

Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)

Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)

CIPRIANO GARCÍA G.¹, MARÍA BERENICE GONZÁLEZ M.² y NÉSTOR BAUTISTA M.³

Resumen: Con la finalidad de contar en Durango, México, con aislamientos nativos de hongos entomopatógenos con patogenicidad contra *Spodoptera frugiperda* y *Epilachna varivestis*, principales plagas de maíz y frijol, respectivamente, se evaluaron 97 aislamientos de los cuales se seleccionaron a Bb42 y Bb18 de *Beauveria bassiana* y Ma91 de *Metarhizium anisopliae*, la actividad insecticida de éstos se midió mediante bioensayos con un diseño completamente al azar aplicando diferentes concentraciones de esporas sobre larvas jóvenes de ambos insectos, los datos de mortalidad de larvas se analizaron con un ANOVA y una prueba de Tukey, la DL_{50} y TL_{50} se determinó con el programa Polo PC. El aislamiento Bb42 obtenido de larvas de *S. frugiperda* fue evaluado contra larvas del segundo estadio ocasionando una mortalidad de 96,6 % a una concentración de $1,0 \times 10^9$ esporas mL^{-1} y tuvo una CL_{50} de $5,92 \times 10^3$ esporas mL^{-1} con un tiempo letal de 3,6 días, siendo la más virulenta de las seleccionadas. De igual forma el aislamiento Bb18 obtenido de frijol fue el más virulento contra *E. varivestis*, ya que causó una mortalidad de larvas neonatas del 93,3%, a $1,0 \times 10^9$ esporas mL^{-1} a los 3 días, con una CL_{50} de $1,20 \times 10^6$ esporas mL^{-1} y tiempo letal de 5,1 días (Tukey; $p \leq 0,05$). Con base en estos resultados se concluyó que la patogenicidad de los aislamientos fue mayor cuando se obtuvieron directamente del insecto que de suelos cultivados con maíz y frijol, así como cuando provienen del respectivo cultivo en el que se encuentra la plaga.

Palabras clave: Conchuela del frijol. Gusano cogollero. *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*.

Abstract: In order to obtain native isolates of entomopathogenic fungi in Durango, Mexico, with pathogenicity against *Spodoptera frugiperda* Fall Armyworm and *Epilachna varivestis* Mexican Bean Beetle, main pests of maize and beans, respectively, 97 isolates were evaluated, Bb42 and Bb18 of *Beauveria bassiana* and Ma91 of *Metarhizium anisopliae*. A bioassay using neonate larvae under completely randomized design of treatments per dose (ANOVA) and Tukey's test were used to measure the insecticidal activity in both insects, mortality data were used to calculate LC_{50} and LT_{50} . The isolation Bb42 obtained from larvae of *S. frugiperda* and evaluated against second instar larvae of the same insect showed the highest virulence 96.6% of mortality to rate of 1×10^9 spores mL^{-1} , with LC_{50} of 5.92×10^3 spores mL^{-1} , and lethal time of 3.6 days; isolation Bb18 from beans was highly virulent against neonate larvae of *E. varivestis*, 93.3% of mortality to 1×10^9 spores mL^{-1} with an LC_{50} of 1.20×10^6 and lethal time of 5.1 days (Tukey, $p \leq 0.05$). In conclusion, the pathogenicity of the isolates was greater when were obtained directly from the insect hosts than from maize and beans soil samples, as well as when it's are obtain from their respective host culture where was find the pest insect.

Key words: Mexican Bean Beetle. Fall Armyworm. *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*.

Introducción

En el Estado de Durango, México, se cultivan anualmente 231.497,61 ha de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y 146.587,00 ha de maíz (*Zea mays* L.) siendo los cultivos de mayor importancia económica, ya que cubren el 71,43% del total de la producción agrícola (SAGARPA 2009). Los insectos plaga que causan los mayores daños a estos cultivos son el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae). Una alternativa viable para el control biológico de estos insectos son los hongos entomopatógenos (HE): *Beauveria bassiana* (Balsamo-Vuilleimin, 1912), *Metarhizium anisopliae* (Metsch-Sorokin, 1883) y *Nomuraea rileyi* (Farlow-Samson) (Lezama *et al.* 2005; Molina *et al.* 2003; García *et al.* 1999; Morales y Röchling 1998).

