

## VIRULENCIA DE *Metarhizium anisopliae* Y *Beauveria bassiana* (ASCOMYCETES) EN ADULTOS DE *Tetranychus urticae* (ACARI: TETRANYCHIDAE)

Roberto Lezama-Gutiérrez<sup>1</sup>, Marcos Heber Morales-Gallegos<sup>1</sup>, Oscar Rebolledo-Domínguez<sup>1</sup>, Francisco Radillo-Juárez<sup>1</sup> y Cesar Andrés Angel-Sahagún<sup>2</sup>. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. KM 40 Carretera Colima-Manzanillo, C.P. 28930, Tecomán, Colima, México. rlezama@uclm.mx. <sup>2</sup>Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Km. 7 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Guanajuato. sahaun01@yahoo.com.mx

**RESUMEN:** Se evaluó la virulencia de nueve cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (7) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., (2) en adultos de *Tetranychus urticae* Koch. Cada cepa se evaluó con las concentraciones de 0,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ , conidios/mL. Para cada cepa se formaron nueve grupos de cuatro frutos de Limón Mexicano y un grupo se inoculó por inmersión en cada concentración, respectivamente. Cada fruto inoculado se colocó en un vaso sobre una capa de algodón saturada de agua destilada estéril, junto con un grupo de 20 adultos de *T. urticae*. Durante 12 días posinoculación se registró la mortalidad de ácaros. Las cepas de *B. bassiana* presentaron valores de  $CL_{50}$  comprendidos entre  $2.2 \times 10^4$  hasta  $7.7 \times 10^5$  conidios/ml. Las cepas de *M. anisopliae*, Ma 165 y Ma 257, sus valores fueron de  $3.9 \times 10^5$  y  $1.1 \times 10^5$  conidios/ml, respectivamente. La cepa *B. bassiana* fue la más virulenta con  $CL_{50}$  de  $2.2 \times 10^4$  conidios/ml.

Palabras clave: *Tetranychus urticae*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, virulencia.

### Virulence of *Metarhizium anisopliae* Y *Beauveria bassiana* (Ascomycetes) on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) adults

**ABSTRACT:** Virulence of nine strains of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (7 strains) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., (2 strains) in adults of *Tetranychus urticae* Koch were evaluated. Each strain was assessed with concentrations of 0,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia/mL. For each strain, nine groups of four Mexican lemon fruits were formed, and one group was inoculated by immersion in each concentration, respectively. Each inoculated fruit was placed in a glass on a layer of cotton saturated with sterile distilled water, along with a group of 20 adults of *T. urticae*. For 12 days after inoculation mite mortality was recorded. *B. bassiana* strains  $CL_{50}$  showed values ranging from  $2.2 \times 10^4$  to  $7.7 \times 10^5$  conidia / ml. The strain of *M. anisopliae*, Ma165 and Ma 257, values were  $3.9 \times 10^5$  and  $1.1 \times 10^5$  conidia / ml, respectively. The *B. bassiana* strain was the most virulent with  $LC_{50}$  of  $2.2 \times 10^4$  conidia / ml.

Key words: *Tetranychus urticae*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, virulence.

### Introducción

El ácaro de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es una plaga con distribución mundial, que ataca a más de 900 especies de plantas cultivadas de diversos cultivos, hortícolas, plantas ornamentales, frutales y silvestres (Hincapié *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2011). Las plantas infestadas presentan inicialmente un punteado o manchas finas blanco-amarillentas en las hojas, forman telarañas en el envés y finalmente causan la caída de las hojas (Moraes y Flechtmann, 2008). En el estado de Colima, México se cultiva el banano (*Musa paradisiaca* L.), cítricos, papaya (*Carica papaya* L.), sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), maíz (*Zea mays* L.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), chile (*Capsicum* sp.), melón (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) y plantas ornamentales, todos susceptibles al ataque de arañas rojas (SAGARPA, 2011). En otros estados causa daños en fresa (*Fragaria* sp. y cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Flores *et al.*, 2011). Su combate se realiza principalmente con el uso

de acaricidas químicos (Aguilar, 2011a; Lorenzo *et al.*, 2002), pero su uso continuo y mal manejo ocasiona problemas de aparición de resistencia, lo que hace de esta práctica insostenible; a nivel mundial se ha documentado que *T. urticae* posee resistencia a más de 90 plaguicidas (Cerna *et al.*, 2005).

