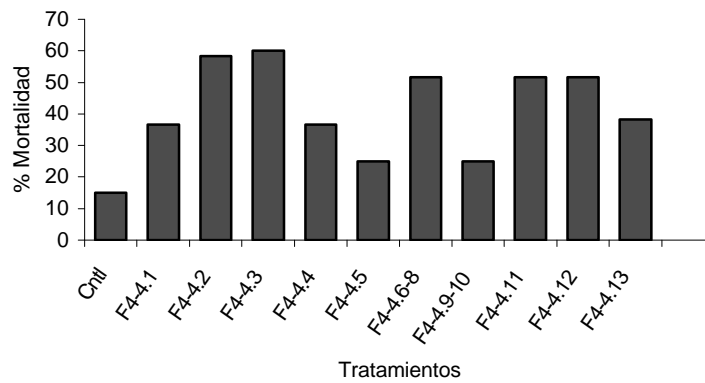
**FIGURA 5.5.1.** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones primarias del extracto total de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322



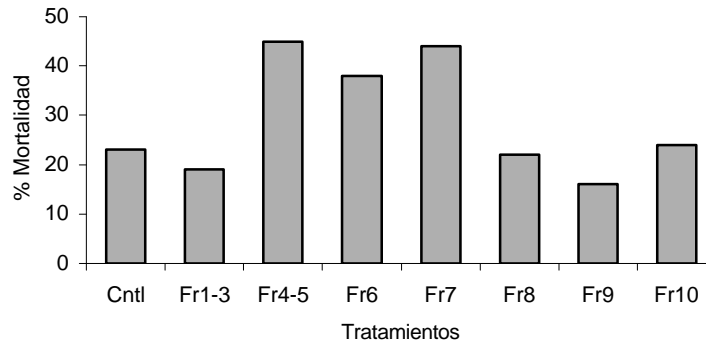
**FIGURA 5.5.2.** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones secundarias de la F4



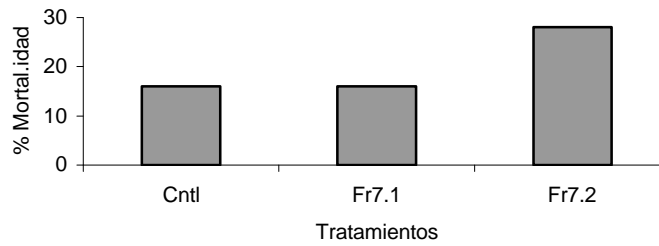
**FIGURA 5.5.3.** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones terciarias de la F4-4



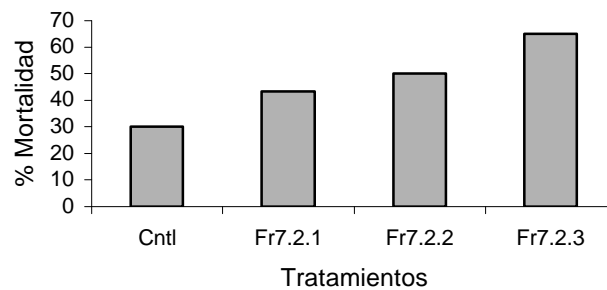
**FIGURA 5.5.4.** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones primarias del extracto total de blastosporas de *F. oxysporum* Ed322



**FIGURA 5.5.5** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones secundarias de la F7



**FIGURA 5.5.6.** Mortalidad de *A. gossipii* ocasionada por las fracciones terciarias de F7.2



---

**5.6 FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *PAECILOMYCES*  
*MARQUANDII* (MASSEE) S.J. HUGHES UTILIZANDO COMO ORGANISMOS DE  
PRUEBA A LA PALOMILLA DE LOS APIARIOS *GALLERIA MELLONELLA*  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) Y A LA MOSQUITA BLANCA *TRIALEURODES*  
*VAPORARIORUM* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE)**

(Capítulo a publicar)

---

**BIODIRECTED CHEMICAL FRACTIONATION OF AN ENTOMOPATHOGENIC  
ISOLATION OF *Paecilomyces marquandii* (Masse) S.J. Hughes**

Torres-Barragán A<sup>1</sup>, AL Anaya<sup>1</sup>, JJ Sims<sup>2</sup> and S Midland<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510; <sup>2</sup>Plant Pathology Department, University of California, Riverside, CA 92521

**ABSTRACT**

Non proteic and proteic toxins of *Paecilomyces marquandii* are involved in the pathogenicity of this fungus over the third-instar nymphs of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* West.) and fourth larval instar of wax moth (*Galleria mellonella* L.). Proteases, lipases and chitinases are produced on culture media and perhaps contribute in the penetration mechanism of this fungus inside its host insect. A non-proteic toxin of this fungus may be causing 40% of mortality on wax moth larvae.

**INTRODUCTION**

Among the most fascinating and important properties of fungi is their ability to produce a tremendous variety of secondary metabolites that display a broad range of biological activities. Numerous important pharmaceuticals have been discovered through studies of fungal chemistry (Masarekar, 1992). Antibacterial agents such as penicillin and cephalosporin are perhaps the best-known examples. Other fungal products show potential as natural agrochemicals (Gardner and McCoy, 1992), examples of these include destruxins (insecticides), strobirulins (fungicides), and various phytotoxins (herbicides).

It is well known that entomopathogenic fungi produce toxins during mycosis and in many cases they are responsible for the death of their host (Khachatourians, 1996). Fumonisin, ochratoxin, patulin, zearalenone, and dipicolinic acid are some of the highly toxic metabolites (Khachatourians, 1996; Asaff et al., 2005).

Chemically diverse, toxic metabolites (destruxins, efraeptins, oosporein, beauvericin, viridoxins, beauveriolides) have been described in several fungal biological control agents including *Beauveria*, *Fusarium*, *Tolypocladium*, *Gliocladium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* (Khachatourians, 1991; Gupta et al., 1993; Hajek and St. Leger, 1994; Strasser et al., 2000; Vey et al., 2001). Although some of these metabolites are known to be important pathogenicity determinants or antagonistic factors, the role of others remains unclear.

The production of fungal toxins has been demonstrated in artificial culture (Vey, et al., 1993) and in few cases, *in vivo* (Bidochka and Khachatourians, 1991). Filtrates of entomopathogenic cultures were toxic upon feeding, topical application or injection into susceptible insects (Weiser and Matha, 1988; Miranpuri and Khachatourians, 1990; Mule, et al, 1992; Wahlman and Bradley, 1993). Their involvement in entomopathogenicity has been controversial since only in some cases has the role of these filtrates been demonstrated in natural conditions.

Knowledge of fungal toxins could lead to the development of new insecticides. A few distinctive classes of insecticidal metabolites have been discovered through studies of such species, including the beauveridiols, destruxins, and viridoxins (Turner and Aldrige, 1983; Gupta et al., 1993, Krasnoff, et al. 1996). Some of these compounds display both dietary and topical activity against insects. Approximately 30 metabolites have been identified from entomopathogenic fungi. However, some of them as destruxins and efraeptines possess different chemical types (Gardner and McCoy 1992; Strasser et al., 2000; Vey et al., 2001).

Some species of genus *Paecilomyces* have been studied for their potential as biological control agents of some insects (Osborne and Landa, 1992; Pendland, et al., 1995; Smith, 1993). *Paecilomyces marquandii* (Masse) S.J. Hughes (anamorphic ascomycete) has been poorly studied. Esnard et al., (1998) investigated its potential as a biological control agent of free living and plant-parasitic nematodes. Brandl et al., (1995) studied it as a degrader of plastic materials; Rossi et al., (1987), Crebelli et al., (1988) and Ricci et al. (2000) reported its capability of producing leucinostatin, a peptide antibiotic with cytotoxic activity.



We found this fungus (*P. marquandii*) naturally infecting ants of *Solenopsis* sp. West. (Hymenoptera: Formicidae) in the tropical forest of El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. We tested its potential as a biological control agent on the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* West. Homoptera: Aleyrodidae) and we observed that it caused more than 90% mortality on the third-instar nymphs of this insect (Torres-Barragan, *et al.* 2004). The present investigation was aimed to determine if there are some toxins involved in the pathogenicity of this fungi on the third-instar nymphs of greenhouse whitefly and fourth larval instar of wax moth (*Galleria mellonella* L., Lepidoptera: Pyralidae).