Debido a la importancia de contar con aislamientos nativos con patogenicidad para el control de estos insectos, adaptados a las condiciones climáticas de una región, Lezama *et*

al. (2000) colectaron larvas de *S. frugiperda* logrando aislar cepas de *B. bassiana*, *N. rileyi* e *Hirsutella* sp., de cultivos de maíz y sorgo en Michoacán, Colima y Jalisco, mientras que en suelo encontraron a *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Wize 1904). Con este mismo fin, Molina *et al.* (2003) tomaron muestras de suelo y colectaron larvas de *S. frugiperda* en campos cultivados con maíz, sorgo *Sorghum vulgare* (Pers.) y pasto Sudán *Sorghum sudanense* Piper (Stapf, 1917) en seis Estados de la República, donde también encontraron larvas infectadas con *N. rileyi* e *Hirsutella* sp., mientras que del suelo aislaron sólo *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Respecto a *E. varivestis*, García *et al.* (1999) evaluaron la susceptibilidad de 10 cepas de colección sobre larvas de tres días de desarrollo, las cepas fueron aisladas de insectos de diferentes órdenes y las más patogénicas fueron obtenidas de coleópteros: *Diabrotica* sp., *Geraeus senilis* (Casey, 1920) (Coleoptera: Curculionidae), *Diabrotica balteata* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), *Hippodamia convergens* (Guérin-Meneville, 1842) (Coleoptera: Coccinellidae) e *Hypothe-*

¹ Ph.D. CIIDIR-IPN COFAA. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. C.P. 81101. Guasave, Sinaloa, México. cgarciag@ipn.mx Autor para correspondencia.

² M. Sc. CIIDIR-IPN COFAA Unidad Durango. Sigma No. 119. Fracc. 20 de Nov. II. C. P. 34220. Durango. mgonzalez@ipn.mx. ³ Ph.D. Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad. Carr. México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo Texcoco. Edo. de México C.P. 56230. nestor@colpos.mx.

nemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae). De éstas la que generó mayor mortalidad fue la que se aisló de *Diabrotica* sp., con 96.6 % de mortalidad a una dosis de $1,27 \times 10^7$ esporas/mL en comparación con las que no fueron aisladas de coleópteros, lo que sugiere que existe cierto grado de especificidad de cepas dependiendo de la ubicación taxonómica del insecto (Srisukchayakul *et al.* 2005); la que mostró menor toxicidad (66 %) fue la cepa aislada de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae).

Por otro lado, Behle *et al.* (2006) evaluaron la efectividad tóxica de blastosporas y esporas de *I. fumosorosea* utilizando dos tipos de bioensayos; uno por aplicación tópica y otro por contaminación de dieta natural (hojas de frijol) a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹ sobre larvas del tercer estadio de *E. varivestis*, se demostró que las blastosporas fueron más efectivas que las esporas, además el bioensayo por aplicación tópica tuvo una mejor CL₅₀ ($2,34 \times 10^8$ esporas mL⁻¹ y $9,88 \times 10^6$ blastosporas mL⁻¹) que el bioensayo por contaminación de dieta ($9,39 \times 10^8$ esporas mL⁻¹ y $3,47 \times 10^7$ blastosporas mL⁻¹), tanto para blastosporas como para esporas.

En relación con la patogenicidad de HE sobre *S. frugiperda*, Lezama *et al.* (1996) evaluaron seis cepas sobre huevecillos y larvas a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹; y observaron que resultaron más efectivas las cepas de *M. anisopliae* y la combinación de *I. fumosorosea* y *P. javanicus* (Friedrichs & Bally) (94 y 100 %), los valores de CL₅₀ fueron de $9,8 \times 10^5$ y $5,6 \times 10^6$ conidias mL⁻¹ para huevecillos y de $3,9 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ para larvas, con un tiempo letal medio (TL₅₀) de 1,3 y 3,3 días, respectivamente. Por la importancia de obtener aislamientos nativos de HE para el control biológico de estas plagas, se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue: Evaluar la patogenicidad de aislamientos provenientes de suelo e insectos colectados en cultivos de maíz y frijol, contra larvas del gusano cogollero y conchuela del frijol.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron 39 muestras de suelos cultivados con maíz y frijol en los municipios de Guadalupe Victoria (GV) ($24^{\circ}27'31,6''N$ $104^{\circ}05'37,3''W$) con altitud de 1997 m.s.n.m., y Francisco I. Madero (FIM) ($24^{\circ}24'16,5''N$ $104^{\circ}20'45,2''W$), con altitud de 1958 m.s.n.m, en el Estado de Durango, México (Tabla 1).

