POTENCIAL DE *Metarhizium flavoviride* Gams & Rzypal PARA EL CONTROL DE ACRIDIDOS EN MÉXICO

SAGAR

Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

DIRECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

Inicialmente *Metarhizium flavoviride* fue detectado en homopteros y evaluado en Filipinas contra el defácido de arroz *Nilaparvata lugens* Stal. Posteriormente el hongo fue reportado en Australia y las Islas Galápago (Goettel *et al.* 1995). Durante el desarrollo del programa de control biológico de langostas y chapulines en Africa, *M. flavoviride* fue el entomopatógeno más común y con mayor dispersión en poblaciones de acrídidos; estudios posteriores demostraron que posee alta virulencia contra *Schistocerca gregaria* Forskal (Prior et al. 1992). Recientemente el hongo fue reportado en Brasil, Madagascar (Goettel *et al*. 1995) y México (Hernández *et al*. 1997).

CARACTERÍSTICAS DE *M. flavoviride*

Metarhizuim flavoviride es un Deuteromycete del cual se conoce únicamente su forma asexual. Pude ser fácilmente diferenciado de *M. anisopliae* (Metch.) Sor. Por la morfología y coloración de sus conidias (Figura 1); las conidias son elípticas con los extremos redondeados o levemente truncados, en medio de cultivo presentan colonias amarillo grisáceas o verde olivo (Samson 1981). Al momento se conocen dos variedades de esta especie, *M. flavoviride* var. *flavoviride* W. Gams & J. Rozsypal (conidias de 7.0-11.0 um de largo) y *M. flavoviride* var. *minus* Rombach, Humber &Roberts (conidias 4.0- 6.5 um de largo) (Prior 1992).

Figura 1. Esporulación de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons.*

Metarhizum flavoviride esta adaptado en zonas tropicales y subtropicales, ya que es frecuentemente aislado de acrídidos en estas áreas, mientras que *M. anisopliae* ocurre principalmente en zonas templadas (Welling et al. 1994). Asimismo bajo condiciones climáticas adversas, *M. flavoviride* produce conidias dentro de la cavidad del huésped, siendo esto un factor importante en la epizootiología del hongo en condiciones ambientales con humedad relativa baja (Goettel *et al.* 1995).

CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS

Básicamente son tres las razones por las que un programa de control microbiano de acrídidos con *M. flavoviride* debe iniciarse con un trabajo intensivo de búsqueda y conservación de aislamientos del hongo. Primero, existe evidencia de que aislamientos de *Metarhizium* spp. muestran considerable especificidad con virulencia diferencial a insectos taxonómicamente relacionados (Prior 1992). Segundo, los aislamientos obtenidos en condiciones climáticas adversas podrían tolerarlas mejor, especialmente humedad relativa baja y niveles altos de temperatura y radiación solar. Tercero, no existen en la actualidad guías o protocolos de cuarentena para el movimiento de aislamientos de hongos purificados en áreas geográficas distintas (Kooyman y Shah 1992), por lo que es deseable el uso de aislamientos nativos.

La necesidad de exploración es obvia por las razones citadas y por los pocos aislamientos de *M. flavoviride* disponibles en las colecciones existentes, así por ejemplo, en la colección del Departamento de Agricultura de EUA ARSEF (Agricultural Research Service Collection of Entomophatogenic Fungi) se conservan 50 aislamientos de *M. flavoviride*, 4 de ellos purificados de acrídidos (Humber 1992) y únicamente 4 en la colección del IMI (International Micological Institute) (Prior 1992); las anteriores son dos de las colecciones de hongos entomopatógenos más importantes a nivel mundial. Por otra parte, en la colección de hongos entomopatógenos del centro nacional de referencia de control biológico se conservan 34 aislamientos de *M. flavoviride* purificados de acrídidos, 3 de ellos provenientes de Nigeria, Tanzania y Australia y el resto del Colima, Michoacán, Nayarit y 4 de la Isla Socorro del Archipiélago de Revillagigedo.

