

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA DE *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL.: SELECCIÓN Y RELACIÓN CON SU HOSPEDANTE

FRANCISCO HERNÁNDEZ-ROSAS & RAQUEL ALATORRE-ROSAS

Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad. Km 35.5 carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. 56230. e-mail: fhrosas@colpos.colpos.mx y alatoros@colpos.colpos.mx.

ABSTRACT

INTRASPECIFIC VARIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL.: SCREENING AND RELATIONSHIP WITH ITS HOST. Rev. Mex. Mic. 16: 1-10 (2000). This work proposes selection criteria for strains with variable genetic nature based on percentage of germination, length of germ tube (LGT) and sporulation of 94 isolates, 18 multisporic (parental) and 76 monosporic cultures. Thirteen parental are *Beauveria bassiana* isolated from *Hypothenemus hampei* except the other five remaining with different species and host. The germination of 95% of the isolates at 24 h allowed to observe differences among *B. bassiana* obtained from *H. hampei* with those isolated from others hosts and *Beauveria* species; regarding LGT, the range of 1-40 μm was the media between isolates of genera *Beauveria* and *Verticillium lecanii*. The 10^7 sp/ml sporulation was established as the ideal concentration for selection of isolates. In the cluster analysis the germination rate, LGT and sporulation data showed a tendency of the parental and monosporic isolates to group by species and host.

Key words: *Beauveria*, sporulation, monosporic, variability, viability.

RESUMEN

El presente trabajo plantea criterios de selección de cepas con naturaleza genética variable a partir de la medición del porcentaje de germinación, la longitud del tubo germinativo (LTG) y la esporulación de 94 aislamientos, 18 multispóricos (parentales) y 76 monospóricos. Trece parentales son de *Beauveria bassiana* aislados de *Hypothenemus hampei* excepto los cinco restantes con diferente especie y/o hospedante. El porcentaje de germinación del 95% a las 24 h permitió observar diferencias entre los aislamientos de *B. bassiana* obtenidas de *H. hampei* con los aislados de otro hospedante y/o especie; en la LTG, la media de 40 μm permitió separar los aislamientos del género *Beauveria* y *Verticillium lecanii*; y la esporulación de 10^7 esporas/ml se estableció como la concentración idónea para la selección de aislamientos. Además, en el análisis de agrupamiento de los datos de la germinación, LTG y esporulación mostraron una tendencia de los aislamientos parentales y monospóricos a agruparse por especie y hospedante.

Palabras clave: *Beauveria*, esporulación, monospóricos, variabilidad, viabilidad.

Introducción

El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin generalmente se encuentra asociado de manera natural a la broca del café *Hypothenemus hampei*, lo que sugiere una estrecha relación coevolutiva broca-*B. bassiana* en el agroecosistema cultivo de café; sin embargo, la incidencia natural no ha sido suficiente para detener el avance de este insecto plaga, por lo que algunos investigadores (González *et al.* 1993; Várela y Morales, 1996; Hoy *et al.* 1998) consideran que la relación ha originado en cierta medida una adaptación de la plaga al patógeno y en consecuencia que la regulación natural se mantenga en niveles bajos. Por lo anterior, Heale *et al.* (1989) y Barrera *et al.* (1990) concluyeron que los aislamientos de *B.*

bassiana de un hospedante diferente son más virulentos a *H. hampei* que los aislados del mismo hospedante o de otro escoltído.

Sin embargo, *B. bassiana* presenta una naturaleza heterocariótica que le confiere un aumento en su variabilidad genética, Mugnai *et al.* (1989) interpretan esta característica como un ensamble heterogéneo de cepas expresada como una alta variabilidad intraespecífica. Esto coincide con las observaciones de Jiménez (1992) quien encontró diferencias en virulencia entre razas o biotipos de *B. bassiana* contra la broca del café. Por ello, es importante considerar a las cepas o aislamientos como entidades individuales, y a su vez optimizar las características biológicas de los cultivos multispóricos o parentales (Samsináková y Kálalová,

1983; Gillespie y Moorhouse, 1989) que posiblemente alberguen un sin número de genotipos, los cuales pueden variar en virulencia. El conjunto de genotipos puede ser regulado u optimizado a través de la obtención de cultivos monospóricos, porque los caracteres o cualidades son suministrados de una espora, reduciendo la variabilidad y manteniendo las características requeridas para la selección y/o mejoramiento de los hongos como agentes de control biológico, dentro de un proceso dirigido al desarrollo de micoinsecticidas (Gillespie y Moorhouse, 1989; Heale *et al.* 1989; St Leger *et al.* 1992).

La presente investigación propone: 1) desarrollar una metodología que permita la selección de aislamientos de *B. bassiana* y otras especies con base en determinantes relacionadas con patogenicidad; i) pureza genética (cultivos monospóricos), ii) porcentaje de germinación, iii) longitud de tubo germinativo y iv) esporulación; 2) realizar un análisis de agrupamiento del conjunto de datos de porcentaje de germinación, longitud de tubo germinativo y esporulación de los aislamientos parentales y monospóricos para determinar patrones relacionados con la especie, hospedante y origen geográfico.

Materiales y métodos

Aislamientos. Cultivos de 18 parentales de *B. bassiana*, *B. amorpha*, *B. brongniartii*, *B. vermiconia* y *Verticillium lecanii* (Tabla 1) se conservaron en tubos inclinados con medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS) a una temperatura de 4°C durante los ensayos *in vitro*. Trece cultivos de *B. bassiana* se aislaron de broca del café (BC) y uno de *Diatraea saccharalis*; los cuatro cultivos restantes *B. amorpha* aislada de *Solenopsis* sp., *B. brongniartii* y *V. lecanii* de *D. saccharalis*; y *B. vermiconia* de cenizas volcánicas. Estos cuatro últimos aislamientos se incluyeron como puntos de comparación.