Se colectaron larvas de *E. varivestis* y *S. frugiperda* con manifestación de micosis, aspecto momificado o esporulación del hongo. Los insectos se colectaron directamente de las plantas y se pusieron en vasitos de plástico con capacidad de 10mL, etiquetados por localidad y mantenidos refrigerados en laboratorio. Los muestreos de larvas y suelos se realizaron semanalmente del 4 de julio al 26 de septiembre del 2008.

Para el aislamiento de HE de suelo se utilizó como insecto trampa a larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) que son altamente susceptibles a hongos (Vänninen 1997). Cada una de las muestras de suelo se tamizaron y se tomaron 300g, el cual se humedeció y se colocó dentro de un recipiente de plástico junto con siete larvas de *G. mellonella* del último estadio de desarrollo, el recipiente con el suelo y las larvas se tapó y se invirtió. Las muestras se incubaron por siete días a $25 \pm 1^{\circ}C$ (Bedding y Akurst 1975). Pasado este tiempo, las larvas se recuperaron del suelo y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito

de sodio al 1%, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril; se removió el exceso de agua y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro con el fin de mantener la humedad relativa elevada, para favorecer el desarrollo de los hongos las larvas se incubaron a $25^{\circ}C$ durante siete días (Hatting *et al.* 1999), luego se aisló el HE por diferentes técnicas como transferencia directa de hifas, impronta y maceración del insecto, dependiendo del desarrollo del HE en el cuerpo del insecto, hasta obtener cultivos puros.

La identificación de los hongos se hizo considerando la forma y el color de las hifas, esporas, células conidiógenas y fiálides, mientras que las características macroscópicas se basaron en la forma y color de la colonia, el crecimiento del sinema y la apariencia del hongo sobre su hospedero (Humber 1998; Samson 1988).

La selección de los aislamientos se hizo con base en su rápida esporulación y alta viabilidad durante los primeros 15 días. Las colonias de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* se sembraron por estrías en cajas petri con el medio de cultivo de referencia para cada hongo, para que el porcentaje de germinación no se viera disminuido. La viabilidad se determinó mediante microcultivos según Jiménez (1992), con un microscopio de contraste de fases (objetivo 40 X); las esporas se consideraron viables si el tubo germinativo era dos veces el diámetro de la espора, contando 400 esporas/repetición, la viabilidad debió ser superior al 90% para que los aislamientos fueran considerados como efectivos (Milner *et al.* 1991).

Los aislamientos seleccionados se propagaron en medio de cultivo líquido como se describe a continuación, para obtener un inóculo que se utilizó para la producción de esporas aéreas en sustrato sólido, éstas fueron usadas para su evaluación contra las larvas de *E. varivestis* y de *S. frugiperda*.

Una vez conservados los aislamientos en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se preparó una suspensión de los hongos adicionando 20mL de agua destilada estéril en el tubo de ensayo, se raspó la superficie del medio de cultivo con ayuda de una asa bacteriológica y dicha suspensión se colocó en 200mL de medio de cultivo líquido a base de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y sulfato de

Tabla 1. Origen de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (2008).