## MATERIALS AND METHODS

*Fungal strain.* A monospore isolate of *Paecilomyces marquandii* originally isolated from *Solenopsis* sp., was selected for this study. This strain is deposited in the culture collection of Instituto de Ecología, Xalapa, VZ, MX as Ed22. The selected isolate was cultivated on Sabouraud dextrose agar plates (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 0.2% yeast extract (DIFCO) (SDAY). Ten days old cultures were used to obtain 5 mm-diameter mycelia discs as inoculum in all experiments.

*Test insects:* A colony of greenhouse whiteflies (*T. vaporariorum*) was maintained on beans (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. Flor de mayo) at Instituto de Biología greenhouse, UNAM. Leaves infested with third-instar nymphs, were taken from plants during the day of an experiment, washed in deionized sterile water, and dried with sterile absorbent paper. After drying, infested leaves were examined under stereomicroscope. Leaves with healthy third-instar nymphs were selected and placed in sterile Petri dishes and each inoculated topically with 500 ppm suspensions of each extract/fraction. Control nymphs were treated with a MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9) solution and a second control with just sterile deionized water. The experimental unit consisted of 30-whitefly nymphs on its respective leaf. Assays were maintained at room temperature in a randomized design with four replicates. Insect survival was evaluated 48 h after treatment.

A *Galleria mellonella* colony was established with a donation from the Laboratory of Insect Pathology, Phytosanitary Center, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico. The colony was maintained on an artificial diet (500 g wheat bran; 200 mL

glycerin; 200 mL honey; 2 g brewer's yeast; 2.5 g of mix of vitamins free of casein; 2 g of salts of Wesson (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland)). The colony was maintained at 25°C and 80 ± 1% of relative humidity in the dark. On the day of an experiment fourth instar larvae, that looked healthy, were randomly chosen from their container. Ten µL of culture broth/extract or fraction were injected in fourth larval instar. Injection was done in the fourth proleg into the haemocoel of each larva. After injection larvae were incubated in plastic containers with artificial diet at 25°C and 80% relative humidity. The number of dead larvae was scored daily. They were considered dead when they displayed no movement in response to touch. Ten replicates of ten larvae each were tested for each media/extract or fraction (500 ppm). A non-inoculated broth control was tested and compared with culture broth. Extracts and fractions were compared with a MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9) solution and sterile deionized water as controls. Larvae were maintained in plastic containers. Mortality was recorded at 48 h post-treatment. Treatments were analyzed by ANOVA and means were compared using Tukey multiple mean test ( $\alpha=0.05$ ).

*Blastospores production.* Because blastospores are formed during the infection cycle of an insect and they facilitate proliferation of the fungus throughout the insect's haemocoel (Inch, *et al.*, 1986), we used three different liquid media to determine the time and best media for their production. The media were (g/L), Czapek Dox Broth (Bacto sacrose 30, NaNO<sub>3</sub> 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KCl 0.5, FeSO<sub>4</sub> 0.01); media 1 (glucose 10, mycological peptone 5, yeast extract 3), and; media 2 (sucrose 5, peptone 5, yeast extract 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10, MgSO<sub>4</sub> 0.2).

Shake flask cultures were prepared by inoculating one 5 mm-diameter mycelia disc for each 100 ml of media (approximately 10<sup>7</sup> conidia/100 mL). Cultures were incubated at 25°C and 140 rpm on a rotary shaker. Each medium was cultivated in three replicate flasks.

Blastospore counts were made every 24 h using a Neubauer haemocytometer. Each count was the mean of three different samples for each flask and medium. Differences among the three media were determined by analysis of variance (ANOVA). When the overall F test was significant, means were compared using Tukey multiple mean test ( $\alpha=0.05$ ).

*Toxicity of crude filtrate.* Crude filtrates of the three different media mentioned above were tested to evaluate their insecticidal effect. Blastospores were harvested after 10 days of growth and separated from the broth by filtration in vacuum through a Büchner funnel and filter paper (Whatman No.2). Broth was then centrifuged at 600 rpm for 10 min. The pellet containing blastospores, was joined with the one obtained in filter paper.

*Fungal extract.* Isolates were grown in 1L Erlenmeyer flasks that contained medium 2. Liquid cultures were grown at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  on a rotary shaker (140 rpm) for eight days. After this time, blastospores were harvested and separated from the broth as mentioned above. Filtrate and blastospores were extracted three times with ethyl acetate separately. Organic layers of both extracts were concentrated under reduced pressure.

Assays to evaluate the insecticidal activity of both extracts were done using the third instar nymphs of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) and fourth larval instars of wax moth as test insects. Extracts were tested at 500 ppm on each insect. Assays on wax moth were done as mentioned above. Both assays were analyzed by analysis of variance (ANOVA). When the overall F test was significant, means were compared using Tukey multiple mean test ( $\alpha=0.05$ ).

*Chemical fractionation and purification of active fractions.* Both of the crude extracts were fractionated by vacuum liquid column chromatography (CC) on Silica gel H (Brinkman Instruments Inc.) (60, 70-230 mesh, Merck) employing a step-wise  $\text{CHCl}_3$ -to-MeOH solvent gradient to finally obtain 9 fractions. Purification of active fraction was done by thin-layer (TLC) and column chromatography (CC). Identification of active compound was attempted by  $^1\text{H}$ NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR and infrared analysis. Insecticidal activity of each fraction was evaluated on wax moth and whiteflies as mentioned previously.

*Detection of enzyme production.* Tests were made on pre-poured plates by point inoculation with mycelium from SDAY. Each plate was inoculated with 5 discs of 0.5 cm of diameter each. Three replicates of each assays was done.

To detect pectolytic activity, we used the medium described by Hanking et al. (1971) at pH 7 to detect pectate lyase production and the same medium at pH 5 to

detect polygalacturonase activity. The medium described by Sierra (1957) was used to detect production of lipolytic enzymes. A medium that contained gelatin as protein substrate (Manual of Methods for PCSB, 1951) was used to detect production of proteolytic enzymes. Finally, chitinase activity was determined by the method described by Cambell and Williams (1951). Details about the specific methodology are given by Hankin and Anagnostakis (1975).

Plates were incubated at room temperature (25°C) and observations were made when colonies reached 10 mm in diameter.

## RESULTS

*Blastospores production.* Media 2 cultured for eight days at 25°C and 140 rpm on a rotary shaker was the best for production of blastospores of *Paecilomyces marquandii* (Fig. 1).

### *Toxicity of crude filtrate*

The three crude extracts were significantly toxic to fourth instar larvae of *G. mellonella* (Table 1). Thirty 36 hr after treatment the larvae turned black, lethargic and died. Czapek Dox Broth and Media 2 had the highest effect since they caused 100% of mortality in this insect; however, the effect of Media 2 was faster than the one of Czapek Dox Broth, this was the reason of why we choose Media 2 to follow the experiments.

*Fungal extracts:* Extracts of *P. marquandi* caused a significant mortality on third instar nymphs of whiteflies. However, the blastospore extract killed 2x more insects than the filtrate extract. The blastospore extract was the only one that had a significant mortality effect on *Galleria mellonella* (Table 2). The mortality caused by both extracts in test insects was significantly smaller compared with the effect of the crude filtrate (Table 1).

*Chemical fractionation and purification of active fractions:* None of the 9 fractions obtained from the CC (CHCl<sub>3</sub>-to-MeOH) had a significant effect on any of the two test insects (data not shown). Small crystals were obtained during the evaporation of

solvents in the vial with total extract. Crystals were detected also in fraction 3 of blastospores extract. Thin layer chromatography of these crystals (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 99:1) showed a fluorescent spot with R<sub>f</sub>= 0.57. The purification process of crystals was done by TLC and step-wise CC with CHCl<sub>3</sub>: MeOH. These crystals had a significant insecticidal effect on fourth instar larvae of *G. mellonella* (Table 3). Characterization and identification of crystals could not be done due to their instability, since they become decomposed during the process.

*Detection of enzyme production:* Detection of enzyme production showed that *P. marquandii* Ed22 produced pectate-lyase, lipase, protease and chitinase type enzymes on culture media. The production of the last three enzymes was more evident (Table 4).

