

Actividad de dos hongos entomopatógenos, identificados molecularmente, sobre *Bactericera cockerelli*

Activity of two entomopathogenic fungi, molecularly identified, on *Bactericera cockerelli*

FABIOLA VILLEGAS-RODRÍGUEZ^{1,7}, OVIDIO DÍAZ-GÓMEZ^{2,7}, J. SERGIO CASAS-FLORES³, CLARA TERESA MONREAL-VARGAS^{4,7}, FERNANDO TAMAYO-MEJÍA⁵ y SOTERO AGUILAR-MEDEL⁶

Resumen: El psílido de la papa *Bactericera cockerelli* afecta a las solanáceas en México, por el daño directo que causa, además, de que es transmisor de patógenos procariotes como *Candidatus Liberibacter solanaceum* (psyllaurosis). Este insecto es combatido principalmente con productos químicos. Sin embargo, en la actualidad, se buscan nuevas estrategias para su manejo como el uso de hongos entomopatógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad del psílido de la papa a dos cepas comerciales y dos nativas de *Metarizhium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, así como confirmar la identificación de las mismas mediante técnicas moleculares. Los bioensayos se realizaron con la cepa nativa MA25 de *M. anisopliae* y las comerciales Metabich® (MA28) y Bassianil® (BB09) y la nativa BB42 de *Be. bassiana*. Se probaron cinco concentraciones sobre ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli* y se obtuvieron sus CL₅₀ y CL₉₅. Todas las cepas resultaron patógenas para el psílido de la papa, las más tóxicas fueron BB09, BB42 y MA28. La mortalidad fluctuó entre 90 a 100% con las concentraciones más altas de cada cepa: la más virulenta fue BB09, con una CL₅₀ de $2,99 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ y MA25 la menos virulenta tuvo una CL₅₀ de $6,34 \times 10^5$ conidias mL⁻¹. Mediante la clonación y la secuenciación de la región ITS de los rADN 18S, se corroboró que las cepas nativas identificadas por morfología microscópica y claves taxonómicas corresponden a *Be. bassiana* y *M. anisopliae*.

Palabras clave: Bioensayos. Paratrizoza. Hongos entomopatógenos.

Abstract: The potato psyllid *Bactericera cockerelli* affects solanaceous causes direct damage to crops in Mexico, as well as transmitting prokaryotic pathogens such as *Candidatus Liberibacter solanaceum* (psyllaurosis). In the past, it has been controlled mainly using chemical products, while recent management strategies seek different strategies, including the use of entomopathogenic fungi. The goal of this study was to evaluate the susceptibility of the potato psyllid to commercial and native *Metarizhium anisopliae* and *Be. bassiana* strains, and to determine the identity of these fungi through molecular techniques. Bioassays were done under laboratory conditions using the wild type (MA25) of *M. anisopliae*, the commercial strain (Metabich®, MA28), the *Be. bassiana* BB42 wild type strain, and the commercial strain Bassianil® BB09. Five different conidia concentrations were tested against third instar nymphs of *Bactericera cockerelli*, and their corresponding LC₅₀ and LC₉₅ were determined. The strains tested were pathogenic against the potato psyllid, with the highest virulence obtained using BB09 followed by BB42 and MA28. Using the highest concentrations of the strains, mortality varied between 90 and 100%, with the most virulent being BB09 with a LC₅₀ of 2.99×10^4 conidia per ml, and the least virulent being MA25, with a LC₅₀ of 6.34×10^5 conidia per ml. Previously, the *Be. bassiana* and *M. anisopliae* wild type strains were identified using conventional methods; this report confirms them through molecular techniques based on the cloning and sequencing of their rDNA 18S gene.

Key words: Bioassays. Paratrizoza. Entomopathogenic fungi.

Introducción

Las solanáceas, como chile (ají), jitomate y papa, son hortalizas muy importantes para México. A nivel mundial este país es el noveno productor de chile y está dentro de los diez principales productores de jitomate (FAO 2009). Estos cultivos son severamente afectados por el psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* (Sulc). Los daños que ocasiona son de tipo directo por la inyección de una toxina transmitida únicamente por las ninfas e indirecto a través de graves enfermedades conocidas como “permanente del tomate” “amarillamiento apical del chile”, y “zebra chip” de la papa, causadas por la bacteria *Candidatus Liberibacter solanaceum* (Psyllaurosis) (Munyanza *et al.* 2009a, b, c) transmitida por este insecto (Hansen *et al.* 2008; Garzón *et al.* 2009). En la industria

de la papa, la enfermedad “zebra chip” ha generado pérdidas valuadas en millones de dólares en zonas productoras del suroeste de los Estados Unidos, México, Centroamérica y Nueva Zelanda (Munyanza *et al.* 2008; Liefting *et al.* 2009; EPPO 2009).

El combate del psílido de la papa se hace, principalmente, con agroquímicos. Sin embargo, se han reportado casos de resistencia a algunos de ellos como la abamectina, cipermetrina, endosulfán, imidacloprid y profenofos (Cerna *et al.* 2010); lo que aunado a los requerimientos actuales de la sanidad de los cultivos para su consumo, disminuyendo los residuos de los productos químicos en las cosechas, hace fundamental encontrar alternativas biológicas para el manejo de esta plaga.

