

VARIACIÓN DE FENOTIPOS DE CRECIMIENTO Y DE VIRULENCIA EN CEPAS MUTANTES DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. RESISTENTES A 2-DESOXI-D-GLUCOSA

VIRULENCE AND GROWTH PHENOTYPES VARIATION IN MUTANT STRAINS OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. RESISTANT TO 2-DEOXY-D-GLUCOSE

Roberto Montesinos-Matías¹, Gustavo Viniestra-González¹, Raquel Alatorre-Rosas²,
Francisco Gallardo-Escamilla^{1(*)}, Octavio Loera^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, 09340, México, D.F. México. ²Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (loera@xanum.uam.mx).

RESUMEN

En los procesos de mejoramiento de cepas de hongos entomopatógenos es necesario conocer cuáles son y cómo inciden las variables más importantes en las cepas más virulentas. En este estudio se evaluó una serie de variables de crecimiento y de virulencia de una cepa parental de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) (88) y mutantes derivadas resistentes al compuesto tóxico 2-desoxi-D-glucosa (2DG). La 2DG es un análogo tóxico de la glucosa, y se ha usado con frecuencia para aislar diversas mutantes de microorganismos desregulados en el metabolismo del carbono. De las variables evaluadas, previo al bioensayo de virulencia sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), el porcentaje de germinación de conidios (G) se correlacionó mejor con los parámetros de virulencia como el tiempo de inicio de muerte (t_0) ($r=-0.879$; $p\leq 0.05$), tiempo letal 50 (TL_{50}) ($r=-0.869$; $p\leq 0.05$) y mortalidad máxima M ($r=0.589$; $p=0.1$). Las demás variables evaluadas mostraron una correlación menor con la virulencia. Se destaca la alta correlación de t_0 con el TL_{50} ($r=0.967$; $p\leq 0.05$), variable determinada en la etapa temprana de infección de *B. bassiana* en larvas de *T. molitor*. Las cepas mutantes 881.2, 882.5 y 885.5 resistentes a 2DG mostraron características mejoradas en la virulencia comparadas con la cepa parental (88). Lo anterior se corroboró mediante coeficientes de regresión simple y Análisis de Componentes Principales (ACP), usados para examinar la relación entre las variables de estudio. El análisis de los resultados muestra las características fisiológicas con mayor influencia para seleccionar cepas más virulentas de hongos entomopatógenos.

ABSTRACT

In the breeding processes of fungal strains of entomopathogenic, it is necessary to know which ones they are and how the most important variables have influence on the most virulent strains. In this study an evaluation was made of a series of growth and virulence variables of a parental strain of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) (88) and derived mutants resistant to the toxic compound 2-doxy-D-glucose (2DG). 2DG is a toxic analogue of glucose, and has frequently been used to isolate a variety deregulated mutants in the metabolism of carbon in some microorganisms. Of the variables evaluated, prior to the bioassay of virulence on larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), the percentage of germination of conidia (G) was best correlated with the parameters of virulence such as time of onset of death (t_0) ($r=-0.879$; $p\leq 0.05$), lethal time 50 (LT_{50}) ($r=-0.869$; $p\leq 0.05$) and maximum mortality M ($r=0.589$; $p=0.1$). The other variables evaluated showed a lower correlation with virulence. There is a high correlation of t_0 with the LT_{50} ($r=0.967$; $p\leq 0.05$), a variable determined in the early stage of infection of *B. bassiana* in larvae of *T. molitor*. The mutant strains 881.2, 882.5 and 885.5 resistant to 2DG showed improved characteristics in virulence compared with the parental strain (88). The above was confirmed through simple regression coefficients and Principal Components Analysis (PCA), used to examine the relationship among the variables of study. The analysis of the results shows the physiological characteristics with highest influence to select more virulent strains of entomopathogenic fungi.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2011. Aprobado: noviembre, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 45: 929-942. 2011.

Key words: biological control, virulence, germination, *Tenebrio molitor*, Principal Components Analysis.

Palabras clave: control biológico, virulencia, germinación, *Tenebrio molitor*, Análisis de Componentes Principales.

INTRODUCCIÓN

En relación al desarrollo del control biológico, los hongos entomopatógenos (HE) fueron los primeros agentes microbianos usados para el control de plagas de insectos (Glare, 2004; Zimmermann, 2007). Estos microorganismos pueden infectar a los insectos a través de la penetración de su cutícula, mediante múltiples mecanismos de acción, lo que les confiere una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia. El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) es una de las especies más estudiadas y usadas en el mundo, y puede infectar a más de 200 especies en nueve órdenes de insectos (Roy y Pell, 2000; Zimmermann, 2007). Aunque el proceso de patogénesis es multivariable, algunas características se relacionan positivamente con la virulencia para algunas interacciones hongo-hospedero; estas características incluyen la velocidad de germinación (Varela y Morales, 1996; Altre *et al.*, 1999; Safavi *et al.*, 2007), velocidad de crecimiento (Samuels *et al.*, 1989; Varela y Morales, 1996; Khachatourians y Qazi, 2008), densidad superficial de esporulación (Feng y Johnson, 1990; Varela y Morales, 1996; Khachatourians y Qazi, 2008), así como la producción de toxinas (Glare, 2004; Khachatourians y Qazi, 2008) y niveles altos de enzimas extracelulares que destruyen el tejido del insecto (Gupta *et al.*, 1994; Khachatourians y Qazi, 2008; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

En los programas de mejoramiento de cepas es importante determinar el nivel de correlación entre estas variables fisiológicas y de crecimiento con la virulencia (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2006), de tal manera que se analicen y seleccionen cepas, silvestres o mutantes, que destaquen por su mejora significativa en varias de estas características, además de saber hasta qué punto se comparten entre las cepas aisladas más agresivas. Esto a su vez tiene fines prácticos para el desarrollo de agentes de biocontrol a partir de colecciones de cepas aisladas de cada región. Por ejemplo, en México se ha mostrado la conveniencia de aislar cepas de HE adaptadas a las condiciones climáticas de cada zona geográfica (De la Rosa *et al.*, 1997; De la Rosa *et al.*, 2000) y se ha comparado la virulencia de estos HE contra insectos que afectan

INTRODUCTION

In relation to the development of biological control, the entomopathogenic fungi (EF) were the first microbial agents used for the control of insect pests (Glare, 2004; Zimmermann, 2007). These microorganisms can infect insects by means of the penetration of the cuticle, through multiple action mechanisms, conferring them a high capacity for preventing the host from developing resistance. The fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) is one of the most studied and utilized species in the world, and can infect more than 200 species in nine insect orders (Roy and Pell, 2000; Zimmermann, 2007). Although the pathogenesis process is multivariable, some characteristics are positively related to virulence for some fungus-host interactions; these characteristics include germination rate (Varela and Morales, 1996; Altre *et al.*, 1999; Safavi *et al.*, 2007), growth rate (Samuels *et al.*, 1989; Varela and Morales, 1996; Khachatourians and Qazi, 2008), superficial density of sporulation (Feng and Johnson, 1990; Varela and Morales, 1996; Khachatourians and Qazi, 2008), as well as the production of toxins (Glare, 2004; Khachatourians and Qazi, 2008) and high levels of extracellular enzymes that destroy both cuticle and insect tissues (Gupta *et al.*, 1994; Khachatourians and Qazi, 2008; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

In the improvement programs of strains, it is important to determine the level of correlation among these physiological and growth variables with virulence (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2006), so that analyses and selection is made from wild or mutant strains, which stand out for their significant improvement in several of these characteristics. It is also important to know up to what point they are shared among the most aggressive isolated strains. This also has practical purposes for the development of biocontrol agents from collections of strains isolated from each region. For example, in México the convenience has been demonstrated of isolating strains of EF adapted to the climatic conditions of each geographic zone (De la Rosa *et al.*, 1997; De la Rosa *et al.*, 2000) and the virulence of these EF has been compared against insects that affect crops (De la Rosa *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2002; Chan-Copul *et al.*, 2010).

a los cultivos (De la Rosa *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2002; Chan-Copul *et al.*, 2010).

