



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL PSÍLIDO DE LA
PAPA *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) Y SU
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

Por:

FABIOLA VILLEGAS RODRÍGUEZ

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL PSÍLIDO DE LA
PAPA *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) Y SU
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

Por:

FABIOLA VILLEGAS RODRÍGUEZ

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

Asesor principal

Dr. Ovidio Díaz Gómez

Asesores

M.C. Clara Teresa Monreal Vargas

Dr. J. Sergio Casas Flores

M.C. Fernando Tamayo Mejía

El trabajo titulado “**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL PSÍLIDO DE LA PAPA *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) Y SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**” fue realizado por Fabiola Villegas Rodríguez como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias Agropecuarias y fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis.

Dr. Ovidio Díaz Gómez
Asesor principal

M.C. Clara Teresa Monreal Vargas
Asesor

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor

M.C. Fernando Tamayo Mejía
Asesor

Ejido Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, a los 05 del mes de diciembre del 2011.

DEDICATORIA

A mi mamá, María del Carmen

Por su apoyo incondicional en todas y cada una de las etapas de mi vida.

A mi esposo, J. Emmanuel

Por brindarme su amor, fidelidad y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

Proverbio chino

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa del IPICyT por el apoyo en los trabajos de biología molecular.

Al CONACyT por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

A la Fundación Produce San Luis Potosí, quien financió los trabajos de biología molecular a través del proyecto: 24-2008-1122, otorgado a J. Sergio Casas Flores.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato por la proporción de las cepas utilizadas en este trabajo.

A mis maestros Dr. Ovidio Díaz Gómez, M.C. Clara Teresa Monreal Vargas, Dr. J. Sergio Casas Flores y M.C. Fernando Tamayo Mejía, por la dirección del presente trabajo y su apoyo.

A los maestros que participaron en mi formación durante mis estudios de maestría.

A todo el personal del Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos, CESAVEG por toda la ayuda brindada: Q.F.B. Violeta Elizalde, I.Q. María Carmen Vela Santoyo, I.Q. Carolina Vela Santoyo.

A la M.C. Gricelda Nuñez Mejía, por la ayuda durante mi estancia en Irapuato, Guanajuato.

A la I.A.F. Isabel Isordia y M.C. Miguel Silva Flores por su ayuda en los trabajos moleculares.

A la Srita. Margarita Orozco por su ayuda en el presente trabajo.

A mis compañeros de maestría por la compañía y apoyo brindados.

A mi familia por el auxilio brindado y su constante preocupación por mis estudios.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	1
Hipótesis.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Importancia Económica de las Solanáceas.....	2
Importancia Económica de <i>Bactericera cockerelli</i>	3
Manejo del Psílido de la Papa.....	3
Uso de Hongos Entomopatógenos para el Control Biológico de Insectos Plaga.....	3
Identificación Molecular de Hongos Entomopatógenos.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Establecimiento de una Colonia de <i>B. cockerelli</i>	6
Hongos Entomopatógenos.....	6
Identificación Molecular.....	7
Concentración de Conidias y Prueba de Viabilidad.....	8
Procedimiento de los Bioensayos.....	9
Análisis Estadístico.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
Viabilidad.....	11
Identificación Molecular.....	11
Bioensayos.....	20
Micosis en <i>B. cockerelli</i>	20
Mortalidad en <i>B. cockerelli</i>	20
CONCLUSIONES.....	26
LITERATURA CITADA.....	27

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1. Alineamiento de clonas de <i>M. anisopliae</i> enviadas al LANBAMA y organismos similares del GenBank.	13
Cuadro 2. Alineamiento de clonas de <i>B. bassiana</i> enviadas al LANBAMA y organismos similares del GenBank.....	16
Cuadro 3. Estimación de la CL ₅₀ y CL ₉₅ (conidias mL ⁻¹) de los hongos entomopatógenos sobre ninfas de <i>B. cockerelli</i>	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Amplificación por PCR de las regiones ITS de las distintas cepas....	12
Figura 2. Análisis filogenético de las especies de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> y grupos externos, basado en la máxima similitud..	19

RESUMEN

El psílido de la papa representa uno de los problemas más graves que afectan a las solanáceas en México, su control se basa principalmente en el uso de insecticidas. Sin embargo, en la actualidad se buscan nuevas estrategias para su manejo, dentro de ellas el uso de hongos entomopatógenos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la virulencia bajo condiciones de laboratorio de dos cepas de *Metarhizium anisopliae*, una comercial (Metabich®, MA28) y una nativa (MA25); además de dos cepas de *Beauveria bassiana*, una comercial (Bassianil®, BB09) y otra nativa (BB42 sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc), conjuntamente, se llevó a cabo la identificación de las cepas nativas a través de técnicas moleculares. En los bioensayos se probaron cinco concentraciones sobre ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli* y se obtuvo su CL₅₀ y CL₉₅. Mediante secuenciación y análisis de la región ITS, se corroboró que las cepas previamente identificadas por morfología microscópica y claves taxonómicas convencionales, corresponden a *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Todas las cepas resultaron patógenas para el psílido de la papa, las más virulentas fueron BB09, BB42 y MA28. La mortalidad varió de 90 a 100% con las concentraciones más altas de cada cepa, la más virulenta fue BB09, con una CL₅₀ de 2.99×10^4 conidias por mL y la menos virulenta tuvo una CL₅₀ de 6.34×10^5 conidias por mL (MA25). Los resultados confirman que el uso de hongos entomopatógenos contra el psílido de la papa es viable y que las cepas obtenidas tienen potencial como alternativa para el manejo de este insecto.

PALABRAS CLAVE: *Bactericera cockerelli*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, bioensayos.

SUMMARY

The potato psyllid is one of the most important pests in Mexico that affects solanaceae crops; it has been controlled mainly using chemical products. Nowadays management strategies have been searching for, within them, the use of enthomopathogenic fungi. Our main goal was to evaluate the virulence of two *Metarizhium anisopliae* strains, one commercial (Metabich®, MA28) and one wild type (MA25); plus two *Beauveria bassiana* strains, also one commercial (Bassianil®, BB09) and one wild type (BB42) against *Bactericera cockerelli* (Sulc); in addition, the wild type strains were identified by molecular techniques. The bioassays were performed under laboratory conditions testing five concentrations against third instars nymphs of *Bactericera cockerelli*, and its LC₅₀ and LC₉₅ were determined. Identification by traditional methods was confirmed using molecular techniques. All tested strains resulted pathogenic against the potato psyllid, being the most virulent BB09, BB42 and MA28. Mortality index was between 90 and 100%, the most virulent strain was BB09 with a LC₅₀ of 2.99X10⁴ conidia per mL, and the less virulent showed a LC₅₀ of 6.34X10⁵ conidia per mL (MA25). The results confirm that it is possible to use enthomopathogenic fungi for the management of potato psyllid.

KEYWORDS: *Bactericera cockerelli*, *Metarizhium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, bioassays, biological control.

INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas ha comenzado a tener un gran auge en nuestros días; principalmente debido a la necesidad de alimentos inocuos, la protección del medio, así como a evitar generar resistencia en las poblaciones de insectos; dentro del control biológico se emplean microorganismos tales como bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios. De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, ésta característica los hace excelentes agentes de control biológico al actuar como insecticidas de contacto. En la actualidad, se han utilizado especies tales como *Metarhizum anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Beauveria brongniartii*; éstas especies se han incluido en planes de manejo integrado de la broca del café, langosta, gallina ciega, entre otros. La inserción en planes de manejo integrado, de estos organismos, sobre el psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* (Sulc) ha probado ser una buena estrategia, debido principalmente al mecanismo de acción antes mencionado, lo que llevó a la realización de este trabajo.