¹ Doctora en Ciencias. ² Doctor en ciencias, odg@uaslp.mx, autor para correspondencia. ³ Doctor en Ciencias. División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José No. 2055. Col. Lomas 4a. sección. San Luis Potosí, México, SLP C. P. 78216.

⁴ Maestra en Ciencias. ⁵ Doctor en Ciencias. Secretaría de Desarrollo Agropecuario. Av. Irrigación s/n. Col. Monte Camargo. Celaya, Guanajuato, México. C.P. 38010. ⁶ Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Tenancingo. Km 1,5 Carretera Tenancingo Villa Guerrero. 52400 Tenancingo, Estado de México, México. ⁷ Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Álvaro Obregón 64 Centro, San Luis Potosí, México, S.L.P. C.P. 78000.

De acuerdo con lo descrito por Lacey *et al.* (2009), el control biológico del psílido de la papa con hongos entomopatógenos promete ser una alternativa viable; debido a que los mecanismos de invasión únicos les permiten actuar como insecticida de contacto (Charnley 1992). Trabajos previos han demostrado la capacidad de estos organismos para ser utilizados en programas de manejo integrado de plagas. A nivel mundial los más utilizados son *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (33,9 % de los casos), *Be. Bassiana* (Blas.- Criv.) Vuill (33,9 %), *Isaria fumosorosea* Wize (5,8 %) y *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (4,1 %) (De Faria y Wraight 2007). Estas especies también se han probado sobre otros psíidos generando altas expectativas de control (Alizadeh *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2007; Lacey *et al.* 2009).

En la actualidad la identificación de los microorganismos eucariontes se lleva a cabo a través de técnicas moleculares como la secuenciación directa de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (St. Leger y Joshi 1997). Los genes rADN 18S poseen características que son apropiadas para la identificación de hongos. Dentro de éstos, las regiones espaciadoras transcripcionales intergénicas (ITS) son en las que presenta más variación entre diferentes especies de hongos y, por consiguiente, son un blanco muy atractivo para estudios de taxonomía, filogenia y detección molecular (White *et al.* 1990). Con esta técnica se ha identificado eficazmente otras cepas de las especies usadas en este estudio (Díaz *et al.* 2008; Hegedus y Khachatourians 1996). En México la identificación de hongos entomopatógenos se ha llevado a cabo por técnicas convencionales y poco precisas, comparadas con las basadas en la secuenciación de productos amplificados por PCR como los ITS.

El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad de ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli* a dos cepas nativas y dos comerciales de *Be. bassiana* y *M. anisopliae*, así como el confirmar el género y especie de las cepas nativas por secuenciación de la región ITS amplificada por PCR.

Materiales y métodos

Colonia de *B. cockerelli*. Se recolectaron aproximadamente 150 adultos de *B. cockerelli* con una red entomológica en el campo de producción de jitomate de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Éstos se colocaron en un frasco de vidrio y se trasladaron al laboratorio de entomología para su cría y reproducción masiva. Los adultos se introdujeron en jaulas de madera y organza (50 cm x 50 cm x 75 cm) con plantas de chile para que ovipositaran sobre ellas y se mantuvieron con un fotoperiodo de 12:12 luz: oscuridad, temperatura media de 25 ± 1 °C y humedad relativa de 60 ± 10 %. Cada 48 h las plantas de chile se cambiaron individualmente a otras jaulas, con la finalidad de obtener ninfas del tercer estadio para la realización de los bioensayos. La edad de las ninfas se determinó por medio de unidades calor y el tamaño de las mismas (Abdullah 2008; Medina y Covarrubias 2008). El procedimiento consiste en usar una temperatura umbral base de desarrollo de la especie, junto con las máximas y mínimas del ambiente en el cual se realiza el desarrollo del ciclo del insecto, con ello se estiman las unidades calor y se pronostica cuando se alcanzará cada estado y/o instar de interés de la especie en estudio. En este caso se usaron los datos de unidades calor y tamaños propuestos por Garzón *et al.* (2007). La

herramienta usada para el cálculo de unidades calor fue de la Universidad de California (UC IPM 2015).

Hongos entomopatógenos. Se evaluaron cuatro cepas de hongos entomopatógenos proporcionadas por el Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos, dependiente del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Guanajuato, México. Las comerciales fueron Bassianil® (*Be. bassiana*-BB09) y Metabich® (*Metarhizium anisopliae* MA28); y las dos nativas fueron *Be. bassiana* (BB42) aislada a partir de una chinche *Lygus* spp. (Hemiptera: Lygaeidae) en “El Copal”, Guanajuato, y otra de *M. anisopliae* (MA25) aislada de una larva de Scarabaeidae (Coleoptera) en la localidad de Puruaga, Guanajuato.

