

# Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*

Effect of the culture conditions over parameters of the action mode of *Metarhizium anisopliae*

LAURA FERNANDA VILLAMIZAR R.<sup>1</sup>, ALBA MARINA COTES<sup>2</sup>

Revista Colombiana de Entomología 29 (2): 121-126 (2003)

**Resumen.** En el presente trabajo se determinó el efecto de diferentes condiciones de cultivo y sustratos potenciales inductores de virulencia sobre la germinación, la adherencia y la hidrofobicidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* y su relación con la actividad biocontroladora sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. El hongo se cultivó en medios líquidos y sólidos, sin suplementar y suplementados con los potenciales inductores de virulencia (quitina coloidal, homogeneizado de alas y patas de langosta y salvado de trigo). Se utilizó la cepa Mt004 que en trabajos previos presentó alta actividad biocontroladora y la cepa Mt006 que demostró baja actividad contra este insecto. Con los conidios obtenidos a partir de los medios de cultivos mencionados, se realizó un bioensayo, encontrándose en todos los casos, mayor actividad biocontroladora con la cepa Mt004 que con la cepa Mt006. De otra parte, en ambas cepas se observó que todos los sustratos ejercieron algún efecto sobre los parámetros evaluados. Sin embargo, la mayor mortalidad se obtuvo con los conidios provenientes del cultivo líquido suplementado con alas y patas de langosta y con salvado de trigo, sugiriendo que estos sustratos podrían ejercer un efecto inductor en la virulencia del hongo, si se tiene en cuenta que la germinación, adherencia e hidrofobicidad de los conidios producidos, también se incrementó. Los resultados obtenidos indican que el tipo de medio de cultivo y su composición determinan las características de la biomasa producida, las cuales pueden estar relacionadas con la virulencia de la misma.

**Palabras clave:** Entomopatógenos. Virulencia. Germinación. Adherencia. Hidrofobicidad.

**Summary.** The objective of the present work was to determine the effect of different culture conditions and potential virulence inducer substrates in the germination, adherence and hydrophobicity of *Metarhizium anisopliae* conidia and its relationship with the biocontrol activity over *Rhammatocerus schistocercoides*. The fungus was cultured in liquid and solid media, supplemented or not with the potential virulence inductors (colloidal chitin, homogenized of locust wings and legs and wheat bran). Two *M. anisopliae* strains were evaluated, the isolate Mt004 which, in previous studies, demonstrated high activity against locust, and the isolate Mt006 which presented low biocontrol activity against this insect. Produced conidia were used in a bioassay and in all cases the highest biocontrol activity was obtained with the strain Mt004. Evaluated substrates produced an effect over measured parameters with both strains however, the highest mortality was obtained with conidia produced in liquid culture media supplemented with homogenized of locust wings and legs and wheat bran, suggesting that these substrates had a virulence inducer effect, considering that germination, adherence and hydrophobicity of these conidia were also increased. The results indicate that the fungus culture medium determines the characteristics of the produced biomass, which could be related to its virulence.

**Key words:** Entomopathogen. Virulence. Germination. Adherence. Hydrophobicity.

## Introducción

La langosta llanera, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae), es una plaga voraz que representa una seria amenaza para la agricultura y la ganadería de los Llanos Orientales de Colombia. Para el control de esta plaga, se ha utilizado el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, el cual actúa por contacto, comprendiendo su mecanismo de acción diferentes etapas como son la adhesión del conidio sobre la cutícula del insecto mediada por fuerzas hidrofóbicas, cargas y producción de sus-

tancias mucilaginosas, la germinación de los conidios, la penetración de la cutícula por acción mecánica y enzimática, la colonización del interior del insecto y la producción de toxinas. La velocidad y eficiencia con que se desarrolle cada una de estas etapas puede determinar la virulencia del microorganismo. El Laboratorio de Control Biológico de Corpoica desarrolló una formulación a base de una cepa de este hongo seleccionada por su actividad alta frente a la plaga, los conidios del hongo son producidos masivamente utilizando un método semiartesanal en el que el medio de cultivo utilizado es arroz. Esta

formulación consiste en un polvo para reconstituir en una emulsión aceite en agua. Dentro del polvo formulado, se encuentran los conidios del hongo encapsulados con filtros solares que le brindan un 100% de protección frente a la radiación ultravioleta (Gómez *et al.* 1997). Dicho producto ha demostrado su eficiencia en campo, alcanzando niveles de hasta 70% de control de la plaga (Espinel 1997).

Varios estudios a nivel mundial han demostrado el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la virulencia de los microorganismos (Lane y Trinci 1991). Va-

1 Autor para correspondencia: M.Sc. Microbiología, Investigador Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, C.I. Tibaitatá, Km 14 Vía Mosquera. E-mail: lvillamizar@corpoica.org.co.