## DISCUSSION

Khachatourians (1996) reports that the physicochemical aspects of the disease development require favorable interaction of the pathogen with the host outer tissues. Thereafter, pathogenesis involves: 1) growth of the germ tube on the cuticle with the concomitant production of extra cellular hydrolytic enzymes, that involves extra cellular proteases, chitinases and lipases; 2) production of adhesive mucilaginous substances; 3) formation of apresoria on the cuticle surface and 4) penetration of infection peg into the epicuticle layer, the procuticle, epidermis and finally the hemocoel and hemolymph, which results from the combination of mechanical pressure and enzymatic degradation. Inside the hemocoel and hemolymph, the fungus grows and produces hyphal bodies or blastospores. In this way, fungi spread throughout the hemocoel, releasing toxic metabolites that interact with insect defense mechanisms. These toxins contribute to killing the host.

Based on criteria of structure and function, entomopathogenic fungi produce toxins that can be divided into non-peptide and peptide groups. The molecular nature, biosynthesis, and general mode of action of these compounds have been demonstrated in cell culture and in few cases in whole insects (Khachatourians, 1991). The results presented in this work suggest that in pathogenesis mechanism of *Paecilomyces marquandii* could be involved both kind of toxins, proteic and non-proteic

as was suggested by the insecticidal effect of crude filtrates but least toxic effect of organic extracts.

Some species of *Paecilomyces* have been studied because their capability to produce toxins, principally proteic toxins. From this, leucinostatins have been highly studied because their antibiotic and cytotoxic properties. Leucinostatin A and B have been described from *P. lilacinus* (Mikami, *et al.* 1984), Leucinostatins D, H and K have been isolated from *P. marquandii* (Radics, *et al.*, 1987 and Rossi, *et al.* 1987). We found that there is a possible toxin involved in the pathogenesis mechanism of *P. marquandii*, however, due to the instability of crystals obtained during the bio-directed fractionation we were unable to determine the chemical structure of this compound. Further studies are needed in order to determine this hypothesis.

We also found that this fungus has the capability of produce enzymes with pectate-lyase, lipase, protease and chitinase activity that could increase its potential as a pathogen of insects. Investigation with these enzymes is of great interest as they may be the source for a new class of insecticidal agents. Moreover, the knowledge of fungal toxins is vital to a better understanding of the mode of action of entomopathogenic fungi at both cellular and the molecular level.

Investigations based on observations of fungal ecology are especially appealing in relation with the bioactive metabolites that fungi produce since it is better to search for bioactive metabolites with an ecological hypothesis in mind than to screen organisms randomly. The percentage of novel compounds isolated through the former criteria has been unusually high (Omura, 1992). The use of "ecologically relevant" assays, in addition to medically and agriculturally relevant test organisms, could be the best way to understand and discover promising molecules with a potential use as agrochemicals or drugs (Jensen and Fenical, 1994). However, the non-random selection of organisms for these kinds of studies and the unexplored nature of many entomopathogenic fungi and their interaction with their hosts could be also useful contributions.

The advantage of fungi as sources of useful natural products is well documented. Fungal metabolites are renewable resources, and methods for large-scale production of important fungal metabolites can be developed using established techniques.

Modification of metabolite structure and dramatic improvements in metabolite production efficiency can be accomplished through strain mutation, medium variation, and optimization of culture conditions (Gloer, 1997).

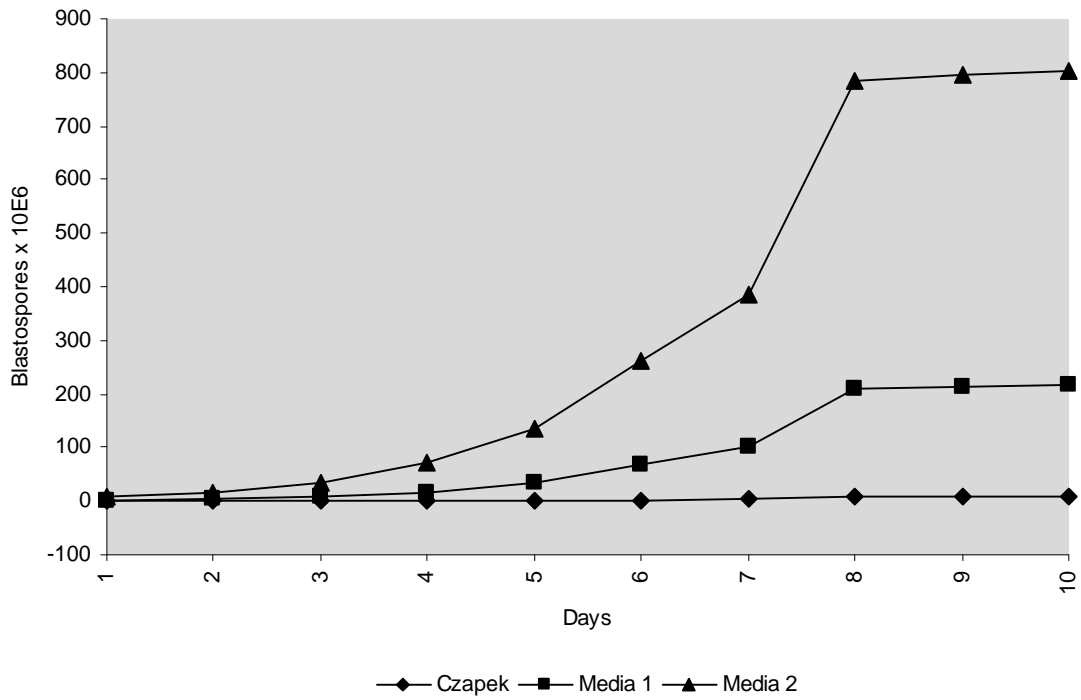
## REFERENCES

- Bidochka, M and GG Khachatourians. 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. **J. Invert. Pathol.** 58: 106-117.
- Brandl, H., Bachofen, R., Mayer, J., and Wintermantel, E. 1995. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. **Can. J. Microbiol.** 41 (Suppl. 1): 143-153.
- Cambell, LL and OB Williams. 1951. A study of the chitin decomposing microorganisms of marine origin. **J. Gen. Microbiol** 5:894-905.
- Hankin L y SL Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607.
- Hankin, L, M Zuker and DC Sands. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Appl Microbiol** 22:205-209.
- Crebelli, R., Carere, A., Conti, G., Conti, L., Rossi, C., and Tuttobello, L. 1988. Evaluation on the mutagenic activity of leucinostatins, a novel class of antibiotic peptides produced by *Paecilomyces marquandii*, in the modul *Aspergillus nidulans*. **Microbiol.** 11: 299-305.
- Esnard, J, Marban-Mendoza, N, and Zuckerman, BM 1998. Effects of three microbial broth cultures and an organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. **Europ. J. Plant Pathol.** 104: 457-463.
- Gardner, WA and CW McCoy. 1992. Insecticides and herbicides. *In: DB Finkelstein and C Ball (Eds.) Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products.* Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 335-359.
- Gloer, JB 1997. Applications of fungal ecology in the serach fro new bioactive natural products. *In: DT Wicklow and B Södeström (Eds.) The Mycota, Vol IV: Environmental and Microbial Relationships.* Springer Vrelag, Berlin. pp. 249-268.
- Gupta, S, SB Krasnoff, JAA Renwik, DW Roberts, JR Steiner and J Clardy. 1993. Viridoxins A and B: novel toxins from the fungus *Metarhizium flavoviridae*. **J. Org. Chem.** 58: 1062-1067.

- Hajek, A.E. and St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insects hosts. **Annual Review of Entomology** 39: 293-322.
- Inch, MM, AM Humphreys, APJ Trinci and AT Gillespie. 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). **Trans. Br. Mycol. Soc.** 87: 215-222.
- Jensen, PR and W Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annual Review of Microbiology* 48: 559-584.
- Khachatourians, GG. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: DK Arora, L Ajello and KG Mukerji (Eds.) **Handbook of Applied Mycology**. Vol 2, Human, animals and insects. Marcel Dekker, New York, pp.613-661.
- Khachatourians, GG. 1996. 17: Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Esser, K and PA Lemke (Eds.) **The Mycota, Vol VI: Human and animal relationships**. Springer Verlag. Germany.
- Krasnoff, SB, DM Gibson, GN Belofsky, KB Gloer and JB Gloer. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. **J. Nat. Prod.** 59: 485-489.
- Masurekar, PS 1992. Therapeutic metabolites. In: DB Finkelstein and C Ball (Eds.) **Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products**. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 241-301.
- Mikami, Y, K Fukushima, T Arai, F Abe, H Shubuya and Y Omura. 1984. Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their roles in fungal infection. **Zbl. Bakt. Hyg. A** 257: 275-283.
- Miranpuri, GS and GG Khachatourianis. 1990. Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegyptii*. **Vet. Parasitol.** 37: 155-162.
- Mule, G; AD Ambrosio, A Logrieco and A Bottalico. 1992. Toxicity of mycotoxins of *Fusarium sambucinum* in *Galleria mellonella*. **Entomol. Ex. App.** 62: 17-22.
- Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology* 10(3-4): 135-156.
- Osborne, L.S., and Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. **Florida Entomologist** 75, 456-471.
- Pendland, J.C., Hung, S.Y., and Boucias, D. 1995. *In vivo* development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. **Mycopathol.** 30: 151-158.