Condiciones de desarrollo. Las diferentes pruebas realizadas se llevaron a cabo utilizando el método de cámara húmeda (CH) modificado por Jiménez (1992), el cual consistió de un portaobjetos con medio de cultivo ADS colocado sobre un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri estéril, para evitar problemas de contaminación.

Aislamientos monospóricos. Se llevaron a cabo con base en la metodología modificada por Lilly y Barnett (1951). La diferencia consistió en la adaptación del método CH y en cortar con un bisturí la porción de agar donde se localizaba una espora

sola. Las condiciones para el desarrollo de la espora en medio ADS fueron de 28°C ± 1, a una humedad relativa (HR) de 70% ± 5 hasta la formación de una colonia.

Germinación. Se determinó el porcentaje de germinación y la longitud del tubo germinativo (LTG). Para ello, se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 10³; de la suspensión se distribuyeron 15 µl de manera homogénea sobre el medio ADS de la CH, el cual se incubó durante 6, 12 y 24 h a 28°C ± 1 y a una HR de 70% ± 5; al término de cada período de incubación, se contaron 100 esporas con la ayuda de un microscopio compuesto, se determinó el porcentaje de esporas germinadas y a éstas se les midió el tubo germinativo con un micrómetro adaptado a un ocular, obteniendo con ello la LTG. El porcentaje de germinación y la LTG se realizó a los tres tiempos mencionados y en cada caso se hicieron tres repeticiones.

Esporulación. Para conocer el número de esporas producidas por aislamiento, una suspensión de 1x10⁵ esporas/ml se distribuyó sobre el medio ADS de manera homogénea, se incubó durante cinco días a 28°C ± 1 y a 70% ± 5 de HR en CH. Después de la incubación, se cortaron con un horador (de 0.8 cm diámetro) tres porciones de agar donde creció el hongo. Cada porción se colocó en un vial con 5 ml de agua destilada más 0.1% de Tween 80 y un imán. La suspensión se agitó durante 15 min para desprender las esporas del agar, la concentración de esporas en suspensión se determinó con un hemocitómetro.

Análisis estadístico. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por rangos ($\alpha = 0.05$) para las mediciones de germinación, LTG y esporulación utilizando el programa SAS para Windows 6.11 (SAS Institute, Inc. 1995) bajo el método sugerido por Eskridge (1995), el cual permitió una comparación de tratamientos de manera más eficiente que el método convencional de ANOVA. Para observar las similitudes entre la germinación, LTG y esporulación con relación a su hospedante, se realizó un análisis de agrupamiento con el programa S-plus para Windows 4.5 (S-plus Mathsoft Inc.) ($\alpha = 0.05$).

Resultados y discusión

Cultivos monospóricos. Se obtuvieron 76 cultivos monospóricos (letras asignadas de la A a la E) de las

18 especies originales consideradas como parentales haciendo un total de 94 aislamientos. El conjunto parental (sin letra) con sus respectivos monospóricos (con letra) se les denominó dentro del trabajo como subgrupos, conformándose 18 (Tabla 1).

Los 94 aislamientos sometidos a pruebas de germinación y de medición del tubo germinativo mostraron cambios durante el período de incubación. A partir del tiempo cero se observa el aspecto normal de las esporas distribuidas sobre la superficie del medio ADS, en cambio a las seis horas de incubación presentaron un aspecto y tamaño diferente, producto de la hidratación de las mismas; las esporas a este tiempo por lo general no germinan, pero se hinchan por la absorción de agua y nutrientes, indicio de que son viables y se preparan para la germinación (Charnley, 1994; Hajek y St. Leger, 1994). A las 12 h las esporas emiten el tubo germinativo proceso que se generaliza a las 24 h.

Porcentaje de germinación. A las 6 h germinaron ocho aislamientos, un parental Bb2 y siete monospóricos representados por los subgrupos Bb96 y Bb99. De los ocho aislamientos destacaron Bb96C y Bb99D con 5.3 y 5% de germinación, respectivamente (Figura 1). Las diferencias significativas del porcentaje de germinación a las 6 h entre el parental y los siete monospóricos fue de $P=0.0001$ con una covarianza (CV) de 6.2.

La germinación de las esporas de los 94 aislamientos a las 12 h fue muy heterogénea mostrando diferencias significativas ($P=0.0001$) con una CV de 12.6. Pese a la enorme variabilidad tanto de los parentales como de los monospóricos se distinguieron 14 parentales con un crecimiento igual o por debajo de sus correspondientes monospóricos, por ejemplo: el aislamiento del subgrupo Bb87, el parental mostró una germinación menor al 25% mientras sus monospóricos fue $\geq 50\%$ de germinación (n° 30 a 35, Figura 1). Este comportamiento se presentó en 13 especies de *B. bassiana* y en una de *B. vermiconia*; en tanto *V. lecanii* iniciaba la germinación (n° 90 a 94, Figura 1).