Objetivos

Confirmar mediante técnicas moleculares (PCR) la identificación de las cepas nativas de hongos entomopatógenos, la cual fue previamente realizada utilizando morfología macroscópica y claves taxonómicas convencionales.

Evaluar la virulencia de cuatro cepas de hongos entomopatógenos pertenecientes a *Beauveria bassiana* y *Metarhizum anisopliae*; dos cepas comerciales y dos cepas nativas de cada especie, recolectadas en el estado de Guanajuato, mediante bioensayos sobre ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli* (Sulc).

Hipótesis

Al menos una de las cepas a probar resulta virulenta sobre ninfas de tercer estadio de *Bactericera cockerelli* (Sulc).

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia Económica de las Solanáceas

Las solanáceas es una de las familias más importantes de hortalizas para México. Por la producción de chile, nuestro país ocupó el noveno lugar, y se colocó dentro de los diez principales productores de jitomate en el mundo (FAO, 2009).

En México, el jitomate tuvo en el año del 2010 una producción de 2.27 millones de toneladas, con un valor de 14,887 millones de pesos; en el caso del chile, la producción fue de 2.3 millones de toneladas y la papa con 1.5 millones de toneladas (SIAP, 2010).

En el caso de San Luis Potosí, la producción de chile y jitomate suman un valor de la producción de dos millones de pesos y una superficie sembrada de 17, 321 hectáreas. Para el ciclo 2010, el distrito de Salinas tuvo la más alta producción de chile verde, en el caso del jitomate el municipio de Villa de Guadalupe resultó como el mayor productor (SIAP, 2010).

Importancia Económica de *Bactericera cockerelli*

El psílido de la papa, *Bactericera cockerelli* (Sulc), es uno de los insectos de mayor importancia económica que afecta a las solanáceas. Se presenta con mayor incidencia en zonas agrícolas de monocultivo de papa, jitomate, tomate de cáscara y chile, llegando a éstos desde cultivos de otras regiones y sus hospedantes silvestres. En algunos lugares el insecto desaparece durante el invierno, emigrando a grandes distancias en busca de alimento. Es una plaga que se alimenta de la savia de las plantas hospederas, ocasionando dos tipos de daños: Directo, provocado por la inyección de una toxina, la cual es transmitida únicamente por las ninfas y el daño indirecto, considerado más importante, ya que es ocasionado por la transmisión de fitoplasmas (SAGARPA, 2009).

El daño potencial se incrementa debido a que la especie se ha consignado como resistente a insecticidas (Cerna *et al.*, 2010) y transmisor de enfermedades como la denominada “Amarillamiento” causada por *Candidatus Liberibacter psyllaourous*, que afecta a papa y jitomate (Hansen *et al.*, 2008), y del permanente del tomate (Garzón *et*

al., 2009). Además, se le ha relacionado también con la transmisión de la enfermedad denominada “Zebra chip”, la cual ha sido responsable de pérdidas millonarias de dólares en la industria de la papa en zonas como el suroeste de los Estados Unidos de Norte América, México, Centroamérica y Nueva Zelanda (Munyaneza *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009; EPPO, 2009).

Manejo del Psílido de la Papa

El manejo del psílido de la papa se basa en productos químicos que poseen ingredientes activos como Abamectina, Spiromesifen o Spinosad (UC IPM, 2010), cada uno con un modo de acción diferente (IRAC, 2005); sin embargo, los casos de resistencia a Abamectina, Cipermetrina, Endosulfan, Imidacloprid y Profenofos, han sido demostrados (Cerna *et al.*, 2010). Lo expuesto y la presión pública y gubernamental por reducir los residuos de productos químicos, exigen encontrar alternativas de manejo de esta plaga.

Dentro de las estrategias utilizadas en el manejo integrado de este insecto, se encuentran el monitoreo de adultos, utilizando trampas amarillas pegajosas, aplicaciones de Imidacloprid al inicio del cultivo, así como aplicaciones foliares de Spiromesifen (Goolsby *et al.*, 2007). Además, de acuerdo a lo descrito por Lacey *et al.* (2009), el control biológico de esta plaga, sustentado en la utilización de hongos entomopatógenos, promete ser una alternativa viable.

Uso de Hongos Entomopatógenos para el Control Biológico de Insectos Plaga

Los hongos entomopatógenos han jugado un papel único en la historia del control de los insectos por microbios (Roberts y Yendol, 1973).

De los diferentes microorganismos empleados para manejo de plagas, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico, actuando como insecticidas de contacto (Charnley, 1992).

Una revisión sobre el modo de acción de los hongos entomopatógenos y el desarrollo de la enfermedad que producen es dada por Téllez *et al.* (2009). Divide el proceso en tres fases: 1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, 2) penetración en el hemocele, y 3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto.

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, mientras que el segundo consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas, llevadas a cabo por proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001).

Trabajos previos han demostrado la capacidad de estos organismos para ser utilizados dentro de planes de manejo integrado de plagas. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (en 33.9 % de los casos), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (De Faria y Wraight, 2007). En nuestro país, se ha observado que la inserción de *B. bassiana* dentro de los planes de manejo integrado de la broca del café han dado buenos resultados (Servicio Nacional de Sanidad, 2008), de igual manera, se han logrado porcentajes de efectividad de hasta 100% contra la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker utilizando *M. anisopliae* var. *acridum* en la Planicie Huasteca de nuestro país (Garza, 2005).

Identificación Molecular de Hongos Entomopatógenos

En la actualidad, los hongos y entre ellos los entomopatógenos, se identifican y caracterizan a través de técnicas moleculares como la secuenciación directa de productos de la Reacción en Cadena de la Polimera (PCR, por sus siglas en inglés), la cual es una herramienta fundamental para incrementar la cantidad de ADN a identificar (St. Leger y Joshi, 1997). Díaz *et al.* (2008) consignan su uso para identificar diferentes hongos pertenecientes al orden *Entomophthorales*, sobre *Aphis faba*; entre otras técnicas

destacan adaptaciones a la PCR, tales como ADN polimórfico amplificado al azar por PCR (RAPD-PCR, por sus siglas en inglés), Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés) y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (St. Leger y Joshi, 1997; Caetano *et al.*, 1991). Para llevar a cabo la identificación molecular, previa extracción de ADN, se realiza la PCR, cuyos principales componentes son la DNA polimerasa, un par de iniciadores, dNTPs, cationes divalentes, un buffer para mantener el pH, cationes monovalentes y el templado de ADN (Sambrook *et al.*, 1989); En cuanto a los iniciadores que pueden utilizarse se encuentran el ITS1/ITS2, ITS1/ITS4 y el ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990). Casos exitosos en la identificación a través de estas técnicas para las especies utilizadas en este trabajo, y otras, han sido reportados (Fukatsu *et al.*, 1997; Driver *et al.*, 2000). En México ésta técnica es cada día mas utilizada, sin embargo son pocas las investigaciones sobre hongos entomopatógenos para el control de *Bactericera cockerelli* (Sulc).

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de una Colonia de *B. cockerelli*

Se realizó una colecta de adultos de *B. cockerelli* en el cultivo de jitomate, en el campo de producción agrícola de la Facultad de Agronomía de la UASLP, durante los meses de abril y mayo. Se usó una red entomológica y se recolectaron aproximadamente 150 individuos, los cuales se introdujeron en un frasco de plástico con boca ancha, de 20 cm de alto por 15 cm de diámetro. En él se trasladaron al laboratorio de entomología para su cría y reproducción masiva.