Por lo anterior, se hace necesario la implementación de un método alternativo de control más eficaz (Aguilar *et al.*, 2011b). Se reportan diversas especies de hongos que atacan a insectos y ácaros, con varios grados de especificidad con su hospedante (Hajek y St, Leger, 1994). Los hongos, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., han sido reconocidos como importantes agentes de control biológico y en varios países se han evaluado en laboratorio, invernadero y campo (Tamai *et al.*, 2002; Rosas *et al.*, 2003). En México se cuenta con poca información sobre la virulencia de hongos en especies de ácaros fitófagos; este estudio se reporta la virulencia de diversas cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Ascomycetes) en adultos de *T. urticae* (Acari: Tetranychidae).

### Materiales y Método

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico Número 1, de Patología de Insectos y Ácaros, de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (FCBA), de la Universidad de Colima, ubicado en el Km 40 de la carretera Colima-Manzanillo en Tecomán, Colima, México, a 18° 41' 20" latitud Norte y 103° 73" longitud Oeste y a 33 msnm (Google earth, 2013). En invernadero se estableció un pie de cría de *T. urticae*, para lo cual se recolectaron hojas de papaya (*Carica papaya* L.) infestadas de adultos de *T. urticae*, de un huerto comercial de papaya del municipio de Tecomán, Colima; adultos hembras y machos se colocaron en plantas en crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. *Flor de mayo*, a fin de contar con los adultos suficientes para los experimentos (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2006). Las cepas forman parte de la Colección de Hongos Entomopatógenos de la FCBA (Cuadro 1); se multiplicaron en agar dextrosa Sabouraud, enriquecido con 1% (p/v) de extracto de levadura (Bioxon) y con 500 ppm de cloranfenicol (Sigma); se incubaron a 25 ± 1°C con 70% HR y 12 h luz/oscuridad durante 21 días en una cámara bioclimática (Forma Scientific model 3740) (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Los conidios se recolectaron en una solución de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1% y 500 ppm de Cloranfenicol antibiótico; para individualizar los conidios la suspensión se agitó durante por 3 min en Vórtex (Genie 2, Daigger) (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2006), se cuantificaron con una cámara hematimétrica de Neubauer y por dilución, se determinaron las concentraciones de 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>2</sup>, 1x10<sup>1</sup> y 0 conidios/mL, mismas que se utilizaron para evaluar la virulencia de cada cepa en adultos de *T. urticae*. Para la evaluación de la virulencia de cada uno de los hongos, se utilizaron las concentraciones antes mencionadas y se empleó la metodología de Gómez (2012).

Se utilizaron frutos de limón Mexicano de 3.5 cm de diámetro; mismos que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) (Cloralex 5.25%) durante 2 min (Qin y Tian, 2004). Para cada concentración y cepa de hongo se utilizaron ocho grupos de cuatro frutos y cada grupo se inoculó, por inmersión en una suspensión de conidios durante 30 s y se colocaron los frutos en una campana de flujo vertical, para eliminar el exceso de agua durante 15 min.