- Radics, L, M Kajtar-Peredy, CG Cassinovi, C Rossi, M Ricci and L Tuttobello. 1987. Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecilomyces marquandii* isolation, structure and biological activity. **J. Antibiot.** 40: 714-716.
- Ricci, M., Sassi, P., Nastruzzi, C. and Rossi, C. (2000) Liposome-based formulations for the antibiotic nonapeptide Leucinostatin A: fourier transform infrared spectroscopy characterization and in vivo toxicologic study. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 1, E2.
- Rossi, C; L Tuttobello; M Ricci; CG Casinovi and L Radics. 1987. Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. **J. Antibiot.** 40: 130-133.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.** 23:15-22.
- Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. **Biocontrol News and Information** 14: 71N-78N.
- Society of American Bacteriologist. 1951. Manual of methods for pure culture study of bacteria. McGraw-Hill, New York
- Strasser, H, A Vey and TM Butt. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metharrizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sciences and Technology* 10(6):717-735.
- Torres-Barragan, A; AL Anaya; R Alatorre; C Toriello. 2004. Entomopathogenic fungi from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycopathologia* 158(1):61-71.
- Turner WB and DC Aldrige. 1983. **Fungal Metabolites** II. Academic Press, New York.
- Vey, A; JM Quiot; I Mazet and CW McCoy. 1993. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. **J. Invert. Pathol.** 61: 131-137.
- Vey, A; R Hoagland and TM Buti. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potentials*. Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford.
- Wahlman M and BS Davidson. 1993. New dextruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 56: 643-647.
- Weiser J and V Matha. 1988. Tolypin, a new metabolite of fungi of the genus *Tolypocladium*. **J. Invert. Pathol.** 51: 94-96.



**Fig. 1.** Production of blastospores in three different media by *Paecilomyces marquandii*

Table 1. Effect of crude filtrates of three different cultures of *Paecilomyces marquandii* on the fourth larval instar of *Galleria mellonella*

Treatment	Mortality (%)
Control	0.0 <sup>a,b</sup> A
Czapek Dox Broth	100.0 B
Media 1	83.33 C
Media 2	100.0 B

<sup>a</sup> Each value represents the mean of ten replicates.

<sup>b</sup> Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Table 2. Effect of total extracts of *Paecilomyces marquandii* on third instar nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* and 4<sup>th</sup> larval instar of *Galleria mellonella*

Treatment	Mortality (%)	
	<i>T. vaporariorum</i>	<i>G. mellonella</i>
Control	1.10 <sup>a,c</sup> a	25.0 <sup>b,c</sup> A
Filtrate extract	25.55 b	25.0 A
Blastospores extract	54.44 c	50.0 B

<sup>a</sup> Each value represents the mean of four replicates.

<sup>b</sup> Each value represents the mean of ten replicates.

<sup>c</sup> Means followed by the same letter by column are not significantly different (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Table 3. Effect of “crystals” of *Paecilomyces marquandii* on *Trialeurodes vaporariorum* and *Galleria mellonella*

Treatment	Mortality (%)	
	<i>T. vaporariorum</i>	<i>G. mellonella</i>
Control	5.4 <sup>a,c</sup> a	13.33 <sup>a,b</sup> A
Crystals	0.0 a	40.0 B

<sup>a</sup> Each value represents the mean of four replicates.

<sup>b</sup> Each value represents the mean of ten replicates.

<sup>c</sup> Means followed by the same letter by column are not significantly different (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Table 4. Detection of enzyme production by *Paecilomyces marquandii*.

Enzyme	Production
Pectate-lyase	++
Poligalacturonase	---
Lipase	+++
Protease	+++
Chitinase	+++

(+++) Very evident; (++) Evident; (+) Lightly evident; (---) Absence

---

---

## **6. DISCUSIÓN GENERAL**

---

---

Los resultados de este estudio permitieron comprobar cada una de las tres hipótesis planteadas para el presente trabajo. La reserva ecológica El Edén, como muchas otras áreas naturales protegidas, es efectivamente una fuente donde pueden ser encontrados recursos que pueden ser empleados para el control biológico de insectos plaga, en este caso, nosotros buscamos y encontramos tres cepas de hongos entomopatógenos que resultaron tener este potencial, *Fusarium oxysporum* Ed322, *F. moniliforme* Ed29a y *Paecilomyces marquandii* Ed22.

Existen estudios que coinciden con los resultados del presente trabajo; Ellison y Evans (1996), llevaron a cabo una expedición en el Amazonas Ecuatoriano para investigar los hongos involucrados en el control natural de plagas. Estos investigadores encontraron un gran número de hongos entomopatógenos afectando a insectos, entre los que destacan varias especies del género *Cordyceps*, aisladas de la langosta de la selva (*Schistocerca* sp.), chapulines y hormigas del género *Componotus*. Otro hongo que se aisló en el 80% de las moscas blancas colectadas en la selva de Cuyabeno fue *Aschersonia* sp.

Otro estudio incluido en el Informe Anual (1994) del Proyecto de Cooperación Regional S-240, fue realizado por investigadores de varios países. El informe reporta el aislamiento de entomopatógenos de todo tipo, principalmente hongos, nemátodos, bacterias y virus, a partir de colectas de insectos realizadas en ecosistemas naturales de diferentes países del mundo.

Lo anterior demuestra que la biodiversidad promueve la presencia de enemigos naturales de plagas, y que, por lo tanto, la conservación de áreas naturales es primordial, ya que éstas son fuente potencial para el descubrimiento de nuevos organismos que puedan ser utilizados en el control biológico de insectos y otras plagas (Caltagirone y colaboradores, 1988; Palm y Chapela, 1997; Van Driesche y Bellows, 1996b).

En el presente estudio, encontramos diferentes especies de hongos causando enfermedades en los insectos, tanto de la selva como de la zona agrícola aledaña a la reserva. Todos los hongos aislados se encuentran dentro de los Ascomycetes anamórficos, lo cual sugiere el importante papel que estos hongos están desempeñando en la naturaleza.

Algunas de las especies aisladas, han sido reportadas previamente como responsables de epizootias en insectos de importancia agrícola, tal es el caso del género *Aschersonia* que es muy efectivo para matar mosquitas blancas e insectos escama (Meekes *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006). Sin embargo, el cultivo de este hongo en el laboratorio es muy difícil y requiere de condiciones muy especiales para ser propagado, por lo cual aún no ha podido ser desarrollado como agente de control biológico. En la presente investigación, aislamos una cepa de *Aschersonia* a partir de la mosquita blanca *Bemisia tabacii*, sin embargo, por lo mencionado, no pudimos realizar pruebas de patogenicidad con este hongo.

Otras especies de hongos aisladas, que presentaron características para ser consideradas como posibles agentes de control de insectos plaga (reporte previo como entomopatógenos, una relación patogénica con el insecto del que fueron aisladas, factibilidad para la producción *in vitro*, etc.) fueron *Fusarium oxysporum* Ed322, *F. moniliforme* Ed29a y *Paecilomyces marquandii* Ed22. Estos tres hongos causaron una alta mortalidad (> 90%) sobre *Trialeurodes vaporariorum*, la mosquita blanca de invernadero, sin embargo, *P. marquandii*, resultó ser el más virulento de los tres al matar al insecto prueba en 67.49 h mientras que las dos especies de *Fusarium* lo hicieron en 82 h.

