

# SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS, PUPAS Y ABEJAS ADULTAS A

## AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium*

### *anisopliae* (Sorokin) Y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize)

Gricela Elidet Espinosa-Ortiz, Joel Lara-Reyna, Gabriel Otero-Colina, Raquel Alatorre-Rosas y Jorge Valdez-Carrasco

#### RESUMEN

Se evaluó la susceptibilidad de larvas, pupas y adultos de abejas obreras a 20 aislamientos de hongos entomopatógenos: doce de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (HBb1-12), siete de *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (HMa1-7) y uno de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (HP1). Tres aislamientos resultaron altamente agresivos en larvas a dosis de 10 conidios/individuo, los cuales fueron HMa7, HMa1 y HBb4, con 100, 90 y 93% de mortalidad, respectivamente; a la misma dosis, los aislamientos HBb8 y HBb4 fueron los más agresivos para pupas al causar 100 y 90% de mortalidad, respectivamente. En el caso de adul-

tos, los aislamientos HBb4 y HBb7 provocaron la mayor mortalidad, con 92,6 y 100%, respectivamente, a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. En contraste, los aislamientos menos agresivos contra adultos fueron HBb1 y HMa4, con 12,7 y 2,2% de mortalidad, respectivamente; en el caso de larvas el aislamiento HBb1 fue el menos virulento, con 5,3% de mortalidad; en pupas el aislamiento HMa3 causó 0% de mortalidad y el HBb1 causó 45% de mortalidad. Se postula que los estados inmaduros de las abejas son altamente susceptibles a los hongos evaluados, no así los adultos, donde se observó baja susceptibilidad.

#### Introducción

Los hongos entomopatógenos son utilizados como insecticidas biológicos dentro de grandes y pequeñas extensiones agrícolas. Los productores del estado de Veracruz, México, aplican en altas concentraciones esporas de *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) contra el salivazo de la caña de azúcar (*Aenolamia postica* (Walker), Hemiptera: Cercopidae, y los cafeticultores aplican *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Coleoptera: Scolytidae, en Oaxaca (SAGARPA 2001), pues dichos hongos son eficaces para el control de esas plagas. Sin embargo, no exis-

ten datos contundentes en la literatura que mencionen colonias de abejas (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) afectadas por éstos u otros hongos entomopatógenos usados para el control de plagas agrícolas (Kanga *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2002), y menos aún sobre el impacto que estos microorganismos tienen o pudieran tener sobre la entomofauna que frecuenta la flora dentro de los cultivos o que circunda a éstos. Al contrario, existen reportes que demuestran que las abejas constituyen efectivos diseminadores de agentes de control biológico que dejan el inóculo en partes de las plantas infestadas por algún hongo fitopatógeno (Gross *et al.*, 1994; Butt *et al.*, 2001) o

bien que dejan las esporas sobre el polen de las flores donde se alimentan algunos escarabajos plaga, y según Butt *et al.* (1988), no hay efecto adverso sobre las abejas.

Existen muchos trabajos que tratan sobre la patogenicidad de los hongos entomopatógenos hacia los insectos plaga y en los últimos años se han realizado esfuerzos para desarrollar bioinsecticidas a base de hongos como *M. anisopliae*, *M. flavoviridae* (Gams y Rozyspal), *B. bassiana*, *Hirsutella thompsonii* (Fisher) y *Paecilomyces* spp. De todos ellos se han obtenido resultados alentadores (Peng *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2002; Kanga *et al.*, 2003). Los trabajos sobre el posible

impacto ecológico del uso de bioinsecticidas han sido centrados principalmente para el caso de microorganismos entomopatógenos modificados genéticamente (Evans, 2002), mientras que otros se han enfocado a evaluar el impacto sobre parasitoides (Mesquita y Lacey, 2001). Rose *et al.* (1999) mencionaron la presencia de hongos entomopatógenos sobre avispa en Nueva Zelanda; Shaw *et al.* (2002) evaluaron la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Varroa destructor* (Anderson y Trueman) (Acari: Varroidae), y citaron la presencia de micosis sobre los cadáveres de abejas obreras tratadas. En ensayos realizados por Peng *et al.* (2002), se reportó la presencia de micosis en las

#### PALABRAS-CLAVE / *Apis mellifera* L / Control Biológico / Hongos Entomopatógenos / Impacto Ecológico /

Recibido: 05/05/2009. Modificado: 18/01/2011. Aceptado: 20/01/2011.