Clave	Origen		Localidad
	Suelo	Insecto	
Bb17	<i>G. mellonella</i> *		FIM
Bb18	<i>G. mellonella</i>		FIM
Ma85	<i>G. mellonella</i>		GV
Ma63		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb09		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb34	<i>G. mellonella</i>		GV
Bb56		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Ma62		<i>S. frugiperda</i>	GV
Bb12	<i>G. mellonella</i>		GV
Bb42		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb52		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Ma91		<i>S. frugiperda</i>	GV

Bb = *B. bassiana*, Ma = *M. anisopliae*, FIM = Francisco I. Madero, GV = Guadalupe, Victoria. *G. mellonella** = insecto trampa.

amonio como fuente de nitrógeno, posteriormente se colocó en una incubadora-agitadora por 48h, a 27°C y agitación de 200rpm, hasta que el hongo alcanzó el 80% de la fase logarítmica de crecimiento, luego se inocularon en bolsas con 250g de arroz previamente tratadas (lavado, estilado, esterilizado), las bolsas se almacenaron en un cuarto a 27°C, 70% de HR, durante 15-18 días (García *et al.* 2006). Una vez que las esporas germinaron se separaron del arroz con ayuda de un tamizador automático, posteriormente se redujo el contenido de humedad (<10%) con ayuda de un deshumidificador, luego las esporas se formularon en Celite® en proporción 1:1, 1g de esporas/1g de Celite®, las esporas se contaron en una cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad de esporas formuladas mediante la técnica descrita anteriormente.

Cría de insectos. Se recolectaron larvas y adultos de *E. varivestis* en cultivos de frijol para establecer la cría masiva del insecto en laboratorio (25±2°C, 60% de HR y 14:10 HL). Los insectos se colocaron sobre plantas de frijol “Flor de Mayo” sembradas en macetas hasta obtener larvas neonatas de la tercera generación de la colonia, las cuales se utilizaron en la ventana de respuesta biológica y en los bioensayos para la determinación de la CL₅₀ y TL₅₀.

Se colectaron larvas de gusano cogollero en un cultivo de maíz, las cuales se criaron individualmente en laboratorio con dieta artificial (Ashby 1972), se usaron recipientes de plástico con capacidad de 10mL con tapa y en su interior se colocaron 8g de dieta. Las pupas se pasaron a una cámara de emergencia con arena húmeda, y una vez que alcanzaron el estado adulto se colocaron en una bolsa de papel y dentro de ésta se colocó un recipiente de 5cm de diámetro con arena, miel y agua, para alimentar a los adultos y obtener los huevecillos, mismos que se pasaron a una caja Petri dentro de la cámara de cría (27±2°C, 80±10% de HR y fotoperiodo 14:10 HL) hasta la emergencia de larvas, las cuales se usaron en las pruebas de patogenicidad.

Bioensayos de actividad insecticida. Con base en los mejores resultados de patogenicidad en las pruebas descritas se obtuvieron ocho aislamientos de *B. bassiana* y cuatro de *M. anisopliae*; se preparó una solución base de cada uno a una concentración de 1x10⁹ esporas mL⁻¹. A partir de ésta se preparó una serie de diluciones para obtener las dosis requeridas para causar el 0 y 100% de mortalidad de larvas. Para lograrlo, se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril sobre el crecimiento del tubo de ensayo y 0,1% de Tween® 80 como dispersante raspando la superficie con un asa, después las esporas se contaron en una cámara de Neubauer. Se emplearon veinticinco larvas por tratamiento de cada insecto, por triplicado y agua destilada como testigo. La aplicación de los tratamientos se realizó sumergiendo las larvas por 30 segundos en cada suspensión, posteriormente las larvas de *S. frugiperda* se mantuvieron con dieta artificial y las de *E. varivestis* con dieta natural, se incubaron bajo las condiciones de cría previamente descritas. A las 72h se determinó el número de larvas muertas en cada aislamiento.

Análisis estadístico. Los resultados de mortalidad de larvas en los insectos se analizaron mediante un diseño completamente al azar de tratamientos por dosis (ANOVA) donde los tratamientos fueron los aislamientos Bb18, Bb42 y Ma91 y las seis diluciones las dosis; se usó el programa SAS, ver 9.0.,

además de una prueba de Tukey para la comparación de medias entre los diferentes aislamientos y concentraciones (Pr < F = 0,05).

Selección de aislamientos. De esta manera se seleccionaron los aislamientos Bb18, Bb42 de *B. bassiana* y Ma91 de *M. anisopliae*, debido al mayor porcentaje de mortalidad de larvas (>90%) y menor tiempo letal (≤72h).