De manera preliminar se aplicaron concentraciones desconocidas de cada cepa a ninfas de *B. cockerelli*, para su posterior re-aislamiento y obtención de colonias en medio agar dextrosa Sabouraud (ADS), incubadas a 28 °C en el caso de las cepas BB09 y BB42; mientras que MA25 y MA28 fueron crecidas a 25 °C.

Identificación molecular. La extracción de ADN se efectuó con el protocolo descrito por Reader y Broda (1989), a partir del crecimiento fúngico en caldo dextrosa y papa (PDA). Las regiones ITS se amplificaron con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 diseñados por White *et al.* (1990). La PCR se realizó en un volumen de 25 µl, con una mezcla de reacción constituida por 5,0 µl de tampón de reacción 5x, 1 µl de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl de cada oligonucleótido 10 µM; 0,3 µl de taq polimerasa 5 uµl⁻¹; 0,5 µl de dNTP's 10 µM; 1,0 µl de ADN, y agua miliQ estéril c.b.p. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos con fase de desnaturalización (30 segundos a 94 °C) cada uno, alineamiento (45 segundos a 60 °C) y extensión (1,5 minutos a 72 °C); y con extensión final de 8 minutos a 72 °C en un termociclador marca Eppendorf®.

El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega 2003). La manipulación genética se llevó a cabo en células competentes de *E. coli* JM 109. El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979), y las clonas positivas se identificaron por liberación del inserto mediante digestión con la enzima *Eco* RI (Sambrook *et al.* 1989). Se eligieron tres clonas positivas para cada uno de los hongos, se purificó el ADN y se secuenció por el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica de México.

Las secuencias de nucleótidos se compararon contra las secuencias en el GenBank-NCBI (National Center for Biotechnology Information 2011), con el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blastn.cgi>). Se realizó un análisis filogenético contrastando las secuencias obtenidas con las que dieron mayor porcentaje de similitud en el GenBank, a través de un dendrograma obtenido con el método agrupamiento de vecinos “neighbor-joining” (Saitou y Nei 1987), basándose en datos de 500 repeticiones (“bootstrap”) (Felsenstein 1985) y las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud en unidades de la cantidad de base de sustituciones por sitio, con el programa MEGA 5.05® (Tamura *et al.* 2011). Finalmente, las secuencias obtenidas fueron dadas de alta en el GenBank.

Concentración de conidias y prueba de viabilidad. Se recolectaron conidias a partir de colonias crecidas en medio ADS y se suspendieron en agua destilada con surfactante INEX-A COSMOCEL® 0,2 %, por agitación en una placa magnética Cimarec®. Se contaron las conidias con un hematocitómetro Neubauer Brigh SUPERIOR® y un microscopio marca Zeiss Axiolab a 40x. Las suspensiones se ajustaron por dilución a las concentraciones de 1×10^3 a 1×10^8 conidias ml^{-1} para cada especie de entomopatógeno y fueron corregidas después de realizar las pruebas de viabilidad.

Para determinar la viabilidad de las esporas se diluyó una concentración desconocida de las conidias en 2 ml de agua destilada con surfactante INEX-A COSMOCEL® al 0,2 %, se tomaron 50 μl de esta dilución y se sembraron sobre pequeños rectángulos de agar, colocándole un cubreobjetos para observar al microscopio la cantidad de conidias germinadas a las 17 h (Lacey *et al.* 2009).

Susceptibilidad de *B. cockerelli* a las cepas de entomopatógenos. Los bioensayos de susceptibilidad se realizaron por aspersión con una Torre de Potter (Burkard®). Cada unidad experimental consistió de una caja Petri de 9 cm de diámetro con una hoja de chile ancho infestada con 10 ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli*, con el envés hacia arriba para exponer a las ninfas directamente a la aspersión. El peciolo de la hoja se envolvió en torundas de algodón humedecidas con agua destilada estéril durante todo el ensayo. En la parte inferior de la caja se ubicaron círculos de papel secante sin humedecer. Las unidades experimentales fueron asperjadas con 2 ml de suspensiones de 10^3 a 10^8 conidias ml^{-1} de las distintas cepas, mientras que los testigos fueron asperjados con 2 ml de la solución agua destilada con surfactante. Se realizaron cuatro repeticiones. Las aspersiones se efectuaron a una presión de 13,3 psi (Lacey *et al.* 2009). Después de la aplicación, las cajas se sellaron y se situaron en una cámara húmeda con temperatura de 25 ± 1 °C, humedad de 60 ± 10 % y fotoperiodo de 12:12 h. Para estimar las líneas de respuesta log-dosis probit se registraron los datos de mortalidad en el séptimo día después de la aplicación.

Análisis estadístico. La mortalidad en el testigo se utilizó para corregir el resto de las mortalidades registradas mediante la fórmula de Abbott (Abbott 1925). Los datos de mortalidad se analizaron con el modelo Probit y el programa POLO PC (LeOra Software 2002). Se estimaron las concentraciones letales CL_{50} y CL_{95} y sus límites de confianza al 95 % para cada especie y cepa de hongo. La respuesta de *B. cockerelli* a cada especie de hongo se consideró significativamente diferente si los valores de los límites de confianza de las CL_{50} y CL_{95} no se traslapaban. Se usó una prueba de χ^2 para demostrar la bondad de ajuste al modelo (Robertson y Preisler 1992). Además se estimó el factor de virulencia (FV), a dos niveles, dividiendo la CL_{50} o CL_{95} de la cepa menos patógena entre la CL_{50} o CL_{95} de la más patógena según el caso (Rueda y Shelton 2003).