**Elidet Espinosa-Ortiz.** Maestra en Ciencias, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Profesora Investigadora, Universidad de la Cañada (UNCA), México. Dirección: Departamento de Agroindustrias, UNCA. Carretera Teotitlán-San Antonio Nanahuatipán, Km. 1,7 s/n. Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flo-

res Magón, Oaxaca. C.P. 68540, México. e-mail: gricelae@colpos.mx.  
**Joel Lara Reyna.** Doctor en Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Irapuato, México. Profesor Investigador, COLPOS, Campeche, México.

**Gabriel Otero-Colina.** Doctor en Biología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. Profesor-Investigador del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Texcoco, México.

**Raquel Alatorre-Rosas.** Ph.D. en Entomología, University of California at Davis, EEUU. Profesora Investigadora, COLPOS, Montecillos, México.

**Jorge Valdez Carrasco.** Maestro en Ciencias, COLPOS, México. Profesor Investigador, COLPOS, Montecillo, México.

## SUSCEPTIBILITY OF LARVAL, PUPAL AND ADULT HONEY BEES TO ISOLATES OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) AND *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize)

Gricela Elidet Espinosa-Ortiz, Joel Lara-Reyna, Gabriel Otero-Colina, Raquel Alatorre-Rosas and Jorge Valdez-Carrasco

### SUMMARY

The susceptibility of larvae, pupae and adults of worker honey bees to 20 isolates of entomopathogenic fungi was evaluated. Of the isolates, twelve were of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (HBb1-12), seven of *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (HMa1-7) and one of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (HP1). The most aggressive isolates against larvae, in doses of 10 conidia/individual, were HMa7, HMa1 and HBb4, with 100, 90 and 93% mortality, respectively; at the same doses, the HBb8 and HBb4 isolates were the most aggressive ones against pupae, as they caused 100 and 90% mortality, respectively. On

adult bees a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/ml was applied, and the isolates HBb4 and HBb7 caused the highest mortality, 92.6 and 100%, respectively. By contrast, the least aggressive isolates against adult bees were HBb1 and HMa4, with 12.7 and 2.2% mortality, respectively; the isolate HBb1 was the least aggressive against larvae, with 5.3% mortality; the isolates HMa3 and HBb1 caused 0% and 45% mortality of pupae, respectively. It is postulated that immature bees are highly susceptible to the tested fungi, contrasting with the adults, which showed a low susceptibility.

## SUSCEPTIBILIDADE DE LARVAS, NINFA E ABELHAS ADULTAS A ISOLAMENTOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) E *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize)

Gricela Elidet Espinosa-Ortiz, Joel Lara-Reyna, Gabriel Otero-Colina, Raquel Alatorre-Rosas e Jorge Valdez-Carrasco

### RESUMO

Avaliou-se a susceptibilidade de larvas, ninfas e adultos de abelhas obreiras a 20 isolamentos de fungos entomopatogênicos: doze de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (HBb1-12), sete de *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (HMa1-7) e um de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (HP1). Três isolamentos resultaram altamente agressivos em larvas a doses de 10 conídios/indivíduo, os quais foram HMa7, HMa1 e HBb4, com 100, 90 e 93% de mortalidade, respectivamente; com a mesma dose, os isolamentos HBb8 e HBb4 foram os mais agressivos para ninfas ao causar 100 e 90% de mortalidade, respectivamente. No caso de adultos, os isolamen-

tos HBb4 e HBb7 provocaram a maior mortalidade, com 92,6 e 100%, respectivamente, a uma concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/ml. Em contraste, os isolamentos menos agressivos contra adultos foram HBb1 e HMa4, com 12,7 e 2,2% de mortalidade, respectivamente; no caso de larvas o isolamento HBb1 foi o menos virulento, com 5,3% de mortalidade; em ninfas o isolamento HMa3 causou 0% de mortalidade e o HBb1 causou 45% de mortalidade. Postula-se que os estados imaturos das abelhas são altamente susceptíveis aos fungos avaliados, mas não os adultos, onde foi observada baixa susceptibilidade.

exuvias de estados inmaduros de abejas obreras. En el presente trabajo se evaluó el efecto directo de hongos entomopatogénicos sobre los diferentes estados biológicos de las abejas, con la finalidad de determinar el riesgo que pudiera tener la utilización masiva de estos bioinsecticidas sobre dichos insectos.