Para determinar la CL₅₀ y TL₅₀, se utilizaron los aislamientos Bb18, Bb42 y Ma91 contra larvas neonatas de *E. varivestis*. Para lograrlo, se preparó una suspensión adicionando 10mL de agua destilada estéril a un tubo de ensayo con el hongo más 0,1mL de Tween® 80, de ésta se tomó 1mL y se adicionó en 9 mL de agua destilada estéril, hasta obtener seis diluciones seriadas (10⁻⁹ a 10⁻⁴); en el bioensayo se utilizaron 25 larvas neonatas de *E. varivestis*, las cuales se sumergieron 30 s por separado en cada concentración, se dejaron secar y luego se colocaron en macetas con frijol para que se alimentaran, cada 24h se observó el número de larvas muertas/tratamiento.

Para los bioensayos con *S. frugiperda* se utilizaron los mismos aislamientos, se obtuvo una suspensión de esporas raspando el contenido del HE con ayuda de una asa adicionando 10mL de agua estéril mas 0,1mL de Tween® 80 (dispersante), se hicieron seis diluciones seriadas (10⁻⁹ a 10⁻⁴). De cada concentración se adicionó 1mL/8g de dieta artificial antes de que solidificara, también se utilizaron 25 larvas con tres repeticiones, las cuales se incubaron de la misma forma que para la cría y cada 24h se revisó de mortalidad de larvas. A estos datos se les aplicó un análisis Probit (POLO PC 1996) para conocer la relación de las concentraciones con el número de insectos muertos (DL₅₀ y TL₅₀) a lo largo de las horas, respecto al control.

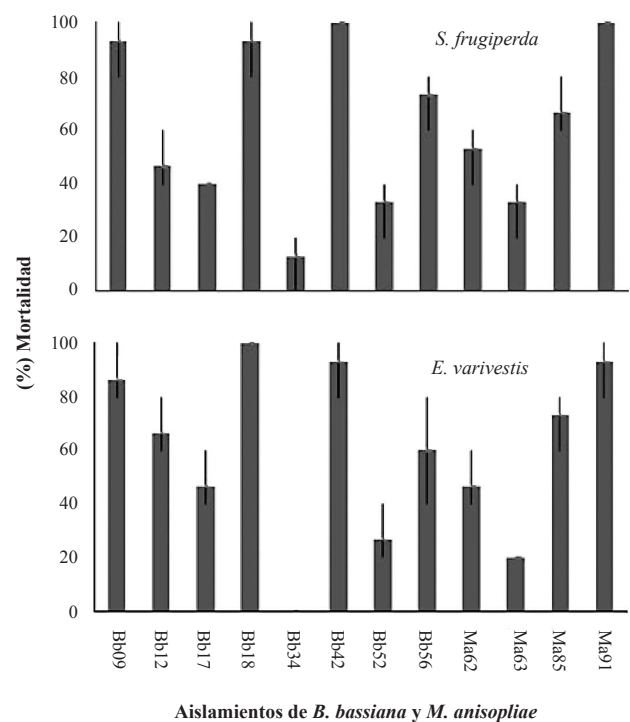


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* y *E. varivestis* a las 72h de inoculación (±error estándar de la media).

Tabla 2. Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* y *E. varivestis* en seis aislamientos a diferente concentración de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Conc. Esporas mL ⁻¹	<i>S. frugiperda</i>			<i>E. varivestis</i>		
	Bb18	Bb42	Ma91	Bb18	Bb42	Ma91
1x10 ⁹	69,3a*	96,66a	78,66a	93,33 ^a	57,33a	20,00a
1x10 ⁸	61,3a	81,33ab	62,66b	74,66b	36,00b	12,00b
1x10 ⁷	48,0b	72,00abc	52,00c	65,33b	29,33c	9,33bc
1x10 ⁶	41,3b	68,00bc	36,00d	52,00c	21,33c	4,00cd
1x10 ⁵	33,3c	54,66bc	25,33e	36,00d	18,66c	4,00cd
1x10 ⁴	12,0d	50,66c	20,00e	20,00e	12,00d	4,00cd
Testigo	2,66e	4,00d	4,00f	2,66f	2,66e	0,00d

* Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0,05$).