Resultados y discusión

Identificación molecular de los entomopatógenos. Los productos de PCR de los ITS fueron bandas de 600 y 700 pares de bases para ambas cepas y se obtuvo la secuencia respectiva. La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el GenBank mostraron que las clonas de

M. anisopliae presentan valores de 79 a 88 % de similitud y de 99 % de identidad con *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *Cordyceps japonica* Lloyd. Las secuencias de *Be. bassiana* presentaron un valor de 99 % de identidad y valor de 84 a 87 % de similitud con el mismo género y especie. Las secuencias obtenidas quedaron inscritas en la base de datos del GenBank, con los registros JX624255 para *Be. bassiana* y JX624254 para *M. anisopliae*.

En la figura 1 se muestra el dendrograma NJ con el que se estableció el análisis filogenético de las secuencias de las cepas en estudio y las seleccionadas del GenBank, las cuales incluyen algunas especies de contraste tanto de la división Ascomycota como Basidiomycota. En este dendrograma se distingue el clado de *Be. bassiana* en el que se ubicaron las clonas de la cepa nativa, y de igual forma el clado de *M. anisopliae* con las clonas de la cepas nativas. Además, se observó que *Be. bassiana* tiene relación con otro hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* R. Zare & W. Gams, pero ambos no se relacionan con *M. anisopliae*, lo que coincide con los resultados de Hegedus y Khachatourians (1993), quienes señalan que hubo hibridación de sondas de ADN mitocondrial de *Be. bassiana* con aislamientos de *Beauveria*, *Lecanicillium* y *Paecilomyces*, pero no con *Metarhizium*. Resultados similares fueron obtenidos por Uribe y Khachatourians (2007) al determinar con la secuencia parcial del rADN 18S una relación entre *Metarhizium* con hongos micoparásitos y no con los entomopatógenos *Beauveria* y *Lecanicillium*, e infieren que la estrategia de parasitismo de insectos proviene de por lo menos dos raíces ancestrales en hongos filamentosos.

En el manejo integrado de plagas es importante identificar las especies de entomopatógenos con exactitud, lo que

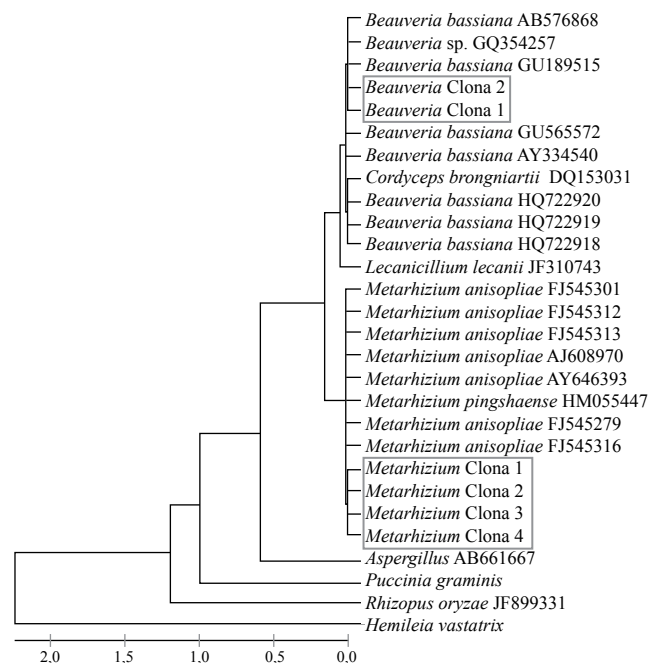


Figura 1. Identificación molecular y relación filogenética de las cepas nativa y comercial de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, basada en la máxima similitud con secuencias de las mismas especies y especies de contraste, registradas en el GenBank. Los números al lado de las ramas indican el nivel de apoyo de arranque basado en datos de 500 repeticiones ("bootstrap") y las distancias evolutivas determinadas con el método de máxima verosimilitud, en unidades de la cantidad de base de sustituciones por sitio.

actualmente se realiza con técnicas moleculares (Sugimoto *et al.* 2002; Luan *et al.* 2011). Driver *et al.* (2000) realizaron una reclasificación taxonómica del género *Metarhizium* con la técnica amplificación por PCR de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPD-PCR), llegando hasta el nivel de variedad. Los mismos autores y Glare *et al.* (1996) enfatizan en que las características morfológicas no siempre son suficientes para una correcta clasificación de cepas de *Metarhizium* y de otros entomopatógenos. Las técnicas moleculares tienen gran aplicabilidad y permiten conocer el desplazamiento geográfico de las cepas, diferenciar entre y dentro de aislados nativos, así como en la biodiversidad de poblaciones de entomopatógenos y de cepas (Meyer *et al.* 2007).