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS

Para desarrollar un programa para el control de insectos plaga utilizando hongos patógenos, es necesario seleccionar genotipos que combinen las mejores características posibles para matar el insecto blanco bajo condiciones de campo. Las características deseables pueden ser divididas en buenas condiciones de producción, tales como alta esporulación, utilización óptima del sustrato disponible, estabilidad genética y buen comportamiento en campo, lo cual se resume como alta virulencia al insecto plaga con un conveniente rango de huéspedes (Prior 1992). El insecticida microbial más exitoso a nivel mundial es basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berlinier), esto se debe en parte al gran número de aislamientos evaluados hasta seleccionar el más virulento, por esto se sugiere que para desarrollar un plaguicida microbiano efectivo, se purifiquen y evalúen mediante bioensayos el mayor número de aislamientos posibles (Milner 1992).

Dentro del programa de control biológico de langostas y chapulines implementado en el Oeste de África, se ha desarrollado un protocolo de bioensayos, el cual permite seleccionar satisfactoriamente los aislamientos virulentos en un periodo de 7 días; la mortalidad se inicia en el día 4 y se incrementa a 4>90% en el sexto día. Todos los aislados altamente virulentos a *S. gregaria* que han sido evaluados a la fecha pertenecen al género *Metarhizuim* y han sido purificados de ortópteros (Prior et al. 1992). En México, mediante un método distinto de bioensayo se han sido evaluados 6 aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, 10 de *Paecilomyces* spp. Y 12 de *Metarhizium* spp. sobre adultos de *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker con base en el tiempo letal medio (TLM), el cual varía de 5.00 y 7.66 días para *Metarhizium* spp., de 5.71 a 6.33 para *B. bassiana* y de 6.90 a>8 para *Paecilomyces* spp. (Hernández y Berlanga 1997).

PRODUCCIÓN

La producción de conidias de hongos es un elemento clave en la utilización de un insecticida microbial. En general, las conidias de hongos entomopatógenos se aplican en rangos de $2x10^{12}$ conidias/ml en 2-3 litros de formulación/ha lo que equivale a aplicar $46x10^{12}$ conidias/ha, por lo que es necesario producir grandes cantidades de hongo (Prior *et al.* 1992).

La tecnología más avanzada para la producción de hongos es utilizando reactores para la fermentación líquida, sin embargo pocos hongos entomopatógenos producen propágulos infectivos en cultivo sumergido; algunas excepciones *son B. bassiana* e *Hirsutella thompsonii* Fisher, los cuales producen conidias en medios líquidos, no obstante estas conidias son usualmente menos virulentas y de vida más corta que las producidas superficialmente. La mayoría de los hongos deuteromicetos producen blastosporas en cultivo sumergido; las blastosporas son más susceptibles a condiciones ambientales adversas y consecuentemente no han sido adoptadas para aplicación en campo (Goettel y Roberts 1992).

No obstante a lo anterior, recientemente Jenkins y Prior (1993) lograron producir más de $1.5x10^9$ conidias de *M. flavoviride*/ml después de 7 días en un medio líquido conteniendo 20 g de levadura y 20 de sacarosa o 30 g de levadura y 30 de sacarosa por litro. La fermentación sumergidas es frecuentemente utilizada en un método difásico, donde micelio y blastosporas son producidas en cultivo sumergido y posteriormente transferidas a un sustrato sólido para la producción de conidios aéreos (Hedgecock *et al.* 1995).

La mayoría de los hongos crecen en medio sólido y producen conidias aéreas. El cultivo superficial en medio sólido o semisólido es usualmente el mejor para estos hongos incluyendo la clase Hyphomycete *M. anisopliae* es producido comercialmente en Brasil para el control del salivazo de la caña de azúcar *Mahnarva posticata* (Stal), el hongo crece en arroz esterilizado en bolsas de polietileno por 15 a 20 días (Goettel y Roberts 1992). En México, *M. flavoviride* ha sido producido en forma similar para evaluación en campo contra *S. piceifrons piceifrons* (Hernández y Berlanga 1997).