Resultados y Discusión

Aislamientos nativos de HE. De las muestras de suelo y larvas en cultivos de maíz y frijol se obtuvieron 97 aislamientos, de los cuales 57 fueron de *M. anisopliae* (58,7%), 36 de *B. bassiana* (37,11%) y cuatro de *I. fumosorosea* (4,12%); de 63 larvas de *S. frugiperda* colectadas en campo, se encontró *M. anisopliae* en 37 y *B. bassiana* en 23, pero no se encontraron aislamientos de HE en larvas o adultos de *E. varivestis* provenientes de campo. Respecto a esto último, Ceryngier (2000) y Beyene *et al.* (2007) señalan que la infección natural de HE en coccinélidos es menor a 20%. En el gusano cogollero nuestros resultados concuerdan con los reportados por Lezama *et al.* (2000) quienes encontraron que *M. anisopliae* fue dominante (10,9 %), seguido por *B. bassiana* (4,7 %) e *I. fumosorosea*, aislados del suelo y asociados a poblaciones de *S. frugiperda* en diferentes localidades de México.

Selección de aislamientos nativos de HE. Del total de aislamientos encontrados se seleccionaron ocho cepas de *B. bassiana* y cuatro de *M. anisopliae* ya que fueron patógenos, tuvieron un adecuado desarrollo en medio de cultivo, un alto porcentaje de esporulación a los 15 días, y una viabilidad superior al 90%. Con los aislamientos Bb18 y Bb42 de *B. bassiana* y Ma91 de *M. anisopliae* se presentó un rango alto de mortalidad de larvas de *E. varivestis* y *S. frugiperda* del 93,2 al 100% (1×10^9 esporas mL⁻¹) a las 72h. Con base en la actividad insecticida observada se seleccionaron sólo los aislamientos Bb18 de suelo cultivado con frijol y Bb42 y Ma91, aisladas de larvas infectadas en maíz,

como las más efectivas para el control de *E. varivestis* y *S. frugiperda* (Fig. 1).

De acuerdo con la Prueba de Tukey ($\alpha=0,05$), los aislamientos más patógenos para el control de *S. frugiperda* fueron Bb42 a las seis concentraciones y Ma91 moderadamente (1×10^7 - 1×10^9), también para *E. varivestis* (Bb18) a las tres concentraciones más altas; al comparar los valores medios y bajos de mortalidad de larvas a las distintas concentraciones se comprobó que los otros aislamientos fueron menos patógenos a las concentraciones probadas (Tabla 2).

Actividad insecticida El aislamiento que tuvo la más alta patogenicidad sobre larvas de *E. varivestis* fue Bb18 de *B. bassiana*, aislada de cultivos con frijol, con una mortalidad de 93,3 % a dosis de $1,0 \times 10^9$; la CL₅₀ fue de $1,20 \times 10^6$ esporas mL⁻¹ y el TL₅₀ fue de 5,1 días (Tabla 3). En los insectos tratados se observó que el inicio de la infección fue a los 3 días, quedando cubiertos totalmente por el micelio a los 13 días después de haber aplicado las diferentes concentraciones.

El aislamiento que causó mayor mortalidad fue el obtenido de larvas infectadas de *S. frugiperda* en campo (Bb42), con una mortalidad máxima de 96,6 % a 1×10^9 esporas mL⁻¹, CL₅₀ de $5,92 \times 10^3$ y TL₅₀ de 3,6 días (valor más bajo). Este resultado coincide con el TL₅₀ reportado por Lezama *et al.* (1996) de 3,3 días para el control de larvas de *S. frugiperda*.

El aislamiento Bb18, el cual fue aislado de suelos cultivados con frijol causó una mortalidad de 69,3 % en larvas de *S. frugiperda*. No obstante, al evaluarlo contra larvas de *E. varivestis* causó una mayor mortalidad (93,3 %) a la misma

Tabla 3. Valores de CL₅₀ y TL₅₀ de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra *S. frugiperda* y *E. varivestis*.