La germinación a las 24 h tuvo un comportamiento uniforme para los aislamientos desde Bb4 hasta Bb104C (n° 7 a 69, Figura 1), que corresponden en su mayoría a los aislamientos de *B. bassiana* obtenidos de broca del café. A este tiempo, 65 aislamientos alcanzaron una germinación $\geq 95\%$, 10 fueron parentales y 55 monospóricos, contrastando con los aislados de *Solenopsis* y *Diatraea* (Ba107, Bb106, Bbr108 y V3), incluyendo

Bvr111 aislada de cenizas volcánicas cuya germinación fue variable. En general, las diferencias de los datos obtenidos a las 24 h de germinación fueron significativas ($P=0.0001$) y con una CV de 26.1; además, en esta medición se observaron ocho parentales con crecimiento menor que sus monospóricos; cinco subgrupos fueron de *B. bassiana* y los tres restantes de Bbr108, Bvr111 y V3 (Figura 1).

El porcentaje de germinación de 95% a las 24 h abre la posibilidad de seleccionar un gran número de aislamientos a partir de umbrales o niveles, haciendo los ensayos posteriores de selección más útiles y prácticos. De otra manera, estas etapas de obtención de cepas candidatas como posibles agentes micoinsecticidas resultarían tediosas y tardadas, por ello la necesidad de establecer umbrales que aseguren una mayor calidad del inóculo con niveles significativos de germinación (González *et al.*, 1993; Heale *et al.*, 1989).

Los experimentos de Heale *et al.* (1989) realizados *in vitro* con aislamientos nativos de *V. lecanii* contra el áfido *Macrosiphoniella sanborni*, demostraron que el más virulento de los aislamientos (TL_{50} de 3 días) tuvo un 50% de germinación en 10 h, en comparación con el de 5 a 9 h para los aislamientos moderadamente virulentos (TL_{50} de 5 a 9 días). Sin embargo, en experimentos *in vivo*, los aislamientos más virulentos mostraron consistentemente la más rápida germinación; considerando a este parámetro con estrecha relación con patogenicidad.

Longitud de tubo germinativo. Los aislamientos Bb96A y Bb96C ambos con un tubo germinativo de 2.3 μm de longitud mostraron a las 6 h diferencias significativas con el resto de los aislamientos ($P=0.0001$, CV=5.6). Por otra parte, a las 12 h hubo cinco aislamientos monospóricos con un crecimiento $> 5 \mu\text{m}$ de longitud y 12 parentales con una LTG con menor crecimiento que sus correspondientes monospóricos, 10 subgrupos de *B. bassiana* y dos de Bbr108 y Bvr111. Estos subgrupos presentaron diferencias significativas de $P=0.0001$ y una CV=22.1 (Figura 2).

A las 24 h se distinguieron dos grupos de acuerdo a la LTG: a) $\geq 40 \mu\text{m}$ y b) $< 40 \mu\text{m}$. En el grupo a) se encontraron dos parentales Bb96 y V3 con sus respectivos monospóricos más Bb2B y el grupo b) presentó 16 parentales, 12 de *B. bassiana* aisladas de BC y cuatro aislados del género *Beauveria* (Bb, Ba, Bbr y Bvr) de diferentes hospedante; y los

monospóricos 54 son de *B. bassiana* de BC y los 12 restantes corresponden a los cuatro parentales mencionados. Los aislamientos presentaron una LTG con diferencias significativas ($P=0.0001$, $CV=24.8$) que permitieron evidenciar algunos aislamientos como los del grupo a) en donde parentales y monospóricos del subgrupo Bb96 y V3 se encontraron en la misma categoría, distinguiéndose del resto por el gran tamaño de su tubo germinativo. Aspecto importante para llevar a cabo procesos infectivos. Con excepción del subgrupo Bb96 y el monospórico Bb2B, los aislamientos ubicados en el grupo b) con una LTG $< 40 \mu\text{m}$ pertenecen al género *Beauveria* (Figura 2).

En el caso de *M. anisopliae*, el desarrollo del tubo germinativo es de gran importancia para llevar a cabo su proceso infectivo debido a que su hifa desarrolla una estructura apresoria que le permite adherirse y penetrar a la cutícula mediante la presión ejercida por fuerzas hidrostáticas; y de esta manera iniciar la invasión del insecto (Charnley, 1994; Hajek y St. Leger, 1994). Por ello, no se descarta la posibilidad para que los aislamientos agrupados como a) y b) de acuerdo al crecimiento de su tubo germinativo, tengan la capacidad de llevar a cabo un proceso infectivo que quizá no forme apresorio pero sí actúe de manera similar a la reportada. Por ello, en ocasiones *B. bassiana* manifiesta una mayor agresividad con determinados hospedantes.

Tabla 1. Cultivos parentales y monospóricos utilizados en el estudio.