2 Ph. D. Fitopatología, Investigador Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, C.I. Tibaitatá, Km 14 Vía Mosquera. E-mail: acotes@corpoica.org.co.

rios componentes cuticulares de insectos hospederos, al ser incorporados al medio de cultivo, producen un aumento considerable de la virulencia de los conidios (Bidochka y Khachatourians 1992). Este incremento en la actividad biocontroladora posiblemente se debe a la activación por parte del sustrato de sistemas enzimáticos o al aumento en la capacidad de adherirse y germinar de los conidios de los hongos, factores determinantes en su actividad biocontroladora sobre el insecto. En estudios realizados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, se determinó el efecto de la composición del medio de cultivo de la virulencia de *M. anisopliae* sobre la langosta llanera y su relación con la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminidasa, esterasa y quimoelastasa-proteasa PR1. En este trabajo se observó que los conidios provenientes de cultivo líquido y suplementado con alas y patas de langosta y salvado de trigo fueron más virulentos y presentaron mayor actividad de las enzimas mencionadas, concluyendo que estos sustratos tienen un efecto inductor de la virulencia del microorganismo, el cual estuvo relacionado con la actividad enzimática (Villamizar 1998). Basados en esta información, el objetivo del presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica C.I. Tibaitatá durante el año 2000, fue el de determinar el efecto de las condiciones de cultivo y de algunos sustratos potenciales inductores de virulencia sobre la actividad de *M. anisopliae* y su relación con factores determinantes en el mecanismo de acción de este hongo como son la germinación, la capacidad de adherencia e hidrofobicidad de los conidios producidos, con el fin de conocer la importancia de cada una de estas etapas en el mecanismo de acción y de seleccionar un sustrato económico que pueda ser utilizado como inductor de virulencia para producir biomasa de calidad alta.

## Materiales y Métodos

### Bioensayo

Los microorganismos biocontroladores que se utilizaron en el presente estudio fueron la cepa de *Metarhizium anisopliae* Mt004 proveniente de Rionegro (Antioquia), aislada de *Ancognatha scarabaeoides* Erichson (Coleoptera: Melolonthidae) y la cepa de *Metarhizium anisopliae* Mt006 aislada del picudo del algodón *Anthonomus grandis* (Bohemian) (Coleoptera: Curculionidae) en Venezuela. Estas cepas se seleccionaron para este trabajo, dado que en estudios previos presentaron actividad biocontroladora contrastante sobre *R. schistocercoides*, ya que la cepa Mt004 produjo la mayor actividad biocontroladora frente a la plaga (Espinel *et al.* 1998), mientras que la cepa Mt006 presentó un control deficiente de la langosta llanera (Zamora 1996). Estos aislamientos, se encuentran conservados en el banco de cepas del Laboratorio de Control Biológico del Programa Nacional de Mane-

jo Integrado de Plagas de Corpoica en su sede C.I. Tibaitatá.

Para la producción de conidios sumergidos, se utilizó el medio líquido descrito por Villamizar (1998), el cual fue seleccionado por permitir la obtención de conidios bajo estas condiciones de cultivo. El medio sin suplementar y suplementado con los sustratos potencialmente inductores de virulencia (homogeneizado de alas y patas de langosta y salvado de trigo), se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos por Villamizar (1998). Los sustratos se adicionaron al medio líquido antes de su esterilización en una concentración del 0,40% P/V. En erlenmeyers de 250 ml de capacidad, que contenían 100 ml de cada medio de cultivo líquido por evaluar, se inoculó 1 ml de suspensión de conidios de *M. anisopliae* de las cepas Mt004 o Mt006 ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml. Posteriormente los medios se incubaron a 25°C y 155 rpm durante 10 días.

Para separar del medio líquido los conidios que iban a ser utilizados para el bioensayo y en las pruebas de adherencia, hidrofobicidad y germinación, una vez terminado el tiempo de incubación, se filtró el medio de cultivo a través de una muselina estéril. El filtrado se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una solución de Tween 80 al 0,2% y se centrifugó nuevamente. Este lavado se realizó dos veces sucesivas. Los conidios se secaron en estufa con corriente de aire a 25°C durante 24 h.

Para el cultivo de *M. anisopliae* en medio sólido, se utilizó arroz humedecido estéril contenido en bolsas de polietileno de densidad alta, siguiendo los procedimientos descritos por Gómez *et al.* (1997). Este medio no se suplementó con los potenciales inductores de virulencia. Para preparar el medio de cultivo, se humedecieron 100 g de arroz contenidos en bolsas de polietileno de densidad alta, con 80 ml de agua. Luego de su esterilización, cada bolsa fue inoculada con 1 ml de suspensión de conidios de *M. anisopliae* ajustada a una concentración de  $4 \times 10^7$  conidios/ml. Estos medios se incubaron a 25°C durante 15 días en presencia de luz constante.

Con el fin de obtener, a partir del medio sólido, los conidios que iban a ser utilizados en el bioensayo y en las pruebas de germinación, adherencia e hidrofobicidad, una vez terminado el tiempo de incubación, éstos se separaron mediante un lavado del arroz esporulado con una solución de Tween 80 al 0,2%. Posteriormente, esta suspensión se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos. Los conidios se secaron en estufa con corriente de aire a 25°C durante 24 h.