Existen otros estudios con especies de *Paecilomyces* en los que se evalúa su potencial como agentes de control biológico de insectos plaga (Osborne y Landa, 1994; Smith, 1993). Algunas cepas de *Paecilomyces fumosoroseus* ya se comercializan para el control de mosquitas blancas y coleópteros (Tamez-Gomez y colaboradores, 2001), y por los resultados obtenidos en la presente investigación, podemos afirmar que *P. marquandii* ED22 podría ser considerado como posible agente de control biológico de la

mosquita blanca de invernadero, aunque aun se requiere de una investigación mucho más amplia para poder afirmar ésto.

En relación con *Fusarium*, existe gran controversia sobre el uso de sus especies en el control biológico, sobre todo porque algunas de ellas son altamente patogénicas a las plantas cultivadas (Agrios, 1997), y otras producen toxinas dañinas al ser humano (Willie y Morenhouse, 1997). A pesar de esto, existen reportes de que las dos especies de *Fusarium* aisladas pueden ser altamente patogénicas sobre insectos de los órdenes Homoptera y Diptera (Feng-Yan y Qing-Tao, 1991). Por otro lado, sabemos que algunas especies de *Fusarium* pueden ser altamente específicas hacia sus hospederos (Zemankova, *et al.* 2001); y que en la naturaleza podemos encontrar tanto aislamientos dañinos como benéficos a las plantas, animales y el ser humano (Kuruville & Jacob 1979b). Nosotros evaluamos el potencial patogénico de *F. oxysporum* Ed322 sobre plántulas de maíz, frijol, calabaza y jitomate, para eliminar la posibilidad de que fuera una cepa fitopatógena y observamos que este hongo no produjo ningún daño en éstas plantas (Torres-Barragán, *et al.* 2004). Sin embargo, al igual que con *P. marquandii* es necesario realizar estudios más amplios con estos aislamientos antes de considerarlos como agentes potenciales para el control biológico de insectos plaga.

En lo que se refiere a la hipótesis que afirma que los hongos que causan mortalidades cercanas al 80% en los insectos de prueba, producen metabolitos tóxicos al ser cultivados *in vitro*, ésta se pudo comprobar por medio de los resultados obtenidos. Las tres cepas de hongos evaluadas (*F. oxysporum* Ed 322, *F. moniliforme* Ed 29a y *P. marquandii* Ed22) produjeron, en medio de cultivo, metabolitos tóxicos para la palomilla de los apiarios, al áfido del melón y la mosquita blanca de invernadero. Lo anterior nos indica que es posible que en el mecanismo de patogénesis de los tres aislamientos estén involucrados dichos metabolitos.

Algunas especies de *Paecilomyces* han sido estudiadas por su habilidad para producir toxinas en medio de cultivo, principalmente toxinas de naturaleza proteica. De éstas, las leucinostatinas han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades antibióticas y citotóxicas. Las leucinostatinas A y B han sido aisladas de *P. lilacinus* (Mikami y colaboradores, 1984) y las leucinostatinas D, H y K se han aislado de *P. marquandii*



(Radics y colaboradores, 1987 y Rossi y colaboradores, 1987), lo que indica que este hongo es capaz de producir toxinas *in vitro*.

Por otro lado, es bien sabido que las especies de *Fusarium* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios. Algunos de éstos son tóxicos tanto para plantas como para animales, incluyendo vertebrados (Willie and Morehouse, 1997). Claydon y colaboradores (1979) reportan que al evaluar la actividad insecticida de metabolitos secundarios extraídos de *F. solani* y *F. larvarum* sobre *Calliphora eritrocephala*, se obtuvieron mortalidades del 40 al 70% por medio de inyección, y del 20 al 40% al aplicarlos tópicamente. Nuestros resultados nos indican que los metabolitos tóxicos producidos *in vitro* por *F. oxysporum* Ed322 y *F. moniliforme* Ed29a, podrían ser responsables del 40 al 70% de la mortalidad observada en el áfido del melón y del 40% en la mosquita blanca de invernadero debido a que estas mortalidades las produjeron los extractos orgánicos. En algunos casos, como el de *M. anisopliae*, la producción de toxinas de naturaleza no proteica, las destruxinas, puede ser responsable de hasta un 100% de la mortalidad de los insectos de prueba (Wahlman y Davidson, 1993).

Es importante mencionar que las fracciones que resultaron activas para los insectos fueron siempre las más polares e inestables, lo cual impidió determinar su estructura química. Lo que posiblemente ocurrió, pudo ser lo que reportan autores como Sibilía y Sibilía (1996) y Harvey (1999) sobre que la actividad de algunos productos naturales esta dada por un sinergismo entre varios compuestos puros y al separarlos, pierden su actividad. En otros casos, al quitarles uno u otro radical, la conformación de las moléculas cambia y también su actividad. Existe la posibilidad de que, al ser tan polares, los compuestos se desnaturalicen fácilmente, o que debido su naturaleza y a la metodología empleada, se hayan desechado durante el proceso de aislamiento. De cualquier forma, es obvio que hace falta aún más investigación química sobre la forma de aislar los compuestos responsables de la actividad insecticida de estos hongos para que puedan ser identificados y estabilizados para emplearlos como insecticidas.

Los tres hongos evaluados mostraron la capacidad para producir enzimas del tipo pectato-liasa, lipasas, proteasas y quitinasas, las cuales también pueden contribuir al potencial patogénico de estas cepas sobre los insectos, como ha sido reportado previamente para otros hongos (St. Leger, 1995).

Es importante mencionar que en la actualidad se lleva a cabo una gran promoción de la búsqueda de metabolitos bioactivos con base en criterios ecológicos, pues se considera que es mucho más efectivo buscar bajo este criterio que realizar búsquedas al azar. Aunque el porcentaje de compuestos activos aislados bajo este último criterio, ha sido generalmente alto (Omura, 1992), la búsqueda y realización de ensayos empleando criterios ecológicos, con organismos de importancia médica o agrícola como organismos prueba, puede ser el mejor método para entender y descubrir nuevas moléculas con potencial para ser usadas como agroquímicos o medicamentos (Jensen and Fenical, 1994).

Finalmente podemos decir, que la búsqueda de productos naturales en los hongos, tiene grandes ventajas que han sido bien documentadas (British Micological Society, 2001). Los metabolitos fúngicos, como todos aquellos que tienen origen biótico, son considerados recursos renovables y un valor agregado de los organismos que los producen. Estos metabolitos se pueden producir a gran escala empleando diversos métodos y técnicas ya establecidas. Además, la modificación de la estructura de estos compuestos, junto con la manipulación genética del hongo productor, puede ser sumamente ventajosa ya que los hace mas eficientes (Gloer, 1997).

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> Ed., Academic Press, San Diego
- Annual Report of Cooperative Regional Project S-240 (Development of Entomopathogens as Control agents for insect pest). 1994
- British Mycological Society. 2001. International Symposium: BIOACTIVE FUNGAL METABOLITES - IMPACT AND EXPLOITATION. 22-27th April. University of Wales Swansea
- Caltagirone, LE; R García y AP Gutierrez. 1988. Biological control as a component of sustainable agriculture. En: Allen, P y D. Van Dusen (Eds.). Global perspectives on agroecology and sustainable agricultural systems. Vol 2. Agroecology program University of California. Santa Cruz. pp. 493-495.