Nº	Especies (parentales / monospóricos)	Aislamientos	Hospedante	Origen	Colección
1-6	<i>B. bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	Bb2 / Bb2A, Bb2B, Bb2C, Bb2D, Bb2E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Estado de Chiapas, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
7-12	<i>B. bassiana</i>	Bb4 / Bb4A, Bb4B, Bb4C, Bb4D, Bb4E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Ecuador	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
13-17	<i>B. bassiana</i>	Bb6 / Bb6A, Bb6C, Bb6D, Bb6E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Estado de Chiapas, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
18-23	<i>B. bassiana</i>	Bb63 / Bb63A, Bb63B, Bb63C, Bb63D, Bb63E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Huatusco, Veracruz, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
24-29	<i>B. bassiana</i>	Bb65 / Bb65A, Bb65B, Bb65C, Bb65D, Bb65E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Huatusco, Veracruz, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
30-35	<i>B. bassiana</i>	Bb87 / Bb87A, Bb87B, Bb87C, Bb87D, Bb87E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Córdoba, Veracruz, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
36-41	<i>B. bassiana</i>	Bb88 / Bb88A, Bb88B, Bb88C, Bb88D, Bb88E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Costa de Oaxaca, Oaxaca, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
42-47	<i>B. bassiana</i>	Bb94 / Bb94A, Bb94B, Bb94C, Bb94D, Bb94E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Teocelo, Veracruz, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
48-53	<i>B. bassiana</i>	Bb95 / Bb95A, Bb95B, Bb95C, Bb95D, Bb95E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Córdoba, Veracruz, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.
54-59	<i>B. bassiana</i>	Bb96 / Bb96A, Bb96B, Bb96C, Bb96D, Bb96E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Estado de Oaxaca, México	CNRCB-DGSV-FCBA-UC.
60-65	<i>B. bassiana</i>	Bb99 / Bb99A, Bb99B, Bb99C, Bb99D, Bb99E	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Colombia	CNRCB-DGSV
66-69	<i>B. bassiana</i>	Bb104 / Bb104A, Bb104B, Bb104C	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Sao Paulo, Brasil	USDA-ARSEF-1480
70-73	<i>B. bassiana</i>	Bb105 / Bb105A, Bb105B, Bb105C	Broca del café <i>H. hampei</i> , Hh	Kenia	USDA-ARSEF-2685
74-77	<i>B. bassiana</i>	Bb106 / Bb106A, Bb106B, Bb106C	Larva de <i>Diatraea saccharalis</i> , Ds	Oliveros, Santa Fe, Argentina	USDA-ARSEF-5500
78-81	<i>B. amorpha</i> (Von Hoehnel) Samson & Evans	Ba107 / Ba107A, Ba107B, Ba107C	<i>Solenopsis</i> sp, S	Alambari, Sao Paulo, Brasil	USDA-ARSEF-2641
82-85	<i>B. brongniartii</i> (Saccardo) Petch	Bbr108 / Bbr108A, Bbr108B, Bbr108C	<i>D. saccharalis</i> , Ds	Sao Paulo, Brasil	USDA-ARSEF-1830
86-89	<i>B. vermiconia</i> de Hoog & Rao	Bvr111 / Bvr111A, Bvr111B, Bvr111C	Cenizas de suelo volcánico, Csv	Chile	USDA-ARSEF-2922
90-94	<i>Verticillium lecanii</i> (Zimmerman) Viegas	V3 / V3A, V3B, V3C, V3D	<i>D. saccharalis</i> , Ds	Estado de Colima, México	Laboratorio de Patología de Insectos, C.P.

C.P.: Colegio de Postgraduados, CNRCB: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, DGSV: Dirección General de Sanidad Vegetal, FCBA-UC: Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias - Universidad de Colima, USDA-ARSEF: Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi.

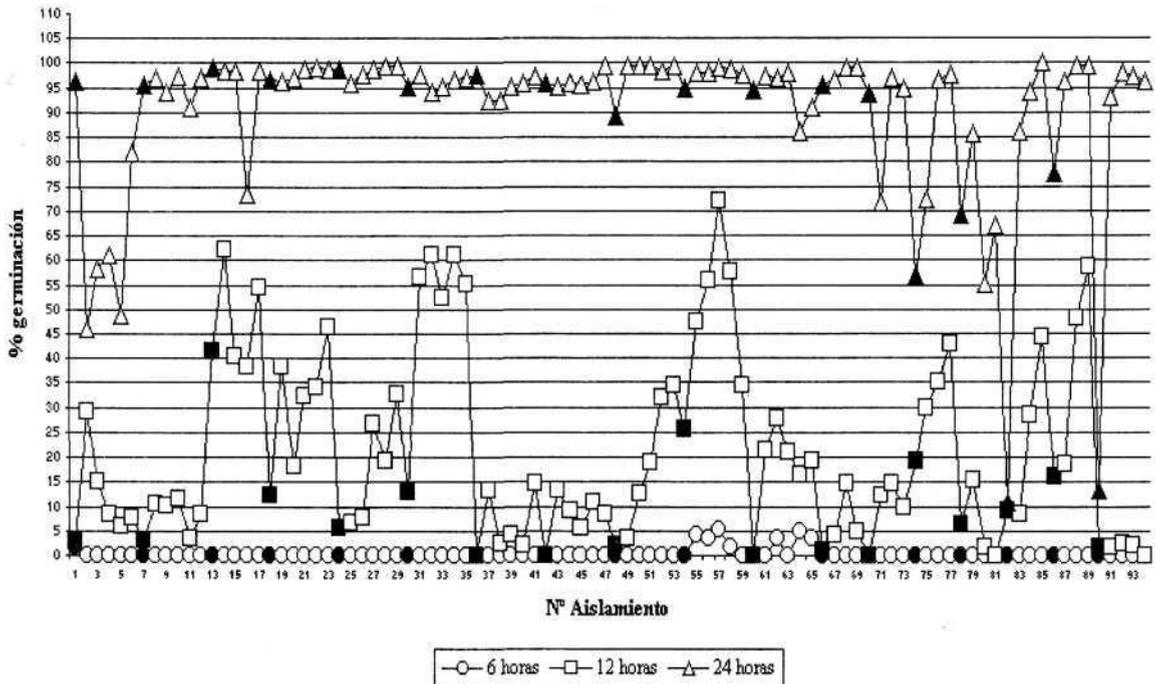


Figura 1. Porcentaje de germinación a las 6, 12 y 24 h de los 94 aislamientos parentales y monospóricos agrupados en el orden en que se muestran en la Tabla 1. Las figuras rellenas de negro representan los parentales.