En el laboratorio, los adultos provenientes de campo se colocaron en jaulas (50 cm x 50 cm x 75 cm) con plantas de chile para ovoposición, y se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas, con un fotoperiodo de 12:12 Luz :Oscuridad, temperatura media de 25 ± 1 °C y una humedad relativa de $60 \pm 10\%$.

Las plantas de chile se cambiaban cada 2 días y se colocaban en jaulas separadas de los adultos e individualmente, con la finalidad de obtener ninfas del tercer estadio, para la realización de los bioensayos. La determinación de la fecha en la que se alcanzaba el estadio deseado, se realizó mediante la estimación de unidades calor (UC), para el tercer estadio requiere 227 UC, el cual se alcanza aproximadamente a los 15 días, y para su ciclo completo de 335 UC, así como el tamaño de las ninfas (Abdullah, 2008; Medina y Covarrubias, 2008).

Hongos Entomopatógenos

Se probaron cuatro cepas de hongos entomopatógenos, dos cepas comerciales y dos cepas nativas del estado de Guanajuato, proporcionadas por el Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos, dependiente del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato (CESAVEG). Los productos fueron: *Beauveria bassiana*, Bassianil® (BB09), *Metarizhium anisopliae* Metabich® (MA28), *Beauveria bassiana* aislada a partir de una chinche lygus en “El Copal”, Guanajuato (BB42) y

Metarizhium anisopliae aislada de una gallina ciega en la localidad de Puruaga, Guanajuato (MA25).

De manera preliminar se aplicaron concentraciones desconocidas de cada cepa a ninfas de *B. cockerelli*, para su posterior re-aislamiento. Una vez re-aislada cada cepa, se sembraron sobre medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron a 25 o 28 °C, dependiendo de la especie; para BB09 y BB42 la temperatura fue de 28°C, en el caso de MA25 y MA28, 25 °C, éstas temperaturas son consideradas las óptimas para cada especie.

Identificación Molecular

Para realizar la extracción de ADN según el protocolo descrito por Reader y Broda (1989), se sembraron cada uno de los aislamientos de los hongos en Caldo Dextrosa y Papa (PDB). Se ampliaron las regiones espaciadoras transcripcionales intergénicas (por sus siglas en inglés, ITS), utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'GAGTCTAGATCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5'AAGCACTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3) reportados por White *et al.* (1990). Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen de 25 µl con una mezcla de reacción constituida por 5.0 µl de Buffer de reacción 5X Promega®; 1 µl de MgCl₂ 25mM Promega®, 0.5 µl de cada oligonucleótido 10 µM; 0.3 µl de Taq Polimerasa 5 uµl⁻¹ (GoTaq Flexi DNA polimerasa Promega®), 0.5 µl de dNTP's 10 µM, 1.0 µl de ADN, y agua miliQ estéril c.b.p. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador marca Eppendorf usando un ciclo de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos, cada ciclo conformado por la fase de desnaturalización (30 segundos a 94 °C), fase de alineamiento (45 segundos a 60 °C) y fase de extensión (1.5 minutos a 72 °C); y la amplificación se finalizó con un ciclo de extensión de 8 minutos a 72 °C.

Posteriormente se llevó a cabo la ligación de los fragmentos en el Vector pGEM®T-Easy (Promega, 2003) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la transformación de los ácidos nucleicos se utilizaron células competentes de *E. coli* JM

109 con el protocolo de choque térmico de acuerdo a métodos estándares (Sambrook *et al.*, 1989). La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para la identificación de las clonas portadoras de los productos esperados, se realizó una digestión con la enzima *Eco* RI como se describe en Sambrook *et al.*, (1989). De las clonas positivas, se eligieron dos o tres para cada uno de los hongos, éstas se purificaron y se secuenciaron por el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) IPICYT.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon contra las secuencias registradas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blastn.cgi/>). Para finalizar la identificación, se realizó un análisis filogenético realizando un dendograma en base a máxima similitud, contrastando las clonas obtenidas con las que dieron mayor porcentaje de similitud en el GenBank, utilizando el programa MEGA 5.05[®].

Concentración de Conidias y Prueba de Viabilidad

Se colectaron conidias a partir de colonias en medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), las cuales fueron utilizadas para obtener las primeras soluciones en agua destilada con surfactante INEX[®] al 0.2%, obteniendo una suspensión por agitación vigorosa con un agitador de placa magnética Cimarec[®]. El conteo de las conidias se realizó utilizando un hematocitometro Neubauer Brigh SUPERIOR[®] y un microscopio marca Zeiss Axiolab con un aumento de 40x. Las suspensiones se ajustaron por dilución a las concentraciones de 1×10^3 hasta 1×10^8 conidias mL⁻¹ para cada cepa de hongo entomopatógeno, y fueron corregidas después de realizar las pruebas de viabilidad.

Para determinar la viabilidad de las esporas, se diluyó una cierta cantidad de ellas en 2 mililitros de agua destilada con surfactante INEX[®] al 0.2%, se tomaron 50 µl de ésta solución y se sembraron sobre pequeños rectángulos de agar, los cuales se cubrieron con un cubreobjetos con la finalidad de observar al microscopio la cantidad de conidias

germinadas a las 17 horas de acuerdo con la metodología seguida por Lacey *et al.*, (2009).

Procedimiento de los Bioensayos

Los bioensayos se realizaron por aspersión con una torre de Potter. Primero se evaluó un intervalo amplio de concentraciones (1×10^2 a 1×10^8), aplicando 2 mL de cada solución, para determinar la ventana de respuesta biológica, donde se encuentre el cero y 100% de mortalidad de ninfas de tercer instar de *B. cockerelli*. La base fue una concentración de 1×10^8 conidias por mL y a partir de ella se prepararon concentraciones menores hasta llegar a cero. Posteriormente, con base a los resultados de la ventana de respuesta biológica, se incluyeron al menos 5 concentraciones intermedias de conidias. En total se realizaron de tres a cuatro repeticiones en diferentes días y cada una incluyó un testigo absoluto al cual solo se le aplicaron 2 mL de la solución agua-surfactante.

Cada unidad experimental consistió en cajas de Petri de 9 cm. A cada caja se le colocó una hoja de chile ancho infestada con ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli*. El peciolo de la hoja se envolvió en torundas de algodón humedecidas con agua destilada estéril y en la parte inferior de la caja se ubicaron círculos de papel secante sin humedecer. En todos los tratamientos se colocaron 10 ninfas por hoja. Las aspersiones de hongos se realizaron utilizando una presión de 13.3 psi con la Torre de Potter (Burkard®). Las cajas del testigo fueron asperjadas con 2 mL de la solución agua destilada con INEX® al 0.2%, y las de los hongos con 2 mL de la suspensión de conidias de 10^3 a 10^8 , más INEX® al 0.2%, dependiendo de la especie (Lacey *et al.*, 2009).

Las hojas fueron colocadas en la caja de Petri con el envés hacia arriba con la finalidad de que las ninfas quedaran expuestas directamente a la aspersión. Después de que se trataron, las cajas fueron selladas con Parafilm®M (SPI Supplies) y colocadas en una cámara húmeda con temperaturas que oscilaban entre los 24 y 26 °C y una humedad de $60 \pm 10\%$. El fotoperiodo en la cámara fue de 12:12 luz:Oscuridad. Las torundas de algodón se humedecieron diariamente con agua destilada estéril. Los datos de

mortalidad para estimar las líneas de respuesta log-dosis probit se registraron a partir del cuarto día de la aplicación hasta el día séptimo después de la misma.