Los conidios obtenidos después de los lavados, tanto de los cultivos líquidos como de los cultivos sólidos en presencia y ausencia de los inductores de virulencia, se

utilizaron para preparar las suspensiones requeridas en el desarrollo del bioensayo empleando una solución de Tween 80 al 0,2%. Para todos los tratamientos, la suspensión de *M. anisopliae* fue ajustada a una concentración de  $6 \times 10^5$  conidios/ml, de manera que al aplicar 20  $\mu$ l de suspensión en el protórax de cada insecto, se obtuvo la dosis letal 90 determinada sobre *R. schistocercoides* para la cepa Mt004 determinada por Espinel (1997), que correspondió a 7 conidios por insecto.

Se inocularon 20 individuos por tratamiento y se colocaron en una jaula dotada de alimento y agua. Las jaulas se ubicaron en un cuarto de incubación a 30°C y 60% de humedad relativa. Cada tratamiento se realizó por triplicado bajo un diseño experimental completamente al azar.

Los insectos utilizados en este ensayo fueron langostas adultas recolectadas en campo en Carimagua (Meta). Estos se transportaron y mantuvieron en cuarentena durante 6 días antes de ser utilizados para los bioensayos. En el ensayo se tuvo un testigo tratado, que consistió en insectos tratados tópicamente con una solución de Tween 80 al 0,2% y un testigo absoluto en el cual no se realizó ninguna manipulación.

Diariamente se puso alimento y agua en cada jaula y se recogieron los individuos muertos, los cuales se colocaron en cámaras húmedas que se incubaron a 25°C hasta que se observara esporulación en los insectos para confirmar la infección fúngica.

El registro de datos se realizó diariamente hasta que el testigo absoluto llegara a un 13% de mortalidad o hasta que todos los individuos de los tratamientos hubieran muerto. Los resultados correspondientes a la tasa de mortalidad acumulada se transformaron en porcentajes, con éstos se calculó el porcentaje de mortalidad corregida, mediante la fórmula de Abbot (Villamizar 1998):

$$Mc = (Mo - Mt) \times 100 / (100 - Mt)$$

donde Mo es el porcentaje de mortalidad observado en el tratamiento y Mt es el porcentaje de mortalidad observado en el testigo tratado.

A partir de los resultados de los bioensayos, se elaboraron gráficas, mediante las cuales se extrapolaron los valores para obtener los tiempos letales medios ( $TL_{50}$ ) correspondientes a cada tratamiento.

Los resultados del experimento se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan con una significancia de 0,05.

**Prueba de germinación.** Para determinar la capacidad de germinación de los conidios producidos según cada tratamiento, se preparó una suspensión de conidios en una solución de Tween 80 al 0,1%, la

cual se ajustó a una concentración de  $10^8$  conidios/ml y se sembraron 0,1 ml de esta suspensión en tres cajas de Petri con medio Agar-Extracto de Malta. Las cajas inoculadas se incubaron durante 48 h a 25°C y se procedió a cuantificar mediante observación al microscopio, el número de conidios germinados y sin germinar en 10 campos ópticos por caja, expresando el resultado como porcentaje de conidios germinados.

**Prueba de adherencia.** Con el fin de determinar la capacidad de adherencia de los conidios producidos según cada tratamiento, se utilizó la metodología descrita por de Boucias *et al.* (1988). Para tal fin, fue necesario preparar fantasmas de cutícula de la langosta llanera tomando fragmentos de protórax del insecto de 1 cm<sup>2</sup> y colocándolos en una solución de dimetilsulfóxido al 2%, que se calentó hasta ebullición y los fragmentos se retiraron al tornarse totalmente traslúcidos. Cinco fantasmas de cutícula se colocaron en 10 ml de una suspensión de conidios con una concentración de  $10^7$  conidios/ml y se agitaron a 200 rpm durante 1 h; luego se retiraron de la suspensión y se lavaron con agua destilada dos veces. Posteriormente, mediante observación al microscopio, se cuantificó el número de conidios adheridos en 50 campos ópticos.

**Hidrofobicidad.** La hidrofobicidad de los conidios está directamente relacionada con la capacidad de adherencia de los mismos y se determinó siguiendo la metodología de Boucias *et al.* (1988). Con los conidios producidos según cada tratamiento, se prepararon suspensiones en agua destilada, ajustadas a una concentración de  $10^7$  conidios/ml. Se tomó 1 ml de suspensión de conidios y se mezcló con 1 ml de benceno (fase oleosa), esta mezcla se agitó durante 1 h a 200 rpm y posteriormente se mantuvo en reposo hasta la separación de la fases. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Posteriormente, se determinó la concentración de la fase acuosa mediante recuento en cámara de Neubauer.

**Diseño Experimental.** El diseño experimental utilizado para todos los ensayos fue completamente al azar y el análisis estadístico empleado fue un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de Duncan con una significancia de 0,05.