También Samuels *et al.* (1989) correlacionaron la extensión del tubo germinativo con la patogenicidad. Los 24 aislamientos que estudiaron con un rango, en la extensión del tubo germinativo, de 6.7 a 14.2 μm , los clasificaron en tres grupos: el primero con 17 aislamientos con una extensión del tubo germinativo de 6.7 a 8.2 μm , y un tiempo letal 50 (TL_{50}) de 6.52 a 8.69 días fue considerado virulento contra *Nilaparvata lugens*; el segundo con una longitud de 10.3 μm y una TL_{50} de 10.03 a 10.57 días fue catalogado con baja virulencia; y el último con seis aislamientos de 12.5 a 14.2 μm y una TL_{50} de 12.07 a 14.70 días fue designado avirulento. En cuanto a los aislamientos procedentes de broca como de otros insectos mostraron que la LTG a las 24 h varió de 1 a 42 μm , con excepción del subgrupo Bb96 y V3 que estuvo por arriba de los 40 μm , sin que esto garantice que los aislamientos con tubo germinativo mas largo

sean patógenos. De acuerdo a Altre *et al.*, (1999) la correlación virulencia, con la longitud del tubo germinativo resultó altamente positiva pese a que la longitud del tubo fluctuó entre 2.9 y 5.3 μm .

Esporulación. Con el número de esporas producidas durante cinco días, se establecieron tres niveles de acuerdo a la concentración. El primer nivel se formó a partir de cuatro aislamientos parentales y 18 monospóricos con una concentración de 10^7 esp/ml, sobresaliendo los subgrupos: Bb4, Bb87, Bb104 y Bb106; el segundo nivel se formó de seis parentales y 25 monospóricos con una concentración 10^6 esp/ml, en este caso los subgrupos sobresalientes fueron: Bb2, Bb99 y V3; y en el tercer nivel hubo ocho parentales y 33 monospóricos con una concentración de 10^5 esp/ml con cinco subgrupos: Bb88, Bb96, Bb105, Ba107 y Bbr108 (Figura 3).

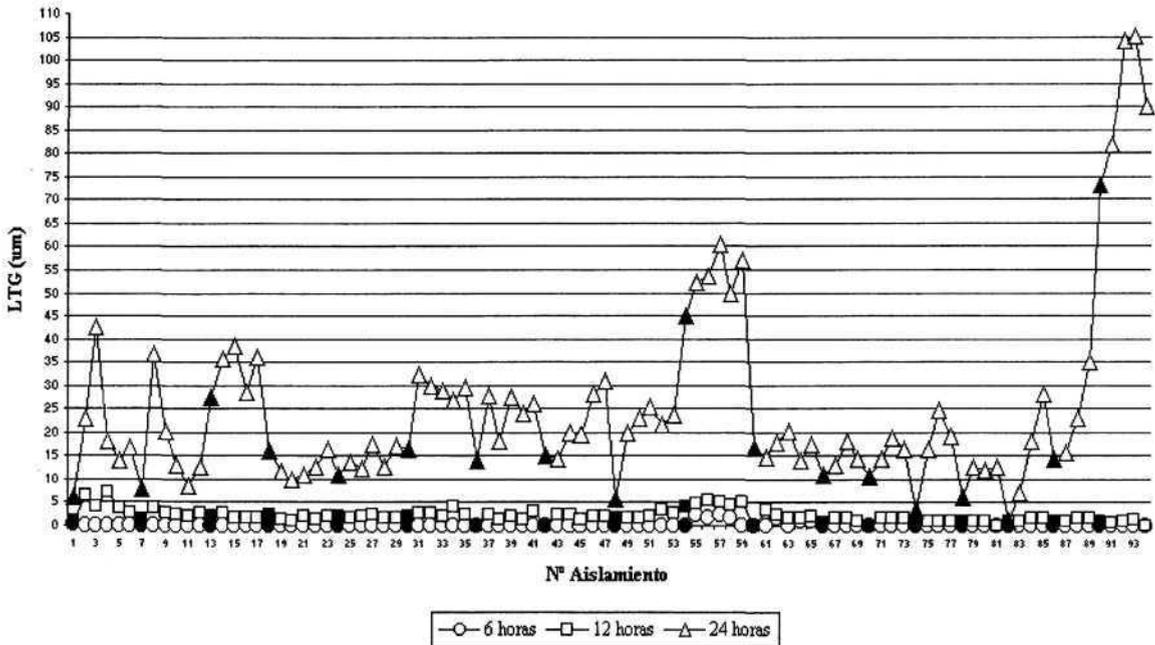


Figura 2. Mediciones de la longitud del tubo germinativo a las 6, 12 y 24 h de los 94 aislamientos parentales y monospóricos en el orden en que se muestran en el Tabla 1. Las figuras rellenas de negro representan los parentales.

La clasificación anterior permitió seleccionar aislamientos que produjeron más unidades infectivas a los cinco días, con diferencias significativas de $P=0.0001$ y con una CV de 20. Feng y Johnson (1990) encontraron que los aislamientos más virulentos contra *Diuraphis noxia* fueron los que tuvieron una esporulación de 10^7 esporas por ml; sin embargo a pesar de ser un parámetro considerado entre los relacionados con patogenicidad, Estrada *et al.* (1997) concluyeron que no existe una relación directa entre la esporulación y la patogenicidad al caracterizar cultivos monospóricos de un mismo parental. Es importante resaltar que en la germinación a las 12 h, los parentales de V3 y Bb88 con sus respectivos monospóricos estuvieron por abajo del 25% de germinación al igual que el parental de Bb87 excepto sus monospóricos con una germinación por arriba del 50%, en cambio a las 24 h tres de los monospóricos de V3 (B, C y D) así como los parentales y algunos de sus monospóricos de Bb87 (A, C, D, E) y Bb88 (C, D, E) alcanzaron una