Los frutos inoculados se colocaron dentro de vasos de plástico sobre una capa de algodón saturado de agua destilada estéril y sobre ellos se colocaron 20 ácaros adultos de *T. urticae*, con la ayuda de una aguja de disección (Wekesa *et al.*, 2005). Con cada cepa se utilizó un testigo formado por un grupo de cuatro frutos de limón Mexicano sumergidos en agua destilada estéril con Tween al 0.1%, sin conidios) y sobre ellos se colocaron de la misma manera 20 adultos de ácaros. Los frutos con los ácaros se

llevaron a incubación a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , HR de 70% con 12 h luz-oscuridad. Cada 48 h se registró el número de adultos muertos, de cada unidad experimental, durante 12 días; los ácaros muertos con el hongo esporulado sobre la superficie del cadáver fueron considerados como muerto por el hongo aplicado.

Cuadro 1. Aislados de hongos entomopatógenos evaluados en adultos de *T. urticae* en condiciones de laboratorio.

Cepas	Procedencia	Año	Hospedero
<i>Beauveria bassiana</i>			
Bb 124	Tecalitlán, Jalisco	2010	<i>Diatraea magnifactella</i>
Bb 168	Tecomán, Colima	2011	<i>Diaphorina citri</i>
Bb 174	Manzanillo, Colima	2011	<i>Hypothenemus hampei</i>
Bb 190	Minatitlán, Colima	2011	<i>H. hampei</i>
Bb 200	Minatitlán, Colima	2011	<i>H. hampei</i>
Bb 331	Armería, Colima	2011	<i>Tetranychus</i>
Bb 249	Tecomán, Colima	2010	<i>cinnabarinus</i>
<i>Metarhizium</i>			
<i>anisopliae</i>			
Ma 165	San José del Carmen, Jal.	2011	<i>D. magnifactella</i>
Ma 257	Cuauhtémoc, Colima	2013	<i>Phyllophaga vetula</i>

Cada experimento se estableció con una distribución de los tratamientos completamente al azar, con 9 tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. Los resultados fueron sometidos a análisis Probit en donde se les realizó una correlación entre el logaritmo de la concentración y el Probit de la mortalidad (Finney, 1971). Lo anterior, para determinar las respectivas  $CL_{50}$ , para cada una de los hongos evaluados.

### Resultados y Discusión

Se encontró que los valores de  $CL_{50}$  % ( $CL_{50}$ ) en las cepas de *B. bassiana* oscilaron entre  $2.2 \times 10^4$  hasta  $7.7 \times 10^5$  conidios/ml. Para las cepas de *M. anisopliae*, Ma 165 y Ma 257, sus valores fueron de  $3.9 \times 10^5$  y  $1.1 \times 10^5$  conidios/ml, respectivamente. Con base a los intervalos de confianza de cada uno de los valores de cada cepa, se encontró que la cepa Bb 200 fue la menos virulenta y con diferencias significativas con la cepa Bb 249; el resto de las cepas de esta especie no presentaron diferencias significativas entre ellas. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las dos cepas de *M. anisopliae* (Cuadro 2).

En esta investigación se trató de dar respuesta a la hipótesis de que las cepas de *B. bassiana* presentarían mayor virulencia, que las de *M. anisopliae* en adultos de *T. urticae*. Los resultados obtenidos, permiten rechazarla, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre ambas especies; sin embargo, se detectó que una cepa de *B. bassiana* (Bb 200) fue menos virulenta que la cepa Bb 249, pero sin diferencia con el resto de las cepas evaluadas, incluidas las de *M. anisopliae*. Del mismo modo, los resultados del presente trabajo ratifican los reportados por Gómez (2012), en donde reporta la susceptibilidad de *T. urticae* a diversas cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en condiciones de laboratorio; también, concuerdan con los resultados obtenidos por Shi *et al.* (2008) pero en *Tetranychus. Cinnabarinus* (Boisd.).

No obstante lo anterior, Shi *et al.* (2008) reportan que cepas de la especie *B. bassiana* es más virulenta que *M. anisopliae* en *T. cinnabarinus* con valores de  $CL_{50}$  comprendidos entre 42 y 177

conidios/mm<sup>2</sup> y *M. anisopliae*, de 179 a 925 conidios/mm<sup>2</sup>, entre los 7 y 9 días después de la inoculación.