### Resultados y Discusión

Cuando los conidios de las cepas Mt004 y Mt006 de *M. anisopliae*, provenientes de los medios líquidos que contenían cada uno de los potenciales inductores de virulencia se utilizaron para su aplicación tópica sobre langostas adultas a una concentración de  $6 \times 10^5$  conidios/ml, para una misma cepa, se encontraron diferentes porcentajes de mortalidad acumulada en los insectos, relacionados con el tipo de inductor adicionado al medio de cultivo (Fig. 1). En todos los casos, los porcenta-

jes obtenidos con la cepa Mt004 fueron superiores a los ocasionados por la cepa Mt006.

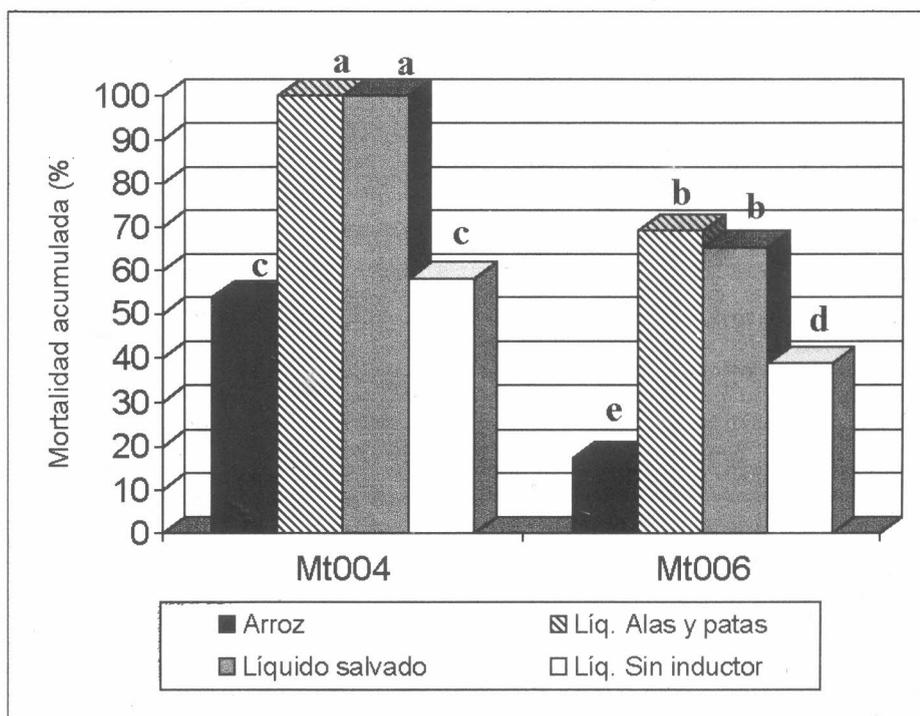
En este ensayo se encontraron porcentajes bajos de mortalidad en los tratamientos testigo, debido a que el testigo tratado con Tween 80 presentó una mortalidad acumulada de 13%, 15 días después de iniciado el bioensayo y el testigo absoluto mostró, en este mismo tiempo, una mortalidad acumulada de 7,2%. Estos valores de mortalidad en los testigos son aceptables para ensayos biológicos y se atribuyen a factores tales como el estrés causado por el confinamiento de las langostas, el cambio en su alimentación y el efecto de las condiciones ambientales.

Cuando la cepa Mt004, seleccionada en trabajos previos por su alta actividad biocontroladora, se cultivó en el medio de cultivo líquido que contenía salvado de trigo y homogeneizado de alas y patas de langosta, produjo en las langostas el 100% de mortalidad acumulada 15 días después de iniciado el ensayo, no presentando diferencias significativas entre sí, pero sí con respecto a los demás tratamientos. Cuando esta cepa se cultivó sin adición de inductor al medio, la mortalidad fue del 58,1% y el tiempo letal medio fue de 13,3 días y cuando se cultivó en medio de arroz, la mortalidad fue del 52% con un tiempo letal de 15,2 días, tratamientos que no fueron diferentes entre sí.

Estos resultados indican que el salvado de trigo y el homogeneizado de alas y patas de langosta tienen un efecto inductor de la virulencia del hongo *M. anisopliae*, ya que además de producir las

mayores mortalidades, con estos tratamientos se obtuvieron los menores tiempos letales medios ( $TL_{50}$ ), los cuales fueron de 7,2 días y de 5,8 días, respectivamente (Tabla 1). El aumento en la actividad biocontroladora encontrada en el presente trabajo, cuando el hongo se cultivó en presencia de alas y patas de langosta, estuvo relacionado con el aumento en la virulencia señalado en *Beauveria bassiana* por Bidochka y Khachatourians (1992), quienes cultivaron el hongo en presencia de componentes cuticulares de su hospedero *Melanoplus sanguinipes* y obtuvieron mayor actividad biológica con la biomasa producida. De otra parte, el salvado de trigo ha sido señalado como un inductor de enzimas, tales como glucanasas, quitinasas y celulasas (Thornart *et al.* 1991) y teniendo en cuenta que la producción de estas enzimas puede ser concomitante con la producción de otras que se encuentran en la membrana celular, se podría pensar que en presencia de salvado, además de las enzimas mencionadas, se podría haber inducido la producción de otras que juegan un papel importante en la actividad contra el insecto.