Análisis Estadístico

La mortalidad en el testigo se utilizó para corregir el resto de las mortalidades registradas mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), la cual no se debe a la aplicación de los hongos y es incluida para determinar si la mortalidad en los insectos tratados puede ser atribuido a la aplicación de los mismos. Los datos de mortalidad de los bioensayos fueron analizados asumiendo el modelo Probit con 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 uso la prueba de χ^2 para demostrar la bondad de ajuste al modelo. Adicionalmente se estimó el factor de virulencia (FV) de las especies y cepas, dividiendo la CL_{50} o CL_{95} de la cepa menos patógena entre la CL_{50} de la más patógena.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad

Con la finalidad de ajustar la concentración de las soluciones de los hongos entomopatógenos a evaluar, se realizaron pruebas de viabilidad con cada cepa a las 17 horas. La germinación de las conidias de *M. anisopliae* y *B. bassiana* fue de 88 a 100%. Las dos cepas de *M. anisopliae* tuvieron en promedio 90% de viabilidad. La cepa de nativa de *B. bassiana* (BB42) tuvo un valor de 88% y la comercial (BB09) un valor de 100% de viabilidad.

Los resultados de porcentaje de viabilidad 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 *B. bassiana*, el porcentaje del presente trabajo fue superiores a lo reportado por los mismos autores.

Los porcentajes de viabilidad obtenidos en la presente investigación, incrementan la posibilidad de incorporar el uso de estas cepas en planes producción masiva y de manejo integrado, ya que se obtuvieron altos niveles de esporas viables, característica requerida para su producción y formulación de nuevos productos comerciales (Monzón, 2001). Sin embargo, se deben revisar aún otros aspectos relacionados con su efectividad en campo, estabilidad de las formulaciones, dosis, entre otras.

Identificación Molecular

Después de realizar la amplificación de los ITS, se obtuvieron bandas entre 600 y 700 pb para ambas cepas (Figura 1), las cuales fueron clonadas y secuenciadas. Con los resultados de secuenciación, éstas fueron comparada con las secuencias registradas en el GenBank en donde se observó que las clonas de *M. anisopliae* presentan valores que van de 79 a 88% de similitud y de 99% de identidad con especies como *M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *Cordyceps japonica* (Cuadro 1). Las clonas 1 y 2 de *Beauveria*

bassiana, tienen un valor de 99% de identidad y valor de 84 al 87% de similitud con especies pertenecientes al mismo género y especie (Cuadro 2).

Con la finalidad de realizar un análisis filogenético de las secuencias en este trabajo, se obtuvieron aquellas del GenBank con las que dieron un mejor “hit” y se realizó un dendograma con el programa MEGA 5.05®. En la Figura 2, se observan las clonas 1 y 2 de *B. bassiana* (resaltadas en azul) y dentro del mismo clado, diversas especies de *B. bassiana* con su número de acceso al GenBank. Al localizar las clonas de *M. anisopliae* (resaltadas en rojo, Figura 2), se observan claramente fuera del clado de las especies de *B. bassiana* y dentro del mismo clado con especies de *M. anisopliae*. Ambas especies se encuentran relacionadas con *L. lecanii*, otra especie de hongo entomopatógeno. En la figura se encuentran las especies utilizadas en este experimento contrastadas con otras pertenecientes a la División Ascomycota.

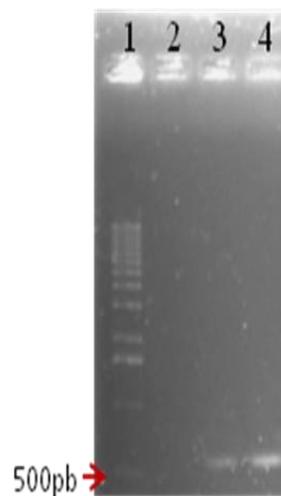


Figura 1. Amplificación por PCR de las regiones ITS de las distintas cepas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Control negativo, 3) *M. anisopliae* y 4) *B. bassiana*

La utilización de técnicas moleculares para realizar la identificación de especies de hongos entomopatógenos, como lo hecho aquí, puede ser de gran utilidad en un futuro para conocer desplazamiento geográfico de las cepas, las diferencias entre y dentro de aislados nativos, así como la biodiversidad de poblaciones de entomopatógenos y cambios evolutivos de las cepas (Meyer *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Alineamiento de clonas de *M. anisopliae* enviadas al LANBAMA y organismos similares del GenBank

Clona1	-----TCCGTAGG 8
Clona4	-----TCCGTAGG 8
FJ545312	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 360
FJ545313	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 359
FJ545279	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 359
HM055447	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 118
FJ545301	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 358
FJ545316	GAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 359
AY646393	-----GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGG 32
AJ608970	-----TCCGTAGG 8
Clona2	TTTACTGCGTAAATCCAGATTCTGAGGGATAACGGTATTAACCGCCTTGAGGTCCGTAGG 153
Clona3	-----TCCGTAGG 80
	***** **
Clona1	TGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 68
Clona4	TGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 68
FJ545312	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 420
FJ545313	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 419
FJ545279	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 419
HM055447	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 178
FJ545301	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 418
FJ545316	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 419
AY646393	TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 92
AJ608970	TGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 68
Clona2	TGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 213
Clona3	TGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATACCT 140

Clona1	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT- 127
Clona4	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT- 127
FJ545312	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 480
FJ545313	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 479
FJ545279	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 479
HM055447	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 238
FJ545301	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 478
FJ545316	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 479
AY646393	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 152
AJ608970	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT 128
Clona2	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT- 272
Clona3	TTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC GCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTT- 199

Clona1	AATAAGTGTCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 187
Clona4	AATAAGTGTCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 187
FJ545312	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 540
FJ545313	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 539
FJ545279	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 539
HM055447	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 298
FJ545301	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 538
FJ545316	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 539
AY646393	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 212
AJ608970	AATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 186
Clona2	AATAAGTGTCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 332
Clona3	AATAAGTGTCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT 259

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *M. anisopliae* se encuentran resaltada en verde, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Continuación Cuadro 1.

Clona1	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	247
Clona4	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	247
FJ545312	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	600
FJ545313	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	599
FJ545279	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	599
HM055447	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	358
FJ545301	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	598
FJ545316	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	599
AY646393	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	272
AJ608970	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	246
Clona2	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	391
Clona3	TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT	319

Clona1	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	307
Clona4	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	307
FJ545312	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	660
FJ545313	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	659
FJ545279	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	659
HM055447	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	418
FJ545301	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	658
FJ545316	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	659
AY646393	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	332
AJ608970	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	306
Clona2	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	451
Clona3	CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	379

Clona1	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	367
Clona4	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	367
FJ545312	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	720
FJ545313	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	719
FJ545279	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	719
HM055447	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	478
FJ545301	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	718
FJ545316	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	719
AY646393	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	392
AJ608970	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	366
Clona2	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	511
Clona3	TGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAG	439

Clona1	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	427
Clona4	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	427
FJ545312	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	780
FJ545313	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	779
FJ545279	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	779
HM055447	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	538
FJ545301	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	778
FJ545316	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	779
AY646393	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	452
AJ608970	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	426
Clona2	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	571
Clona3	GCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC	499

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *M. anisopliae* se encuentran resaltada en verde, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Continuación Cuadro 1.