### Materiales y Métodos

#### Material biológico

Se evaluaron un total de 20 aislamientos. Doce aislamientos de *B. bassiana* (HBb1 al 12), obtenidos de la colección del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología (LBMyB) del Colegio de Postgraduados, Campeche, México; un aislamiento de *Paecilomyces sp.* (HP1), proporcionado por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de

Campeche; y siete aislamientos de *M. anisopliae* (HMa1-7) de hospedantes desconocidos, de la colección del LBMyB. Estos aislamientos fueron cultivados en tubos inclinados con ADS (agar dextrosa Sabouraud) y almacenados a 4°C.

#### Reactivación de los aislamientos

Antes de realizar las pruebas de efectividad, los diferentes aislamientos fueron reactivados inoculándolos en insectos de acuerdo con la técnica mencionada por López (1994); así, *B. bassiana* fue reactivada sobre *Sitophilus zeamais* (Mots.), Coleoptera: Curculionidae; *M. anisopliae*, sobre chapulines (Orthoptera: Acrididae) capturados en plantas silvestres; y *Paecilomyces fumosoroseus*, sobre ejemplares del pulgón *Myzus*

*persicae* (Sulzer), Homoptera: Aphidae, obtenidos de plantas de cítricos. Dichos insectos se alimentaron por dos días con material vegetal de las plantas donde fueron colectados; en el día tres los insectos fueron desinfectados con alcohol, hipoclorito de sodio y agua destilada estéril, y posteriormente con luz UV germicida por 3min. Enseguida, dos individuos fueron colocados por 5min dentro de una caja de Petri que contenía esporas de un hongo entomopatogénico en particular; después esos ejemplares fueron retirados y colocados en cámara húmeda a 28°C. Cuando el micelio fue visible en el exterior del insecto (día seis en promedio), éste se sembró en una placa de papa-dextrosa-agar (PDA), propiciando su crecimiento y posterior conservación.

Posteriormente, cada aislamiento reactivado fue sem-

brado en tres cajas de Petri con medio PDA e incubado a 30°C por 15 días, luego de lo cual las esporas fueron cosechadas, colocadas en tubos de Eppendorff, y almacenadas a 4°C para ser utilizadas en los ensayos. Se descartaron los aislamientos con poca producción de esporas.

#### Susceptibilidad de larvas y pupas de obreras de *A. mellifera*

Primero se realizó un bioensayo preliminar para determinar las concentraciones a las cuales se causaba 0 y 100% de mortalidad. Para ello se preparó la suspensión "madre" ( $1 \times 10^7$  conídios/ml) y a partir de ella se realizaron diluciones con un factor 1/10 en tubos Eppendorff de 1,5ml utilizando agua destilada estéril como diluyente, hasta ajustar la concentra-

ción a evaluar (10, 100, 1000 y 10000 conidios/individuo). Se utilizaron 20 individuos por concentración, que se colectaron directamente de los panales. Para ser tratadas, se eligieron larvas con un peso promedio de 0,371g, mientras que las pupas se trataron cuando tenían alrededor de siete días de edad (ojos de color rosa a café), como lo menciona Jay (1962). Previamente a los tratamientos, larvas y pupas fueron colocadas en cajas de Petri y observadas por 24h para desechar aquellas en mal estado físico. Con una micropipeta se aplicó la dosis en volúmenes de suspensión que fueron de 1 a 4µl por abeja, ya que las concentraciones más elevadas debieron diluirse más para su manejo. Las cajas con los individuos tratados se incubaron a 30°C y 71,2% de humedad relativa, y se registró la mortalidad durante siete días.