Cuando se evaluó la actividad biocontroladora de la cepa Mt006, cultivada en medios líquidos que contenían los potenciales inductores de virulencia, se encontró en todos los casos, significativamente menor mortalidad en las langostas que la encontrada con la cepa Mt004 (Fig. 1). Este resultado está relacionado con lo registrado por Espinel (1997) y por Zamora (1996), quienes demostraron que las cepas Mt004 y Mt006 tenían respectivamente alta y baja



**Figura 1.** Efecto biocontrolador sobre *Rhammatocerus schistocercoides* de las cepas Mt004 y Mt006 de *Metarhizium anisopliae* multiplicadas en medio líquido y sólido suplementados con diferentes potenciales inductores de virulencia.

**Tabla 1.** Efecto biocontrolador sobre *Rhammatocerus schistocercoides* de las cepas Mt004 y Mt006 de *Metarhizium anisopliae* multiplicadas en medio líquido y sólido suplementados con diferentes potenciales inductores de virulencia

| Tratamiento   | Tiempos Letales Medios - LT <sub>50</sub> (días) |            |
|---|--|------------|
|   | Cepa Mt004                                       | Cepa Mt006 |
| Medio líquido suplementado con alas y patas de langosta | 7,2  | 11,8       |
| Medio líquido suplementado con salvado de trigo         | 5,8  | 12,4       |
| Medio líquido sin suplementar                           | 13,3   | -          |
| Arroz   | 15,2   | -          |

(-) Tratamientos en los que no se alcanzó el 50% de mortalidad

actividad biocontroladora contra *R. schistocercoides*.

Al inocular langostas con la cepa Mt006, no se alcanzó el 100% de mortalidad acumulada con ninguno de los tratamientos después de 15 días de iniciado el ensayo, lo cual confirma que dicho aislamiento es poco eficiente para el control de este insecto. La mayor actividad biocontroladora se obtuvo cuando la cepa Mt006 creció en medio líquido en presencia de alas y patas de langosta, obteniéndose un TL<sub>50</sub> de 11 días y una mortalidad acumulada a los 15 días de iniciado el ensayo de 69,2%. Esta actividad biocontroladora no fue significativamente diferente de la observada con conidios provenientes del medio líquido suplementado con salvado de trigo. En este caso, se obtuvo un porcentaje de mortalidad acumulada del 65,3% y un TL<sub>50</sub> de 12,4 días. Resultados que fueron significativamente diferentes del obtenido con los conidios producidos en el medio líquido sin suplementar, lo cual indicaría que el salvado de trigo y el homogeneizado de alas y patas de langosta tienen un efecto inductor sobre la virulencia de este aislamiento de *M. anisopliae*.

Los conidios del aislamiento Mt006 producidos en los medios líquidos sin inductor, presentaron una actividad biocontroladora significativamente menor que los obtenidos en los medios suplementados, siendo ésta equivalente a una mortalidad del 38% a los 15 días después de iniciado el ensayo.

Cuando el sustrato de crecimiento del hongo fue arroz, la mortalidad observada en las langostas fue inferior a la obtenida cuando éste fue cultivado en medios líquidos para las dos cepas en todos los tratamientos.

Para una misma cepa se observaron diferencias significativas entre la actividad biocontroladora de los conidios producidos en medio líquido y los producidos en medio sólido; siendo los conidios más virulentos cuando el microorganismo se cultivó en medio líquido, posiblemente porque la producción sumergida de conidios mejora alguno de los factores determinantes en la actividad biológica del hongo entomopatógeno.

Los resultados de mortalidad obtenidos en las langostas, confirmaron la poca efi-