germinación del 95% (Figura 1). En la LTG, V3 y sus respectivos monospóricos superaron los 40 μm de longitud, no así los parentales y monospóricos de Bb87 y Bb88 donde la LTG fue menor a 40 μm (Figura 2); y en la esporulación el subgrupo Bb87 alcanzó una concentración de 10^7 esp/ml, en cambio el subgrupo V3 tuvo una concentración de 10^6 esp/ml mientras el subgrupo Bb88 presentó la concentración más baja, 10^5 esp/ml (Figura 3). Lo anterior abre mayores posibilidades para aseverar que la germinación, LTG y esporulación en conjunto permiten seleccionar aislamientos con posibilidades de ser candidatos con un grado de virulencia considerable, para un hospedante dado. V3 por ejemplo ha mostrado potencialidad natural para controlar homópteros como la mosquita blanca y pulgones, mientras que Bb87 y Bb88 aún cuando tienen el potencial patógeno contra mosquita blanca no se compara con la agresividad de V3, esto probablemente se debe a que la mosquita blanca no es el hospedante original de Bb87 y Bb88; sino que

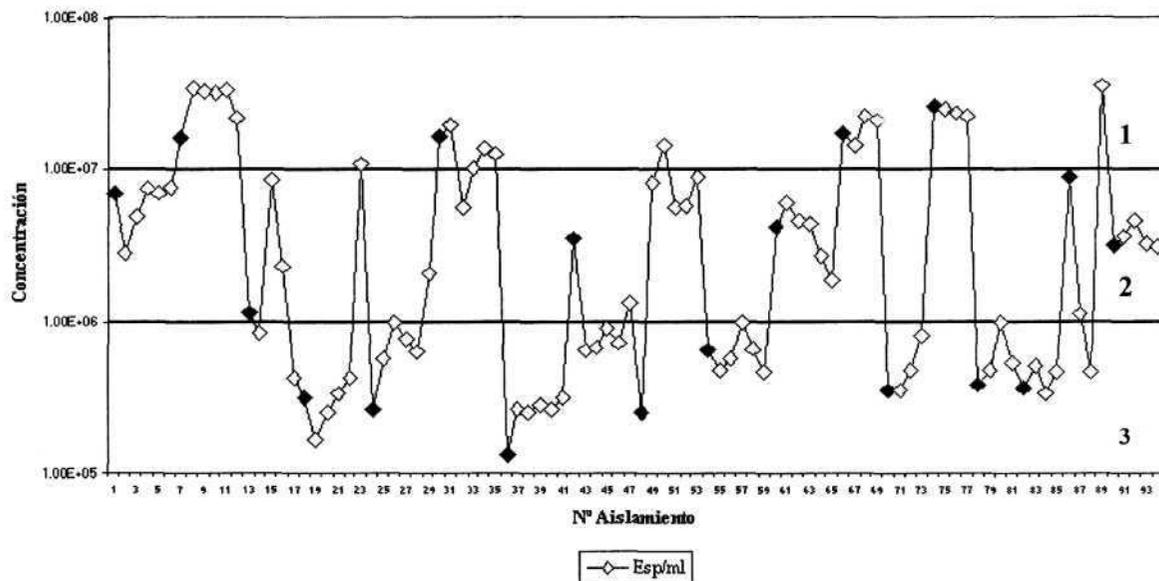


Figura 3. Concentración de esporas producidas a los cinco días de crecimiento de los 94 aislamientos parentales y monospóricos, separando cada una de las concentraciones en tres niveles de mayor a menor (1, 2 y 3). Las figuras rellenas de negro representan los parentales.

fueron aislados de un brote epizootico sobre BC. Tamayo (1998) encontró que V3 es altamente virulento contra mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* con un TL_{50} de 2.7 días y con menor virulencia Bb87 y Bb88 con un TL_{50} de 3.5 y 3.9 días respectivamente. Aunque Bb96 presenta la misma naturaleza epizootica que los aislamientos anteriores no se ha confirmado su patogenicidad, sólo se observó un porcentaje de germinación por arriba del 95%, una LTG mayor a los 40 μm y esporulación de 1×10^5 .

Análisis de agrupamiento de los aislamientos a partir de las mediciones de germinación, LTG y esporulación correlacionadas con el hospedante.

Con la información generada de los patrones de germinación, LTG y esporulación se desarrolló un dendograma (Figura 4). Los aislamientos mostraron una tendencia de agrupamiento: 1) por especie, 2) de acuerdo al insecto hospedante y 3) por su origen geográfico. Considerando la especie, se observó un agrupamiento muy marcado de los aislamientos de *B.*

bassiana, *B. amorpha* y *V. lecanii*, mientras que en el caso de *B. vermiconia* y *B. brongniartii* no fue así, éstas se encontraron entre las otras especies, quedando estas dos especies junto con *B. amorpha* incluidas dentro de una gran grupo conformado en su mayoría por aislamientos de *B. bassiana* como lo muestran los brazos A y B del dendograma. Con respecto al agrupamiento por el insecto hospedante se definen tres grupos; en el primero se agrupan principalmente los aislamientos de *H. hampei* (Bb2 hasta Bb105); en el segundo lo constituyen los aislamientos procedentes de *Solenopsis* (Ba107) y el tercero agrupa los aislamientos de *D. saccharalis* (Bb106 y V3). De acuerdo al origen geográfico, también se observó una tendencia a agruparse; sin embargo, ésta fue menos marcada que la asociación observada con el hospedante, aunque ambos agrupamientos (de acuerdo al huésped y al origen) nos ayudan a justificar en parte, la ubicación de dos aislamientos de *B. brongniartii*, el parental Bbr108 comparte el mismo hospedante con el agrupamiento