Con los datos, se graficó el porcentaje de mortalidad contra el logaritmo de la dosis y se determinaron las concentraciones intermedias a ser utilizadas en los bioensayos finos. El análisis de los datos obtenidos de cada bioensayo se realizó a través del programa Probit desarrollado para PASCAL®. Se realizaron tres bioensayos para cada uno de los aislamientos; de ellos se obtuvo el promedio de las DL<sub>50</sub>'s, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). El testigo consistió en un grupo al que se le aplicó agua más el dispersante polioxietileno sorbitan monooleato 0,01%.

*Susceptibilidad de obreras adultas*

Se utilizaron 18 panales con cría operculada (uno por cada aislamiento más

TABLA I  
PORCENTAJES DE MORTALIDAD REGISTRADOS EN LARVAS DE *A. mellifera* INOCULADAS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Dosis	10000	1000	100	10	0	Dosis	10000	1000	100	10	0
HBb1	88,0	68,0	23,5	5,3	11,5	HBb10	100,0	95,0	85,0	80,0	0
HBb2	95,0	95,0	55,0	50,0	0	HBb11	100,0	100,0	90,0	60,0	0
HBb3	95,0	90,0	80,0	10,0	0	HBb12	100,0	100,0	85,0	10,0	0
HBb4	93,3	86,4	61,5	18,5	11,5	HP1	80,0	44,8	54,2	45,8	0
HBb5	100,0	35,0	65,0	35,0	0	HMa2	88,5	88,5	81,35	47,12	0
HBb6	95,0	65,0	55,0	55,0	0	HMa4	100,0	100,0	55,0	20,0	0
HBb7	80,0	65,0	65,0	65,0	0	HMa5	100,0	100,0	100,0	30,0	0
HBb8	100,0	100,0	75,0	20,0	0	HMa6	100,0	100,0	90,0	5,0	0
HBb9	85,0	60,0	35,0	30,0	0	HMa7	100	96,55	79,2	50,0	0
Testigo					N=20	Mortalidad 0%					

HBb: *Beauveria bassiana*, HP: *Paecilomyces fumososroseus.*, HMa: *Metarhizium anisopliae*

TABLA II  
MORTALIDAD DE LARVAS DE *A. mellifera* OCACIONADA POR LOS AISLAMIENTOS HBb1 Y HBb9 DE *B. bassiana* EN SEIS DIFERENTES DOSIS (n=20)

Dosis (conidios/individuo)	10,000	2500	800	200	50	10
HBb1	90	83,33	65	63,3	31,7	0
HBb9	88,33	78,33	73,33	51,7	30	0
Testigo	0	0	0	0	0	0

el testigo) y cada panal se colocó dentro de una cámara de cría tamaño Langstroth para formar una colonia (núcleo). Sobre cada cámara se colocó un vidrio para facilitar las observaciones y sobre éste se colocó la tapa; la piquera fue sellada con papel para evitar la fuga de individuos. Al tercer día, cuando había emergido ~50% de las abejas de todos los panales, los individuos muertos fueron retirados de cada colonia y se aplicaron los tratamientos en los insectos sobrevivientes (100 en promedio). Cada tratamiento consistió en un panal con las abejas que estaban posadas en él, las cuales fueron asperjadas con 20ml de agua más el dispersante polioxietileno sorbitan mo-

nooleato 0,5% con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Los panales tratados fueron incubados a 28°C y 60,5% de humedad relativa.

La mortalidad se contabilizó a los 10 días, período que duró la incubación. El testigo consistió en una colonia de abejas tratadas con 20ml de agua más el dispersante (0,5%). Transcurrido el tiempo, se capturaron y contabilizaron los individuos vivos y después se agregaron al número de cadáveres para obtener el total de individuos tratados; los cadáveres fueron colocados en cámara húmeda e incubados a 28°C y 71,3% de humedad relativa, para recuperar el hongo aplicado y confirmar si la mortali-

TABLA III  
DOSIS LETALES MEDIAS (DL<sub>50</sub>) Y AJUSTE A MODELO PROBIT DE MORTALIDAD DE LARVAS DE *A. mellifera* TRATADAS CON DOS AISLAMIENTOS DE *B. bassiana*