Cuadro 2. Valores de Concentración Letal 50% (CL<sub>50</sub>) de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en adultos de *Tetranychus urticae*.

Cepas	CL <sub>50</sub> (conidios/ml)	Intervalo de confianza (0.05)	Ecuación	X <sup>2</sup> Calc.*
Bb 124	4.3x10 <sup>4</sup> ab	8.9x10 <sup>3</sup> - 2.1x10 <sup>6</sup>	Y=0.15x + 4.02	0.171
Bb 168	2.2x10 <sup>5</sup> ab	4.9x10 <sup>4</sup> - 9.8x10 <sup>5</sup>	Y=0.17x + 3.78	7.006
Bb 174	1.2x10 <sup>5</sup> ab	4.8x10 <sup>4</sup> - 3.4x10 <sup>5</sup>	Y=0.25x + 3.2	5.173
Bb 190	3.1x10 <sup>5</sup> ab	6.1x10 <sup>4</sup> - 1.6x10 <sup>6</sup>	Y=0.15x + 3.84	10.08
Bb 200	7.7x10 <sup>5</sup> b	2.2x10 <sup>5</sup> - 2.7x10 <sup>6</sup>	Y=0.22x + 3.28	3.756
Bb 249	2.2x10 <sup>4</sup> a	4.0x10 <sup>3</sup> - 1.2x10 <sup>5</sup>	Y=0.14x + 4.14	0.55
Bb 331	6.2x10 <sup>4</sup> ab	1.3x10 <sup>4</sup> - 2.8x10 <sup>5</sup>	Y=0.16 x + 3.94	8.052
Ma 165	3.9x10 <sup>5</sup> ab	7.9x10 <sup>4</sup> - 1.9x10 <sup>6</sup>	Y=0.16x + 3.77	3.802
Ma 257	1.1x10 <sup>5</sup> ab	2.7x10 <sup>4</sup> - 4.5x10 <sup>5</sup>	Y=0.17x + 3.78	3.378

\* X<sup>2</sup> 0.05 =12.592

Estos autores, mencionan que CL<sub>50</sub> menores a 1000 conidios/mm<sup>2</sup>, son adecuados para poder seleccionar a un agente con potencial de uso como bioacaricida a nivel comercial y que varias de sus cepas presentaron ésta característica, por lo que pudieran ser seleccionados para programas de control biológico. También mencionan que sus datos no pueden ser comparados con otros, por la razón de que la mayoría reporta CL<sub>50</sub> en conidios/ml. Del mismo modo, Wekesa *et al.* (2005) evaluaron 17 aislados de *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana* en *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard. Todos los aislados presentaron valores de CL<sub>50</sub> comprendidos entre 0.7x10<sup>7</sup> a 2.5x10<sup>7</sup> conidias/ml. Los adultos fueron más susceptibles a *B. bassiana* que a *M. anisopliae*. Estos valores son superiores a los encontrados en el presente trabajo.

En este trabajo ocho de las nueve cepas de hongos entomopatógenos resultaron igualmente virulentas; sin embargo, Bb 249 presentó una CL<sub>50</sub> de 2.2x10<sup>4</sup> conidios/ml y fue 1.95 veces más virulenta que la Bb 124. De mayor a menor virulencia las cepas se pueden agrupar de la siguiente manera: Bb 249 > Bb 124 > Bb 331 > Ma 257 > Bb 174 > Bb 168 > Bb 190 > Ma 165 > Bb 200, que son 1.95 > 2.8 > 5 > 5.45 > 10 > 14 > 17.7 > 35 veces más virulenta, respectivamente. De lo anterior, se puede recomendar, para futuros trabajos en invernadero o campo, a las cepas Ba 249, Bb 124, Bb 331 y Ma 257. Los resultados obtenidos con estas cepas, aisladas de *D. citri*, *D. magnifactella*, *T. cinnabarinus* y de *P. vetula*, respectivamente, corroboran lo mencionado por Tamai *et al.* (2002) de que los hongos entomopatógenos aislados a partir de insectos, pueden ser más virulentos que los obtenidos de suelo.