Viabilidad de las conidias de los hongos entomopatógenos. La germinación de las conidias de *M. anisopliae* y *Be. bassiana* fue de 88 a 100 %. Las dos cepas de *M. anisopliae* tuvieron en promedio 90 % de viabilidad. Para la cepa nativa de *Be. bassiana* (BB42) la viabilidad fue de 88 % y para la comercial (BB09) de 100 %. Los resultados concuerdan con lo citado por Lacey *et al.* (2009), quienes obtuvieron porcentajes que varían de 95 a 99 % con cepas de *M. anisopliae*. Sin embargo, respecto a las cepas de *Be. bassiana*, el porcentaje del presente trabajo es superior a lo reportado por los mismos autores, lo que es un buen indicador de la calidad de las cepas en estudio, como lo señalan Alves y Pereira (1998).

Micosis en *Bactericera cockerelli*. Todas las cepas utilizadas esporularon sobre los cadáveres de las ninfas o adultos de *B. cockerelli*. La micosis se presentó primero en los insectos a los que se les aplicó las concentraciones más altas. En el caso de *Be. bassiana*, antes de la esporulación, el cuerpo de los insectos se tornó rosa, sin importar la cepa, lo que ha sido reportado también en otros insectos, como el psílido del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore y la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Wraight *et al.* 2000; Dal *et al.* 2011). Este síntoma de infección es de utilidad en trabajo de campo, ya que las condiciones no siempre son las adecuadas para observar la esporulación del hongo, y el cambio en la coloración puede evidenciar que el entomopatógeno está actuando sobre las ninfas de *B. cockerelli*.

Mortalidad. La mortalidad de *B. cockerelli* por la aplicación de las cepas de *Be. bassiana* y *M. anisopliae* presentó diferencia estadística significativa con relación al testigo; el cual presentó un porcentaje de mortalidad menor a 10 %, pro-

blemente debido a manejo y no por efecto del bioensayo. Además, hubo un aumento en el porcentaje de mortalidad conforme al incremento en la concentración de conidias de las diferentes especies y cepas. La mortalidad varió de 90 a 100 % con las concentraciones más altas. Sobresalen las cepas de *Be. bassiana* BB09 y BB42, que a menores concentraciones provocaron 100 % de mortalidad (Tabla 1).

En el caso de *M. anisopliae*, MA25 y MA28 provocaron 100 % de mortalidad con la concentración de 1×10^8 conidias ml^{-1} , sin embargo, en la respuesta de mortalidad que inducen estas dos cepas sobre ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*, existió diferencia significativa ($P < 0,05$) solo a nivel de la CL_{50} . MA25 presentó una CL_{50} de $6,34 \times 10^5$ conidias ml^{-1} , y en MA28, la CL_{50} fue $1,32 \times 10^5$ conidias ml^{-1} . No obstante que a nivel de CL_{95} no existió diferencia significativa en la patotoxicidad de las dos cepas sobre *B. cockerelli*, pues los límites fiduciales de ambas respuestas se traslapan, la cepa comercial es aproximadamente cinco veces más virulenta que la nativa a nivel de CL_{50} (Tabla 1).

Respecto a la respuesta por la aplicación de cepas de *Be. bassiana*, no se encontró diferencia en la CL_{50} ni en la CL_{95} . Con BB42 se obtuvo 100 % de mortalidad con una concentración de 1×10^6 , su CL_{50} estimada fue $3,01 \times 10^4$ conidias ml^{-1} y una CL_{95} de $1,6 \times 10^6$. Al probar BB09 se obtuvo 100 % de mortalidad con la concentración de 1×10^7 , una CL_{50} de $2,99 \times 10^4$ y una CL_{95} de $4,2 \times 10^6$. Esto significa que a nivel de la CL_{50} la cepa nativa es prácticamente igual de virulenta que la comercial, pero a nivel de CL_{95} , la cepa nativa evaluada en este trabajo resulta aproximadamente 2,5 veces más virulenta que la comercial (Tabla 1).

Al realizar una comparación entre las cuatro cepas de los hongos evaluados, la única que resultó ser diferente en su CL_{50} fue la nativa MA25, la cual es significativamente ($P < 0,05$) menos virulenta contra ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*. La cepa comercial BB09 es la más virulenta, aproximadamente 21 veces más que la cepa nativa MA25, y cuatro veces más que la comercial MA28; contrastando con la cepa nativa BB42, ésta resultó no ser diferente (Tabla 1). A diferencia del trabajo de Lacey *et al.* (2009), las cepas de *Be. bassiana* en este trabajo resultaron ser más virulentas que las de *M. anisopliae*, además de obtener mortalidad mayores a 95 % con una concentración de 1×10^8 conidias por ml^{-1} .

Al comparar las CL_{50} obtenidos por Hoy *et al.* (2010) sobre el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwamura con las estimadas en el presente trabajo, se apreció que las cepas de *Be. bassiana* y una de *M. anisopliae* (MA28),

Tabla 1. Estimación de la CL_{50} y la CL_{95} (conidias mL^{-1}) de cuatro cepas de hongos entomopatógenos sobre ninfas de *B. cockerelli*.