Una de las principales limitaciones en el desarrollo de los bioinsecticidas es que, en relación a los insecticidas químicos, después de su aplicación se requiere más tiempo (5-10 d) para mitigar la plaga, tiempo en el cual el insecto puede causar serios daños a la cosecha (Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007). Aunque en la naturaleza, los hongos mutan de manera natural provocando variaciones ligadas a la selección en la población, el mejoramiento de estos hongos se puede lograr por genética clásica (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), o bien por técnicas que involucran la inserción de secuencias de ADN ajenas a la especie en estudio (St Leger *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2005, 2009; Fan *et al.*, 2007). Cuando en un HE se insertan genes o secuencias de otras especies, hay restricciones para el uso y liberación de estas cepas al medio ambiente, como lo establece en México la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) (Reglamento de la Ley de Bioseguridad, 2008). El uso de microorganismos manipulados por genética clásica como método de mejoramiento de la virulencia, es una alternativa concreta al uso de OGM, además no representa un riesgo en la conservación de la biodiversidad (Ritter *et al.*, 2004). Robledo-Monterrubio *et al.*, (2009) desarrollaron una metodología para obtener cepas mejoradas de *B. bassiana*, mediante radiación ultravioleta (uv) y las mutantes se seleccionaron a partir de la resistencia a 2-desoxi-D-glucosa (2DG) en medios con quitina coloidal. Además se seleccionaron aquellas cepas que no perdieron la capacidad de esporulación, la secreción de enzimas hidrolíticas, y con una tasa de crecimiento igual o mayor al aislado silvestre (88) (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

El objetivo de este estudio fue evaluar y correlacionar los fenotipos fisiológicos de una cepa silvestre de *B. bassiana* y sus mutantes, aisladas previamente (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), con la virulencia hacia *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), el cual es considerado como plaga en almacenes de granos (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se usó la cepa silvestre de *B. bassiana* (88) y seis mutantes derivadas (881.2, 882.2, 882.5, 884.5, 885.5 y 887.5), por un

One of the principal limitations in the development of bioinsecticides is that, in relation to the chemical insecticides, after their application more time is required (5-10 d) to mitigate the pest, time in which the insect can cause serious damage to the crop (Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007). Although in nature fungi mutate naturally, provoking variations linked to the selection in the population, the improvement of these fungi can be achieved through classical genetics (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), or through techniques that involve the insertion of DNA sequences that are foreign to the species under study (St Leger *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2005, 2009; Fan *et al.*, 2007). When in an EF genes or DNA sequences of other species are inserted, there are restrictions for the use and release of those strains to the environment, as established in México by the Law of Biosecurity of Genetically Modified Organisms (GMO) (Reglamento de la Ley de Bioseguridad, 2008). The use of microorganisms manipulated by classical genetics as a method of improving virulence is a concrete alternative to the use of GMO, and does not represent a risk in the conservation of biodiversity (Ritter *et al.*, 2004). Robledo-Monterrubio *et al.* (2009) developed a methodology for obtaining improved strains of *B. bassiana* by means of the ultraviolet (uv) radiation, and the mutants were selected from the resistance to 2-desoxy-D-glucose (2DG) in media containing colloidal chitin. Also, the strains selected were those which did not lose sporulation capacity nor the secretion of hydrolytic enzymes, and with a growth rate equal to or higher than the wild isolate (88) (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

The objective of the present study was to evaluate and correlate the physiological phenotypes of a wild strain of *B. bassiana* and its mutants, previously isolated (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), with virulence toward *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), which is considered to be a pest in grain storage (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The wild strain of *B. bassiana* (88) was used, along with six derived mutants (881.2, 882.2, 882.5, 884.5, 885.5 and 887.5), through a process of mutagenesis with ultraviolet light in previous study (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), where

proceso de mutagénesis con luz ultravioleta en un estudio previo (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), donde se expusieron los conidios de la cepa silvestre a luz ultravioleta ($350 \mu\text{W}/\text{cm}^{-2}$) hasta obtener un porcentaje de sobrevivencia entre 50 y 10 % y las mutantes se recuperaron en medio con quitina y 2 desoxi-D-glucosa (0.2 o 0.5 g L^{-1}). Estas mutantes y la cepa silvestre se reactivaron por pase sobre larvas de *T. molitor* para recuperar las características de virulencia (Safavi *et al.*, 2007). Los conidios de insectos micosados tomados con el asa se sembraron por estría en medio agar maltosa Sabouraud (AMS) más desoxicolato de sodio al 0.05 % (Sigma, México) con la finalidad de recuperar colonias compactas (Goettel e Inglis, 1997). De este cultivo, se propagaron colonias independientes en medio agar maltosa Sabouraud al 2 %, más un suplemento de extracto de levadura (0.5 %) y avena pulverizada (1.5 %) (SMAYO) por 10 d a 28 °C. Los conidios producidos en este medio se usaron para las pruebas subsecuentes.

Identificación molecular a través de genes de ADNr

Para la extracción del ADN genómico de la cepa silvestre (88) se empleó un kit de purificación de ADN de Wizard® Genomic Promega (Cat. A1120). La amplificación del fragmento de ITS por PCR se realizó con los cebadores (*primers*) ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3') e ITS4b (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), usando 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 s), hibridación (55 °C por 1 min) y polimerización (72 °C por 45 s). Los cebadores se diseñaron de las secuencias conservadas 18S-ADNr y 28S-ADNr en hongos (White *et al.*, 1990). La secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados se compararon con las secuencias ya publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Prueba de germinación (G)

El porcentaje de conidios germinados se determinó siguiendo la metodología descrita por Goettel e Inglis *et al.* (1997). Sobre un portaobjetos, en condiciones de asepsia, se colocó una gota de una solución de agar-agua al 1.5 %. Se dejó enfriar y se colocó 50 μL de una suspensión de conidios, cuya concentración fue de 1×10^6 conidios mL^{-1} . El portaobjetos se colocó sobre un disco de papel filtro humedecido dentro de una caja Petri y se incubó a 28 °C durante 24 h. Los conidios se consideraron como germinados si el tubo germinativo era mayor al diámetro del propio conidio (Safavi *et al.*, 2007). Los conidios aquí evaluados se utilizaron para la prueba del bioensayo.

Tasa de crecimiento radial (V) y producción de conidios (ρ)

Cada cepa se sembró por picadura en el centro de cajas petri de 49 mm de diámetro con 10 mL de medio SMAYO, empleando

the conidia of the wild strain were exposed to ultraviolet light ($350 \mu\text{W}/\text{cm}^{-2}$) until obtaining a survival percentage of between 50 and 10 % and the mutants were recovered in medium with chitin and 2 deoxy-D-glucose (0.2 or 0.5 g L^{-1}). These mutants and the wild strain were reactivated by passing over larvae of *T. molitor* to recover the characteristics of virulence (Safavi *et al.*, 2007). The conidia from insects showing mycoses were sown in maltose agar medium Sabouraud (AMS) plus sodium deoxycolate at 0.05 % (Sigma, Mexico) with the purpose of recovering compact colonies (Goerrel and Inglis, 1997). From this culture, independent colonies were propagated in maltose agar medium Sabouraud at 2 %, plus a supplement of yeast extract (0.5%) and pulverized oats (1.5 %) (SMAYO medium) for 10 d at 28 °C. The conidia produced in this medium were used for the subsequent tests.