FORMULACION Y APLICACIÓN

Una de las principales limitantes en el uso de hongos para el control de insectos es la falta de tecnología de formulación disponible, al cual es frecuentemente simple o inexistente; sin embargo la importancia de esto es que a través del formulado se mejora la vida de almacén, persistencia eficacia y seguridad en campo (Goettel y Roberts 1992). Las conidias de hongos pueden ser aplicadas en seco (polvos o granulados) y líquidos o en presencia de líquidos (polvos humectables, concentrados acuosos y concentrados emulsificables) (Auld 1992).

Los polvos humectables, también llamados polvos dispersables o asperjables, consisten en partículas muy pequeñas con conidias del hongo y agentes surfactantes que permiten mezclarse con agua para formar una suspensión estable y homogénea. Los polvos humectables

tienen una proporción elevada de partículas menores de 5µm y todas las partículas deben pasar una malla de 44 µm En forma ideal, la cantidad de agentes surfactante activo debe ser suficiente para permitir que las partículas asperjadas humedezcan la superficie del objetivo y se extienden, pero no deben ser lavadas con facilidad por la lluvia (Mathews 1988). Los inertes comúnmente utilizados en la formulación de hongos entomopatógenos son arcillas con caolín, sílica gel o tierras diatomeas (Auld 1992). En México, se utilizan formulaciones en polvo humectable de *M. anisopliae, B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broun & Smith utilizando diatomita como inerte.

Resulta relativamente sencillo preparar suspensiones de conidias de los hongos *Beauveria y Metarhizium* en aceite para su aplicación a ultrabajo volumen, ya que la cutícula lipofílica de las conidias hacen que estas se suspendan fácilmente en aceite después de vigorosas agitaciones del sustrato esporulado sobre el aceite; los aceites son preferidos para aplicaciones a ultrabajo volumen dado que la evaporación del líquido es minimizado cuando se utilizan gotas pequeñas, especialmente en condiciones de baja humedad relativa (Bateman 1992). La formulación en aceite también es deseable ya que éste se adhiere y dispersa sobre la cutícula lipofólica del insecto, y puede ayudar en el transporte de la conidia a las membranas intersegmentales del mismo, las cuales son más susceptibles a la penetración hifal (Prior *et al.* 1988).

Los conidios de *M. flavoviride* almacenados a 17 y 18 C en aceites conservan viabilidad por largos periodos. Después de 50 semanas mantienen más de 90% de germinación, con 78 semanas de almacenamiento su germinación es de 90% a 8º C y de 80% a 17ºC, a las 160 semanas conservan 89 y 79% de germinación respectivamente (Moore *et al.* 1995); en este experimento el aceite mineral Edelex fue significativamente inferior a los aceites del petróleo han sido reportados con efectos negativos sobre la viabilidad de conidias en comparación con aceites vegetales. En forma general algunos aceites minerales derivados del petróleo han sido reportados con efectos negativos sobre la viabilidad de conidias en comparación con aceites vegetales (Daoust *et al*. 1983), pero los resultados no han sido consistentes ya que también se ha reportado al keroseno con capacidad de proporcionar una viabilidad de conidios de *M. flavoviride* mayor que los aceites vegetales (Stathers *et al.* 1993). En México, *M. flavoviride* se ha formulado en aceite mineral (citrolina de uso agrícola obteniéndose una viabilidad de los conidios de 89% después de 40 días a 7ºC (Anónimo 1996).

Debido al tamaño pequeño de los conidios de *M. flavoviride*, el rango de técnicas para su aplicación es amplio incluyendo todos los equipos disponibles para la aplicación de plaguicidas convencionales, con volumen alto (1000 l), medio (350 l), volumen a muy bajo (3-50 l), ultrabajo volumen (0.5-3 l), aplicación de gota controlada y aspersión electrostática (Auld 1992).