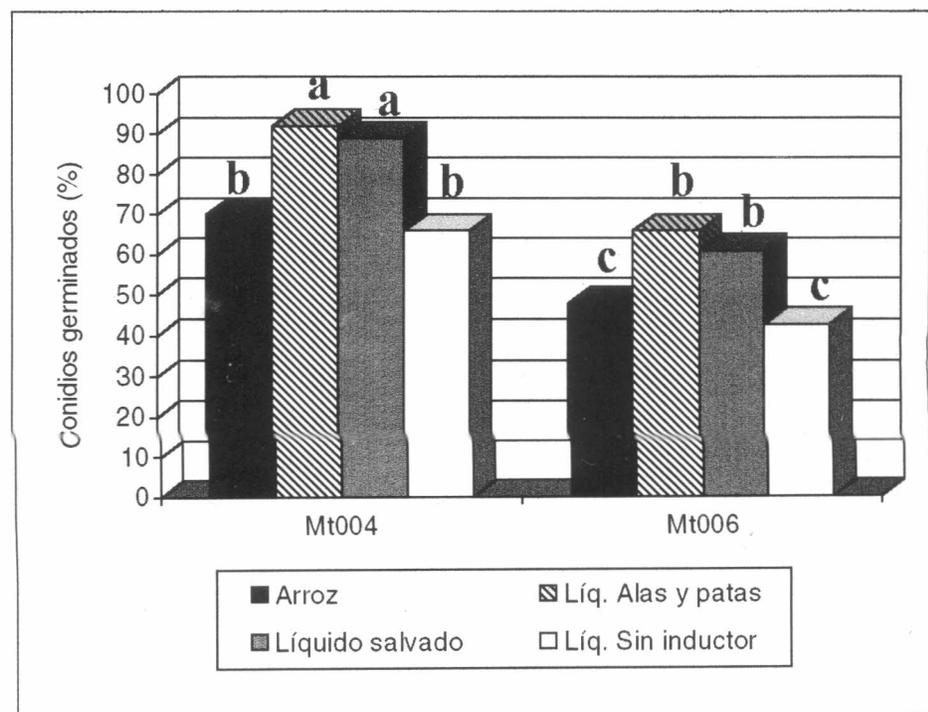
ciencia biocontroladora del aislamiento Mt006 de *M. anisopliae* sobre *R. schistocercoides*. Dicho aislamiento mostró ser menos virulento que la cepa Mt004, a pesar de que ambas pertenecen a la misma especie de hongo entomopatógeno. Esta diferencia se podría atribuir a diferencias genéticas entre las cepas, las cuales estarían directamente relacionadas con la producción de enzimas y de toxinas. Dichas diferencias además, podrían deberse a factores climáticos, estructurales, espaciales y genéticos de los insectos hospederos, factores que pueden producir cambios fisiológicos o genéticos de estos microorganismos, incidiendo en la reducción de la patogenicidad de los aislamientos. Las diferencias en patogenicidad de las dos cepas también podrían atribuirse a diferencias en la capacidad de adhesión de los conidios sobre la cutícula del hospedero, debido a que éste es el primer paso en el proceso de infección y se ve afectado por factores como interacciones estereoquímicas entre anticuerpos de la cutícula

del insecto y glucoproteínas de la membrana celular de los conidios, fuerzas de Van der Waals de la película de agua de ambas y producción de mucílagos (Lezama 1994).

Independientemente de la cepa utilizada o del tipo de medio de cultivo utilizado (líquido o sólido), los mayores niveles de control se obtuvieron en todos los casos por los conidios producidos en presencia de alas y patas de langosta y de salvado de trigo, lo que sugiere que estos suplementos actúan como inductores de la virulencia de *M. anisopliae* sobre la langosta llanera *R. schistocercoides*.

En cuanto a la germinación de los conidios producidos bajo las diferentes condiciones de cultivo, se observó la misma tendencia obtenida en el bioensayo. Los porcentajes de germinación de la cepa eficiente Mt004 fueron significativamente superiores a los obtenidos para la cepa Mt006 con cada medio de cultivo, lo cual estuvo relacionado con las diferencias en la actividad biocontroladora de los dos aislamientos, ya que la cepa Mt004 produjo mayores porcentajes de mortalidad con respecto a la cepa Mt006. Estos resultados indican que la germinación es determinante en el mecanismo de acción, debido a que sólo aquellos conidios que germinan son capaces de infectar al insecto.

Para las dos cepas se obtuvieron los porcentajes mayores de germinación cuando los conidios se produjeron en medio líquido suplementado con alas y patas de langosta (92% para la cepa Mt004 y 66% para la cepa Mt006) y salvado de trigo (89% para la cepa Mt004 y 61% para la cepa Mt006) (Fig. 2), tratamientos que para



**Figura 2.** Efecto de las condiciones de cultivo sobre la capacidad de germinación de los conidios de las cepas Mt004 y Mt006 de *Metarhizium anisopliae*.

cada aislamiento no presentaron diferencias entre sí pero sí entre éstos y los conidios cultivados en medio líquido sin suplementar (66 y 43% para las cepas Mt004 y Mt006, respectivamente) y de los cultivados en arroz (70 y 48% para las cepas Mt004 y Mt006, respectivamente). Este resultado sugiere que estos sustratos tienen un efecto inductor de la germinación de los conidios de *M. anisopliae*, el cual puede estar relacionado con la actividad biocontroladora del microorganismo. Estos resultados concuerdan con lo determinado por Inyang *et al.* (1999) e Ibrahim *et al.* (1999), quienes obtuvieron una mayor actividad biocontroladora de *M. anisopliae* con conidios con porcentajes altos de germinación al compararlos con otros con menor capacidad para germinar, concluyendo que la germinación de los conidios es una etapa fundamental en el mecanismo de acción de este hongo.

Al evaluar la capacidad de adherencia de los conidios producidos en las diferentes condiciones de cultivo, se observó que los conidios con mayor y significativamente diferente capacidad de adhesión para las dos cepas fueron aquellos producidos en medio sólido con respecto a los cultivados en medio líquido, lo que indica que los conidios producidos en superficie tienen características que les permiten adherirse mejor a la cutícula del insecto, tales como un mayor carácter hidrofóbico por no haber sido producidos en un medio acuoso o una mayor producción de mucílago, que facilita que las esporas se peguen en la superficie de la cutícula o la generación de cargas o antígenos de superficie que mejoran la interacción conidio-insecto.