Aislamientos	CL <sub>50</sub>	L. Inf.	L. Sup.	Pendiente	χ <sup>2</sup>	MN	PE	DM
HBb1	261,01	39,85	1665,58	1,067168167	11,79	0	+	+
HBb9	396,84	182,59	1124,31	0,97392116	8,78	0	+	+

CL<sub>50</sub> para HBb1= 261,01; S= 7,564; CV= 68  
CL<sub>50</sub> para HBb9= 396,842; S= 6,696; CV= 63

dad se debió a micosis. Se fijó una mortalidad máxima de 20% tolerada por el testigo

## Resultados

### *Susceptibilidad de larvas de obreras*

Los porcentajes de mortalidad observados se muestran en la Tabla I. De manera consistente, la mortalidad incrementó al aumentar la dosis; sin embargo, cabe notar que algunos aislamientos (HBb2, HBb6, HBb7, HP1, HMa2 y HMa7) provocaron alta mortalidad a dosis de 10 esporas/individuo, y no alcanzaron 100% de mortalidad a dosis de 10000 esporas/individuo.

Los aislamientos HBb1 y HBb9 provocaron los porcentajes más bajos de mortalidad (Tabla II). Al determinar la DL<sub>50</sub> para estos aislamientos se encontró que HBb1 requiere menor concentración de esporas para matar al 50% de la población de larvas tratadas (Tabla III).

### *Susceptibilidad de pupas de obreras*

En la Tabla IV se puede observar la mortalidad ocasionada por los aislamientos HBb1, HBb2, HBb3, HBb4, HBb5, HBb6, HBb7, HBb8, HBb9, HP1, HMa1, HMa2, HMa4, HMa5, HMa6, y HMa7. A dosis de 10 esporas/individuo, la mortalidad fue de 45-100%, lo que ubica a las pupas como más susceptibles que las larvas al parasitismo de los hongos empleados, de manera general. Como en el caso de las larvas, a mayor dosis la mortalidad fue más elevada.

Los aislamientos HBb1, HBb3 y HMa4 en dosis de 10 conidios/individuo ocasionaron la menor mortalidad; en el caso de

TABLA IV  
PORCENTAJES DE MORTALIDAD REGISTRADOS  
EN PUPAS DE *A. mellifera* INOCULADAS  
CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Dosis	10000	1000	100	10	Dosis	10000	1000	100	10
HBb1	100	95	95	45	HBb10	100	90	85	85
HBb2	100	100	90	80	HP-1	100	100	90	50
HBb3	100	90	65	45	HMa1	100	90	70	85
HBb4	95	95	95	90	HMa2	100	100	100	90
HBb5	85	60	50	50	HMa3	35	20	20	0
HBb6	100	65	55	55	HMa4	100	100	80	75
HBb7	100	65	65	65	HMa5	100	100	80	75
HBb8	100	95	95	100	HMa6	95	75	75	75
HBb9	100	100	85	35	HMa7	100	100	100	100
Testigo	N=20				Mortalidad 0%				

Las dosis están expresadas en número de conidios por individuo. HBb: *B. bassiana*, HP: *Paecilomyces* sp., HMa: *M. anisopliae*.

HMa4 la dosis máxima aplicada (10000 conidios por individuo) ocasionó 35% de mortalidad, pero con 10 esporas por individuo este aislamiento fue inocuo. En el caso de las pupas los resultados presentados en la Ta-

#### Susceptibilidad de obreras adultas

La aspersion de panales con obreras adultas de *A. mellifera* con 20ml de suspensión con  $1 \times 10^7$  conidios/

TABLA V  
DOSIS LETALES MEDIAS ( $DL_{50}$ ) Y AJUSTE A MODELO  
PROBIT DE MORTALIDAD DE PUPAS DE *A. mellifera*  
TRATADAS CON DOS AISLAMIENTOS DE *B. bassiana*

Aislamiento	$DL_{50}$	LF Inf	LF Sup	Pendiente	$\chi^2$	MN	PE	DM
HBb1	9,904	1,2543	24,374	1,07276	3,094	6	+	+
HBb9	18,633	7,1111	36,261	1,50773	0,132	0	+	+

$DL_{50}$  para HBb1= 9,904; S= 5,188; CV= 30,97  
 $DL_{50}$  para HBb9= 18,633; S= 1,73; CV= 9,35

bla IV sugieren que los aislamientos menos agresivos fueron HBb1, HBb3, HBb9 y HMa3.