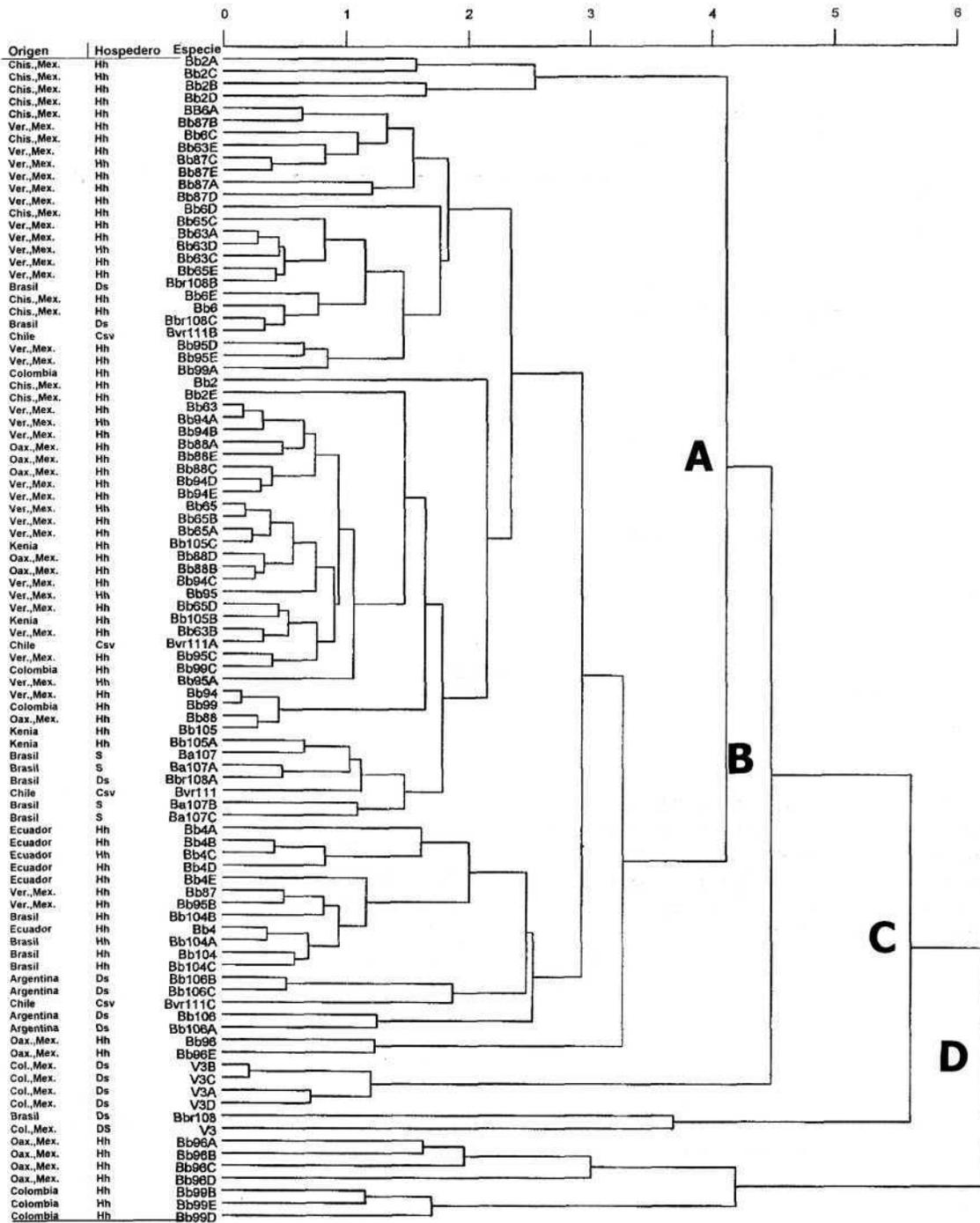


Figura 4. Dendrograma obtenido de las mediciones de germinación, LTG (6, 12 y 24 h) y de esporulación a los cinco días de los 94 aislamientos parentales y monospóricos; separados en cuatro grupos indicados con las letras A, B, C y D. Detalles de los aislamientos, del hospedante y del origen en el Tabla 1.

V3 (*D. saccharalis*) y el monospórico Bb108A por el origen geográfico con el agrupamiento Ba107, de Brasil. El hecho de que se encuentre Bbr108B, Bbr108C y *B. vermiconia* (Bver111, A, B y C) entre los aislamientos de *B. bassiana*, quizá se justifique porque *B. bassiana* se considera como un ensamble heterogéneo de cepas (Mugnai *et al.* 1989). Además, estudios de frecuencias alélicas realizados por St Leger *et al.* (1992) ubicaron a *B. vermiconia* (utilizado para esta misma investigación) dentro de aislamientos de *B. bassiana* en un dendograma de agrupamiento, por lo que le denominaron a *B. bassiana* como una especie críptica o de agregación.