Clave	CL ₅₀	Límites fiduciales al 95%	Pendiente	TL ₅₀
Bb18 <i>S. frugiperda</i>	$8,93 \times 10^6$	$1,77 \times 10^6$ - $5,01 \times 10^7$	$0,304 \pm 0,039$	$6,1 \pm 0,288$
<i>E. varivestis</i>	$1,20 \times 10^6$	$3,24 \times 10^5$ - $4,19 \times 10^6$	$0,428 \pm 0,043$	$5,1 \pm 0,288$
Bb42 <i>S. frugiperda</i>	$5,92 \times 10^3$	$3,05 \times 10^2$ - $4,07 \times 10^4$	$0,295 \pm 0,042$	$3,6 \pm 0,288$
<i>E. varivestis</i>	$3,96 \times 10^8$	$5,56 \times 10^7$ - $7,06 \times 10^9$	$0,274 \pm 0,044$	$5,8 \pm 0,288$
Ma91 <i>S. frugiperda</i>	$8,18 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$ - $3,85 \times 10^7$	$0,355 \pm 0,042$	$4,5 \pm 0$
<i>E. varivestis</i>	0	—	$0,220 \pm 0,060$	$8,1 \pm 0,577$

concentración, mientras que el aislamiento Ma91 proveniente de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *M. anisopliae* en campo causó una menor mortalidad (78,6 %) en larvas de *S. frugiperda* que *B. bassiana*. Sin embargo, para el control de *E. varivestis* la mortalidad fue menor (20%).

Polanczyk y Alves (2005) aplicaron 100 µL de una suspensión de *B. bassiana* de 1×10^8 esporas/mL en la superficie de placas con dieta artificial para evaluar su toxicidad sobre larvas de *S. frugiperda*, obteniendo una mortalidad del 30 al 45 %, la que fue mayor cuando se aplicó en combinación con *Bacillus thuringiensis* Berlinier (58 %), esto indica la patogenicidad del hongo probada en nuestro ensayo con este insecto.

En relación con la selección de cepas, Kaur y Padmaja (2008) evaluaron 32 cepas de *N. rileyi* de diferente origen geográfico y huésped para el control de *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) encontrando tres cepas altamente tóxicas, donde el grado de variación entre aislamientos se relacionó con la muda del insecto. De forma similar, en nuestro estudio también observamos que el mayor número de larvas muertas de *E. varivestis* se dio durante la muda del insecto.

Al evaluar las diferencias entre el grado y la rapidez de la infección de aislamientos de *I. fumosorosea* en lepidópteros, Altre y Vandenberg (2001) encontraron que las blastosporas del aislamiento 4461 fueron capaces de penetrar a la cutícula y proliferar en la hemolinfa de *S. frugiperda* a las 22h después de la inoculación, mientras que el aislamiento 1576 no fue efectivo, es decir que no hubo penetración de las hifas del HE en el insecto. Así mismo, Srisukchayakul *et al.* (2005) sugieren que la germinación de esporas en aislamientos nativos depende del insecto hospedero, debido quizás a la variación del integumento, la penetración de los HE a través de la cutícula es a veces precedida por la formación de un apresorio que se fija a la epicutícula y proporciona el punto de apoyo para los procesos mecánicos y enzimáticos. Lo anterior sugiere que el origen de los aislamientos determina el grado de patogenicidad, esto apoya el porqué los aislamientos de frijol fueron más efectivos contra *E. varivestis* y los de maíz contra *S. frugiperda*, pues las quitinasas poseen el dominio de unión a la quitina, componentes genéticos del insecto huésped, lo que aumenta la capacidad de penetración de aislamientos nativos de HE (Fan *et al.* 2007). También podrían ser hongos endófitos localizados en diversos cultivos propiciando la infección en diversas plagas (Vera 2008).

En síntesis se encontraron abundantes aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en campos cultivados con frijol y maíz en la región de estudio, siendo posible aislar a los dos hongos sólo de gusano cogollero con potencial para biocontrol. Fue evidente una mayor patogenicidad y virulencia de los dos hongos dependiendo de su origen; el aislamiento Bb42 aislado de larvas de *S. frugiperda* en maíz fue el más virulento, mientras que para *E. varivestis* lo fue el Bb18 aislado del frijol.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (SIP 20070543), el apoyo económico otorgado al Proyecto de Investigación: Búsqueda e identificación de hongos y nematodos entomopatógenos en suelos cultivados con frijol y maíz en Durango.