Clona1	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	487
Clona4	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	487
FJ545312	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	840
FJ545313	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	839
FJ545279	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	839
HM055447	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	598
FJ545301	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	838
FJ545316	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	839
AY646393	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	512
AJ608970	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	486
Clona2	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	631
Clona3	TGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC	559

Clona1	CCAACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	546
Clona4	CCAACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	546
FJ545312	C-AACTTTTTATAGTTGACCCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	899
FJ545313	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	897
FJ545279	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	897
HM055447	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	656
FJ545301	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	896
FJ545316	CCAACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	898
AY646393	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	570
AJ608970	C-AACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	544
Clona2	CCAACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	690
Clona3	CCAACTTTTTATAGTTGACC-TCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC	618
* *****		
Clona1	AATAAGCGGAGGACAAGG--TCAGCA-----	570
Clona4	AATAAGCGGAGGATAAG----CAGCA-----	568
FJ545312	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	959
FJ545313	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	957
FJ545279	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	957
HM055447	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	716
FJ545301	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	956
FJ545316	AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAA	958
AY646393	AATAAGCGGAGGA-----	583
AJ608970	AATAAGCGGAGGA-----	557
Clona2	AATAAGCGGAGGA-----	703
Clona3	AATAAGCGGAGGA-----	631

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *M. anisopliae* se encuentran resaltada en verde, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Cuadro 2. Alineamiento de clonas de *B. bassiana* enviadas al LANBAMA y organismos similares del GenBank

Clona2	TC---TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	137
AY334540	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	55
HQ722920	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	55
HQ722919	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	55
Clona1	TCGTGTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	161
GU189515	----TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	56
HQ722918	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	55
GU565572	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	55
AB576868	--GTCTCCGTTGGTGAACCGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	216
JF429894	--GTCTCCGTTAGGTGAACCGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	3838
GQ354257	--GTCTCCGTTGGTGAACCGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCTT	79
	*****:*****:*****	
Clona2	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	197
AY334540	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	115
HQ722920	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	115
HQ722919	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	115
Clona1	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	221
GU189515	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	116
HQ722918	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	115
GU565572	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	115
AB576868	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	276
JF429894	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	3898
GQ354257	CTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACC	139

Clona2	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	257
AY334540	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	175
HQ722920	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	175
HQ722919	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	175
Clona1	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	281
GU189515	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	176
HQ722918	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	175
GU565572	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	175
AB576868	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	336
JF429894	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	3958
GQ354257	AGCGGCCCGCCGGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGG	199

Clona2	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	317
AY334540	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	235
HQ722920	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	235
HQ722919	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	235
Clona1	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	341
GU189515	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	236
HQ722918	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	235
GU565572	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	235
AB576868	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	396
JF429894	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	4018
GQ354257	CAAAACAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA	259

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *B. bassiana* se encuentran resaltada en rojo, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Continuación Cuadro 2.

Clona2	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	377
AY334540	CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	295
HQ722920	CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	295
HQ722919	CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	295
Clona1	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	401
GU189515	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	296
HQ722918	CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	295
GU565572	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	295
AB576868	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	456
JF429894	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	4078
GQ354257	CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGA	319

Clona2	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	437
AY334540	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	355
HQ722920	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	355
HQ722919	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	355
Clona1	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	461
GU189515	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	356
HQ722918	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	355
GU565572	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	355
AB576868	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	516
JF429894	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	4138
GQ354257	ACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCC	379

Clona2	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	496
AY334540	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	414
HQ722920	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	414
HQ722919	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	414
Clona1	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	520
GU189515	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	415
HQ722918	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	414
GU565572	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	414
AB576868	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	575
JF429894	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	4197
GQ354257	TCGACCTCCCCT-TGGGGGGGTCGGCGTTGGG-ACGGCAGCACACCGCCGGCCCTGAAA	438

Clona2	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	556
AY334540	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	474
HQ722920	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	474
HQ722919	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	474
Clona1	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	580
GU189515	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	475
HQ722918	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	474
GU565572	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAATAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	474
AB576868	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	635
JF429894	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	4257
GQ354257	TGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCC	498

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *B. bassiana* se encuentran resaltada en rojo, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Continuación Cuadro 2

Clona2	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	616
AY334540	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	534
HQ722920	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	534
HQ722919	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	534
Clona1	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	640
GU189515	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	535
HQ722918	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	534
GU565572	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	534
AB576868	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	695
JF429894	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	4317
GQ354257	GACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACT	558

Clona2	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	651
AY334540	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	569
HQ722920	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	569
HQ722919	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	569
Clona1	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	675
GU189515	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	570
HQ722918	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	569
GU565572	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	569
AB576868	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCA	755
JF429894	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCA	4377
GQ354257	ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-----	593

: Alta similitud

*Identidad

Las clonas de *B. bassiana* se encuentran resaltada en rojo, las iniciales y números corresponden al número de acceso del GenBank de los organismos con los que las clonas dieron los porcentajes de identidad y similitud mas altos.

Un caso específico de la importancia del uso de técnicas moleculares en la patología de insectos, lo representa el trabajo de Glare *et al.*, (1996), encontrando que la morfología de las fiálides de un solo aislado de *M. anisopliae* podía variar dentro del mismo cultivo así como entre diferentes sustratos. Además concluyeron que la morfología de las conidias era el único carácter morfológico útil para la identificación, sin embargo en el caso de la diferenciación entre *M. anisopliae* y *M. flavoviridae*, inclusive éste carácter resultaba limitado. De ahí la trascendencia de las actuales técnicas moleculares de identificación, ya que para la epidemiología, ecología y el manejo integrado de plagas es importante identificar las especies de entomopatógenos con exactitud.