Conclusiones

La germinación a las 24 h del 95% de los aislamientos permitió separar a casi todos los aislamientos de la broca del café y seleccionar 10 parentales y 55 monospóricos. Respecto a la LTG, se obtuvieron 12 aislamientos con un rango mayor a los 40 μm , destacando Bb2B, Bb96 y V3; siendo 40 μm la medida que separa el género *Beauveria* de *V. lecanii* (V3) con excepción de Bb2B y Bb96. Por otra parte, la esporulación a los cinco días ayudó a clasificar y seleccionar los aislamientos con mayor producción de esporas, característica importante de un agente con propiedades de transmisibilidad. Es decir, con potencial para diseminarse e infectar a una población en campo. Con base en este factor consideramos que los aislamientos con alta producción de esporas por ml (10^7 esp/ml), pueden tener una ventaja sobre aquellos con menor esporulación en cuanto a la invasión del hospedante y posiblemente para establecerse en el ambiente.

Los parámetros medidos en este estudio *in vitro*, no son determinantes y sería incorrecto extrapolar estos datos únicamente para predecir la respuesta del hongo con el hospedante (Vidal *et al.* 1997), incluso por haber sido el mejor en todas las pruebas; cada característica medida tiene un sustento o valor distinto pero el conjunto de estas, puede tener un efecto aditivo en la expresión de la virulencia dependiendo de la complejidad de la especie bajo la relación hongo-hospedante (Maurer *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1985). Además, los parámetros establecidos son parte de una metodología discriminante, pero no para poder determinar al aislamiento con la seguridad de que sea capaz de controlar a un hospedante dado.

En el análisis de agrupamiento, los aislamientos parentales y monospóricos tendieron a agruparse por especies: *B. bassiana*, *B. amorpha* y *V. lecanii* (Bb, Ba y V3) y en correspondencia por los hospedantes *H. hampei* (Bb), *Solenopsis* (Ba107) y de *D. saccharalis* (Ba106 y V3), concordando con la observación de Maurer *et al.* (1997): el insecto hospedante puede ejercer una presión de selección tal que favorezca a uno o pocos genotipos; por consiguiente, conduce a que la diversidad patogénica en *Beauveria* sp. se exprese en términos de especialización con respecto al hospedante (St Leger *et al.*, 1992). En cambio, el estudio en asociación con el origen geográfico no presentó relaciones concluyentes entre la especie y el hospedante.

Agradecimientos

Al Micólogo de Insectos el Dr. Richard A. Humber por proveer los aislamientos de *Beauveria* de la USDA-Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, EUA. Al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico y a la Dirección General de Sanidad Vegetal, México por haber proporcionado cepas de *Beauveria bassiana*; y al Dr. Octavio Martínez de la Vega del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) por el análisis estadístico de agrupamiento.

Literatura citada

- Altre, J.A., J.D. Vandenberg, F.A. Cantone, 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332-338.
- Barrera, J.F., D. Moore, Y.J. Abraham, S.T. Murphy, C. Prior, 1990. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Mexico and possibilities for further action. Brighton Crop Protection Conference. *Pests and Disease.* 4B: 391-396.
- Charnley, A.K., 1994. Recent advances in the study of entomopathogenic fungi. *Proceedings XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology.* Montpellier, France. 28 August - 2 September. Vol. 1. 292-298.
- Eskridge, K.M., 1995. Statistical analysis of disease reaction data using nonparametric methods. *HortScience.* 30 (3): 478-481.
- Estrada, V.M.N., A.P.E. Vélez, R.E.C. Montoya, 1997. Caracterización de cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48 (4): 217-224.
- Feng, M.G., J.B. Johnson, 1990. Relative of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 19 (3): 785-790.
- Gillespie, A.T., E.R. Moorhouse, 1989. The use of fungi to control pests of agricultural and horticultural importance. *In: J. M. Whipps, R. D. Lumsden (eds.). Biotechnology of fungi*

- for improving plant growth. Cambridge University Press Londres, pp 55-84.
- González, G.M.T., F.F.J. Posada, P.A.E. Bustillo, 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* **44** (3): 93-102.
- Hajek, A.E., R.J. St. Leger, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- Heale, J.B., J.E. Isaac, D. Chandler, 1989. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. *Pestic. Sci.* **26**: 79-92.
- Hoy, C.W., G.P. Head, F.R. Hall, 1998. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. *Ann. Rev. Entomol.* **43**: 571-594.
- Jackson, C.W., J.B. Heale, R.A. Hall, 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* **106**: 39-48.
- Jiménez, G.J.A., 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé* **43** (3): 84-98.
- Lilly, V.G., H.L. Barnett, 1951. *Physiology of the fungi*. McGraw-Hill, New York.
- Maurer, P., Y. Couteaudier, P.A. Girard, P.D. Bridge, G. Riba, 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* **101** (2): 159-164.
- Mugnai, L.; P.D. Bridge, H.C. Evans, 1989. A chemotaxonomy evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res.* **92** (2): 199-209.
- Samsináková, A., S. Kálalová, 1983. The influence of a single-spore isolation and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 156-161.
- Samuels, K.D.Z., J.B. Heale, M. Llewellyn, 1989. Characterization to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 25-31.
- SAS Institute, 1995. SAS software for windows release 6.11. SAS Institute, Cary, N. C.
- St. Leger, R.J., L.L. Allee, B. May, R.C. Staples, D.W. Roberts, 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Res.* **96** (12): 1007-1015.
- Tamayo, M.F., 1998. Efectividad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra mosquitos blancos (Homoptera: Aleyrodidae) en Tenextepango, Morelos. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, 86 pp.
- Várela, A., E. Morales, 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 147-152.
- Vidal, C., J. Fargues, L.A. Lacey, 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 18-26.

Recibido: 19 de julio 2001. Aceptado: 23 de febrero 2002.
Solicitud de sobretiros: Francisco Hernández Rosas.