Literatura citada

- ALTRE, J. A.; J. D. VANDENBERG. 2001. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 78(2): 81-86.
- ASHBY, G. 1972. The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals, eds. Worden, A. N. and Lane-Petter, W. The Universities Federation for Animal Welfare, London. 582-587 p.
- BEDDING, R. A.; R. J. AKURST. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematológica* 21:109-116.
- BEHLE, R. W., C. GARCIA G., P. TAMEZ G., M. R. MCGUIRE., M. A. JACKSON. 2006. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 31(4): 289-295.
- BEYENE, Y., T. HOFVSANG., F. AZEREFEGNE. 2007. Population dynamics of tef *Epilachna (Chnootriba similis)* Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) in Ethiopia. *Crop Protection* 26: 1634-1643.
- CERYNGIER, P. 2000. Overwintering of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) at different altitudes in the Karkonosze Mts, SW Poland. *European Journal of Entomology* 97: 323-328.
- FAN, Y., W. FANG., S. GUO., X. O. PEI., Y. ZHANG., Y. XIAO., D. LI., K. JIN., M. J. BIDOCHKA., Y. PEI. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 295-302.
- GARCÍA G., C., H. MEDRANO R., J. MORALES C., V. HERNÁNDEZ V. 1999. Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Southwestern Entomologist* 24(3): 255-260.
- GARCÍA G. C., P. TAMEZ G., H. MEDRANO R., Y M. B. GONZÁLEZ MALDONADO. 2006. Mercado de bioinsecticidas en México. En: Cipriano García Gutiérrez e Hiram Medrano Rolán (Eds). *Biotecnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas*. 17-40 pp.
- HATTING, J.L., R.A.HUMBER., T. J.POPRAWSKI, R.M.MILLER. 1999. A survey of fungal pathogens from South Africa with special reference to cereal aphid. *Biological Control* 16:1-12.
- HUMBER, R., A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. November 7, 1998. APS/ESA Joint Annual Meeting. Las Vegas, NV. 26.
- JIMÉNEZ J., A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé* 43: 84-98.
- KAUR, G., V. PADMAJA. 2008. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. *African Journal of Microbiology Research* 2: 299-307.
- LEZAMA G., R., R. ALATORRE R., L. F. BOJALIL J., J. MOLINA O., M. ARENAS V., M. GONZÁLEZ R., Y O. REBOLLEDO D. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia (México)* 3: 35-40.
- LEZAMA G., R., J. J. HAMM., J. MOLINA O., M. LÓPEZ E., A. PESCADOR R., M. GONZÁLEZ R.; L. E. STYER. 2000. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist* 84(1): 23-28.
- LEZAMA G., R., J. MOLINA O., M. LÓPEZ., A. PESCADOR., E. GALINDO., C. A. ÁNGEL Y A. C. MICHEL. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances de Investigación Agropecuaria (México)* 9(1): 1-6.

- MILNER, R. J., R. HUPPATZ.; B. SWARIS B. 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 121-123.
- MORALES, E.; H. RÖCHLING. 1998. Water-dispensable granule of spores or live *Beauveria bassiana*. United States Patent. Patent Number 5, 9730, 973. US005730973A.
- MOLINA O., J., R. LEZAMA G., M. GONZÁLEZ R., M. LÓPEZ E., M. A. RODRÍGUEZ V.; A. PALACIOS F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist* 86(3):244-253.
- POLANCZYK, R. A., S. B. ALVES. 2005. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 74: 24-33.
- POLO PC. 1996. A user's guide to Probit or Logit analysis. LeOra Berkeley, CA.
- SAGARPA. 2009. Anuario estadístico de datos del sitio web: <http://www.oeidrus-durango.gob.mx/> Fecha última revisión: 28 de febrero 2008. Fecha último acceso: [19 de abril 2009].
- SAMSON, R. A., H. C. EVANS, AND J. P. LATGÉ. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 187 p.
- SRISUKCHAYAKUL, P., C. WIWAT., AND S. PANTUWATANA. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Sci enceAsia* 31: 273-276.
- SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition, SAS Institute Inc, Cary (1988). 1028.
- VANNINEN, I. 1997. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat and soil type. *Mycological Research* 91:93-101.
- VERA, F. E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 277-279.

Recibido: 3-mar-2010 • Aceptado: 20-oct-2011