Cepa	N ^a	Pendiente	CL_{50} ^b (Límites fiduciales)	CL_{95} ^c (Límites fiduciales)	χ^2 ^d	FV ₅₀ ^e	FV ₉₅ ^f
MA25 (Nativa)	256	0,602	$6,34 \times 10^5$ ($3,37 \times 10^5$ - $11,74 \times 10^6$)	$3,43 \times 10^8$ ($1,03 \times 10^8$ - $1,99 \times 10^9$)	0,806	21,2	214,37
MA28	223	0,709	$1,32 \times 10^5$ ($6,00 \times 10^4$ - $2,5 \times 10^5$)	$2,7 \times 10^7$ ($9,7 \times 10^6$ - $1,36 \times 10^8$)	2,723	4,41	16,88
BB42 (Nativa)	224	0,952	$3,01 \times 10^4$ ($6,79 \times 10^3$ - $1,53 \times 10^5$)	$1,6 \times 10^6$ ($2,64 \times 10^5$ - $2,23 \times 10^6$)	9,69	1,01	1,00
BB09	343	0,766	$2,99 \times 10^4$ ($9,9 \times 10^3$ - $7,11 \times 10^4$)	$4,2 \times 10^6$ ($1,15 \times 10^6$ - $4,6 \times 10^7$)	3,588	1,00	2,63

^aN Número de individuos utilizados en cada bioensayo. ^b CL_{50} Concentración letal 50. ^c CL_{95} Concentración letal 95. ^d χ^2 Prueba de bondad de ajuste al modelo.

^eFactor de virulencia 50 (CL_{50} de la cepa menos patógena entre la más patógena). ^fFactor de virulencia 95 (CL_{95} de la cepa menos patógena entre la más patógena).

resultan hasta 23 veces más virulentas contra el psílido de la papa. Sin embargo la cepa MA25 tiene un efecto similar a nivel de CL_{50} . Derivado de los resultados, se puede hipotetizar que las cepas nativas del estado de Guanajuato pueden lograr en campo un buen control de *B. cockerelli*, y lo más importante, que las dosis obtenidas en esta investigación son económicamente viables de aplicar en campo, ya que la mayoría de los productos comerciales poseen formulaciones más concentradas.

El aislamiento y uso de cepas nativas de hongos entomopatógenos ha cobrado gran importancia a nivel mundial, porque ellas se encuentran mejor adaptadas a las condiciones naturales locales y a sus huéspedes (Meyer *et al.* 2007, 2008; Hoy *et al.* 2010). Este es el caso de una cepa nativa de *I. fumosorosea* que se utilizó contra el psílido asiático de los cítricos, y resultó altamente virulenta (Meyer 2008).

En este trabajo también se estudió la respuesta al uso de cepas comerciales, cuya ventaja es que ya se encuentran formuladas, y los resultados obtenidos son similares a los de Dal *et al.* (2011), quienes evaluaron seis cepas comerciales de *Be. bassiana*, *M. anisopliae* y *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & W. Gams contra el psílido del eucalipto. Al comparar la virulencia de las cepas comerciales de *M. anisopliae* (Metarril WP® y Toyobo®) utilizadas por los autores citados con la observada en el presente trabajo, MA28 resultó entre 2,2 y 2,8 veces más virulenta que las cepas comerciales. Dichos resultados se pueden deber a las diferencias en el grado de susceptibilidad de los insectos, a propiedades y características genéticas del mismo hongo entomopatógeno, como se expone en el trabajo de Padulla y Alves (2009), quienes con la misma cepa de *Be. bassiana* (Boveril WP®) utilizada en el trabajo de Dal *et al.* (2011), requirieron una concentración de $2,37 \times 10^7$ conidias ml^{-1} para matar a 50 % de la población del psílido asiático de los cítricos; resultando más susceptible que el psílido del eucalipto; esta concentración es menor a la determinada en este trabajo con el uso de la cepa BB09 sobre el psílido de la papa.

La concentración de las cepas BB42 y BB09 no difirieron en patogenicidad a la cepa menos virulenta de *Be. bassiana* que aplicaron Alizadeh *et al.* (2007), sobre el psílido del pistacho *Agonoscena pistaciae* Burck. and Laut.

Es importante señalar que además de las altas mortalidades obtenidas con las cepas de entomopatógenos en este trabajo, ya fueran nativas o comerciales, existe la posibilidad de transmisión horizontal durante el uso de hongos entomopatógenos para el manejo de *B. cockerelli*, como lo mencionan Avery *et al.* (2009) con el hongo *I. fumosorosea*, el cual se transmite de manera eficaz por *D. citri*. Esta es otra ventaja sobre los productos químicos, y representa una cualidad mas para la utilización de hongos entomopatógenos dentro de los programas de manejo integrado del psílido de la papa.