Molecular identification by means of genes of DNAr

For the extraction of genomic DNA from the wild strain (88), a purification kit of Wizard® Genomic Promega (Cat. A1120) was used. The amplification of the fragment of ITS by PCR was carried out with the primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3') and ITS4b (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), using 30 cycles of denaturalization (94 °C for 45 s), annealing (55 °C for 1 min) and polymerization (72 °C for 45 s). The primers were designed from the conserved sequences 18S-DNAr and 28S-DNAr in fungi (White *et al.*, 1990). The nucleotide sequences of the amplified fragments were compared with the sequences already published in the data base of the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Germination test (G)

The percentage of germinated conidia was determined following the methodology described by Goettel and Inglis *et al.* (1997). Over a slide, under conditions of asepsis, a drop was placed of a solution of agar-agar at 1.5 %. It was left to cool, then 50 μL of a suspension of conidia was placed, whose concentration was 1×10^6 conidia mL^{-1} . The slide was placed over a disc of moistened filter paper within a Petri dish and was incubated at 28 °C during 24 h. The conidia were considered germinated if the germinative tube was larger than the diameter of the conidium (Safavi *et al.*, 2007). The same conidia batches were evaluated in the bioassay with insects.

Radial growth rate (V) and production of conidia (ρ)

Each strain was inoculated by puncture in the center of Petri dishes of 49 mm diameter with 10 mL of SMAYO medium, employing a sterile wooden toothpick whose point was submerged

un palillo de madera estéril cuya punta se sumergió por 3 s en una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). Se aseguró que el palillo tocara el fondo de las cajas Petri (4 mm de profundidad). Se midió el crecimiento radial con un Vernier cada 24 h. Las mediciones se detuvieron cuando al menos una de las cepas le faltaba medio centímetro para llegar al borde de la caja. Se calculó la pendiente por regresión lineal, este valor se tomó como tasa de crecimiento radial (V_r), expresada en mm d^{-1} (Safavi *et al.*, 2007). La producción de conidios se midió al final del crecimiento radial. Se cortó con un tubo de ensayo (1 cm diámetro), tres fragmentos del hongo ya esporulado entre el centro y el borde de la colonia de cada cepa (Kamp and Bidochka, 2002). Se cosecharon los conidios usando Tween 80 al 0.05 % (v/v) en tubos Falcon de 15 ml. Se realizó el conteo al microscopio con la cámara de Neubauer, al final se reportó la densidad como conidios producidos cm^{-2} . Se realizaron cinco repeticiones (una caja fue una repetición) por cepa para evaluar ambas variables.

Cría de insectos y bioensayos

Se estableció una colonia de *T. molitor* en cajas de plástico rectangulares para los diferentes estadios de desarrollo. Los insectos se mantuvieron a temperatura ambiente, se les alimentó con una mezcla de avena y salvado de trigo (1:1), además se colocó un algodón húmedo estéril en cada caja.

Para las pruebas de virulencia se emplearon grupos de 10 larvas, melanizadas de un solo color y un tamaño de 2 cm de longitud, que fueron sumergidas en 30 mL de una suspensión con conidios de *B. bassiana* (1×10^8 conidios mL^{-1}) o solución de Tween 80 al 0.05 % (v/v) (Testigo) por 15 s (Safavi *et al.*, 2007). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Una vez que se infectaron los insectos, se agregó alimento estéril (avena/salvado de trigo 1:1) en cada caja Petri. Las cajas se incubaron a 28 ± 1 °C con un fotoperiodo de 12:12 h en contenedores de plástico transparente con papel filtro húmedo. La mortalidad se registró diariamente y los insectos muertos se colocaron en cámaras húmedas para promover el crecimiento del hongo, confirmando que la muerte fue ocasionada por la infección de *B. bassiana*. Al final del bioensayo se evaluó el tiempo de inicio de muerte (t_0 , d) (Gupta *et al.*, 1994), el tiempo para alcanzar 50 % de mortalidad (TL_{50} , d), la velocidad específica de muerte (k , d^{-1}) y la mortalidad máxima acumulada (M , %); que se calcularon con el ajuste de los datos al siguiente modelo de decaimiento exponencial:

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S, \quad \text{si } t > t_0$$

$$Y = 100 \%, \quad \text{si } 0 \leq t \leq t_0$$

for 3 s in a suspension of 1×10^6 conidia mL^{-1} (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). It was assured that the toothpick touched the bottom of the Petri dishes (4 mm depth). Radial growth was measured every 24 h with a Vernier. The measurements were finished when at least one of the strains was half a centimeter from the edge of the dish. The slope was calculated by linear regression, this value was taken as radial growth rate (V_r), expressed in mm d^{-1} (Safavi *et al.*, 2007). The production of conidia was measured at the end of the radial growth. A test tube (1 cm diameter) was used to cut three fragments of the sporulated fungus between the center and the edge of the colony of each strain (Kamp and Bidochka, 2002). The conidia were harvested using Tween 80 at 0.05 % (v/v) in Falcon tubes of 15 ml. The microscope count was made with the Neubauer camera, at the end density was reported as conidia produced cm^{-2} . Five replicates were carried out (one dish was one replicate) per strain to evaluate both variables.

Insect breeding and bioassays

A colony of *T. molitor* was established in rectangular plastic cases for the different stages of development. The insects were maintained at room temperature, and were fed with a mixture of oats and wheat bran (1:1), also a moistened sterile cotton was placed in each case.

For the virulence tests groups of 10 larvae were used, melanized of a single color and a size of 2 cm in length, which were submerged in 30 mL of a suspension with conidia of *B. bassiana* (1×10^8 conidia mL^{-1}) or Tween 80 solution at 0.05 % (v/v) (Control) for 15 s (Safavi *et al.*, 2007). Five replicates were carried out per treatment. Once the insects had been infected, sterile feed was added (oats/wheat bran 1:1) in each Petri dish. The dishes were incubated at 28 ± 1 °C with a photoperiod of 12:12 h in transparent plastic containers with moistened filter paper. Mortality was registered daily and the dead insects were placed in wet chambers to promote fungal growth, confirming that death was caused by infection with *B. bassiana*. At the end of the bioassay, evaluation was made of time of onset of death (t_0 , d) (Gupta *et al.*, 1994), the time for reaching 50 % of mortality (LT_{50} , D), specific rate of death (k , d^{-1}) and accumulated maximum mortality (M %); which were calculated with the fitting of the data to the following model of exponential decline:

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S, \quad \text{si } t > t_0$$

$$Y = 100 \%, \quad \text{si } 0 \leq t \leq t_0$$

where Y is the percentage of survival at time t and S is the level of estimated asymptotic survival (%); $Y \rightarrow S$, for $t \rightarrow \infty$ (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

donde, Y es el porcentaje de sobrevivencia al tiempo t y S el nivel de sobrevivencia asintótica estimada (%); $Y \rightarrow S$, para $t \rightarrow \infty$ (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

Producción de conidios sobre cadáveres de *T. molitor* (Φ)

En cadáveres micosados, con 12 d de haber sido infectados con el hongo, se midió la producción de conidios. Se seleccionaron al azar cuatro cadáveres de *T. monitor*, se llevaron a un volumen de 10 mL de Tween 80 al 0.05 % y se agitó por 5 min con una barra magnética (Tefera y Pringle, 2003). En esta suspensión se realizó el conteo en cámara de Neubauer y se reportó el promedio (conidios producidos larva⁻¹) y la desviación estándar (SD) de estas observaciones.