Para las dos cepas, los conidios que presentaron la mayor adhesión a los fantasmas de cutícula fueron para los dos aislamientos, aquellos producidos en el medio sólido de arroz (686 conidios/campo para la cepa Mt004 y 358 conidios/campo para la cepa Mt006), tratamientos que fueron significativamente diferentes entre éstos y los demás. Los conidios producidos en arroz fueron los que en el bioensayo produjeron las mortalidades menores para los dos aislamientos, lo que sugeriría que no existe una relación directa entre la capacidad de adhesión y la virulencia del hongo o que existen otros factores más importantes en el mecanismo de acción. La segunda adherencia mayor con las dos cepas, la presentaron los conidios producidos en medio líquido suplementado con alas y patas de langosta, siendo ésta de 147 conidios por campo para la cepa Mt004 y de 112 conidios/campo para la cepa Mt006 (Fig. 3), tratamientos que no fueron estadísticamente diferentes entre sí, pero sí lo fueron de los tratamientos restantes.

Los resultados indican que la adherencia no es determinante en el mecanismo de acción de *M. anisopliae*, confirmando los resultados de Boucias *et al.* (1988), quienes demostraron que dicho factor no es

específico y que los conidios de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* se adhieren de igual forma a insectos hospederos y no hospederos.

Al evaluar la hidrofobicidad de los conidios producidos bajo las diferentes condiciones de cultivo, se observó un comportamiento similar al obtenido en la prueba de adherencia, confirmando la relación

que existe entre estos dos factores. Para las dos cepas, los conidios con carácter hidrofóbico significativamente mayor fueron aquellos provenientes del cultivo en arroz, tratamientos que no fueron significativamente diferentes entre sí (Fig. 4). Dichos conidios presentaron también la mayor capacidad de adhesión, posiblemente porque la cutícula del insecto tiene también un carácter hidrofóbico debido a que

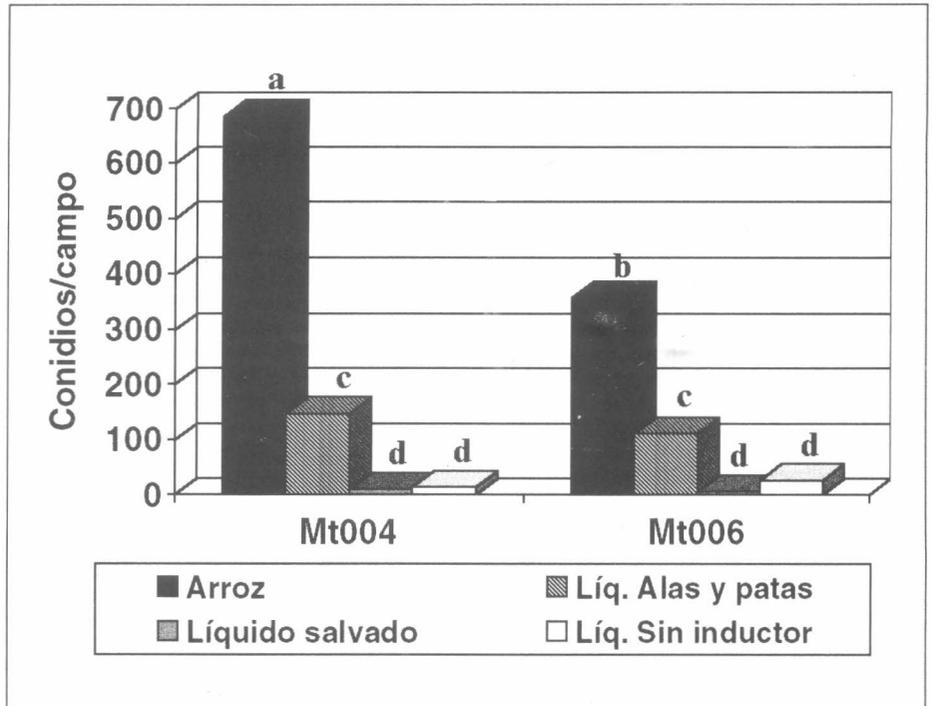


Figura 3. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la capacidad de adherencia de los conidios de las cepas Mt004 y Mt006 de *Metarhizium anisopliae*.