Con nuestra investigación corroboramos el potencial de *Be. bassiana* y *M. anisopliae* para el manejo de este psílido y representan nuevas opciones de manejo debido a su modo de infección, el cual no requiere ser ingerido para poder causar una enfermedad (Téllez *et al.* 2009). Trabajos previos han demostrado la capacidad de estos entomopatógenos para ser utilizados dentro de programas de manejo integrado de *B. cockerelli* (Díaz *et al.* 2005), que entre otras ventajas son la seguridad para los humanos y otros organismos que no son blanco, la preservación de otras especies naturales y el incremento de la biodiversidad en los agroecosistemas (Lacey *et al.* 2001).

Finalmente, son necesarias las pruebas en campo e invernadero para determinar qué cepa tiene mayor aplicabilidad bajo diferentes condiciones agroecológicas, así como explorar sobre la producción masiva y la elaboración de formulaciones.

Conclusiones

Mediante secuenciación de la región ITS, se corroboró que las cepas nativas de hongos entomopatógenos recolectadas en el estado de Guanajuato, sí corresponden a *Be. bassiana* y *M. anisopliae*. Las cepas de *Be. bassiana* resultaron más virulentas que las de *M. anisopliae* sobre ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*. La cepa más virulenta fue la comercial de *Be. bassiana* (BB09) con una CL_{50} de $2,99 \times 10^4$ conidias ml^{-1} . La cepa nativa de *Be. bassiana* (BB42) posee la misma virulencia que las comerciales de *M. anisopliae* (MA28) y *Be. bassiana* (BB09).

Literatura citada

- ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- ABDULLAH, N. M. M. 2008. Life history of the potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. *African Journal of Agricultural Research* 3 (1): 060-067.
- ALIZADEH, A.; KHARRAZA, A.; TALEBI-JAHROMI, K. H.; SAMIH, M. A. 2007. Effect of some *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. isolates on common pistachio psylla *Agonoscena pistaciae* Burck. and Laut. *International Journal of Agriculture and Biology* 9 (1): 76-79.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. 1998. Produção de fungos entomopatógenos. In: Alves, S. B. *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. Cap. 27, pp. 845-869.
- AVERY, P.; HUNTER, W. B.; HALL, D. G.; JACKSON, M. A.; POWELL, C.A. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordypitaceae) under laboratory conditions. *Florida Entomology* 92 (4): 608-618.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7 (6): 1513-1523.
- CERNA, C.; AGUIRRE, C. L.; FLORES, M.; GUERVARA, L.; LANDEROS, J. OCHOA, Y. 2010. Susceptibility to *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Trioziidae) to insecticides in the State of Nuevo Leon, Mexico. *Resistant Pest Management Newsletter* 19: 14-17.
- CHARNLEY, A. K. 1992. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C. J. and C. Prior Eds. *Biological control of locusts and grasshoppers*. Melksham, RU: CAB International. pp. 190-191.
- DAL, M. H. F. A.; WILCKEN, C. F.; CHRISTOVAM, R. S.; PRADO, E. P.; GIMENES, M.J. 2011. Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lepp psyllid *Glycaspis brimblecombei*. *Research Journal of Forestry* 5 (2): 99-106.
- DE FARIA, M.; WRIGHT, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237- 256.
- DÍAZ, B.; LÓPEZ, C.; OGGERIN, M.; FERERES, A.; RUBIO, V. 2008. Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hortícolas en la zona centro de la Península Ibérica. *Boletín de Sanidad Vegetal* 34: 287-296.
- DÍAZ, G.; TEJEDA, M. E.; ÁVALOS, L. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae). *Entomologia Mexicana* 5: 539-541.