Análisis de datos

Los resultados se expresaron como valores promedios \pm SD. Con los datos se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para las medias. Para determinar la correlación de las variables se usó un análisis de correlación simple (Pearson) y un método de estadística multivariable de Análisis de Componentes Principales (ACP), en el cual se transforman las variables originales (conjunto de variables) en componentes principales (variables sintéticas) que son funciones lineales de las primeras (Ramette, 2007). El primer CP (CP1) representa la mayor porción de variabilidad de los datos y sucesivamente los componentes restantes (CP2, CP3, etc.), la mayor porción de variabilidad remanente. El programa para analizar los datos fue el SPSS versión 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular

La cepa silvestre (88) fue proporcionada por el Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Esta cepa fue aislada originalmente del insecto *Hypothenemus hampei* en una finca de café ubicada en el sureste del estado de Oaxaca. Se planteó su identificación molecular a nivel de especie, debido a que sólo había sido caracterizada a nivel morfológico. El producto de amplificación de ITS fue de 596 pb. Después se realizó la comparación de las secuencias homólogas de la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se obtuvo un porcentaje de similitud de más del 99 % con *Cordyceps bassiana* y *B. bassiana* (número de acceso GenBank es HM189220). Con

Production of conidia over cadavers of *T. molitor* (Φ)

In mycosed cadavers, to those with 12 d of having been infected with the fungus, conidia production was measured. Four cadavers of *T. monitor* were randomly selected, taken to a volume of 10 mL of Tween 80 at 0.05 % and agitated for 5 min with a magnetic rod (Tefera and Pringle, 2003). In this suspension, the count in Neubauer camera was made and the average was reported (conidia produced larva⁻¹) along with the standard deviation (SD) of these observations.

Data analysis

The results were expressed as average values \pm SD. An analysis of variance was made (ANDEVA) along with a Tukey test ($p \leq 0.05$) for the means. To determine the correlation of the variables, an analysis of simple correlation (Pearson) was used, as well as a method of multivariable statistics of Principal Components Analysis (PCA), in which the original variables (set of variables) are transformed into principal components (synthetic variables) which are linear functions of the first (Ramette, 2007). The first CP (CP1) represents the largest portion of the variability of the data and successively the remaining components (CP2, CP3, etc., the highest portion of variability remaining). The program for analyzing the data was the SPSS version 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular identification

The wild strain (88) was provided by the Laboratorio de Patología de Insectos of the Instituto de Fitosanidad of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. This strain was originally isolated from the insect *Hypothenemus hampei* in a coffee plantation located in the southwestern portion of the state of Oaxaca. Its molecular identification was stated at the species level, as it had only been characterized at the morphological level. The product of amplification of ITS was of 596 pb. Later, the comparison of the homologous sequences was made from the data base BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and a percentage of similarity of more than 99 % was obtained with *Cordyceps bassiana* and *B. bassiana* (GenBank access number is HM189220). Based on this comparison, the strains of study were considered as *B. bassiana*, which is the asexual stage of *Cordyceps bassiana* (Cho *et al.*, 2006).

base en esta comparación, se consideró a las cepas de estudio como *B. bassiana*, que es la fase asexual de *Cordyceps bassiana* (Cho *et al.*, 2006).

Caracterización fenotípica de cepas de *B. bassiana*

Las características fisiológicas evaluadas de la cepa silvestre y las mutantes se resumen en el Cuadro 1. Estos fenotipos evaluados se reconocen como factores de virulencia en *B. bassiana* (Feng y Johnson, 1990; Posada y Vega, 2005; Safavi *et al.*, 2007). De acuerdo con el protocolo de mutagénesis utilizado por Robledo-Monterrubio *et al.* (2009), se seleccionaron sólo aquellas mutantes que no perdieron significativamente la capacidad de esporulación, secreción de enzimas hidrolíticas y con una tasa de crecimiento igual o mayor a la cepa silvestre. Como se observa en el Cuadro 1, las mutantes mostraron fenotipos diversos en las variables medidas derivadas de la estrategia de selección.

La germinación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre cepas. Esta variable se incrementó sólo en la cepa 881.2 (98.4 %), mientras que las cepas 882.2 (85.10 ± 3.8 %), 885.5 (88.8 ± 4.6 %) y 887.5 (89.1 ± 2.7 %) mostraron un porcentaje de germinación similar a la cepa silvestre (90.2 %). Las mutantes 882.5 (78.80 ± 2.4 %) y 884.5 (57.34 ± 4.1 %) mostraron los valores menores. Es importante señalar que el método de mutación fue al azar como ya se mencionó, por lo cual se esperaba una variación en estas variables medidas (Cuadro 1). La germinación en hongos entomopatógenos comúnmente se evalúa a las 24 h

Phenotype characterization of strains of *B. bassiana*

The physiological characteristics evaluated in the wild strain and the mutants are summed in Table 1. These evaluated phenotypes are recognized as factors of virulence in *B. bassiana* (Feng and Johnson, 1990; Posada and Vega, 2005; Safavi *et al.*, 2007). According to the protocol of mutagenesis used by Robledo-Monterrubio *et al.* (2009), selected mutants did not significantly lose capacity of sporulation nor secretion of hydrolytic enzymes, and showed a growth rate equal to or greater than the wild strain. As shown in Table 1, the mutants presented diverse phenotypes in the measured variables derived from the selection strategy.

Germination showed statistically significant differences ($p \leq 0.05$) among strains. This variable increased only in strain 881.2 (98.4 %), while the strains 882.2 (85.10 ± 3.8 %), 885.5 (88.8 ± 4.6 %) and 887.5 (89.1 ± 2.7 %) showed a percentage of germination similar to the wild strain (90.2 %). The mutants 882.5 and 884.5 presented the lowest values 78.80 ± 2.4 % and 57.34 ± 4.1 %. It is important to point out that the mutation method was at random as was previously mentioned, thus a variation would be expected in these measured variables (Table 1). Germination in entomopathogenic fungi is commonly evaluated at 24 h (Goettel and Inglis, 1997), but Posada and Vega (2005) recommend evaluating germination from 12 to 72 h, because this variable is affected by the culture medium used during the test, as well as by the physiological characteristics of the inoculum. The evaluation in

**Cuadro 1. Resumen de las variables fenotípicas de *Beauveria bassiana* y mutantes resistentes a 2-desoxi-D-glucosa¹.
Table 1. Summary of the phenotypic variables of *Beauveria bassiana* and mutants resistant to 2-deoxy-D-glucose¹.**

Cepa	G (%)	V_r (mm d ⁻¹)	ρ (conidios $\times 10^7$ cm ⁻²)	Φ (conidios $\times 10^7$ larva ⁻¹)
88	90.2 \pm 3.1 cd	1.98 \pm 0.06 a	15.35 \pm 2.03 ab	3.13 \pm 0.62 a
881.2	98.40 \pm 4.7 d	2.43 \pm 0.03 e	75.6 \pm 5.50 e	2.44 \pm 0.37 a
882.2	85.10 \pm 3.8 bc	2.31 \pm 0.05cd	4.27 \pm 0.63a	12.75 \pm 2.38 b
882.5	78.80 \pm 2.4 b	2.23 \pm 0.01bc	34.7 \pm 4.71c	26.54 \pm 5.91 c
884.5	57.34 \pm 4.1 a	2.14 \pm 0.02 b	16.44 \pm 1.83 b	6.19 \pm 2.00 ab
885.5	88.8 \pm 4.6 bcd	2.38 \pm 0.02 de	22.3 \pm 1.75b	1.75 \pm 0.27 a
887.5	89.1 \pm 2.7 bcd	2.40 \pm 0.05 de	60.58 \pm 7.49 d	4.33 \pm 0.75 a

¹G: germinación; V_r : tasa de crecimiento radial; ρ : densidad superficial de conidios; Φ : densidad conidios por insecto. Las letras distinguen los grupos con diferencias significativas en cada columna ($p \leq 0.05$) ♦ G: germination; V_r : radial growth rate; ρ : superficial density of conidia; Φ : density of conidia per insect. The letters distinguish the groups with significant differences in each column ($p \leq 0.05$).