El aislamiento HBb1 provocó una mortalidad de 45% a dosis de 10 esporas/individuo, lo que lo ubica entre los menos agresivos, aunque la mortalidad se elevó a 100% a dosis de 10000 esporas/individuo. Igualmente, el aislamiento HBb9 se ubicó entre los menos agresivos, con 35 y 100% de mortalidad a las dosis mínima y máxima, respectivamente. Ya que estos aislamientos esporularon abundantemente, se consideró interesante obtener más datos acerca de su efecto sobre las abejas, por lo que se estimaron sus  $DL_{50}$ . Los datos aparecen en la Tabla V.

ml provocó la mortalidad registrada en la Figura 1. Diez aislamientos (HBb2, HBb3, HBb4, HBb7, HBb11, HBb12, HMa1, HMa2,

HMa5 y HMa7) provocaron mortalidades >50%, cuatro aislamientos produjeron mortalidad entre 20 y 50% (HBb6, HBb9, HP1, y HMa6), y sólo dos aislamientos mostraron baja infectividad en obreras adultas, con mortalidades <20% (HBb1 y HMa4). Nuevamente, HBb1 se mostró entre los aislamientos menos agresivos (11% de mortalidad). Por otra parte, la micosis solo fue

confirmada en abejas tratadas con los aislamientos de *M. anisopliae* y *Paecilomyces* sp., HMa1, HMa4, HBb4, HMa7, HMa5 y HP1.

Los aislamientos de HBb5, HBb8 y HBb10 no se aplicaron en abejas adultas debido a que no produjeron suficientes esporas. Los individuos del testigo en las mismas condiciones ambientales y de alimentación vivieron 20 días en promedio.

#### Discusión

El interés en métodos alternativos para el control de plagas agrícolas ha crecido en todo el mundo debido a la resistencia hacia los insecticidas químicos que algunos insecticidas

han desarrollado (Fournier, 2005). En los últimos años, en México se ha incrementado el uso de hongos entomopatógenos en cultivos agroindustriales a través de la utilización de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, como en los casos de la caña de azúcar y el café. El incremento en la superficie de aplicación, sobre todo en zonas donde la agricultura se mezcla con la actividad apícola, pone de manifiesto la necesidad de evaluar el impacto que pudieran tener las principales especies de hongos entomopatógenos sobre las abejas.

En este trabajo se demostró la alta susceptibilidad que presentan los estados inmaduros de *A. mellifera* al ser inoculados con conidios de las principales especies de Hyphomycetes que son utilizados como bioinsecticidas en el mundo. Dosis tan bajas como 10 esporas/individuo provocaron mortalidades >50% en los bioensayos (Tabla I); si bien algunos aislamientos fueron poco infectivos a esta misma dosis y ocasionaron mortalidades <10% (HBb1, HBb12, HMa6), varios de ellos provocaron mortalidades >55% (HBb7, HBb10, HBb11 y HMa1), lo cual los hace altamente infectivos hacia las larvas de último instar de *A. mellifera*.

Las pupas fueron más susceptibles que las larvas según los resultados del bioensayo (Tablas I y V). El aislamiento menos agresivo provocó una mortalidad de 20% de pupas a una dosis de 100 conidios/pupa (HMa4); sin embargo, la menor mortalidad en el resto de los aislamientos a una dosis de 10 conidios/pupa fue de 45%. En el caso de los aislamientos HBb1 y HBb9, menos agresivos para larvas, éstos requirieron pocos conidios para matar al 50% de la población de pupas (9,904 y 18,633 conidios, respectivamente; Tabla V), lo que demuestra que las pupas son altamente sus-