### Literatura Citada

- Aguilar, F. E., Ibáñez, G. M. V., Pascual, R. S., Hurtado, M., y J. A. Jacas 2011a. Effect of ground-cover management on spider mites and their phytoseiid natural enemies in clementine mandarin orchards (II): Top-down regulation mechanisms. *Biological Control*, 59: 171 – 179.
- Aguilar, M. S., Díaz, G. O., Rodríguez, M. C., González, C. J., García, V. R., Martínez, C. J., y G. B. Reséndiz 2011b. *Tetranychus urticae* Koch Resistance to Acaricides in Greenhouse Rose Production in Mexico. *South western Entomologist*, 36(3): 363 - 371.

- Cerna, E., Landeros, J., Guerrero, E., Flores, A. E., y M. H. Badii, 2005. Detección de resistencia enzimática por productos sinergistas en una línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 44: 287 - 295.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Flores, C. R., Isiordia, A. N., Robles, B. A., Ortega, Á. O., Pérez, G. R., y Q. A. Ramos, Q. 2011. Ácaros fitófagos asociados a frutales en la zona centro de Nayarit. *Revista Fuente*, 2(7): 25 - 33.
- Gómez, N. N. 2012. Patogenicidad de los hongos *Cordyceps bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycetes) sobre adultos de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Seminario de investigación II. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 12 p.
- Google earth. 2012. Google earth software ver. 2010. (Consultado el 01 de marzo de 2013).
- Hajek, A. E., y R. J. St, Leger 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, (39): 293 – 322.
- Hincapié, Ll., López, P., y Ch. Torres 2008. Comparison and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs extracts and their effect on mortality and repellency of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68 (4): 317 - 327.
- Lezama-Gutiérrez, R., Reyes-Martínez, J. G., Barba-Reynoso, M., Ángel-Sahagún, C. A., Galindo-Velasco, E., López-Lavín, M. y J. Molina-Ochoa 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) para el control de *Rynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) en campo. En: *Entomol. Mex.* Estrada, V. E. G., Esquivia, M. A., Luna, L. C. y Rosas, A. J. L. Ed. Sociedad Mexicana de Entomol. Méx. D.F.
- Lorenzo, F. J. M., Prendes, A. C., y B. C. D. Lorenzo 2002. Seguimiento de la dinámica poblacional de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en *Musa acuminata* Colla. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 461 – 467.
- Moraes, G. J. y C. H. Flechtmann 2008. Manual de Acarología: acarología básica y ácaros de plantas cultivadas en Brasil. Ribeirão Preto: Holos, Editorial, 308 p.
- Qin, G. Z. y S. P. Tian 2004. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. *Plant Disease*, 88: 497-501.
- Rosas, A. J. L. 2003. Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de *Hirsutella thompsonii* (cepa HtM120I) sobre *Tetranychus urticae* Koch y otros artrópodos. Tesis (Doctorado), Universidad de Colima. México 223 p.
- SAGARPA-SENASICA. 2011. Listado de plaguicidas de uso agrícola. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=22993>.
- Shi, W. B., Zhang, L., y F. M. Guang 2008. Time-concentration-mortality responses of carmine spider mite (Acari: Tetranychidae) females to three Hypocrealean fungi as biocontrol agents. *Biological Control*, 46: 495–501.
- Tamai, M. A., Alves, S. B., Almeida, J. E. M. y M. Faion 2002. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 69: 77-84.
- Wekesa, V. W., Maniania, N. K., Knapp, M. y H. I. Boga 2005. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental Applied Acarology*, 36:41-50.