(Goettel e Inglis, 1997), pero Posada y Vega (2005) recomiendan evaluar la germinación de 12 a 72 h porque esta variable se afecta por el medio de cultivo usado durante la prueba, así como también de las características fisiológicas del inóculo. La evaluación en este lapso de tiempo permite tener una mejor idea del potencial del patógeno para las pruebas de virulencia posterior (Posada y Vega, 2005). Al seleccionar aislados con una rápida germinación aumenta la probabilidad de éxito en campo; en contraste, los aislados con una lenta germinación son más sensibles a las variaciones ambientales. La velocidad de germinación es una de las determinantes de virulencia más reportada (Shah *et al.*, 2005).

La V_r también mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre las cepas evaluadas, con un intervalo de 1.98 mm d^{-1} (88) a 2.43 mm d^{-1} (881.2) (Cuadro 1). Todas las mutantes seleccionadas mostraron un crecimiento radial superior a la cepa silvestre, aun cuando los valores obtenidos en el presente estudio son inferiores a lo reportado por Safavi *et al.* (2007). Es importante considerar que la tasa de crecimiento radial es una variable que depende de diversos factores, por ejemplo, el tipo de cepa utilizada, la naturaleza del sustrato donde crece el hongo, la relación C/N del sustrato usado, entre otros factores (Shah *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007). La tasa de crecimiento radial es un indicativo de la capacidad del hongo para invadir los sustratos donde crece, pero también se relaciona con su capacidad para crecer sobre la cutícula, como estrategia competitiva contra otros microorganismos durante el ciclo saprobio, lo que acelera la infección del hospedero (Varela y Morales, 1996).

La densidad superficial de conidios de *B. bassiana* de igual manera mostró diferencias estadísticas significativas entre cepas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 1). La mutante 881.2 ($75.6 \pm 5.5 \times 10^7$ conidios cm^{-2}) alcanzó la mayor producción de conidios, mientras que la cepa silvestre ($15.35 \pm 2.03 \times 10^7$ conidios cm^{-2}) y la cepa 882.2 ($4.27 \pm 0.63 \times 10^7$ conidios cm^{-2}) mostraron entre 80 % y 94 % menor producción, en comparación a la cepa 881.2. El proceso de mutagénesis en *B. bassiana* afectó de manera distinta las variables fisiológicas analizadas. Considerando la producción de conidios cm^{-2} para la cepa 881.2, con un tiempo de cosecha de 10 d de cultivo, ésta fue 78 veces superior a lo reportado por Kamp y Bidochka (2002), utilizando medio SDA al 4 % y un tiempo de incubación

this time lapse makes it possible to have a better idea of the potential of the pathogen for later virulence tests (Posada and Vega, 2005). By selecting isolates with rapid germination, there is greater likelihood of success in the field; in contrast, the isolates with slow germination are more sensitive to environmental variations. Germination speed is one of the most frequently reported determinants of virulence (Shah *et al.*, 2005).

The V_r also showed statistically significant differences ($p \leq 0.05$) among the strains evaluated, with an interval of 1.98 mm d^{-1} (88) to 2.43 mm d^{-1} (881.2) (Table 1). All of the mutants selected showed a radial growth superior to the wild strain, even when the values obtained in the present study are lower than those reported by Safavi *et al.* (2007); it is important to consider that radial growth rate is a variable that depends on diverse factors, for example, the type of strain used, the nature of the substrate where the fungus grows, the C/N ratio of the substrate used, among other factors (Shah *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007). Radial growth rate is an indicator of the capacity of the fungus to invade the substrate where it grows, but it is also related with its capacity to grow over the cuticle, as a competitive strategy against other microorganisms during the saprobes cycle, which accelerates the infection of the host (Varela and Morales, 1996).

The superficial density of conidia of *B. bassiana* also showed statistically significant differences among strains ($p \leq 0.05$) (Table 1). The mutant 881.2 reached the highest production of conidia ($75.6 \pm 5.5 \times 10^7$ conidia cm^{-2}), while the wild strain ($15.35 \pm 2.03 \times 10^7$ conidia cm^{-2}) and the strain 882.2 ($4.27 \pm 0.63 \times 10^7$ conidia cm^{-2}) showed between 80 % and 94 % lower production, compared with strain 881.2. The process of mutagenesis in *B. bassiana* affected differently the physiological variables analyzed. Considering the production of conidia cm^{-2} for the strain 881.2, with a harvest time of 10 d of culture, this was 78 times higher than that reported by Kamp and Bidochka (2002), using SDA medium at 4 % and incubation time of 15 d. The conidia are the infective units of the entomopathogenic fungi and the study of their production is essential during the commercial or laboratory practices.

The determination of the amount of conidia of *B. bassiana* produced in the dead insects of *T. molitor* was carried out 12 d of postmortem incubation (Table 1)

de 15 d. Los conidios son las unidades infectivas de los HE y el estudio de su producción es esencial durante las prácticas comerciales o de laboratorio.

La determinación de la cantidad de conidios de *B. bassiana* producidos en los insectos muertos de *T. molitor* se realizó a los 12 d de incubación postmuerte (Cuadro 1) para asegurar que el hongo completara su ciclo de vida saprobio (Posada y Vega, 2005). Esta variable mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) con valores de 1.75×10^7 (885.5) a 26.54×10^7 (882.5) conidios por larva. De manera específica, la cepa 882.5 tuvo una producción de más de ocho veces superior a la cepa 88. La capacidad de esporulación del hongo sobre su hospedero es fundamental para diseminar la enfermedad en condiciones de campo, pues permite reinfecciones a partir de insectos muertos. Además, al pasar por el insecto, se mantiene la virulencia del HE. Esta capacidad de esporulación *in vivo* también se considera como criterio durante la selección de aislados más virulentos (Posada y Vega, 2005; Pava-Ripoll *et al.*, 2008).

Bioensayos de virulencia en larvas de *T. molitor*

El Cuadro 2 muestra los parámetros de virulencia obtenidos para las cepas de *B. bassiana* evaluados, utilizando larvas de *T. molitor* como hospedero. El TL_{50} mostró diferencias estadísticas significativas entre cepas ($p \leq 0.05$). Las mutantes 882.5 y 881.2 tuvieron el TL_{50} menor, 5.6 ± 0.34 d y 5.72 ± 0.41 d. En contraste, la cepa 884.5 no alcanzó el 50 % de mortalidad aun después de los 12 d postinfección. Estos valores de TL_{50} obtenidos para la cepa silvestre

to insure that the fungus completed its saprobe life cycle (Posada and Vega, 2005). This variable showed significant statistical differences ($p \leq 0.05$) with values of 1.75×10^7 (885.5) to 26.54×10^7 (882.5) conidia per larva. Specifically, strain 882.5 had a production more than eight times higher than strain 88. The sporulation capacity of the fungus over its host is fundamental for disseminating the disease under field conditions, as it permits reinfections from dead insects. Furthermore, by passing through the insect, the virulence of the EF is maintained. This *in vivo* sporulation capacity is also considered as criteria during the selection of more virulent isolates (Posada and Vega, 2005; Pava-Ripoll *et al.*, 2008).

Bioassays of virulence in larvae of *T. molitor*

Table 2 shows the parameters of virulence obtained for the strains of *B. bassiana* evaluated, using larvae of *T. molitor* as host. The LT_{50} showed statistically significant differences among strains ($p \leq 0.05$). The mutants 882.5 and 881.2 had the lowest LT_{50} , 5.6 ± 0.34 d and 5.72 ± 0.41 d. In contrast, strain 884.5 did not reach 50 % mortality even after the 12 d postinfection. These values of LT_{50} obtained for the wild strain and mutant 882.5 are similar to what was reported by Rodríguez-Gómez *et al.* (2009). In this sense, Safavi *et al.* (2007) show values of LT_{50} between 3.05 and 8.86 d for *B. bassiana* using larvae of *T. molitor* as host. However these authors varied some conditions; for example, the immersion time of the insects in the conidia suspension was double (30s), and also the insects were maintained

Cuadro 2. Parámetros de virulencia de las cepas de *Beauveria bassiana* contra larvas de *Tenebrio molitor*[§].

Table 2. Parameters of virulence of the strains of *Beauveria bassiana* against larvae of *Tenebrio molitor*[§].

Cepa	TL_{50} (d)	t_0 (d)	k (d ⁻¹)	M (%)
88	6.75 ± 0.25 b	5.34 ± 0.22 b	0.66 ± 0.06 ab	65.84 ± 5.15 b
881.2	5.72 ± 0.41 a	4.36 ± 0.63 a	0.87 ± 0.15 b	96.93 ± 3.5 d
882.2	6.15 ± 0.54 ab	4.82 ± 0.45 ab	0.6 ± 0.16 ab	86.52 ± 3.8 c
882.5	5.6 ± 0.34 a	4.72 ± 0.24 ab	0.74 ± 0.1 ab	97.84 ± 4.1 d
884.5	ND	7.06 ± 0.92 c	0.61 ± 0.15 ab	44.45 ± 6 a
885.5	7.04 ± 0.52 b	4.97 ± 0.08 ab	0.9 ± 0.13 b	60.74 ± 2.8 b
887.5	6.34 ± 0.39 ab	4.57 ± 0.14 ab	0.53 ± 0.16 a	80.5 ± 4.4 c

[§] TL_{50} : tiempo letal 50 (d); t_0 : tiempo de inicio de muerte de los insectos; k : velocidad específica de muerte (d⁻¹); M: mortalidad máxima (%) alcanzada a los 12 d. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias en cada columna ($p \leq 0.05$). \clubsuit LT_{50} : lethal time 50 (d); t_0 : time of onset of death of the insects; k : specific rate of death (d⁻¹); M: maximum mortality (%) reached at 12 d. Letters distinguish the groups that resulted from the means test in each column ($p \leq 0.05$).

y 882.5 son similares a lo reportado por Rodríguez-Gómez *et al.* (2009). En este sentido, Safavi *et al.* (2007) muestran valores de TL_{50} entre 3.05 y 8.86 d para *B. bassiana* utilizando larvas de *T. molitor* como hospedero. Sin embargo, estos autores variaron algunas condiciones, por ejemplo, el tiempo de inmersión de los insectos en la suspensión de conidios fue el doble (30 s), y además los insectos se mantuvieron sin alimento durante el bioensayo. Según Siva-Jonhy y Thomson (2002), la privación nutricional tiene implicaciones en la modulación del sistema inmune en *T. molitor*, haciéndolos más susceptible a la infección por *B. bassiana*, lo que repercute en la interpretación o comparación de variables de virulencia.

Con el propósito de mejorar la virulencia de algunos HE se ha recurrido a la incorporación de genes de enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de infección. Por ejemplo, la expresión constitutiva de la proteasa *Pr1A* en *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin resultó en una disminución de 25 % en el TL_{50} sobre larvas de *Manduca sexta* (St Leger *et al.*, 1996). Del mismo modo, con la sobreexpresión de un gen de quitinasa (*Bb chit1-Bm Ch BD*) en cepas de *B. bassiana* se logró reducir el TL_{50} hasta en 23 % (Fan *et al.*, 2007). Fang *et al.* (2009) reportan que la sobreexpresión en forma combinada de estos genes (*Bbchit1* y *cdep1*) en *B. bassiana* 0062, lograron reducir el TL_{50} en 24.9 %. En el presente estudio, mediante otra estrategia de mejoramiento (genética clásica), el TL_{50} disminuyó en 16 % y 17 % para las mutantes 881.2 y 882.5, en comparación a la cepa silvestre (Cuadro 2). Además, el porcentaje de mortalidad máxima acumulada (M) de las cepas analizadas aumentó en 47 % y 49 % para las cepas 881.2 (96.93 ± 3.5 %) y 882.5 (97.84 ± 4.1 %) en comparación con la silvestre (65.84 ± 5.15 %). Es importante mencionar que en México no está permitido la liberación de organismos transgénicos (Reglamento de la Ley de Bioseguridad, 2008); sin embargo, las cepas mejoradas por radiación uv no tienen esta limitante.

En relación a la variable t_0 , los valores obtenidos muestran una estrecha relación con el TL_{50} ($r=0.967$; $p \leq 0.05$). Las cepas más infectivas requieren un tiempo menor para iniciar la muerte de los insectos (Cuadro 2, Figura 2). Este fenómeno (etapa temprana de infección) se explica en parte por la modificación de las variables de crecimiento, así como por la alteración en la secreción de enzimas para hidrolizar la cutícula de *T. molitor* (Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

without food during the bioassay. According to Siva-Jonhy and Thompson (2002), nutritional privation has implications in the modulation of the immune system in *T. molitor*, making them more susceptible to infection by *B. bassiana*, which has repercussions in the interpretation or comparison of variables of virulence.

With the purpose of improving virulence of some entomopathogenic fungi, genes of hydrolytic enzymes have been overexpressed, since those enzymes participate in the infection process. For example, the constitutive expression of the protease *Pr1A* in *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin resulted in a decrease of 25 % in the LT_{50} over larvae of *Manduca sexta* (St Leger *et al.*, 1996). Similarly, with the overexpression of chitinase genes (*Bbchit1-BmChBD*) in strains of *B. bassiana*, it was possible to reduce LT_{50} by as much as 23 % (Fan *et al.*, 2007). Fang *et al.* (2009) report that with the combined overexpression of these genes (*Bbchit1* and *cdep1*) in *B. bassiana* 0062, LT_{50} reduced by 24.9 %. In the present study, by means of another improvement strategy (classical genetics), LT_{50} decreased by 16 % and 17 % for the mutants 881.2 and 882.5, compared to the wild strain (Table 2). Furthermore, the accumulated maximum mortality percentage (M) of the strains analyzed increased by 47 % and 49 % for strains 881.2 (96.93 ± 3.5 %) and 882.5 (97.84 ± 4.1 %), compared with the wild strain (65.84 ± 5.15 %). It is important to mention that in México the release of transgenic organisms is not permitted (Reglamento de la Ley de Bioseguridad, 2008); however, the strains improved by uv radiation do not have this limitation.

With respect to the variable t_0 , the values obtained show a close relationship with LT_{50} ($r=0.967$; $p \leq 0.05$). The most infective strains require less time to initiate the death of the insects (Table 2, Figures 2). This phenomenon (early stage of infection) is explained partially by the modification of the growth variables, as well as the alteration in the secretion of enzymes for hydrolyzing the cuticle of *T. molitor* (Montesinos-Matías *et al.*, 2011). In the case of the specific rate of death (k), the estimated values showed significant differences ($p \leq 0.05$) (Table 2).

Analysis of correlation of variables of growth and virulence

Figure 1 shows the simple correlation (Pearson) of each pair of variables evaluated, making emphasis

En el caso de la velocidad específica de muerte (k), los valores estimados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Análisis de correlación de variables de crecimiento y virulencia

La Figura 1 muestra la correlación simple (Pearson) de cada par de variable evaluada, haciendo énfasis en fenotipos de crecimiento y variables de virulencia. Al considerar los fenotipos evaluados previos al bioensayo, el porcentaje de germinación (G) tuvo la mejor correlación con las variables de virulencia t_0 ($r = -0.879$; $p \leq 0.05$), TL_{50} ($r = -0.869$; $p \leq 0.05$) y M ($r = 0.589$; $p = 0.1$).

Posteriormente, para englobar todas las variables evaluadas en un análisis de correlación se usó el método ACP. El análisis indicó que 84.24 % de la variabilidad se puede explicar por tres componentes: CP1 (53.92 %), CP2 (19.22 %) y CP3 (11.08 %). El diagrama generado mediante ACP (Figura 2) muestra a los grupos de variables que denotan correlación positiva entre ellas, por ejemplo, k , ρ , V_r y G; o entre el TL_{50} y t_0 . La velocidad específica de muerte (k) mostró una fuerte correlación con las variables de crecimiento V_r , G y ρ , evaluadas previo al bioensayo de virulencia.

La Figura 2 muestra la distribución de cada cepa (●) en el plano cartesiano y la variable que mejor la caracteriza, por ejemplo, la cepa 881.2 sobresale en los parámetros k , ρ , V_r y G. Con base en esta herramienta de análisis, las mutantes 881.2 y 882.5 resistentes a 2DG son promisorias como agentes de control biológico, debido a que muestran características mejoradas en variables de crecimiento y de virulencia (Figura 2). El ACP se ha empleado en ecología microbiana como herramienta de análisis a diversos conjuntos de datos de fenotipos y genotipos, y es uno de los análisis exploratorios más usados (Ramette, 2007).

Esta correlación positiva, entre algunos fenotipos de crecimiento y la mayor virulencia en HE, coincide con algunos reportes previos (Varela y Morales, 1996; Altre *et al.*, 1999; Safavi *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio se usó como primer criterio la resistencia a 2DG para la selección de mutantes, puesto que en otros hongos filamentosos ya se ha descrito que la resistencia a 2DG se asocia con la desrepresión de enzimas hidrolíticas, alteración de los patrones de

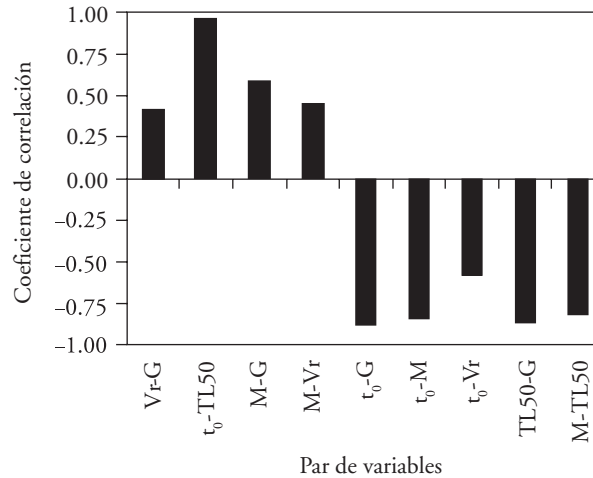


Figura 1. Resultados del análisis de correlación de Pearson de cada par de variables evaluadas.

Figure 1. Results of analysis of Pearson correlation of each pair of variables evaluated.

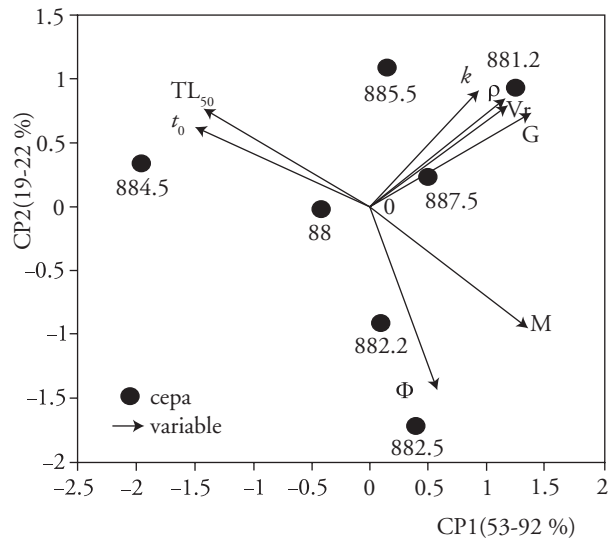


Figura 2. Análisis de componentes principales (CP1 vs CP2; 73.15 % de varianza explicada acumulada) de las variables de crecimiento y virulencia evaluadas en cepas de *Beauveria bassiana*.

Figure 2. Analysis of principal components (CP1 vs CP2; 73.15 % of accumulated variance explained) of the variables of growth and virulence evaluated in strains of *Beauveria bassiana*.

on growth phenotypes and variables of virulence. When considering the phenotypes evaluated prior to the bioassay, the percentage of germination (G) had the best correlation with the variables of virulence t_0 ($r = -0.879$; $p \leq 0.05$), LT_{50} ($r = -0.869$; $p \leq 0.05$) and M ($r = 0.589$; $p = 0.1$).

esporulación y crecimiento radial, y de algunos metabolitos de interés industrial (Minjares-Carranco *et al.*, 1997). Los mecanismos de resistencia a 2DG se relacionan con la sobreexpresión de enzimas quinasas y fosforilasas, que a su vez participan en diversas rutas de transducción de señales (Randez-Gil *et al.*, 1995). *Beauveria bassiana* es el único HE en el que se ha probado esta estrategia de mejoramiento de cepas (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

Los factores de virulencia individuales se han descrito para diversos HE; sin embargo, como sucede con otros hongos, *B. bassiana* emplea múltiples mecanismos de acción durante el proceso de infección en su hospedero, muchos de los cuales no están aun dilucidados, en particular a nivel molecular (Cho *et al.*, 2006). Esta es la primera vez que se sigue esta estrategia, análisis de fenotipos propuestos, como herramienta para analizar y seleccionar mutantes superiores en parámetros como la rapidez en que muere el insecto, lo que las hace candidatas para utilizarse en programas de control biológico.

CONCLUSIONES

Después del análisis de fenotipos propuestos, el uso de la resistencia a 2DG como criterio de selección de mutantes permitió identificar a las mutantes 881.2 y 882.5 como las más agresivas. Las variables de crecimiento G y V_r se correlacionaron mejor con los parámetros de virulencia t_0 , TL_{50} y M. La afirmación previa fue corroborada mediante un ACP y coeficientes de regresión simple. Este trabajo contribuye con un método de análisis y selección de cepas mejoradas, aplicable a HE, basado en características fisiológicas y de virulencia. Lo anterior tiene impacto en programas de control biológico, con énfasis en un uso más eficiente del tiempo, trabajo y recursos disponibles.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a R. Montesinos Matías (Reg. No. 202363) y por el proyecto de Ciencia Básica 152420-z, a la UAM-Iztapalapa (DCBS) y a la Red Promep por el financiamiento conjunto para esta investigación”.

LITERATURA CITADA

Altre, J. A., J. D. Vandenberg, and F. A. Cantone. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback

Afterwards, to include all of the variables evaluated in an analysis of correlation, the PCA method was used. The analysis indicated that 84.24 % of the variability can be explained by three components: CP1 (53.92 %), CP2 (19.22 %) and CP3 (11.08 %). The diagram generated by PCA (Figure 2) shows the groups of variables that denote positive correlation among each other, for example, k , ρ , V_r and G; or between LT_{50} and t_0 . The specific rate of death (k) showed a strong correlation with the growth variables V_r , G and ρ , evaluated prior to the bioassay of virulence.