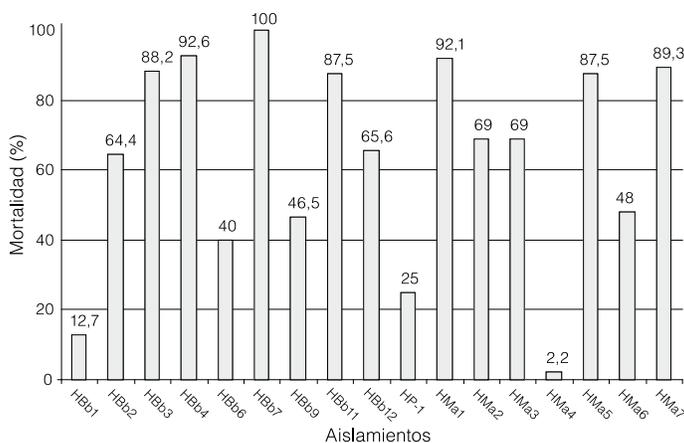


Figura 1. Mortalidad en adultos de *A. mellifera* obreras causada por hongos entomopatógenos. HBb: *B. bassiana*, HP: *Paecilomyces* sp., HMa: *M. anisopliae*

ceptibles a los aislamientos usados. La infección en larvas y en pupas ocurrió en las primeras 24h, lo cual indica que la infección fue muy rápida.

A diferencia de la alta susceptibilidad demostrada por larvas y pupas a hongos entomopatógenos, en el caso de adultos las dosis aplicadas estuvieron muy por encima de las evaluadas en inmaduros. Los resultados obtenidos en adultos no pueden compararse con los de larvas y pupas, ya que el método de aplicación fue distinto y no hay un dato preciso acerca de la concentración de esporas en suspensión que recibió cada abeja adulta. Sin embargo, aplicaciones del orden de  $1 \times 10^7$  esporas/ml (seis órdenes de magnitud por encima de la dosis de 10 conidios/larva o pupa), provocaron mortalidades menores y solo en tres aislamientos (HBb3, HBb7 y HMa1) superaron el 90%. A la concentración anotada, diez aislamientos provocaron una mortalidad >50% (HBb2, HBb3, HBb4, HBb7, HBb11, HBb12, HMa1, HMa2, HMa5, HMa7), cuatro aislamientos dieron una mortalidad de 20-50% (HBb6, HBb9, HP-1, HMa6) y dos presentaron mortalidad <20% (HBb1 y HMa4).

En el caso de larvas y pupas de *A. mellifera* tratadas, los hongos esporularon sobre los cadáveres; en contraste, éste no fue el caso para las abejas adultas. Esto último concuerda con lo reportado por Kanga *et al.* (2003), quienes aplicaron esporas de *M. anisopliae* dentro de colmenas y, aunque hubo mortalidad en los tratamientos, la micosis no fue confirmada. Sin embargo, no concuerda con lo reportado por Shaw *et al.* (2002), quienes obtuvieron entre 87 y 100% de micosis sobre cadáveres de abejas adultas tratadas con *B. bassiana*. En el presente trabajo, el micelio solo fue observado sobre insectos tratados con HBb4. En el caso de *M. anisopliae*, Shaw *et al.* (2002) obtuvieron mor-

talidades en 60-87% de abejas adultas, mientras que en el presente trabajo la infección fue <5% y la micosis solo fue observada sobre cadáveres tratados con HMa1, HMa4, HMa5 y HMa7. Para el caso de *P. fumosoroseus*, Shaw *et al.* (2002) obtuvieron 71% de abejas micotizadas, mientras que en el presente trabajo solo el 1% de abejas tratadas con *Paecilomyces fumosoroseus* presentó micosis.