SEGURIDAD

Los riesgos representados por micoinsecticidas a organismos no blanco caen en los grupos de toxicidad, alergia e infección directa; los dos primeros incluyen directamente a humanos y otros vertebrados, mientras el tercero se refiere a cualquier organismo (Austwick 1980, citado por Morre y Prior 1993). Varios hongos producen tóxinas, pero en la mayoría de los entomopatógenos solamente han sido encontrados en el medio de cultivo. Algunos aislados de *M. anisopliae* producen destruxinas las cuales han sido implicadas en la mortalidad de insectos, pero no existe evidencia de toxicidad por ingestión en vertebrados a éstas o cualquier compuesto producido por hongos durante su desarrollo como insecticidas (Moore y Prior 1993).

El riesgo más serio es debido a reacciones alérgicas por sensibilidad pulmonar, especialmente por hongos conidias pequeñas (<3µm de diámetro) tales como *Beauveria* spp. Y *Paecilomyces* spp durante el proceso de producción y formulación, cuando no se tienen las precauciones necesarias; epizootias naturales e inducidas resultan en enormes niveles de conidias en los ecosistemas, pero no se han detectado problemas ni se han reportado infecciones en humanos u otros vertebrados (Moore y Prior 1993); sin embargo, se debe tener en consideración la adaptación de algunos aislamientos de *M. flavoviride* a altas temperaturas (Welling et al. 1994), lo cual puede representar riesgos potenciales de infección con aislados que presentan desarrollo en temperaturas superiores a 37º C (Prior 1992).

Los casos mejor documentados de impacto ambiental detrimental de hongos como agentes de control, son afectos indirectos sobre depredadores y parasitoides del insecto plaga por disminución de la presa y huésped respectivamente, aunque también pueden afectar adversamente a invertebrados no blanco, incluyendo depredadores y parasitoides (Goettel et al. 1990).

Dentro de las pruebas de laboratorio de susceptibilidad de invertebrados, usualmente se incluye a la abeja *Apis mellifera* Linnaeus (Goettel y Jhonson 1992). Al respecto,

estudios realizados con *M. flavoviride,* formulado en aceite, indican mortalidades a 30% de abejas cuando se utilizó el doble de la dosis recomendada en campo y un 11% de mortalidad con dosis semejantes a las utilizadas en campo; no así cuando fue aplicado en agua, donde la mortalidad provocada es de 8% (Ball et al. 1994).

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 1996. Viabilidad de conidias de *Metarhizium flavoviride* formuladas en aceites vegetales y minerales. Resúmenes de investigación (no publicado). SAGAR-DGSV-CNRC. 2p.

Auld, B.A. 1992. Mass production, formulation and applicaction of fungi as biocontrol agents pp: 219-229. In: Lomer, C, J. & C. Prior (eds). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Ball, B.V., B. J. Pye, N.L. Carreck, D. Moore & R. P. Bateman. 1994. Laboratory testing of mycopesticide on non- target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied to *Apis mellifera*. Biocontrol Science and Technology 4: 289-296.

Bateman, R.P. 1992. Controlled droplet application of mycopesticides to locusts. Pp: 249-254. In: Lomer, C. J. & C. Prior (eds). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Daoust, R.A., M. G. Ward & D. W. Roberts. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Patholoty 41: 151-160.

Goettel, M. S., D.L. Johnson &G. Douglas Inglis. 1995. The role of fungi the control of grasshoppers. Can. J. Bot. 73: 71-75.

Goettel, M.S. & D.W. Roberts. 1992. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. Pp: 230-238. In: Lomer, C.J.& C. Prior (eds). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Goettel, M.S., T.J. Poprawsky, J.D. Vandeberg, Z. Li &D.W. Roberts. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. Pp: 209-231. In: Laird, M., L.A. Lacey &E.W. Davidson (eds.). Safety of microbial insecticides. CRC Press, Boca Raton. 259 p.