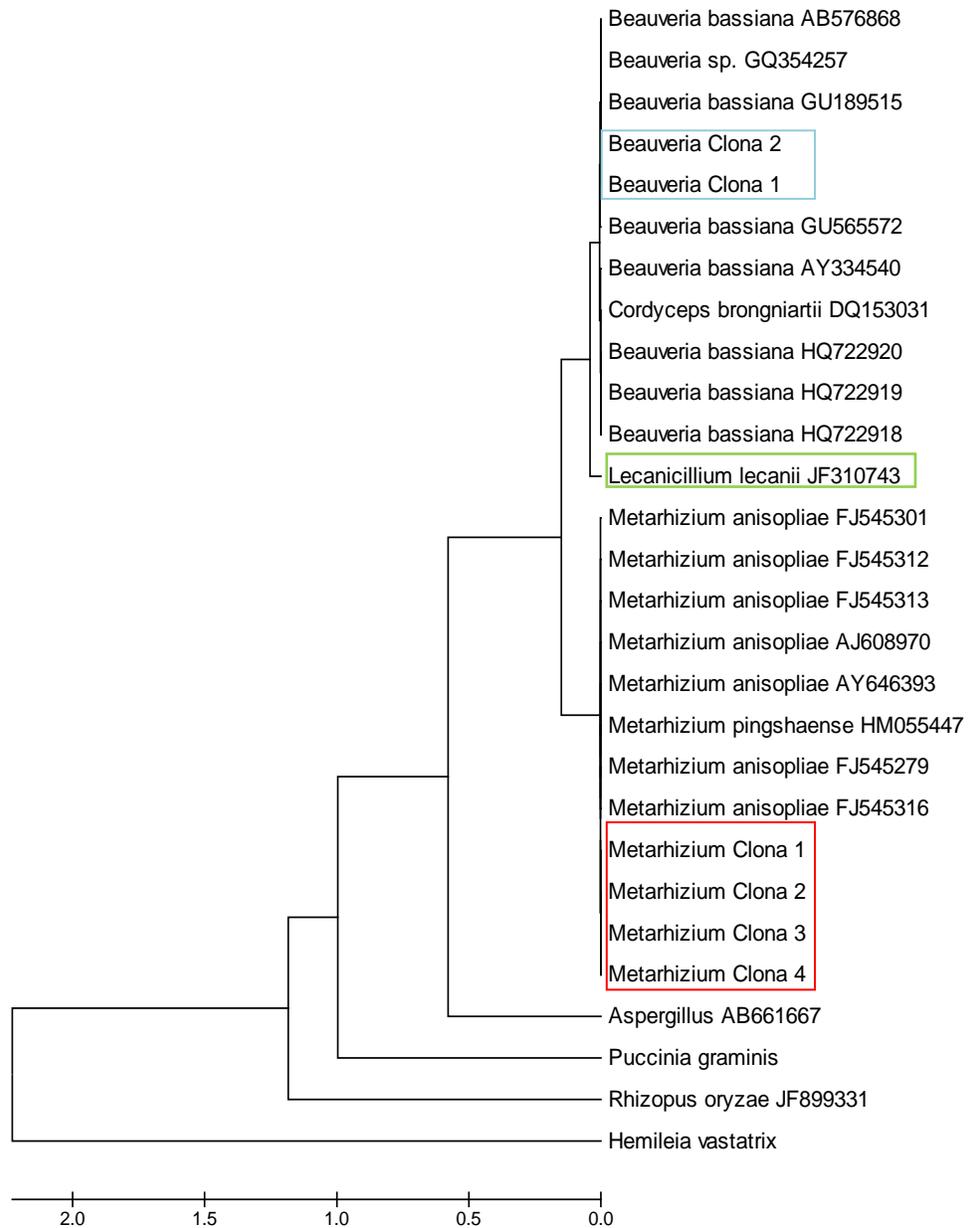


Figura 2. Análisis filogenético de las especies de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y grupos externos, basado en la máxima similitud. Las clonas de *B. bassiana* (resaltadas en azul) se encuentran en el mismo clado que especies similares de *B. bassiana* tomadas del GenBank, de la misma manera las clonas de *M. anisopliae* (resaltadas en rojo) se encuentran con sus similares. Ambas especies se relacionan con *L. lecanii* (resaltado en verde), otra especie de

La técnica se ha usado exitosamente para hacer identificaciones precisas de cepas de diferentes especies de hongos y ha demostrado su amplia exactitud y utilidad (Sugimoto *et al.*, 2002; Luan *et al.*, 2011), confirmando su importancia en el campo de la taxonomía. Hegedus y Khachatourians (1996) llegaron a una identificación y diferenciación correcta de una cepa de *B. bassiana* utilizando la técnica de SSCP. Driver *et al.*, (2000) realizaron a una reclasificación taxonómica basada en la secuencia de los ITS del género *Metarhizium*, llegando hasta el nivel de variedad, utilizando la técnica de RAPD PCR. Estos autores, al igual que Glare *et al.* (1996), hacen hincapié en el hecho de que las características morfológicas no siempre son suficientes para una correcta clasificación de las cepas del género *Metarhizium*.

Bioensayos

Micosis en *Bactericera cockerelli*

Todas las cepas utilizadas mostraron esporulación sobre los cadáveres de las ninfas o adultos de *B. cockerelli*. La micosis se presentó primero en los individuos a los que se les aplicó las concentraciones más altas.

Antes de que hubiera esporulación de *B. bassiana*, el cuerpo de los insectos se tornaba rosa, sin importar la cepa. El cambio de color del cuerpo del insecto ha sido reportado en otras especies de insectos, como el psílido del eucalipto y la mosquita blanca (Dal *et al.*, 2011; Wraight *et al.*, 2000). Este síntoma de infección, es de utilidad cuando se trabaje con estas especies en campo, ya que las condiciones no siempre son las adecuadas para observar la esporulación del hongo, y el cambio en la coloración del insecto puede evidenciar que el entomopatógeno está actuando sobre las ninfas de *B. cockerelli*.

Mortalidad en *B. cockerelli*

Existe diferencia estadística significativa en la respuesta de *B. cockerelli* a la aplicación de especies y cepas de hongos. Además, se aprecia una relación de aumento

en el porcentaje de mortalidad con respecto 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 *B. bassiana* BB09 y BB42, que a menores concentraciones provocan 100% de mortalidad.

En el Cuadro 3 se muestran los datos de respuesta de las cepas y hongos evaluados. Se presenta los valores de pendiente de las líneas de regresión obtenidas, la CL_{50} , CL_{95} y los límites de confianza de cada una al 95%, así como el valor de la prueba de bondad de ajuste y el factor de virulencia estimado.

En el caso de *M. anisopliae*, ambas cepas, Ma25 y Ma28 provocaron 100% de mortalidad con la concentración de 1×10^8 conidias mL^{-1} , sin embargo, existe diferencia significativa en la respuesta de mortalidad que inducen estas dos cepas a nivel de CL_{50} sobre ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*. Ma25 tiene una CL_{50} de 6.34×10^5 conidias mL^{-1} , y su CL_{95} se estimó en 3.43×10^8 conidias mL^{-1} , y en el caso de Ma28, la CL_{50} fue 1.32×10^5 conidias mL^{-1} con una CL_{95} de 2.7×10^7 . A nivel de CL_{95} no existe diferencia significativa en la virulencia de las dos cepas sobre *B. cockerelli*, los límites fiduciales de ambas respuestas se traslapan, sin embargo la cepa comercial es aproximadamente 5 veces más virulenta que la nativa.

Respecto a la respuesta por la aplicación de cepas de *B. bassiana*, no se encontró diferencia estadísticamente significativa a nivel de CL_{50} ni al de CL_{95} . Con BB42 (cepa nativa) se obtuvo 100% de mortalidad con una concentración de 1×10^6 , su CL_{50} estimada fue 3.01×10^4 conidias mL^{-1} y una CL_{95} de 1.6×10^6 . Al probar la BB09 se obtuvo 100% de mortalidad con la concentración de 1×10^7 , una CL_{50} de 2.99×10^4 y una CL_{95} de 4.2×10^6 . Esto significa que a nivel de 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 (Cuadro 3).

Al realizar una comparación entre las cuatro cepas de los hongos evaluados, la única que resultó ser estadísticamente diferente, a nivel de CL_{50} , fue la nativa MA25, la cual es significativamente menos virulenta contra ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*.

Cuadro 3. Estimación de la CL₅₀ y la CL₉₅ (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^{2d}	FV ₅₀ ^e	FV ₉₅ ^f
MA25 (Nativa)	256	0.602	6.34X10 ⁵ (3.37X10 ⁵ -11.74X10 ⁶)	3.43X10 ⁸ (1.03X10 ⁸ -1.99X10 ⁹)	0.806	21.20	214.37
MA28	223	0.709	1.32X10 ⁵ (6.00X10 ⁴ -2.5x10 ⁵)	2.7X10 ⁷ (9.7X10 ⁶ -1.36X10 ⁸)	2.723	4.41	16.88
BB42 (Nativa)	224	0.952	3.01x10 ⁴ (6.79x10 ³ - 1.53x10 ⁵)	1.6x10 ⁶ (2.64x10 ⁵ - 2.23x10 ⁸)	9.69	1.01	1.00
BB09	343	0.766	2.99X10 ⁴ (9.9X10 ³ -7.11X10 ⁴)	4.2X10 ⁶ (1.15X10 ⁶ -4.6X10 ⁷)	3.588	1.00	2.63

^a N Número de individuos utilizados en cada bioensayo

^b CL₅₀ Concentración letal 50

^c CL₉₅ Concentración letal 95

^d χ^2 Prueba de bondad de ajuste al modelo

^e Factor de virulencia 50 (CL₅₀ de la cepa menos patógena entre la mas patógena)

^f Factor de virulencia 95 (CL₉₅ de la cepa menos patógena entre la mas patógena)

La cepa comercial BB09 es la más virulenta, aproximadamente 21 veces más tóxica que la cepa nativa de *M. anisopliae*, MA25, y cuatro veces más que la comercial de la misma especie, MA28; contrastándosele con la cepa nativa de *B. bassiana*, BB42, resulta prácticamente similar (Cuadro 3).