- DRIVER, F.; MILNER, R.; TRUEMAN, J. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104 (2): 134-150.
- EPPO. 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Reporting Service 5 5-8. www.eppo.org. [Fecha revisión: 13 julio 2011].
- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization. Disponible en: www.fao.org. [Fecha revisión: 15 enero 2012].
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- GARZÓN, J. A.; BUJANOS, R.; MARÍN, A. 2007. Manejo integrado de la paratrioza *Bactericera cockerelli* Sulc. INIFAP, Campo Experimental Valle de Culiacán, Culiacán, Sin., México. Folleto para productores Núm. 54. 24 p.
- GARZÓN, J. A.; CÁRDENAS, O. G.; BUJANOS, R.; MARÍN, A.; BECERRA, A.; VELARDE, S.; REYES, C.; GONZÁLEZ, M.; MARTÍNEZ, J. L. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad "permanente del tomate" en México. *Agricultura Técnica en México* 35 (1): 61-72.
- GLARE, T. R.; MILNER, R. J.; BEATON, C. D. 1996. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogens attacking *Orthoptera*: Is phialide morphology a useful criterion. *Journal of Orthoptera Research* 5: 19-27.
- HANSEN, A. K.; TRUMBLE, J. T.; STOUTHAMER, R.; PAINE, T. D. 2008. A new huanglongbing species, "*Candidatus Liberibacter psyllauros*", found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied Environmental Microbiology* 74 (18): 5862-5865.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. *Applied Environmental Microbiology* 59 (12): 4283-4288.
- HEGEDUS D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 67 (3): 289-99.
- HOY, M.; SINGH, R.; ROGERS, M. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomology* 93 (1): 24-32.
- LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.; VAIL, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control* 21: 230-248.
- LACEY, L. A.; DE LA ROSA, F.; HORTON, D. 2009. Insecticidal activity of entomopathogenic fungi (Hypocreales) for potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae): Development of bioassay techniques, effects of fungal species and stage of psyllid. *Biocontrol Science and Technology* 19 (9): 957-970.
- LEORA SOFTWARE. 2002. POLO PC A user's manual for probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- LIEFTING, L. W.; SUTHERLAND, P. W.; WARD, L. I.; PAICE, K. L.; WEIR, B. S.; CLOVER, G. R. G. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous Crops. *Plant Disease* 93 (3): 208-214.
- LUAN, F.; ZHANG, S.; CAI, Y.; SUN, Z.; WANG, B.; HUANG, B.; LI, Z. 2011. Identification of the molecular origin and development of a panzootic caused by *Beauveria bassiana* in praying mantis populations in eastern China. *Journal of Invertebrate Pathology* 108 (2): 98-105.
- MEDINA, G.; COVARRUBIAS, J. 2008. Reporte agrometeorológico. Abril 2008. Red de monitoreo agrometeorológico del estado de Zacatecas. INIFAP. Folleto informativo No. 52. pp 21.
- MEYER, J. M.; HOY, M. A.; BOUCIAS, D. G. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutiella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 95 (2): 101-109.
- MEYER, J. M.; HOY, M. A.; BOUCIAS, D. G. 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 96-102.
- MUNYANEZA, J. E.; BUCHMAN, J. L.; UPTON, J. E.; GOOLSBY, J. A.; CROSSLIN, J. M.; BESTER, G.; MILES, G. P.; SENGODA, V. G. 2008. Impact of different potato psyllid populations on zebra chip disease incidence, severity, and potato yield. *Subtropical Plant Science* 60: 27-37.
- MUNYANEZA, J. E.; SENGODA, V. G.; GARZÓN-TIZNADO, J. A.; CÁRDENAS-VALENZUELA, O. G. 2009a. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in Mexico. *Plant Disease* 93 (10): 1076.
- MUNYANEZA, J. E.; SENGODA, V. G.; GARZÓN-TIZNADO, J. A.; CÁRDENAS-VALENZUELA, O. G. 2009b. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in pepper plants in Mexico. *Plant Disease* 93 (10): 1076.
- MUNYANEZA J. E.; SENGODA, V. G.; CROSSLIN, J. M.; DE LA ROSA, G.; LOZANO, G.; SÁNCHEZ, A. 2009c. First report of "*Candidatus Liberibacter psyllauros*" in potato tubers with zebra chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93 (5): 552.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2011. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov. [Fecha última revisión: 15 agosto 2011].
- PADULLA, L. F. L.; ALVES, S. B. 2009. Susceptibility of *Diaphorina citri* nymphs to entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico* 76 (2): 297-302.
- PROMEGA. 2003. Technical manual. pGEM®-T y pGEM®-T Easy Vector Systems. Instructions for use of products.
- READER, U.; BRODA, P. 1989. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1 (1): 17-20.
- ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL. 127 p.
- RUEDA, A.; SHELTON, A. M. 2003. Development of a bioassay system for monitoring susceptibility in *Thrips tabaci*. *Pest Management Science* 59: 553-558.
- SAITOU N, M. N. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-25.
- SAMBROOK, L.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New-York.
- ST. LEGER, R.; JOSHI, L. 1997. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. En: Lacey, L. A. (ed): *Manuals of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. Capítulo VII-3.
- SUGIMOTO, M.; KOIKE, M.; HIYAMA, N.; NAGAO, H. 2002. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82 (3): 176-182.
- TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731-2739.
- TÉLLEZ, A.; CRUZ, M.; MERCADO, Y.; ASSAF, A.; ARANA-CUENCA, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: 73-80.
- UC IPM. 2016. Weather, models, & degree-days. Disponible en: <http://ipm.ucanr.edu/WEATHER/index.html> [Fecha revisión: 6 diciembre 2016].
- URIBE, D.; KHACHATOURIANS, G. 2007. Análisis y aplicaciones de la tipificación molecular del genoma mitocondrial de *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Entomología* 33 (1): 89-97.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.;

Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York.

WRIGHT, S.; CARRUTHERS, R. I.; JARONSKI, S. T.; BRADLEY, C. A.; GARZA, C. J.; GALAINI-WRIGHT, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203-217.

CitaciÓn sugerida:

VILLEGAS-RODRÍGUEZ, F.; DÍAZ-GÓMEZ, O.; CASAS-FLORES, J. S.; MONREAL-VARGAS, C. T.; TAMAYO-MEJÍA, F.; AGUILAR-MEDEL, S. 2017. Actividad de dos hongos entomopatÓgenos, identificados molecularmente, sobre *Bactericera cockerelli*. Revista Colombiana de Entomología 43 (1): 27-33. Enero-Junio 2017. ISSN 0120-0488.

Recibido: 28-ago-2015 • Aceptado: 04-feb-2017