En conclusión, los estados inmaduros de *A. mellifera* fueron altamente susceptibles a diferentes aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. En el caso de los adultos se considera que muchas de las abejas obreras murieron por infección indirecta; es decir, a través del inóculo residual dentro de la colonia y por contagio de abejas infectadas hacia abejas sanas, ya que muchas no habían emergido cuando se aplicó el tratamiento. En la literatura no se reportan casos de epizootias provocadas en apiarios por hongos Hyphomycetes usados para el control de plagas agrícolas. Una posible explicación a este hecho es la conocida capacidad de las abejas para hacer limpieza de la colmena (Winston, 1987). Si se postula que una abeja obrera adulta enferma es inmediatamente sacada de la colmena por sus compañeras, aun cuando la humedad sea propicia para el desarrollo de la infección, no hay tiempo suficiente para que ésta ocurra; la misma situación tiene lugar con las larvas enfermas o muertas que son sacadas de sus celdas por las obreras. En relación con las pupas, una vez selladas es difícil que penetren las esporas de los patógenos, por lo que solo puede ocurrir infección si hay entrada de esporas a las celdas antes de que éstas sean operculadas, pero una vez que esto ha ocurrido, la pupa en desarrollo están en un ambiente cerrado, de alta humedad y al parecer muy propicio para

el desarrollo de los hongos entomopatógenos.

El comportamiento de las abejas puede ser un factor determinante para que no ocurran epizootias en las colmenas. Sin embargo, también es de suponerse que los niveles de inóculo presentes en la naturaleza nunca llegan a los niveles de una aplicación comercial o que el inóculo que se aplica no alcanza los niveles necesarios para causar epizootias. De acuerdo con los resultados aquí mostrados, el aislamiento HBb1 ofrecería menor riesgo para las abejas, ya que presentó menor agresividad sobre inmaduros y adultos a pesar de su abundante esporulación en medio de cultivo.

Sin que éste sea aún un problema para la apicultura en el país, es necesario realizar un estudio de impacto ecológico de los microorganismos mencionados sobre especies no blanco antes de aplicarlos masivamente sobre una plaga puesto que, como se demostró en este trabajo, algunos hongos entomopatógenos pueden ser letales para las abejas.

## REFERENCIAS

- Butt TM, Jackson C, Magan N (2001) Fungal Biological Control Agents- Appraisal and Recommendations. En Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.) *Fungi as Biocontrol Agents*. CABI. Wallingford, RU. pp. 377-384.
- Butt TM, Carreck NL, Ibrahim L, Williams IH (1998) Honey bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes* spp.) by the insect pathogenic fungus, *Metharhizium anisopliae*. *Biocont, Sci. Technol.* 8: 533-538.
- Evans HC (2002) Plant pathogens for biological control of weeds. En Waller JM, Lenne JM, Waller SJ (Eds.) *Plant Pathologist's Pocketbook*. CABI, Wallingford, RU. pp 366-378.
- Fournier D (2005) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem. Biol. Interact.* 157-158: 257-261.
- Gross HR, Hamm J, Carpenter JE (1994) Design and application

of a hive-maintained device that uses honey bees (Hymenoptera: Aphididae) to disseminate *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *Env. Entomol.* 23: 492-501

- Jay SC (1962) Colour changes of honeybee pupae. *Bee World* 43: 119-122.
- Kanga LH, James RR, Boucias D (2002) *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *J. Invert. Pathol.* 81: 175-184.
- Kanga LH, Jones WA, James RR (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.* 96: 1091-1099.
- López JC (1994) Efecto patológico de cuatro aislamientos de *Beauveria hasfiana* (Bals) Vuill. (Hyphomycetes) sobre larvas de *Bombus mori* (L.) en laboratorio. *Rev. Col. Entomol.* 20: 82-89.
- Mesquita AL, Lacey LA (2001) Interaction of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) with the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: aphelinidae) and their competition for an aphid host. *Biol. Cont.* 22: 51-59.
- Peng C, Zhou X, Kaya H (2002) Virulence and site of infection of the fungus *Hirsutella thompsonii* to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Invert. Pathol.* 81: 185-195.
- Rose E, Harris R, Glare T (1999) Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *N. Zel. J. Zool.* 26: 179-190.
- SAGARPA (2001) *NOM-002-FITO-2000. Por la que se Establece la Campaña contra la Broca del café*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, México.
- Shaw K, Davidson G, Clark SJ, Ball BV, Pell JK, Chandler D, Sunderland KD (2002) Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitospore fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honey bee, *Apis mellifera*. *Biol. Cont.* 24: 266-276.
- Winston M (1987) *The Biology of the Honeybee*. Harvard University Press. Cambridge, MA, EEUU. 281 pp.