- 
- Claydon, N, JF Grove y M People. 1979. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium larvarum*. J. INVERT. PATHOL. 33:364-367
  - Ellison, CA y HC Evans. 1996. Amazon-ingly useful fungi- A biological control cornupia? MYCOLOGIST 10(1): 11-13.
  - Feng-Yan B. y C. Qing-Tao, 1991. *Fusarium* species on some insects from China. ACTA MYCOL. SINICA 10:120-128
  - Gloer, JB 1997. Applications of fungal ecology in the serach fro new bioactive natural products. En: DT Wicklow and B Södeström (Eds.) The Mycota, Vol IV: Environmental and Microbial Relationships. Springer Vrelag, Berlin. pp. 249-268
  - Harvey, AL. 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE: MEDICINES FROM NATURE. Vol. 20: 196-198
  - Jensen, PR y W Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY 48: 559-584
  - Kuruvilla, S. y A. Jacob, 1979. Host range of the entomogenous fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht. and its safety to three crop plants. CURRENT SCENCE. 48: 603.
  - Meekes, E.T.M., Fransen, J.J. y Van Lenteren, J.C. 2002. Pathogenicity of *Aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 81:1-11
  - Mikami, Y, K Fukushima, T Arai, F Abe, H Shubuya y Y Omura. 1984. Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their roles in fungal infection. ZBL. BAKT. HYG. A 257: 275-283
  - Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 10(3-4): 135-156
  - Osborne, L.S., & Z. Landa, 1994. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. BULLETIN OILB/SROP 17: 201-206
  - Palm, ME e I Chapela. 1997, Mycology in sustainable development: Expanding concepts, vanishing borders. Parkway Publishers Inc. USA. 306 p.
  - Quesada-Moraga, E., E.A.A. Maranhao, P. Valverde-Garcia y C. Santiago-Alvarez. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. BIOLOGICAL CONTROL 36: 274–287
-

- Radics, L, M Kajtar-Peredy, CG Cassinovi, C Rossi, M Ricci and L Tuttobello. 1987. Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecilomyces marquandii* isolation, structure and biological activity. J. ANTIBIOT. 40: 714-716
- Rossi, C; L Tuttobello; M Ricci; CG Casinovi and L Radics. 1987. Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. J. ANTIBIOT. 40: 130-133.
- Sibilía, JP y A Sibilía. 1996. A guide to materials characterization and chemical análisis. Wiley- VCH. 408 pp.
- Smith, P., 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. BIOCONTROL NEWS AND INFORMATION 14: 71N-78N
- St. Leger, RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY (Suplement) 73:S1119-S125
- Tamez-Guerra, P; LG Galán-Wong, H Medrano-Roldan, C García-Gutiérrez, C Rodríguez-Padilla, RA Gómez-Flores y RS Tamez-Guerra. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. CIENCIA UANL 4(2):143-152
- Teetor-Barsch, G.H. y D.W. Roberts, 1983, Entomogenous *Fusarium* species. MYCOPATHOLOGIA 84: 3-16
- Torres-Barragan, A., A.L. Anaya, R. Alatorre y C. Toriello. 2004. Entomopathogenic fungi from 'El Eden' ecological reserve, Quintana Roo, México. MYCOPATHOLOGIA 158(1):61-71
- Van Driesche, RG y TS Bellows. 1996b. 21: Biological control in support of nature conservation. En: Van Driesche, RG y TS Bellows (Eds.). Biological Control. Chapman Hall. USA. pp. 424-443.
- Wahlman M y BS Davidson. 1993. New dextruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. INVERT. PATHOL. 56: 643-647.
- Willie TD y LG Morehouse. 1997. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses. Vol 1. Mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins, Marcel Dekker, USA.
- Zemankova, M. y A. Lebeda. 2001. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. PLANT PROTECTION SCIENCE 37:25-42.

---

---

## **7. CONCLUSIONES**

---

---

- ❖ En la selva mediana de la reserva ecológica El Edén y en la zona agrícola aledaña a ésta, se encontraron hongos asociados a insectos que actuaban como entomopatógenos.
- ❖ Se encontró que la mosquita blanca, *Bemisia tabaci*, es uno de los insectos plaga más importantes en la zona agrícola debido a las grandes pérdidas que causa a la producción de los cultivos hortícolas.
- ❖ Todos los hongos entomopatógenos aislados en las dos zonas de estudio, pertenecen a estados anamórficos de algunos Ascomycetes.
- ❖ El género *Fusarium* fue aislado del 75% de las especies de insectos colectados en la zona agrícola; por esta razón, se considera que puede estar jugando un papel relevante como biorregulador natural, lo cual debe ser estudiado con mayor detalle.
- ❖ *Paecilomyces marquandii* Ed22 es una cepa que podría tener potencial como agente de control biológico, ya que además de haber resultado altamente virulenta sobre la mosquita blanca de invernadero, su cultivo y producción son relativamente sencillos.
- ❖ La especificidad del aislamiento Ed322 de *F. oxysporum*, su patogenicidad hacia la mosquita blanca y su fácil cultivo *in vitro*, resultan muy ventajosos para su posible uso como agente de control de insectos plaga.
- ❖ Durante su cultivo *in vitro*, las dos especies de *Fusarium* y *P. marquandii* Ed22, produjeron metabolitos tóxicos para el tercer estadio ninfal de la mosquita blanca de invernadero, la palomilla de los apiarios y el áfido del melón. Posiblemente, dichos metabolitos están relacionados con el mecanismo de patogénesis de estos tres hongos sobre los insectos.

- ❖ Tanto *P. marquandii* Ed22 como los dos aislados de *Fusarium* estudiados, produjeron, en medio de cultivo sólido, enzimas de tipo proteasa, lipasa y quitinasa. Estas enzimas también podrían estar relacionadas con el mecanismo de patogénesis de estos hongos.
- ❖ Los resultados obtenidos muestran que hay necesidad de realizar estudios posteriores con estos tres aislados para determinar si el efecto insecticida obtenido con los filtrados crudos, se debe a la presencia de metabolitos químicos de naturaleza proteica y/o no proteica y emplear las metodologías específicas para cada caso.
- ❖ En el presente trabajo se aisló *Aschersonia* sp, un hongo reportado como agente potencial para el manejo de mosquita blanca. Deben realizarse estudios con este aislado con el fin de determinar su potencial como agente de control biológico.
- ❖ Los hongos estudiados abren nuevas alternativas de investigación sobre su posible potencial como biorreguladores en los sistemas naturales y su uso en el manejo integrado de plagas.

---

---

## **8. ANEXOS**

---

---



---

---

## 8.1 LA ZONA AGRÍCOLA ALEDAÑA A LA RESERVA ECOLÓGICA EL EDÉN

La zona agrícola aledaña a la Reserva Ecológica El Edén está formada por aproximadamente 50 ranchos, de los cuales se visitaron 3 en la primera visita (4-7 de Diciembre de 1996), 19 en la segunda (28 de Julio-1º. de Agosto de 1997) y 10 en la tercera (10-14 de Noviembre de 1997). Durante las dos últimas visitas se realizaron las entrevistas de tipo abierto (Anexo 8.3). A continuación se presenta la información más importante obtenida de las observaciones de campo, las entrevistas y los muestreos de insectos plaga.

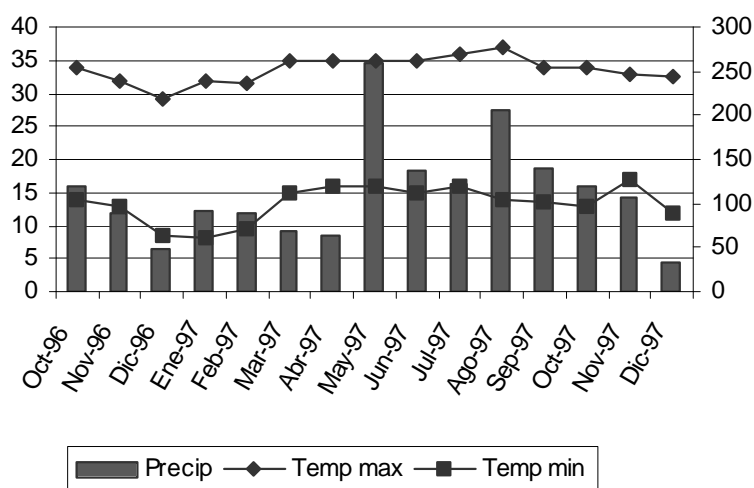
La zona agrícola es una zona que se estableció recientemente; los pobladores del lugar no reportan más de 15 años de estancia en la misma. Esta zona de desmonte de la selva fue creada por el municipio de Cancún, con el fin de abastecer a la ciudad de insumos agrícolas, principalmente hortalizas. Los ranchos tienen en promedio 30 has de extensión y algunos son cuidados por peones locales o venidos de otros estados de la República, principalmente de Yucatán; estos peones son quienes trabajan las tierras, y la mayoría de ellos viven en la zona.

El sistema de producción que utilizan es el tradicional en toda la península de Yucatán: la roza, tumba ó desmonte y quema. La siembra se hace en espeque o pozetas aunque el suelo es sumamente pobre y somero y en su gran mayoría está formado por rocas calcáreas; por lo tanto es no mecanizable (este tipo de suelo recibe el nombre maya de tzek'el).