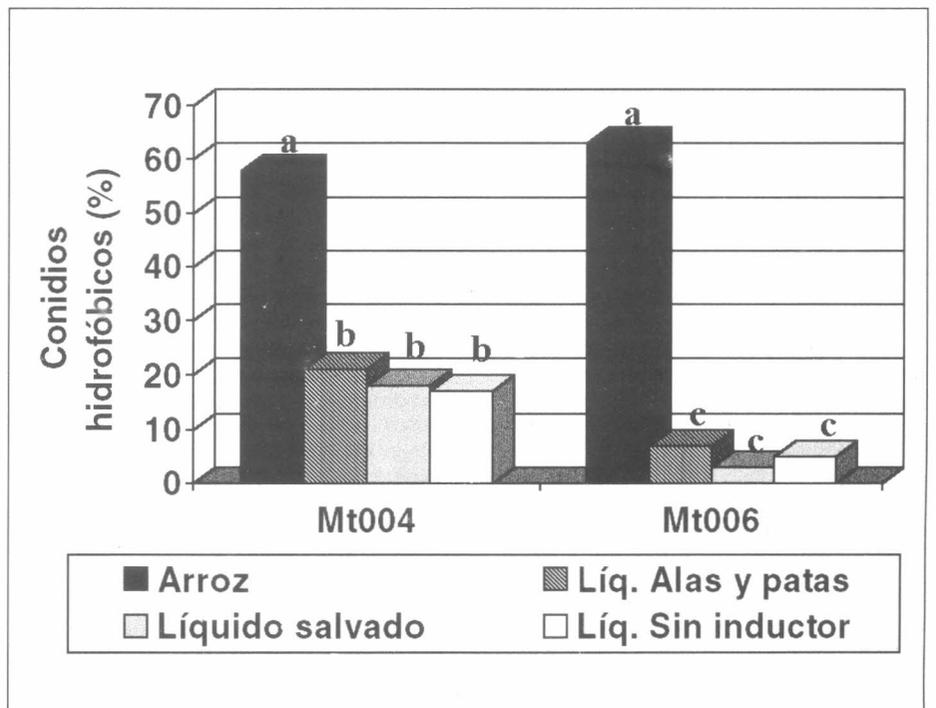


Figura 4. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la hidrofobicidad de los conidios de las cepas Mt004 y Mt006 de *Metarhizium anisopliae*.

se encuentra recubierta por ácidos grasos y esteroides, generando una interacción hidrofóbica entre las dos estructuras. Los conidios con carácter hidrofóbico menor para las dos cepas, fueron aquellos cultivados en medio líquido, no observándose diferencias dentro de cada aislamiento entre los conidios provenientes del medio líquido sin suplementar y suplementado con los potenciales inductores de virulencia, lo que sugiere que estos sustratos no afectaron la hidrofobicidad de los conidios producidos. La menor hidrofobicidad presentada cuando el hongo se cultivó en medio líquido, posiblemente se deba a que en este caso los conidios se producen sumergidos dentro de un medio acuoso, factor que induce un carácter hidrófilo en la superficie de las estructuras producidas.

Los resultados del trabajo permitieron demostrar, que las condiciones de cultivo del microorganismo determinan su actividad biocontroladora, la cual podría deberse a cambios en la virulencia que depende de un sistema complejo de pasos involucrados en el mecanismo de acción.

### Conclusiones

- El tipo y composición del medio de cultivo son determinantes en las características de los conidios producidos como: hidrofobicidad, germinación, adherencia y actividad biocontroladora.
- La adherencia de los conidios depende de la hidrofobicidad de los mismos.
- Los conidios producidos en medio líquido presentaron mayor capacidad de germinación y mayor control de la langosta llanera.
- Los conidios producidos en presencia de salvado de trigo y homogeneizado de alas

y patas de langosta fueron más eficientes en el control de la plaga.

- La inclusión de salvado de trigo en los medios de cultivo es una alternativa promisoría para la producción de biomasa altamente virulenta.

### Literatura citada

- BIDOCHKA, M.; KHACHATOURIANS, G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanomus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 165-173.
- BOUCIAS, D.; PENDLAND, J.; LATGE, J. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (7): 1795-1805.
- ESPINEL, C. 1997. Evaluación en laboratorio y campo de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Trabajo de grado (Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 115 p.
- ESPINEL, C.; EBRATT, E.; COTES, A. 1998. Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistocercoides*. *Revista Colombiana de Entomología* 24 (1-2): 1-6.
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. 1997. Estudio tecnológico para producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control biológico de la langosta de los Llanos Orientales. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (3-4): 119-124.
- IBRAHIM, L.; BUTT, T.; BECKETT, A.; CLARK, S. 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 103 (7): 901-907.
- INYANG, E.; BUTT, T.; DOUGHTY, K.; TODD, A.; ARCHER, S. 1999. The effect of isothiocyanates on the growth of *Metarhizium anisopliae* and its infection of the mustard beetle. *Mycological Research* 103 (8): 974-980.
- LANE, B.; TRINCI, A. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycological Research* 95 (7): 829-833.
- LEZAMA, R. 1994. Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. 1er. Seminario de Patología. Facultad de Ciencias. Biología Aplicada. Universidad de Colima. México. p. 47-69.
- THONART, P.; COTES, A.; CAMPOS, D.; ROBLAIN, D.; LEPOIVRE, P. 1991. Modeling of uses of microorganism in the degradation of natural polymers. Production and utilization of lignocellulosic. Editorial G.C. Galletti, Gembloux, Belgium, p. 79-89.
- VILLAMIZAR, L. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Tesis (M. Sc. Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 125 p.
- ZAMORA, R. 1996. Evaluación de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) y *Metarhizium flavoviridae* (Gams y Rozsypal), bajo condiciones de laboratorio, para el control de la Langosta Sudamericana (*Rhammatocerus schistocercoides*, Rehn). Trabajo de grado (Biólogo). Universidad de Los Andes, Bogotá. 110 p.

Recibido: Jun. 30 / 2002

Aceptado: Ene. 26 / 2003