Goettel, M.S. & D.L. Jhonson. 1992. Environmental impact and safety of fungal control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Hedgecock, S., D. Moore, P.M. Higgins & C. Prior. 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. Biocontrol Science and Technology 5: 371-377.

Hernández V., V.M. & A.M. Berlanga P. 1997. Virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride, Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* spp. Sobre adultos de langosta *Schistocerca piceifrons*. Pp: 53-54. En: Memoria XXXII Congreso Nacional de Entomología SME. Metepec, Pue.

Hernández V., V.M. & A.M. Berlanga P. 1997. Evaluación de *Metarhizium flavovirdae* Gams &Ruzypal aplicado como polvo humectable concentrado emulsificable y a ultrabajo volumen sobre ninfas de *Schistocerca piceifrons* Walker pp. 42-44. En memoria XX Congreso Nacional de Control Biológico. Guadalajara, Jal.

Hernández V., V.M., A.M. Berlanga P. & E. Garza G.1997. Detección de *Metarhizium flavoviridae* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en las Islas Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. Vedalia Volumen 4, número, pp. 45-46.

Humber, R. H. 1992. Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains. U.S. Departament of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-110-177 pp.

Jenkins, N.E. &C. Prior. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. Mycol. Res. 97(12): 1489-1494.

Kooyman, C. & P. Shah. 1992. Exploration for locust and grasshopper pathogens. Pp: 208-211. In: Lomer, C.J. & Prior (eds.). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra, CAB International. 394 p.

Matthews, G.A. 1988. Métodos para la aplicación de pesticidas. Editorial CECSA. 365 p.

Milner, R.J. 1992. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. Pp: 200-207. In: Lomer, C.J. & C. Prior (eds) Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra, CAB International 394 p.

Moore, D., R.P. Bateman, M. Corey & C. Prior. 1995. Long- storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology 5: 193-199.

Moore, D. & C. Prior. 1993. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and Information. 14(2): 31N-40N.

Prior, C. 1992. Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshoper control. Pp: 159-180. In: Lomer, C.J.& C. Prior (eds.). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Prior, C., C. J. Lomer, H. Herren, A. Paraíso, C. Kooyman &J. J. Smit. 1992. The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programe on the biological control of locusts and grasshoppers. Pp: 8-18. In: Lomer, C. J. & C. Prior (eds.) Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. CAB International. 394 p.

Prior, C., P. Jollands & G. Patourel. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria basssiana* (Deuteromyconia: Hyphomyces) to the cocoa weevil pest *Pantorhyctes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Invertebrate Pathology 52: 66-72.

Samson R. A. 1981. Identification: entomopathogenic deuteromycetes. Pp: 93-106. In: Burges, H.D. (ed). Microbial of pests and plant diaseases 1970-1980. Londres, Academic Press. 555 p.

Stathers, T. E., D. Moore & C. Prior. 1993. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. Journal Invertebrate Pathology 62: 111-115.

Welling, M., G. Nachigall & G. Zimermann. 1994. *Metarhizium* spp. Isolates from Madagascar: morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, Locusta migratoria. Entomophaga 39: 351-361.

SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL
Ing. Romárico Arroyo Marroquín
SUBSECRETARIO DE AGRICULTURA Y GANDERÍA
M.V.Z. Francisco José Gurría Treviño
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M.C. Luis Angel Villareal García
SUBDIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO
M.C. Hugo César Arredondo Bernal
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENTOMOPATÓGENOS
M.C. Víctor Manuel Hernández Velázquez

COMPILADORES:
M.C: Víctor Manuel Hernández Velázquez
M.C. Angélica María Berlanga Padilla
Ing. Enrique Garza González

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE CONTROL BIOLÓGICO
KM. 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. A.P. 133
TECOMÁN, COL. C.P. 28120
TEL. (313) 32 4 07 45
FAX (313) 32 4 27 73

Año 1999