Durante el ciclo primavera-verano se siembran los cultivos tradicionales de temporal, maíz-frijol-calabaza y algunas hortalizas. Sin embargo, durante 1997, debido a que las lluvias se retrasaron (Figura 1), el 36.85 % de los ranchos visitados (7 ranchos) estaba abandonado; en el 21.05 % (4 ranchos) no estaba sembrado porque no había llovido; en el 10.52% (2 ranchos) estaban ya preparando el terreno para la siembra, es decir, estaban rozando, y en el 31.57% (6 ranchos), habían sembrado hortalizas, principalmente chile, jitomate y frijol, pero reportaban 100% de pérdidas en la cosecha, debido a la virosis transmitida por mosca blanca. En el frijol en almacén se

determinó además, pérdidas del 95% debido al ataque del gorgojo del genero *Zabrotes* sp. De estos ranchos, sólo en tres habían ya sembrado el cultivo de maíz típico de temporal, y solo en uno de ellos, el que presentaba el cultivo más crecido, los agricultores contaban con riego. Los demás productores no habían sembrado debido a la falta de agua y al desánimo al ver perdidos sus cultivos por las plagas; esto ocasionó que dejaran las tierras y se fueran a las ciudades en busca de empleo.

**Datos climáticos de la reserva ecológica El Edén, 1996-97**



En uno de los ranchos tenían sembrados cítricos (naranja agria, limón y mandarina), sin embargo, la hormiga arriera (*Atta* sp) estaba causando grandes estragos en estos frutales. En otro rancho se observaron 4 ha sembradas con papaya, cultivo que hasta el momento de la visita no presentaba ninguna plaga. En cambio, tenían 100% de pérdidas en sandía debido a la virosis, la cual lograban controlar un poco con insecticidas, sin embargo cuando el fruto empezaba a formarse era atacado por un hongo.

Durante las visitas se observaron también otras plagas como el barrenador del chile (*Carpophilus lugubris*), el cual también presentaba una incidencia del 100%; un nematodo atacando al chile y al jitomate (*Meloidogyne* sp), y una chicharrita (*Dalbulus maydis*) en un cultivo de maíz de aproximadamente 2 meses; los productores reportaron además, la presencia de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el maíz.

---

---

Durante el ciclo otoño-invierno, como ya había llovido, la mayoría de los ranchos tenían agua en sus pozos para abastecer a los cultivos. Dentro de los cultivos básicos, se encuentran la combinación maíz-frijol-calabaza que sufre grandes pérdidas por plagas; el maíz se ve severamente afectado por el gusano cogollero ó “tzak”; el frijol por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y en almacén por un gorgojo (*Zabrotes subfasciatus*); la calabaza por la virosis transmitida por la mosca blanca. Aunado a todo lo anterior, los productores enfrentaban el problema de escasez del suelo y la sequía, que como en este año en particular, causó la pérdida de prácticamente todos los cultivos de maíz.

En los ranchos estaban sembrados además algunos frutales como naranja, limón, papayo y guanabana, entre otros. Las principales plagas observadas en el naranjo y cítricos en general, son la hormiga arriera (*Atta* sp), los minadores (*Liriomyza* spp), la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*) y un barrenillo (*Carphophilus humeralis*). Por otro lado, se cultivan también hortalizas, las que en general, no son sembradas a la orilla del camino, sino en pequeñas parcelas que tienen entre la selva y asociadas frecuentemente a otros cultivos. Por ejemplo, entre las hileras de frutales, en lo que ellos llaman “la huerta”. Entre las hortalizas sembradas se encuentran: jitomate (*Lycopersicon esculentum*), chile habanero (*Capsicum frutescens*) y jalapeño (*Capsicum annum*), pepino blanco (*Cucumis sativus*), cebolla (*Allium cepa*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y melón (*Cucurbita melo*). Todos estos cultivos, a excepción de la cebolla, se ven fuertemente afectados por la mosca blanca, la cual hasta ese momento se controlaba con el uso de insecticidas como Tamaron 600, Lindano, Furadan, Mitac 20CE, Thiodan 35CE y Thionex 35%.

Cabe señalar que en aproximadamente la mitad de los ranchos visitados no se encontraban plagas, dado el excesivo uso de plaguicidas, y en otros, fué difícil encontrarlas, particularmente a la mosca blanca, la cual aparentemente se resguarda en algunas plantas de la selva.

La producción de hortalizas da rendimientos muy satisfactorios pero, dadas las características del lugar, parcelas establecidas en zona de selva previamente desmontada, y rodeadas de otros manchones de selva con un suelo no apto para la agricultura, se tienen que utilizar una gran cantidad de insumos agrícolas que van desde

---

---

fertilizantes, de los cuales los más empleados son el Triple 17, el Actibol y el 18-46-0; herbicidas como el Herbicida G, y los insecticidas mencionados anteriormente. A pesar del gran uso de plaguicidas, la mayoría de los productores no conocen su manejo, algunos reportan que hechan DDT, polvo o veneno pero no saben ni que dosis manejan, sólo les interesa si da o no resultado. El presidente de la asociación de productores agropecuarios de la zona mencionó que para cultivar 1 ha de chile o jitomate invierten hasta \$20,000.00 lo cual es una de las grandes limitantes para la agricultura y ha contribuido al abandono de muchos ranchos.

En vista del interés que tiene el municipio de Cancún de convertir esta zona agrícola en el centro de abastecimiento de productos perecederos cuyo costo sea menor que el de los productos traídos de otras zonas del país, se ha creado un programa de apoyo a estos productores en el cual estaban inscritos 30 jefes de familia, y para el ciclo otoño-invierno, se dio apoyo a la unión de productores con semillas, agroquímicos y asesoría técnica.

Como resultado de las encuestas y observaciones de campo realizadas en esta zona agrícola, se concluye que dentro de las principales plagas que atacan a las hortalizas se encuentran la mosca blanca y las virosis que transmite, los pulgones, los barrenillos y los pájaros. Además, se pudo comprobar fácilmente el enorme daño que causan las plagas en los cultivos, ya que se mencionaron y se observaron pérdidas del 100% en las cosechas por efecto de la mosca blanca y algunos otros insectos. Lo anterior posiblemente está determinado por la profunda perturbación de las condiciones naturales, y la pérdida significativa de la diversidad, lo que determina, entre otras cosas, la desaparición de muchos de los enemigos naturales de los insectos y crea condiciones propicias para la proliferación de los mismos, por esta razón los productores tienen que emplear numerosos plaguicidas sintéticos para controlarlas, los cuales causan un enorme daño sobre las cadenas tróficas y la salud humana. Los agricultores que no cuentan con apoyo económico, se ven forzados definitivamente a abandonar la producción y buscan otras opciones para su supervivencia. Esto reafirma una vez más, la importancia de buscar nuevas alternativas para el control y manejo de las plagas, que tengan un mínimo impacto sobre el ambiente y que utilicen, entre otras opciones los bio-reguladores naturales de la zona.

---

---

## 8.2 ENTREVISTA GENERAL PARA EL CONOCIMIENTO DE LAS PLAGAS EN LA ZONA AGRÍCOLA ALEDAÑA A LA RESERVA ECOLÓGICA EL EDÉN

No. De entrevista: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Localidad: \_\_\_\_\_

- 1.- ¿Qué cultivos siembra?
- 2.- ¿Cómo los siembra? (Técnica de labranza)
- 3.- ¿Siembra algunos cultivos juntos?
- 4.- ¿Cuáles?
- 5.- ¿Ha visto alguna plaga afectando sus cultivos?
- 6.- ¿De qué tipo?
- 7.- ¿Cómo le llama?
8. – ¿A qué cultivo afecta?
- 9.- ¿Qué parte del cultivo daña?

Raíz 0

Tallo 0

Ramas 0

Hojas 0

Frutos 0

10.- ¿En qué época aparecen?

11.- ¿Cómo los controla?

12.- ¿Con qué las controla?

13.- ¿Cuándo las ataca?

14.- ¿Alguna vez ha observado algún insecto que se comporte “raro”?

15.- ¿Alguna vez ha encontrado insectos muertos?

16.- ¿Dónde?

17.- ¿Qué apariencia presentaba?

18.- Ha observado que algún insecto sea bueno?

19.- ¿Cuál?

20.- ¿Por qué?