Figure 2 shows the distribution of each strain (●) in the Cartesian plot and the variable that best characterizes it, for example, strain 881.2 is outstanding in parameters k , ρ , V_r and G. Based on this analysis tool, the mutants 881.2 and 882.5 resistant to 2DG are promising as biological control agents, as they present improved characteristics in growth variables and of virulence (Figure 2). The PCA has been employed in microbial ecology as a tool of analysis of diverse sets of data of phenotypes and genotypes, and is one of the most widely used exploratory analyses (Ramette, 2007).

This positive correlation, between some growth phenotypes and higher virulence in EF, coincide with some reports (Varela and Morales, 1996; Altre *et al.*, 1999); Safavi *et al.*, 2007). However, in this study resistance to 2DG was used as first criteria for the selection of mutants, since in other filamentous fungi it has already been described that the resistance to 2DG is associated with the derepression of hydrolytic enzymes, alteration of the patterns of sporulation and radial growth, and of some metabolites of industrial interest (Minjares-Carranco *et al.*, 1997). The mechanisms of resistance to 2DG are related with the over-expression of kinase enzymes and phosphorylases, which in turn participate in diverse of signal transduction pathways (Randez-Gil *et al.*, 1995). *Beauveria bassiana* is the only EF in which this improvement strategy of strains has been tested (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

The individual factors of virulence have been described for diverse EF; however, as is the case with other fungi, *B. bassiana* employs multiple action mechanisms during the infection process in its host, many of which are still not elucidated, particularly at the molecular level (Cho *et al.*, 2006). This is the first time that this strategy is followed, including analysis of proposed phenotypes, as a tool for analyzing and

- Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332-338.
- Chan-Copul, W., E. Ruiz-Sánchez, J. Cristobal-Alejo, A. Pérez-Gutiérrez, R. Munguía-Rosales, and J. Lara-Reyna. 2010. *In vitro* development of four *Paecilomyces (Isaria) fumosoroseus* isolates and their pathogenicity on immature whitefly. *Agrociencia* 44(5): 587-597.
- Cho, E. M., L. Liu, W. Farmerie, and N. O. Keyhani. 2006. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, *in vitro* blastospores and submerged conidia. *Microbiology* 152: 2843-2854.
- De la Rosa, W., R. Alatorre-Rosas, J. Trujillo, and J. F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *J. Econ. Entomol.* 90 (9): 1534-1538.
- De la Rosa, W., R. Alatorre-Rosas, J. F. Barrera, and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera:Scolytidae) under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 90 (9): 1409-1414.
- De la Rosa, W., F. L. Lopez, and P. Liedo. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95 (1): 36-43.
- Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, M. J. Bidochka, and Y. Pei. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strain overexpressing and engineered chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1): 295-302
- Fang, W., B. Leng, Y. Xiao, K. Jin, J. Ma, Y. Fan, J. Feng, X. Yang, Y. Zhang, and Y. Pei. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1): 363-370.
- Fang, W., J. Feng, Y. Fan, Y. Zhang, M.J. Bidochka, R.J. St. Leger, and Y. Pei. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 102: 155-159.
- Feng, M. G., and J. B. Johnson. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 19 (3): 185-190.
- Flores, A. G., W. de la Rosa, J. C. Rojas, and A. E. Castro-Ramirez. 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (mitosporic) against species of the "White grub complex" in the south of Mexico. *Southwest. Entomol.* 27: 73-83.
- Glare, T. R., 2004. Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. *Mycology Series Vol. 21*. Arora, D. K. (ed). Edit Marcel Dekker Inc. New York, USA, 700 p.
- Goettel, M. S., and D. G. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In: Lacey, L. A. (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA, Academic Press, INC. pp: 213-249.
- Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. El-Sayed, and C. M. Ignoffo. 1994. Relationships among Enzyme Activities and Virulence Parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 13-17.
- Kamp, A. M., and M. J. Bidochka 2002. Conidium production selecting mutants which are superior in parameters such as speed in which the insect dies, which makes them candidates for being used in programs of biological control.

CONCLUSIONS

After the analysis of proposed phenotypes, the use of the resistance to 2DG as criteria for selection of mutants permitted the identification of strains 881.2 and 882.5 as the most aggressive mutants. The growth variables G and V_r correlated better with the parameters of virulence t_0 , LT_{50} and M. The previous affirmation was confirmed by means of a PCA and coefficients of simple regression. This work contributes with a method of analysis and selection of improves strains, applicable to entomopathogenic fungi, based on both physiological characteristics and virulence. The above has an impact on biological control programs, with emphasis on a more efficient use of time, labor and available resources.

—End of the English version—

-----*-----

- by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 74-77
- Khachatourians, G. G., and S. S. Qazi. 2008. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. *The Mycota VI. Human and Animal Relationships*. 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 33-53.
- Minjares-Carranco, A., B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar, and G. Viniegra-González. 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 25-31.
- Montesinos-Matías, R., G. Viniegra-González, R. Alatorre-Rosas, and O. Loera. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World J. Microb. Biot.* 27: 2095-2102.
- Pava-Ripoll, M., F. J. Posada, B. Momen, C. Wang, and R. J. St. Leger. 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 220-226.
- Posada, F. J., and F. E. Vega. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *J. Insect Sci.* 5 (37): 1-10
- Quesada-Moraga, E., E. A. A. Maranhao, P. Valverde-García, and C. Santiago-Alvarez. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and

- Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biol. Control* 36: 274-287.
- Ramette, A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 142-160.
- Randez-Gil, F., A. Blasco, J. A. Prieto, and P. Sanz. 1995. Title DOG^R1 and DOG^R2: Two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast* 11: 1233-1240.
- Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial, Viernes 19 de Marzo de 2008. Secretaría de Salud. México.
- Ritter, W., R. Garduño, S. Guzmán, H. Vanderwals, H. Ritter, N. Estrella, R. Luévano, G. Urban, N. Sánchez, T. Rodríguez, A. Tejada, R. Klimek, T. Perez, J. Suarez, A. Ramos, C. Corona, H. Nava, J. Jiménez, and S. Orozco. 2004. Agroecología vs. Biotecnología agrícola transgénica. *Ciencia y Mar* 23: 19-30.
- Robledo-Monterrubio, R., R. Alatorre-Rosas, G. Viniestra-Gonzalez, and O. Loera. 2009. Selection of Improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose Resistance and Physiological Analysis. *J. Invertebr. Pathol.* 101: 222-227.
- Rodríguez-Gómez, D., O. Loera, G. Saucedo-Castañeda, and G. Viniestra-González. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae of *Tenebrio molitor*. *World J. Microb. Biot.* 25: 513-518
- Roy, H. E., and J. K. Pell. 2000. Interactions between Entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. *Biocontrol Sci. Techn.* 10: 737-752.
- Safavi, S. A., F. A. Shah, A. K. Pakdel, G. R. Rasouljan, A. R. Bandani, and T. M. Butt. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 116-123.
- Samuels, K. D. Z., J. B. Heale, and M. Llewellyn. 1989. Characteristics Relating to the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 25-31.
- Shah, F. A., C. S. Wang, and T. B. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 259-266.
- Siva-Jonhy M. T., and J. J. W. Thompson. 2002. Short-term nutrient deprivation effects immune function. *Phys. Entomol.* 27: 206-212.
- St Leger, R. J., L. Joshi, M. J. Bidochka, and D. W. Roberts. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6349-6354.
- Talaei-Hassanloui, R., A. Kharazi-Pakdel, M. Goettel, and J. Mozaffari. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Sci. Techn.* 16(5): 525-534.
- Tefera, T., and K. L. Pringle. 2003. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* 84:90-95.
- Varela, A., and E. Morales. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 147-152.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *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, San Diego. Pp: 315-322
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Techn.* 17: 553-596.