El presente estudio demuestra el potencial que tienen *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el manejo de *B. cockerelli*. El uso de microorganismos, específicamente hongos entomopatógenos, para el manejo de este y otros hemípteros, ha probado ser la única estrategia posible, debido a su modo de infección, el cual, no requiere ser ingerido para poder causar una enfermedad (Téllez *et al.*, 2009), además de algunas otras ventajas tales como 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).

La notable variación en las CL₅₀ producidas sobre ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*, sugiere grados de patogenicidad diferenciados por cepa. En este trabajo las cepas pertenecientes a *B. bassiana* tuvieron mayor patogenicidad que las de *M. anisopliae*, además la cepa nativa (BB42) resultó ser tan virulenta como la comercial (BB09), sin embargo no se puede considerar que la virulencia este determinada por especie, si no por cepa.

Trabajos previos han demostrado la capacidad de estos organismos para ser utilizados dentro de programas de manejo integrado de plagas. En el caso de la mosquita blanca, se ha observado buenos resultados al utilizar cepas de *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii*, siendo la primera las más utilizada (Wraight *et al.*, 2000; Lacey *et al.*, 1999; De Faria y Wraight, 2001). También se ha probado la capacidad de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* para disminuir la población del áfido de la papa (*Macrosiphum euphorbiae*), por su efecto letal e influencia en la reducción de su tasa reproductiva (Askarly *et al.*, 1998).

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 y 2008; Hoy *et al.* (2010). Después de aislar dos patógenos de psílidos de los cítricos, *Hirsutella citriformis* e *Isaria fumosorosea*, se

realizaron pruebas para conocer la patogenicidad de la cepa nativa de *I. fumosorosea*, aislada del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, encontrando que la cepa de *I. fumosorosea* es altamente virulenta.

Al contrastar las CL₅₀ obtenidos por Hoy *et al.*, (2010) sobre *D. citri* con las estimadas en el presente trabajo, se aprecia que las cepas de *B. bassiana* (BB09 y BB42), y una de *M. anisopliae* (MA28), son hasta 23 veces más virulentas (BB09) contra el psílido de la papa. Sin embargo, en el caso de la cepa nativa de *M. anisopliae* (MA25), resultó muy similar a nivel de CL₅₀. Por lo anterior se puede inferir que las cepas nativas del estado de Guanajuato pueden generar un buen control de este insecto, y lo más importante, que las dosis obtenidas son económicamente viables de aplicar en campo ya que la mayoría de los productos comerciales poseen formulaciones mas concentradas.

Por otro lado, Wraight *et al.* (2000) aplicaron en campo cepas de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, a un concentración de 5×10^{13} conidias mL⁻¹, y obtuvieron porcentajes de mortalidades entre 67.7 y 75.1%, esta mortalidad es inferior a la obtenida en el presente trabajo. Sin embargo, los porcentajes de mortalidad nuestros son de laboratorio y no necesariamente reflejan lo que ocurrirá en campo, a pesar de que la técnica de bioensayo usada simula las aspersiones comerciales, pues no existen evidencias para traspolar directamente los resultados de laboratorio a campo, pero si son un buen indicador de lo que puede suceder con su uso en campo o en invernadero bajo condiciones de humedad controlada.

En nuestro trabajo tambien se estudio la respuesta al uso de cepas comerciales, cuya ventaja es que ya se encuentran formuladas. La cepa más virulenta a nivel de CL₅₀ fue la BB09. Resultados similares fueron obtenidos por Dal *et al.* (2011), quienes evaluaron seis cepas comerciales de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Lecanicillium longisporum* contra el psílido del eucalipto (*Glycaspis brimblecombei*); todas resultaron patógenas para ese insecto. Al comparar la virulencia de sus cepas comerciales con las del presente trabajo, nuestra cepa comercial MA28, resultó entre 2.2 y 2.8 veces más virulenta que sus dos cepas comerciales de *M. anisopliae* (Metarril WP® y Toyobo®). Sin embargo debe considerarse que se evaluaron sobre diferentes especies de insectos. Al considerar las cepas comerciales de *B. bassiana*, una de sus cepas, Mycotrol®, obtuvo una CL₅₀ menor que con la ensaya en nuestro trabajo, la cepa BB09, mientras que otras dos, Toyobo® y Boveril WP®, tuvieron una concentración letal mayor a la estimada en nuestro

trabajo. Con estos resultados se puede inferir una mayor susceptibilidad de *B. cockerelli* a los hongos entomopatógenos que *G. brimblecombei*. Lo anterior se corrobora en un trabajo realizado por Padulla y Alves, (2009), quienes con la misma cepa de *B. bassiana* (Boveril WP®) utilizada en el trabajo anterior, requirieron una concentración de 2.37×10^7 conidias mL^{-1} para matar a 50% de la población del psílido de los cítricos.

En el trabajo realizado sobre *Agonoscena pistaciae*, el psílido del pistacho, las cepas de *B. bassiana* utilizadas en este trabajo (BB42 y BB09), resultaron prácticamente similares en patogenicidad que su cepa menos virulenta de *B. bassiana* (Alizadeh *et al.*, 2007).

Se han realizado pocos trabajos en donde se pruebe la virulencia de cepas de hongos para el manejo del psílido de la papa. Estos en su mayoría han encontrado buenos resultados utilizando especies como *B. bassiana*, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (Lacey *et al.* 2009; Sánchez *et al.*, 2007). En contraste con el trabajo de Lacey *et al.* (2009), las cepas de *B. bassiana* en nuestro 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, lo cual podría deberse a diferencias de virulencia de las cepas utilizadas ese trabajo, al compararlo con el nuestro.

Es importante señalar, que además de las altas mortalidades obtenidas con la mayoría de 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 menciona Avery *et al.* (2009) con el hongo *I. fumosorosea*, el cual se transmite de manera eficaz por *D. citri*. Esta es otra gran ventaja sobre los productos químicos, lo cual representa una cualidad más para la utilización de hongos entomopatógenos dentro de los programas de manejo integrado del psílido de la papa.

Finalmente se recomienda realizar pruebas en campo e invernadero para conocer cual cepa tiene mayor aplicabilidad bajo diferentes condiciones agroecológicas, así como explorar sobre 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 *B. bassiana* y *M. anisopliae*, las cuales fueron previamente identificadas por morfología microscópica y claves taxonómicas convencionales.

Las cepas de *B. bassiana* resultaron más virulentas que las de *M. anisopliae* sobre ninfas de tercer estadio de *B. cockerelli*.

La cepa más virulenta de todas las evaluadas fue *B. bassiana* (BB09) con una CL_{50} de 2.99×10^4 conidias mL^{-1} .

La cepa nativa de *B. bassiana*, BB42, posee la misma virulencia que las cepas comerciales de *M. anisopliae*, MA28, y de *B. bassiana*, BB09, y tiene alto potencial para desarrollarse como alternativa para el control de *B. cockerelli*.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. of Econ. Entomol.* 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 J. Agric. Res.* 3: 060-067.
- Alizadeh, A., A. Kharraza P., K. H. Talebi-Jahromi and M. A. Samih. 2007. Effect of some *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. isolates on common pistachio psylla *Agonoscena pistaciae* Burck. and Laut. *Int. J. Agric. Biol.* 9: 76-79.
- Askarly, H., Y. Carriere, R. Belanger and J. Brodeur. 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Science and Technology.* 8: 23-3.
- Avery, P., W. B. Hunter, D. G. Hall, M. A. Jackson and C. A. Powell. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordypitaceae) under laboratory conditions. *Florida Entomol.* 92: 608-618.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Caetano, G., B. Bassam, P. Gresshoff.1991. DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers. *Nature Biotechnology* 9: 553-557.
- Cerna, C., C. L. Aguirre U., M. Flores D., L. Guervera A., J. Landeros F. and Y. Ochoa F. 2010. Susceptibility to *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) 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. En: Lomer, C.J., C. Prior Eds.), *Biological control of locusts and grasshoppers.* Melkshan, UK: CAB International. pp. 190-191.
- Dal, M. H. F. A., C. F. Wilcken, R.S. Christovam, E. P. Prado and M. J. Gimenes. 2011. Effect of formulated entomopatogenic fungi on Red Gum Lerp Psyllid *Glycaspis brimblecombei*. *Res. J. For.* 5: 99-106.
- De Faria, M., and S. Wraight. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection.* 20: 767-777.

- De Faria, M., S. Wraight, 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43:237- 256.
- Díaz, B., C. López, M. Oggerin, A. Fereres y V. Rubio. 2008. Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hortícolas en la zona centro de la Península Ibérica. *Bol. San. Veg. Plagas.* 34: 287-296.
- Driver, F., R. Milner y J. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104: 134-150.
- EPPO. 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Reporting Service 5 5-8. www.eppo.org. Revisado: 13 julio 2011.
- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization. www.fao.org. Revisado: 15 enero 2012
- Fukatsu, T. H. Sato, H. Kuriyama. 1997. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *J. Invert. Pathol.* 70: 203-208.
- Garza, E. 2005. La langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* y su manejo en la Planicie Huasteca. Folleto Técnico No. 12. Campo experimental Ebano. INIFAP. SAGARPA.
- Garzón, T., J. A., O. G. Cárdenas V., R. Bujanos M., A. Marín J., A. Becerra F., S. Velarde F., C. Reyes M., M. González C. y J. L. Martínez C. 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad “Permanente del tomate” en México. *Agric. Téc. Méx.* 35: 61-72.
- Glare, T. R., Milner, R. J. and Beaton, C. D. 1996. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogens attacking *Orthoptera*: Is phialide morphology a useful criterion? *J. Orth. Res.* 5: 19-27.
- Goolsby, J.A., Adamczyk, J., Bextine, B., Lin, D., Munyaneza, J.E., and Bester, G. 2007. Development of an IPM Program for Management of the Potato Psyllid to Reduce Incidence of Zebra Chip Disorder in Potatoes, *Subtropical Plant Science*, 59: 85-94.
- Hansen, A. K., J. T. Trumble, R. Stouthamer and T. D. Paine. 2008. A new huanglongbing species, “*Candidatus Liberibacter psyllaourous*,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5862–5865.
- Hegedus, D. y G. Khachatourians. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Invert. Pathol.* 67: 289- 299.

- Hoy, M., R. Singh and M. Rogers. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomol. 93: 24-32.
- IRAC. 2005. <http://www.iraconline.org/> Revisada el 15 de agosto 2011.
- Lacey, L. A., A. A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier and C. Vidal. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. Biocontrol Science and Technology. 9: 8-18.
- Lacey, L. A., R. Frutos, H. Kaya and P. Vail. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biol. Control. 21: 230-248.
- Lacey L. A., F. de la Rosa and D. Horton. 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: 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., and Clover, G.R.G. 2009. A New '*Candidatus Liberibacter*' Species Associated with Diseases of Solanaceous Crops. Plant Disease, 93: 208-214.
- Luan, F., S. Zhang, Y. Cai, Z. Sun, B. Wang, B. Huang and Z. Li. 2011. Identification of the molecular origin and development of a panzootic caused by *Beauveria bassiana* in praying mantis populations in eastern China. J. Inverteb. Pathol. 108: 98-105.
- Medina, G. y J. Covarrubias. 2008. Reporte Agrometeorológico. Abril 2008. Red de monitoreo agrometeorológico del estado de Zacatecas. INIFAP. Folleto informativo No. 52. pp 21.
- Meyer, J. M., M. A. Hoy, and D. G. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. J. Inverteb. Pathol. 95: 101-109.
- Meyer, J. M., M. A. Hoy, and D. G. Boucias. 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian Citrus Psyllid in Florida. J. Inverteb. Pathol. 99: 96-102.
- Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas. (CATIE, Costa Rica) 63:95-103.

- Munyaneza, J.E., Buchman, J.L., Upton, J.E., Goolsby, J.A., Crosslin, J.M., Bester, G., Miles, G.P., and 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.
- National Center for Biotechnology Information. 2011. www.ncbi.nlm.nih.gov. Revisado: 15 agosto 2011
- Padulla, L. F. L. and S. B. Alves. 2009. Susceptibility of *Diaphorina citri* nymphs to entomopathogenic fungi. *Arq. Inst. Biol.* 76: 297-302.
- Promega. 2003. Technical Manual. pGEM®-T y pGEM®- T Easy Vector Systems. Instructions for use of Products.
- Reader, U. and P. Broda. 1989. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 17-20.
- Roberts, D. y Yendol, W. 1973. Use of Fungi for Microbial Control of Insects en Burges, H.D. y Hussey, N.W. 1973 *Microbial Control of Insects and Mites*, Academic Press Inc. Estados Unidos.
- Sambrook, L., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New- York.
- Sánchez, S., E. Casas, R. Hernández and K. Wall. 2007 A comparison of the activity of soil fungal isolates against three insects pests. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. 24: 43-48.
- St. Leger, R. y 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.
- SAGARPA. 2009. Manejo Integrado de la Paratrypana Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México www.sagarpa.gob.mx. Revisado el 18 julio 2011.
- Servicio Nacional de Sanidad. 2008. Dirección de Protección Fitosanitaria. Apéndice de Manejo Integrado de la broca del café en México (Manual Técnico Operativo de la campaña contra la broca del café).
- SIAP. 2010. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. Reportes estadísticos de producción anual y mensual por cultivo. <http://www.siap.gob.mx/>. Revisado 13 julio 2011.
- Sugimoto, M., M. Koike, N. Hiyama and H. Nagao. 2002. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *J. Inverteb. Pathol.* 82: 176-182.

- Téllez, A., M. Cruz, Y. Mercado, A. Assaf y A. Arana-Cuenca. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 73-80.
- UC IPM. 2010. Tomato Psyllid <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r783303011.html>. Revisado: 5 Julio 2010.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York.
- Wraight, S., R. I. Carruthers, S. T. Jaronski, C. A. Bradley, C. J. Garza and S. Galaini-Wraight. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control*. 17: 203-217.