---

---

### 8.3 MEDIOS PARA EL CULTIVO Y MONTAJE DE HONGOS

#### Sabouraud-Dextrosa-Agar más Extracto de levadura

Peptona	10 g
Dextrosa	40 g
Extracto de levadura	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

#### MEDIO PARA *ACREMONIUM*

Glucosa	80 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.48 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.0 g
KHPO <sub>4</sub>	5 g
Agua	1 L

#### Lactofenol blanco

Cristales de fenol	20 g
Ácido láctico	20 g
Glycerol	40 g
Agua destilada	20 mL

#### Lactofenol azul

Cristales de fenol	20 g
Ácido láctico	20 g
Glicerol	40 g
Azul de algodón	Una pizca
Agua destilada	20 mL

**Alcohol polivinílico**

Disolver 8.3 g de alcohol polivinilico en 50 mL de agua desionizada

Añadir 50 mL de ácido láctico

Añadir 5 mL de glicerina y filtrar si es necesario

Almacenar a temperatura ambiente por 24 h antes de ser usado



---

---

## 8.4 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS

### Medio 1

Glucosa	80 g
Extracto de levadura	20 g
Agua	1 L

### Medio 2

Glucosa	80 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub>	1 g
Extracto de levadura	20 g
Agua	1 L

### Medio 3

Glucosa	80 g
Extracto de levadura <sup>a</sup>	20 g
Agua	1 L

<sup>a</sup> Se agregaron 20 g de extracto de levadura a 250 mL de agua, esta solución se colocó en una membrana de diálisis de 6-8000. La membrana con la solución se introdujo en 1 L de agua desionizada y se dejó dializar por 24 h. Después de esto, se agregaron 80 g de glucosa al litro de agua y se esterilizó.

---

---

**Medio 4**

Glucosa	80 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub>	1 g
Extracto de levadura <sup>a</sup>	20 g
Agua	1 L

<sup>a</sup> Se agregaron 20 g de extracto de levadura a 250 mL de agua, esta solución se colocó en una membrana de diálisis de 6-8000. La membrana con la solución se introdujo en 1 L de agua desionizada y se dejó dializar por 24 h. Después de esto, se agregaron los demás ingredientes del medio al litro de agua y se esterilizó.

---

---

## 8.5 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE

### *PAECILOMYCES MARQUANDII*

#### Czapek Dox Broth

Bacto Sacarosa	30 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g

#### Extracto de levadura

Glucosa	10 g
Peptona micológica	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua	1 L

#### Leucinostatinas

Sucrosa	5 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
Agua corriente	1 L

---

---

## 8.6 MEDIOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE ENZIMAS EN HONGOS

(Hankin y Anagnostakis, 1975)

Todas las pruebas se realizan en placas prevaciadas inoculando por punto con micelio o asperjando las placas con una suspensión de esporas de no más de 20 colonias por mL.

Los medios requeridos a un pH superior a 6 se preparan a una sola concentración con el agar incluido. Los medios con un pH debajo de 6 se preparan al doble de su concentración sin el agar. Se esterilizan aisladamente y se mezclan cuando alcancen la temperatura aproximada de 48°C, inmediatamente después se vacían en las cajas.

La determinación de la actividad enzimática se realiza cuando las colonias tienen entre 5 y 10 mm de diámetro. La determinación de la actividad enzimática para cada medio se describe a continuación.

### ACTIVIDAD PECTOLÍTICA

(Hankin, Zuker y Sands, 1971)

#### MEDIO DE CULTIVO

Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Pectina (manzana o cítricos)	5 g
Agua destilada	500 mL
Solución de sales minerales	500 mL

pH = 7

---

---

Solución de sales minerales (1 L)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2$	1 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	10 $\mu\text{g}$
$\text{MnSO}_4$	10 $\mu\text{g}$
$\text{ZnSO}_4$	70 $\mu\text{g}$
$\text{CuSO}_4$	50 $\mu\text{g}$
$\text{MoO}_3$	10 $\mu\text{g}$

pH = 7 ó 5, como se requiera

Otros:

Solución acuosa al 1% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio

El medio a pH 7 es usado para detectar la producción pectato-liasa (pectato-transeliminasa). El mismo medio a pH 5 es usado para detectar actividad polgalacturonasa (pectin depolimerasa, pectinasa).

Las placas se incuban por 3-5 días a temperatura ambiente (21-23°C) después de los cuales las placas son inundadas con una solución acuosa al 1% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Fisher Chemical). Este reactivo precipita la pectina intacta en el medio y, por lo tanto zonas claras alrededor de una colonia indican que no existe degradación de lo contrario el medio opaco indica la degradación de la pectina. Las colonias viables pueden ser recuperadas y purificadas si el precipitado no permanece en contacto con ellas por más de 5 min.

---

---

**ACTIVIDAD LIPOLITICA**

(Sierra, G. 1957)

El medio es empleado para detectar la actividad de enzimas lipolíticas, el monolaurato de sorbitan (Tween 20, Fisher Scientific), es usado como el sustrato lípido.

**MEDIO DE CULTIVO**

Difco peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agar	20 g
Agua	1 L

pH = 6

El tween 20 se esteriliza separadamente por autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y se agrega 1 mL por 100 mL de medio basal estéril y frío.

La formación de enzimas lipolíticas por una colonia se observa ya sea por un precipitado visible debido a la formación de cristales de la sal de calcio o del ácido laurico liberado por la enzima, o como una zona clara o un precipitado claro alrededor de la colonia debido a la completa degradación de la sal de los ácidos grasos.

**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

(Society of American Bacteriologist, 1951)

Emplea gelatina como sustrato de proteínas y es empleado para detectar la producción de enzimas proteolíticas.

**MEDIO DE CULTIVO**

Agar nutritivo Difco

Solución acuosa de gelatina 8%

pH = 6

Otros: Solución saturada de sulfato de amonio

---

---

El medio consiste de agar nutritivo Difco más gelatina al 0.4%, a un pH=6. Se prepara una solución acuosa de gelatina al 8% y de agar nutritivo. Se esterilizan separadamente agregando 5 mL de la solución de gelatina por cada 100 mL de agar nutritivo, se mezclan y se vacían en las cajas.

Después de la incubación se observa la degradación completa de la gelatina y se observan unas zonas claras en el agar opaco alrededor de las colonias. Si se inundan las placas con una solución saturada de sulfato de amonio se forma un precipitado que hace el agar más opaco y resalta las zonas claras alrededor de las colonias.

#### **ACTIVIDAD QUITINASA**

(Campbell and Williams, 1951)

##### MEDIO DE CULTIVO

Solución de sales minerales	500 mL
Agua destilada	500 mL
Agar	15 g
Extracto de levadura	0.2 g
Quitina purificada	2.4% (24 g)

La quitina es preparada empleando el tratamiento de quitina propuesto por Campbell y Williams (Poli-N-acetilglucosamina de conchas de cangrejo, Sigma). La quitina se disuelve en ácido sulfúrico al 50% y la solución se vacía rápidamente en 15 volúmenes de agua destilada. La quitina precipitada se colecta por centrifugación. El lavado y centrifugación se continua hasta que el ácido es removido. Finalmente la quitina se suspende en agua y se esteriliza con autoclave. El contenido sólido de la solución de quitina estéril se determina por análisis de humedad y se calcula la cantidad necesaria para dar 2.4% en el medio basal.

Las placas se preparan con una capa de agar al 1.5% y una capa superior de 3 mL del medio prueba. Después de 5 a 8 días de incubación se observan zonas claras en el agar opaco alrededor de las colonias capaces de degradar la quitina.

---

---

## 8.7 DIETA ARTIFICIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE UNA CRIA DE *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Salvado de trigo	2000 mL= 0.5 kg
Glicerina	200 mL
Miel de abeja	200 mL
Agua	50 mL
Mezcla de vitaminas <sup>a</sup>	2.5 g
Levadura de cerveza	1 cucharada cafetera
Sales Wesson <sup>b</sup>	¼ de cucharada

<sup>a</sup> **Mezcla de vitaminas libre de caseína**  
(ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland)

Biotina	0.0012 µg/g
Ácido fólico	0.029 µg/g
Niacina	0.30 µg/g
Acido pantoténico	0.15 µg/g
Piridoxina HCl	0.63 µg/g
Rivoflavina	0.50 µg/g
Tiamina HCl	0.14 µg/g
Vitamina B-12	0.003 µg/g

<sup>b</sup> **Sales Wesson**  
(ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland)