



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas

*Metarhizium Sorokin genus and the microbial control of pests insects*

María Elena Márquez Gutiérrez<sup>1\*</sup>, Yohana Gato Cárdenas<sup>2</sup> y Andreas Lequerque<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

<sup>3</sup> Instituto de Microbiología y Bioquímica, Universidad de Geisenheim, Alemania

\* Autor para correspondencia:  
[maria.elena@rect.uh.cu](mailto:maria.elena@rect.uh.cu)

### RESUMEN

La aplicación de hongos entomopatógenos es una alternativa ecológica que contribuye a la protección del medio ambiente y el ecosistema. Este trabajo tiene como objetivo abordar algunos aspectos sobre la taxonomía, los métodos de identificación, caracterización, modo de acción, el rango de hospedantes y la influencia de factores ambientales en la efectividad biológica del género *Metarhizium*. Las técnicas de caracterización incluyen la morfología de las colonias, conidios, conidióforos y fiálides, el perfil de proteínas extracelulares, la determinación de sus características fisiológicas y la evaluación de su actividad patogénica mediante la determinación de los porcentajes de mortalidad, en función de concentraciones y tiempos letales. El uso de las técnicas moleculares resulta esencial en los estudios filogenéticos. La importancia del género *Metarhizium* como agente de control biológico de diferentes órdenes de insectos y otros artrópodos, está incrementándose en numerosos países y se encuentra insertado dentro de varios sistemas de manejo de plagas en Cuba.

**Palabras clave:** *Metarhizium*, control biológico, caracterización, taxonomía

### ABSTRACT

*The use of entomopathogenic fungi is an ecological alternative which contributes to the protection of the environment and the ecosystem. This paper deals on some aspects of the taxonomy, identification methods, characterization, action ways, host range and the influence on environmental factors in the biological effectiveness of Metarhizium genus. The characterization procedures includes the morphology of colonies, conidia, conidiophores and phialides, the profile of extracellular proteins, the determination of the physiological characteristics and the assessment of the pathogenic activity through the determination of mortality percentages according lethal concentrations and times. The use of molecular techniques is essential in the phylogenetical studies. The importance of Metarhizium as biological control agent of different orders of insects and others arthropods is increasing in several countries and it is included in various pest management systems in Cuba.*

**Keywords:** *Metarhizium*, biological control, characterization, taxonomy

Recibido: 2016-03-29

Aceptado: 2016-08-08

## INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) son considerados agentes de biocontrol efectivos, por su acción ante una amplia gama de organismos, el bajo impacto sobre el ambiente y la fauna benéfica (Roberts y St. Leger, 2004; Souza *et al.*, 2014). Se utilizan mundialmente para la prevención y el manejo de diversas plagas de interés agrícola (Bischoff *et al.*, 2009; Perinotto *et al.*, 2014).

Su distribución y abundancia en el ambiente se afectan en gran medida por varios factores abióticos y bióticos, tales como la temperatura, las radiaciones solares, la humedad relativa y el hospedante. Han sido aislados mayormente a partir de insectos, aunque pueden desarrollarse en la rizosfera de las plantas y en el suelo, donde actúan como saprófitos (Zimmermann, 2007). Tienen una temperatura óptima entre los 25 y 35°C, aunque crecen entre los 10 y 40°C. Hasta el momento sólo se conoce su reproducción asexual, sin embargo mediante estudios filogenéticos, se conoce que el estadio sexual pertenece al género *Metacordyceps* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Kepler y Rehner, 2013).

El género *Metarhizium* se conoce por ser parásito de insectos de diferentes órdenes (Roberts y St. Leger, 2004). Aunque existe variabilidad en cuanto al rango de hospedantes de las diferentes especies. *M. acridium* (Driver & Milner) J. F. Bisch., Rehner & Humber es específico para el orden Orthoptera (Fernandes *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ataca a un amplio grupo de insectos. Los aislados de *M. anisopliae* Metschnikoff (Sorokin) controlan especies de insectos y artrópodos plagas de diferentes órdenes, entre los cuales se encuentran Hemiptera, Heteroptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Orthoptera (Souza *et al.*, 2014), Diptera (Carolino *et al.*, 2014), Isoptera (Niassy *et al.*, 2013) y Acari (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El desarrollo de la micosis contiene diferentes pasos, cada uno con una importancia particular, colonizan al insecto por vía cutánea, para provocar su muerte y la posterior diseminación en el hábitat (Roberts y Humber, 1981). Debido a su fácil producción masiva, su modo de acción y actividad biológica se considera un género comercialmente atractivo, y existe un interés creciente en el uso de sus especies en programas de control biológico de plagas de importancia económica.

Este trabajo tiene como objetivo ofrecer una panorámica actual del género *Metarhizium* con énfasis en el control microbiano de insectos plagas, en su ocurrencia natural, rango de hospedantes y modo de acción, métodos de identificación y caracterización, y sus perspectivas de uso para el control biológico de plagas (Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011).

## DESARROLLO

### Distribución geográfica

El género *Metarhizium* tiene una amplia distribución geográfica (Hu y St. Leger, 2002). Robert y St. Leger (2004) plantearon que se ha aislado a partir de diferentes órdenes de insectos en áreas del mediterráneo o tropicales, y hasta cerca del círculo Antártico. Otros hábitats donde se han encontrado de manera natural son los quistes de nemátodos, como *Heterodera schachtii* Schmidt y *Globodera rostochiensis* Woll (Zimmermann, 2007).

*Metarhizium* spp. coloniza la rizosfera y se adhiere a la superficie de las raíces de las plantas por lo que puede tener una alta influencia como repelente de insectos de suelo en estos nichos ecológicos (Hu y St. Leger, 2002; St. Leger *et al.*, 2011). Estas especies tienen la capacidad de utilizar como fuentes de nutrientes los exudados vegetales (Kepler y Rehner, 2013). Otros resultados refieren cepas de *Metarhizium* con una asociación específica con diferentes especies de plantas, lo que sugiere su impacto en la competencia por la rizosfera, sobre la ecología de la planta, y en general, conducen a implicaciones co-evolutivas implícitas (St. Leger *et al.*, 2011).

Las especies de *M. anisopliae* y *M. robertsii* son patógenos de un amplio grupo de artrópodos (Garisto - Donzelli *et al.*, 2010; Ojeda-Chi *et al.*, 2011). *M. anisopliae* se ha aislado de sedimentos del río y material orgánico en descomposición. Se plantea que actúan como saprófitos en el suelo sin embargo, *M. robertsii* actúa como endófito y promotor del crecimiento vegetal (Zhao *et al.*, 2014).

### Efecto de factores bióticos y abióticos sobre *Metarhizium* y su relación en el control de insectos plaga

La principal ruta de infección en la mayoría de los insectos, ocurre por contacto directo con el hongo inoculado. El porcentaje de infección o mortalidad resultante está ampliamente influenciado por el estado

susceptible del hospedante, el método de aplicación y los factores ambientales como la temperatura, humedad, velocidad del viento y estructura de la vegetación. La segunda ruta de infección, en el caso de los adultos es por los residuos o deriva de la aspersión. El método de aplicación, formulación y los efectos de los factores ambientales desempeñan un papel importante, sobre la persistencia y distribución espacial de los propágulos del patógeno (Rath *et al.*, 1992).

Existe la posibilidad de una transmisión horizontal del patógeno producido en individuos infectados por cualquiera de las vías antes mencionadas. La dinámica de esta fase está influenciada por los factores bióticos que relacionan la edad específica del insecto hospedante y las características de comportamiento del hospedante y del patógeno, así como factores abióticos que tienen una particular incidencia sobre procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la interacción hospedante-patógeno. Es necesario comprender las interacciones que existen en la dinámica hospedante-patógeno y las condiciones ecológicas en que se desarrollan estos eventos (Alatorre, 2000).

En particular, el estudio de la ecología del género *Metarhizium* y el impacto que tienen los factores ambientales definen el desarrollo de estrategias de control biológico satisfactorias, y al relacionarse con la persistencia en el ambiente, esto ha permitido la selección de cepas promisorias de alta virulencia. La preferencia de hábitats y la sobrevivencia fuera del hospedante son aspectos que en ocasiones han sido ignorados en las investigaciones (Roberts y St. Leger, 2004). Cuando las condiciones ambientales son adecuadas las esporas germinan iniciando el proceso de infección sobre un hospedante susceptible, esto favorece la presencia de epizootias en la población del insecto huésped. Son varios los factores bióticos y abióticos que afectan la eficacia, estabilidad y persistencia de *Metarhizium* en el campo (Zimmermann, 2007), los que se explican a continuación.

Entre los factores bióticos están los parásitos y depredadores, organismos que favorecen la dispersión y complementan la actividad de los entomopatógenos. Las plantas hospedantes desempeñan un papel importante en las relaciones tritróficas (planta-hospedante-entomopatógeno), ya que en muchas situaciones producen sustancias con características fungistáticas, que afectan a los hongos entomopatógenos. Las plantas interfieren en los patógenos fúngicos de forma directa o indirecta. Los insectos herbívoros

tienen una relación compleja con las plantas hospedantes, incluso puede estar determinado por la variación entre plantas y sus enemigos naturales. Los patógenos fúngicos que se desarrollan en su interior, pueden ser afectados no solo por las reacciones de inmunidad, sino también por la composición química del alimento ingerido por el insecto (Feldhaar y Gross, 2008).

La temperatura afecta directamente el proceso de desarrollo de la enfermedad. La respuesta ante las variaciones de temperatura se considera como un punto de partida para la selección de cepas fúngicas con potencial para el control biológico, por incidir en el crecimiento vegetativo y persistencia en el campo y por tanto, en su eficacia (Souza *et al.*, 2014).

La humedad relativa es un factor esencial para la germinación de los conidios, no solo afecta la eficacia sino también la sobrevivencia del entomopatógeno en condiciones naturales. Generalmente, se necesita una alta humedad relativa para la germinación de los conidios. La óptima germinación ocurre con un 100% de humedad relativa, con un 92,5% puede observarse cierta germinación y con valores menores al 85% no se logran resultados satisfactorios (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009).

La temperatura y la humedad relativa interactúan para incidir sobre la viabilidad de los conidios. El desarrollo de las micosis es afectado por temperaturas extremas (<15° y >32°C), pero ocasionalmente el hongo solo retarda su desarrollo o capacidad para esporular. Si la humedad relativa se mantiene en 70% por un período de 14 horas continuas, el micelio se hará evidente sobre los insectos infectados (Ortiz y Alatorre 1996). Por otra parte, si el tiempo de exposición es menor, ocurrirá la infección, pero el micelio y las esporas no se manifestarán sobre el insecto cadáver.

La radiación solar ultravioleta (UV-A y UV-B) incide en la eficacia de *Metarhizium* en condiciones de campo, ya que son susceptibles a la radiación. Sin embargo, pueden persistir en el ambiente ya sea en el cuerpo de los insectos infectados o por la presencia de estructuras de resistencia. Los aislados con conidios de pigmentación oscura pueden ser más estables que los que presentan conidios de pigmentación más clara. Zimmermann (2007), detectó una vida media de 1.5 horas en conidios (claros) de *M. anisopliae* por estimulación de la radiación solar, en contraste a los de

*Aspergillus niger* van Tieghem con una vida media de 15 horas. Ante esta limitante, una práctica recomendable es incluir protectores UV, en los productos formulados que se comercializan.

Los micoinsecticidas pueden ser compatibles con otras prácticas de control. Diversos estudios han demostrado que los fungicidas, herbicidas, e insecticidas pueden prevenir la germinación y desarrollo micelial del hongo *in vitro*. Sin embargo, el control de plagas con micoinsecticidas no se ve afectado por la aplicación de pesticidas, si existe un período de 7 días entre cada aplicación (Anderson y Roberts, 1983).

### Clasificación taxonómica e identificación

La primera especie descrita del género *Metarhizium* fue un aislado proveniente de insectos infectados en Ucrania en la década del 70 (Roberts y St. Leger, 2004). Este género fue establecido por Sorokin (1883) y nombrado como muscardiana verde, el cual fue descrito primeramente por Metschnikoff (1879) cerca de Odessa, infectando larvas de *Anisoplia austriaca* (Herbst.). Inicialmente Metschnikoff propuso el nombre de *Entomophthora anisopliae* (Metschn.) para el aislado fúngico y un año después fue renombrado como *Isaria destructor* (Metschn.), citado por Zimmermann (2007). Kepler *et al.* (2014), realizaron un análisis más profundo en la taxonomía del género y lo clasificaron como *Metarhizium* Sorokin, Veg. Parasitenk. Mensch Tieren: 268 (1879), emend. Kepler, S.A. Rehner & Humber. Se considera a *M. anisopliae* como la especie tipo de este género (Bischoff *et al.*, 2009; Kepler *et al.*, 2014).

Kepler *et al.* (2014) plantearon que el género es aceptado como originalmente lo describió Sorokin y rectificado por Rombach *et al.* (1987), pero incluye especies de hongos anamorfos que no producen sinema. Presenta conidióforos ramificados, y ocasionalmente simples en algunas especies, con una o varias fialides, las cuales tienen forma variable, ya que pueden ser truncadas o alargadas. Los conidios son de hialinos a pardo claro o verdes en cadenas secas, o de lo contrario de hialinos a lilas.

Las revisiones taxonómicas más importantes de este género se realizaron por Tulloch (1976), Rombach *et al.* (1986, 1987), Driver *et al.* (2000), Bischoff *et al.* (2009) y Kepler *et al.* (2014). Es necesario destacar que 65 nombres del taxón *Metarhizium* fueron listados en Index Fungorum por CABI Bioscience.

La clasificación taxonómica de *Metarhizium* ha sufrido cambios de acuerdo a los criterios de varios autores. Tulloch (1976) clasificó a las especies de este género, sobre la base de sus características morfológicas y reconoció dos especies: *M. anisopliae* y *M. flavoviride* Gams & Rozsypal. Rombach *et al.* (1986, 1987), presentaron una clave con las especies aceptadas del género incluyendo los siguientes taxa: *M. album* Petch, *M. brunneum* Petch, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *anisopliae*, *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin var. *majus* (Johnston) Tulloch, *M. flavoviride* var. *flavoviride* Gams & Rozypal y *M. flavoviride* var. *minus* Rombach, Humber & Roberts. Sobre la base del color de las colonias y varias características morfológicas, algunos taxa adicionales han sido descritos en China como *M. cylindrosporum* Chen & Guo, *M. guizhouense* Chen & Guo, *M. pingshaense* Chen & Guo y *M. taii* Z.Q. Liang & A.Y. Liu.

Según Mycobank (IMA, 2015), el género *Metarhizium* taxonómicamente pertenece al:

Reino: Fungi  
Phylum: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Orden: Hypocreales  
Familia: Clavicipitaceae  
Género: *Metacordyceps*  
Especie: *Metacordyceps* spp.  
Estado anamorfo: *Metarhizium*

Liang *et al.* (1991) fueron los primeros en confirmar la relación de *Metarhizium* con el género *Cordyceps* (Fr.) Link (Clavicipitaceae, Hypocreales). Ellos describieron a *Cordyceps taii* Z. Q. Liang & A. Y. Liu y lo relacionaron con el anamorfo *M. taii* Z. Q. Liang & A. Y. Liu. Además Liu *et al.*, (2001) describieron a *Metarhizium* como el anamorfo de *C. brittlebankisoides* Zuo Y. Liu, Z. Q. Liang, Whalley, Y. J. Yao & Y. A. Liu. Esta relación a nivel de género entre anamorfo – teleomorfo fue respaldada por estudios filogenéticos realizados por Liu *et al.* (2002) y Huang *et al.* (2005). Estudios de las relaciones filogenéticas basados en análisis empleando los datos de secuencias de regiones nrSSu, nrLSU (del inglés *nuclear ribosomal small and large subunits*) y EF-1 $\alpha$  (del inglés *translation elongation factor 1-alpha*), RPB1 (del inglés *RNA polymerase II largest subunit*), RPB2 (del inglés *RNA polymerase second largest subunit*), gen  $\beta$  tubulina, atp 6

(mitochondrial ATP6) conllevaron a que los estados sexuales de *Metarhizium* se transfieran de *Cordyceps* a *Metacordyceps* según Sung *et al.* (2007).

Driver *et al.* (2000) realizaron estudios sobre la taxonomía de *Metarhizium*, que incluyeron aislados fúngicos de diversas localidades y varias colecciones de hongos. Para ello utilizaron los métodos moleculares RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA) y los datos de secuencias de las regiones ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 y 28S rDNA D3. Esta investigación dividió el género en 10 grupos filogenéticos. Específicamente los nombres *M. album*, *M. flavoviride* y *M. anisopliae* se mantuvieron. Sin embargo, *M. flavoviride* se dividió en 5 y *M. anisopliae* en 4 grupos filogenéticos. Driver *et al.* (2000) describieron y representaron los grupos filogenéticos para la taxonomía de *Metarhizium*. Las cuatro variedades de *M. anisopliae* descritas por estos autores fueron: *M. anisopliae* var. *acridium* Driver & Milner, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotae* Driver & Milner (como *M. anisopliae* var. *lepidiotum*) y *M. anisopliae* var. *majus*. También describieron *M. flavoviride* var. *flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus* y dos nuevas variedades por los datos de secuencia ITS distintivos: *M. flavoviride* var. *Novazealandicum* Driver & Milner y *M. flavoviride* var. *pemphigum* Driver & Milner, así como un grupo de especies indeterminadas de *M. flavoviride* var. Type E. Además Bischoff *et al.* (2006) realizaron estudios moleculares mediante análisis filogenético multigen utilizando las secuencias de las regiones EF-1 $\alpha$ , RPB1, RPB2 y describieron la especie *M. frigidum* (= *M. anisopliae* var. *frigidum* A.C. Rath, C.J. Carr & B.R. Graham).

Huang *et al.* (2005) dirigieron la taxonomía y las relaciones entre varios taxa provenientes de China que no fueron incluidos en las investigaciones previamente realizadas por Driver *et al.* (2000). En estos estudios *M. guizhouense*, *M. pingshaense* y *M. taii* se trataron como sinonimias de *M. anisopliae*.

Bischoff *et al.* (2009) emplearon un estudio filogenético multigen usando secuencias completas cercanas a partir de regiones nucleares codificadas EF-1 $\alpha$ , RPB1, RPB2 y regiones del gen  $\beta$  tubulina y se evaluó la morfología de estos taxa, e incluyeron aislados ex-tipos. Basados en los resultados de análisis filogenéticos y datos morfológicos, describieron dos nuevas especies: *M. globosum* J. F. Bisch., S.A. Rehner & Humber y *M. robertsii*, elevaron tres variedades de *M. anisopliae* a nivel de especie, *M. acridium*; *M. lepidiotae*

(Driver & Milner) J. F. Bisch., S.A. Rehner & Humber; *M. majus* (J.R. Johnst.) J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber y se reconoció a *M. guizhouense* como el anamorfó de *Metacordyceps taii*.

Kepler y Rehner (2013) plantearon que la aplicación de técnicas moleculares permite lograr una mejor identificación de las especies en comparación con el empleo de técnicas convencionales como única herramienta. Utilizaron secuencias de genoma nuclear de *M. acridum* y *M. robertsii*, identificaron regiones de genes conservados, desarrollaron cebadores para amplificar regiones intergénicas de 7 loci y mediante el empleo de especies del complejo *M. anisopliae*, demostraron que los datos de secuencias derivadas de loci intergénicos son más variables y brindan más información filogenética que los marcadores antes disponibles. Estos nuevos marcadores permitieron identificar aislados por debajo del nivel de especie en el complejo *M. anisopliae*.

Recientemente, Kepler *et al.* (2014) reorganizaron el género basado en la morfología, técnicas moleculares y estudios filogenéticos obteniendo una base de datos de genes que codifican para las proteínas BTUB (beta tubulina), RPB1, RPB2 y TEF (del inglés *3' portion of translation elongation factor 1 alpha*). Se obtuvo como resultado la descripción de las especies *M. brasiliense* Kepler, S.A. Rehner & Humber y *M. koreanum* Kepler, S.A. Rehner & Humber pertenecientes al complejo *M. flavoviride*, además determinaron 21 especies. La nomenclatura de este género no ha tenido cambios, y se identifica con el nombre de *Metarhizium* Sorokin.

### Métodos para la caracterización de *Metarhizium*

La caracterización de este género se basa en la descripción y medición de estructuras de interés taxonómico, en la determinación de sus características fisiológicas y en la evaluación de su actividad patogénica, así como en estudios isoenzimáticos (Zimmermann, 2007). Driver *et al.* (2000), Bischoff *et al.* (2009), Kepler y Rehner (2013) y Kepler *et al.* (2014) destacan en sus investigaciones la importancia de las técnicas moleculares y estudios filogenéticos para la identificación de las especies de *Metarhizium*.

Tradicionalmente, la identificación de *Metarhizium* se ha basado en métodos fenotípicos tales como: la morfología de los conidios, conidióforos y fiálides o métodos bioquímicos, como el perfil de proteínas extracelulares, que son influenciados por el ambiente.

También resulta importante la caracterización patogénica y fisiológica.

Para que la micosis se propague de un individuo a otro, a nivel de población, es necesario que el aislado tenga alta capacidad de transmisión, además de que sea virulento, capacidad que es medida mediante bioensayos. a) Prueba de patogenicidad, en la que se determina si un agente biológico causa enfermedad en el insecto a una dosis establecida; b) Intervalo de respuesta biológica, en el que se recomiendan cuatro concentraciones que permiten establecer o determinar la concentración mínima inhibitoria del 100% de la población y la máxima que ocasione 0% de mortalidad; y por último, c) los bioensayos, que permiten determinar la CL50 (concentración en que se presenta el 50% de mortalidad de los insectos tratados) y la TL50 (tiempo en que se alcanza el 50% de mortalidad de los insectos tratados con el hongo a una dosis determinada), y además permiten definir la concentración o dosis a aplicar en campo (Alatorre, 2000). Por lo general, las dosis de aplicación varían con el tipo de cultivo, presencia y tipo de plaga, así como con el preparado comercial que se utilice.

La caracterización patogénica del género *Metarhizium* ha estado basada en el estudio comparativo de los porcentajes de mortalidad por micosis provocada por el hongo en función de concentraciones y tiempos letales (Torres *et al.*, 2013). Estos parámetros se han empleado en la determinación de la virulencia para el control de diferentes plagas como *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) y *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) (Niassy *et al.*, 2012; Sedighi *et al.*, 2013; Yousef *et al.*, 2013).

Bridge *et al.* (1993), realizaron la caracterización de 24 aislados de *Metarhizium* spp. mediante el empleo del sistema API ZYM, y demostraron que los aislados de *M. anisopliae* difieren de *M. flavoviride* en el procesamiento de la actividad  $\alpha$  flucosidasa. Posteriormente, Rath *et al.* (1995) caracterizaron 16 cepas de *M. anisopliae* en cuanto a la utilización de 49 carbohidratos, empleando el sistema API 50CH, concluyeron que la utilización de carbohidratos era relevante como criterio taxonómico para separar *Metarhizium* de otros hongos entomopatógenos como *B. bassiana*.

Delgado *et al.* (2001) relacionaron la actividad enzimática y la patogenicidad de cepas de *M. anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera:

Curculionidae). Además Padilla-Melo *et al.* (2000) determinaron la actividad patogénica de aislados de *M. anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. Otros autores realizaron la caracterización patogénica de *M. anisopliae* y *M. acridium* y su relación con la temperatura, obteniendo como aislados más virulentos los de *M. acridium* a 32°C (Berlanga –Padilla y Hernández-Velázquez, 2002). Toriello *et al.* (2008) evaluaron la virulencia y termotolerancia de *M. anisopliae* considerando el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) y el crecimiento a temperaturas de 25 a 40°C.

Los estudios bioquímicos realizados por Niassy *et al.* (2013) demostraron el papel de las quitinasas y las diferencias de virulencia entre aislados de *Metarhizium*. Perinotto *et al.* (2014) cuantificaron la actividad enzimática de lipasas, quitinasas y proteasas en ensayos para el control de ácaros y lo recomiendan como marcadores bioquímicos de *M. anisopliae* relacionados con la virulencia.

Las características fisiológicas son de gran importancia en la evaluación de *Metarhizium* para la selección de aislados con potencialidades en el control biológico. Onofre *et al.* (2001) evaluaron el crecimiento micelial y la esporulación de *M. flavoviride* en diferentes medios de cultivo y regímenes de iluminación. Obando *et al.* (2013) y Torres *et al.* (2013), caracterizaron aislados nativos de México de *M. anisopliae* según su patogenicidad y variables fisiológicas como desarrollo micelial, velocidad de germinación y producción de conidios. Gato *et al.* (2015) calcularon la tasa de crecimiento y el nivel de esporulación en diferentes medios de cultivo de siete cepas cubanas del complejo *M. anisopliae*. Además, determinaron el crecimiento y el efecto de la exposición a las temperaturas de 28, 30, 32, 34 y 37°C. Los resultados indicaron que el rango de temperatura favorable para el desarrollo de los cultivos es de 28-30°C. La mayor concentración de conidios en las cepas se produjo en Medio Completo (BioCen), Agar Dextrosa de Sabouraud (BioCen) y Extracto de Malta (BioCen).

En los estudios antes mencionados se discute la relevancia e importancia del empleo de técnicas de caracterización como la determinación de la virulencia y las características fisiológicas para la selección de cepas de hongos como agentes microbianos para el control biológico.

### Rango de hospedantes y modo de acción de *Metarhizium*

El género *Metarhizium* es conocido por ser parásito de insectos de diferentes órdenes que envuelven el cadáver de los hospedantes de una cubierta de conidios con tonalidades que varían desde verde a carmelita (Roberts y St. Leger, 2004). Sin embargo, existe variabilidad en cuanto al rango de hospedantes de las diferentes especies.

*M. robertsii* tiene acción contra un amplio grupo de insectos, mientras que *M. acridium* es específico para el orden Orthoptera (Fernandes *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). A diferencia de los aislados de *M. anisopliae* que controlan especies de insectos y artrópodos plagas de diferentes órdenes, entre los cuales se encuentran Hemiptera, Heteroptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Orthoptera (Souza *et al.*, 2014), Diptera (Carolino *et al.*, 2014), Isoptera (Niassy *et al.*, 2013) y Acari (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Se ha informado la patogenicidad de *M. brunneum* hacia coleópteros (Reddy *et al.*, 2014) y dípteros (Yousef *et al.*, 2013). *M. flavoviride*, ha sido empleado en el biocontrol de ortópteros, homópteros y coleópteros (Onofre *et al.*, 2001). La especie *M. majus* resulta virulenta hacia especies del orden Coleoptera (Scarabaeidae) (Bischoff *et al.*, 2009). Además Kepler *et al.* (2014) plantean que *M. brasiliense* infecta salta hojas (Hemiptera: Cicadellidae) y *M. koreanum* controla insectos del orden Hemiptera (Delphacidae).

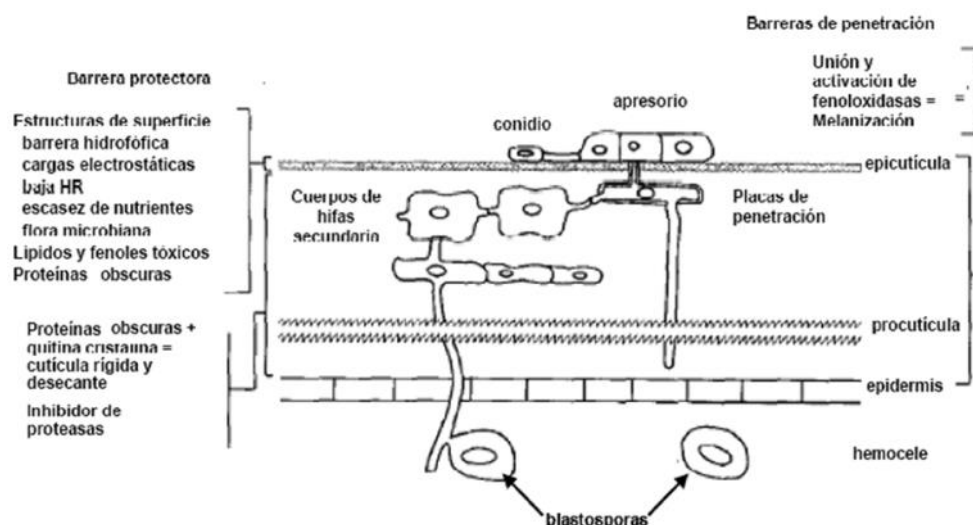
Ferrón *et al.* (1972), citado por Roberts y St. Leger (2004), evaluaron cepas de *Metarhizium* contra 9 especies de coleópteros de la familia Scarabaeidae. Los resultados evidenciaron que la mayoría de especies de insectos fueron susceptibles solamente ante aislados fúngicos provenientes de insectos de la misma especie. Por otra parte, se informa que aislados obtenidos de muestras de suelo se han comportado altamente virulentos contra insectos plaga específicos (Zimmermann, 2007).

El hongo inicia su proceso infectivo en los insectos hospedantes cuando los conidios viables se retienen por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedante e iniciar la formación del tubo germinativo (hifa de penetración) penetra al interior de las distintas capas de la cutícula del insecto (Fig. 1). En este evento interviene un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la

presión ejercida por la hifa, la que penetra la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizándolo completamente en forma de blastosporas en la hemolinfa, y a partir de la cual se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo. Este evento es acompañado por la liberación de metabolitos secundarios con actividad insecticida (toxinas peptídicas) que aceleran la muerte del insecto. Al final, la muerte del insecto se debe a una combinación de factores: la acción de toxinas del hongo, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, la privación de nutrientes y la invasión de órganos. Al agotarse los nutrientes dentro del insecto, el hongo inicia un crecimiento micelial colonizando los órganos del hospedante. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de conidios, con lo que se puede completar el ciclo infectivo (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009).

El apresorio además de servir de anclaje del conidio, ejerce una presión hacia el interior del insecto. El hongo desarrolla cuerpos hifales, los cuales se van disseminando a través del hemocoele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, túbulos de Malpighi y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto. Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedante. Las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevos conidios, continuando con el ciclo patológico. La dispersión de los conidios ocurre a través del viento, el suelo, la lluvia e incluso insectos enfermos al entrar en contacto con otros sanos (Roberts y St. Leger, 2004; Pucheta *et al.*, 2006). Todas estas fases ocurren en un período de entre cuatro y diez días, en dependencia del hospedante y de la especie del hongo.

Las especies del género *Metarhizium* poseen un conjunto de mecanismos que les permite penetrar y asimilar los nutrientes del hospedante para superar los mecanismos de resistencia. Diferentes metabolitos fúngicos favorecen la penetración física y colonización del insecto (Dong *et al.*, 2009). Las enzimas degradadoras de la cutícula destruyen o modifican la integridad estructural del hospedante, inhiben sus procesos selectivos e interfieren con su sistema regulatorio.



**Figura 1.** Esquema que muestra la estructura, composición de la cutícula de insectos y formas de penetración de los hongos entomopatógenos (Montesinos, 2008).

Figure 1. Diagram that showing the structure, composition of the cuticle of insects and penetration forms of entomopathogenic fungi (Montesinos, 2008).

### Producción de metabolitos secundarios y toxinas

Se ha demostrado la importancia de las enzimas que son secretadas durante el proceso de infección fúngica (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009). Estos estudios se han conducido a describir las interacciones que tienen lugar entre el hongo y el insecto plaga.

La actividad entomopatógena requiere de la acción de enzimas hidrolíticas como proteasas, quitinasas, lipasas, quitobiosas, lipooxigenasa que degradan componentes cuticulares y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo, dentro del insecto. Las proteasas tipo subtilisinas Pr1, son el factor clave para la penetración del hongo a la cutícula del insecto (Perinotto *et al.*, 2014).

En el antagonismo de *M. robertsii* contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc y *Colletotrichum falcatum* Went se demostró la acción patológica de proteasas, amilasas, lipasas, quitinasas y caseinasas producidas por *M. anisopliae*, *M. globosum*, *M. guizhouense* (Sanivanda y Kalla, 2014).

Las especies de *Metarhizium* tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en la interacción patógeno-hospedante. Se destacan las destruxinas (dimetildestruxina y protodestruxina) ya que su modo de acción inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en las células de los insectos (Pucheta *et al.*, 2006).

Además son sustancias que presentan actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Monzón, 2001).

Las destruxinas (dtxs) son las toxinas más importantes producidos por *Metarhizium*, se han informado mayormente en *M. anisopliae* (Wang *et al.*, 2012), aunque *M. album* y *M. flavoviride* también las producen (Roberts y St. Leger, 2004). Wang *et al.* (2012) plantearon que hay 39 destruxinas diferentes, las cuales han sido clasificadas en 6 grupos: dtxs A, dtxs B, dtxsC, dtxs D, dtxs E, dtxs F y sus derivados.

Las destruxinas afectan varios organelos celulares tales como la mitocondria, el retículo endoplasmático y la membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular (Wang *et al.*, 2004). Además estos metabolitos bioactivos inducen la contracción del músculo visceral en insectos. Los efectos citotóxicos sobre las células epiteliales ocurren a través de los canales de  $Ca^{2+}$  y ATP-asa tipo vacuolar (Wang *et al.*, 2012).

La actividad biológica de las destruxinas ha sido descrita por Strasser *et al.* (2000), Pedras *et al.* (2002), Roberts y St. Leger (2004) y comprende:

- 1) Efectos sobre insectos y relación con la virulencia
- 2) Efectos sobre diferentes células y líneas celulares



## 3) Efectos sobre vertebrados

## 4) Interacción con plantas

La producción de destruxinas y viridoxinas A y B se correlacionan con la especificidad de hospedantes de algunas especies de *Metarhizium*. Adicionalmente a la actividad insecticida, se han explorado sus potencialidades farmacéuticas con aplicaciones en el tratamiento contra el cáncer, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer y hepatitis B. Wang *et al.* (2012). *M. anisopliae* secreta citocalasinas, son metabolitos fúngicos con permeabilidad celular que se unen a los filamentos de actina, inhiben su polimerización y pueden interferir en varios procesos celulares (Zimmermann, 2007).

**Perspectivas del uso de *Metarhizium* spp. para el control biológico de plagas**

Los avances en el conocimiento de la ecología y biología de este género fúngico ha impulsado su empleo como agente de control biológico. Históricamente *Metarhizium* spp. ha sido el hongo entomopatógeno más empleado en el campo para el control de insectos precedido por *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Fernandes *et al.*, 2010).

Especies de *Metarhizium* han sido utilizadas en programas de control biológico contra diversas plagas, como saltamontes y termitas. *M. anisopliae* ha sido efectivo en el control de mosquitos transmisores de enfermedades a humanos como la malaria (Bischoff *et al.*, 2009, Kepler y Rehner, 2013). Otra especie ampliamente utilizada es *M. acridium* con la que se han desarrollado productos comerciales contra insectos de la familia Acridoidea.

La especie *M. anisopliae* fue el primer hongo producido mundialmente de forma masiva y utilizado en el control de insectos plagas según Roberts y St. Leger (2004). Esta especie ha sido un modelo para el estudio del control biológico de insectos plaga y se utiliza comercialmente en países como Brasil, Colombia, Australia y Estados Unidos.

El amplio rango de hospedantes del género *Metarhizium* lo hace comercialmente atractivo como agente de control biológico (Dalla Pria *et al.*, 2008). Varios micoinsecticidas a base de *Metarhizium* como ingrediente activo han sido comercializados y registrados en diversos países, como son los bioproductos BioBlast, BioPath de la Compañía EcoScience y Green Muscle de CABI Bioscience/NPP (Zimmermann, 2007).

**Experiencias del empleo de *Metarhizium anisopliae* en Cuba**

Los estudios del género *Metarhizium* en Cuba surgen en las décadas del 80 y 90. Estos incluyeron la caracterización, patogenicidad y fisiología de aislados autóctonos y otros, que fueron obtenidos en colaboración con diferentes países. Se evaluó el crecimiento y la esporulación en cultivo líquidos estático y sobre soportes sólidos (Castiñeiras *et al.*, 1984; Luján, 1988, Luján *et al.*, 1992).

Meneses *et al.* (1980) estudiaron la efectividad de diferentes aislados de *M. anisopliae* en el control de *Lissorhoptrus brevisrostris* Suffrian (Coleoptera: Curculionidae), en el cultivo del arroz en campo. Se estudió la actividad biológica de varias cepas autóctonas sobre adultos de *C. formicarius*, las cuales fueron altamente virulentas (Castiñeiras *et al.*, 1984).

Castiñeiras *et al.* (1990, 1990a, 1991) determinaron la virulencia en laboratorio y en campo para el control de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Se determinó la virulencia *in vitro* de 11 aislados de *M. anisopliae* sobre adultos de *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae), obteniendo valores de 52,25% de mortalidad a los 30 días. Además, Cabrera *et al.* (1990) evaluaron el crecimiento y esporulación de cuatro cepas de *M. anisopliae* (4, PIC, Brasil, 44) a temperaturas de 24 a 32°C.

Estos estudios permitieron la selección de la cepa LBMa-11 de *M. anisopliae* para el control de las especies *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae) y *Monecphora bicincta fraterna* Uhler (Hemiptera: Cercopidae), en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) y pastos (*Brachiaria* spp.), respectivamente (Meneses *et al.*, 1980, 1981; Jiménez y Fernández, 1980; Jiménez y Calderón, 1990; Calderón *et al.*, 1991; Castiñeiras *et al.*, 1984; Luján *et al.*, 1992; Duarte *et al.*, 1992).

Desde el año 1988, esta cepa se reproduce de forma masiva por tecnologías de producción artesanal en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) pertenecientes al Sistema Estatal de Sanidad Vegetal y constituye el ingrediente activo del producto comercial Metasave-1, que se emplea para el control de 11 plagas insectiles en diferentes cultivos (Tabla 1).

Las investigaciones actuales se enfocan a trabajos de prospección y variabilidad intraespecífica, con el

consiguiente estudio de las propiedades biológicas. El empleo de técnicas para la caracterización fenotípica, y molecular así como la influencia de factores abióticos como la temperatura, constituyen otros aspectos de interés para la selección de cepas con potencial en el control biológico del tetúan, *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae), una de las principales limitantes de la producción de *Ipomea batatas* L. en Cuba y a nivel mundial (Gato *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

El conocimiento del origen geográfico del aislado, las enzimas involucradas en la patogenicidad, la capacidad de adhesión de los conidios a la cutícula, la producción y regulación de las toxinas y la susceptibilidad del hospedante, así como los factores involucrados en la virulencia del microorganismo y el medio ambiente, influyen en el éxito del proceso de infección de especies de *Metarhizium* y por tanto en su eficacia como agente de control biológico. Ante las actuales demandas de la producción agrícola, su utilización podría incrementarse con nuevas aplicaciones para el control de otras especies de insectos y artrópodos

plaga, al constituir una alternativa sostenible en la protección de los cultivos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan sus agradecimientos a la Universidad de Geisenheim y al Departamento Federal de Investigación y Educación (BMBF) de Alemania por la financiación brindada para el proyecto "Biodiversidad, bioseguridad y biotecnología para la protección de plantas en ecosistemas amigables y sostenibles en Cuba", según BMBF subvención 01DN14020.

## LITERATURA CITADA

- Alatorre, R. (2000) Hongos entomopatógenos. En: El control biológico, una herramienta sustentable. (Eds.) Ibarra, J. del Rincón, M. C., Leyva, J. L., pp: 123-134.
- Anderson, T y D. W. Roberts (1983) Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. Journal of Economic Entomology (76): 1437-1441
- Berlanga -Padilla, A y V. Hernández-Velázquez (2002) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de

**Tabla 1.** Aplicación de la cepa *M. anisopliae* LBMa-11 para el control de plagas que afectan a cultivos de importancia económica en Cuba.

**Table 1.** Application of *M. anisopliae* LBMa-11 strain for the control of pests affecting crops of economic importance in Cuba

Cultivos	Plagas que controla
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> , <i>Tagosodes oryzicolus</i> Muir (Hemiptera: Delphacidae), <i>Oebalus insularis</i> Stal. (Heteroptera: Pentatomidae), <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith (Lepidoptera: Noctuidae)
<i>Brachiaria</i> spp.	<i>Monecphorabincta</i> , <i>Mocis latipes</i> Guenée (Lepidoptera: Erebidae)
<i>Citrus</i> spp.	<i>Pachnaeus litus</i> (Coleoptera: Curculionidae)
<i>Zea mays</i> L.	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Solanum tuberosum</i> L.	
<i>Cucumis sativus</i> L.	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Thrips palmi</i> Karny (Thysanoptera: Thripidae)
<i>Capsicum annuum</i> L.	
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	
<i>Cedrela odorata</i> L.	<i>Hypsipyla grandella</i> (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Rhyacionia frustrana</i> Scudder in Comstock (Lepidoptera: Tortricidae)
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Hypothenemus hampei</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Diabrotica balteata</i> LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae)
<i>Ipomoea batata</i> L.	<i>Cylas formicarius</i>
<i>Musa</i> spp	<i>Cosmopolites sordidus</i>

- Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridium* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca gregaria*. Manejo Integrado de Plagas. (63):51-55.
- Bischoff, J. F., S. A. Rehner y R. A. Humber (2006) *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia (98):737-745.
- Bischoff, J., S. Rehner y R. A. Humber (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia, 100(4): 512-530.
- Bridge, P., M. Williams, C. Prior y R. Paterson (1993) Morphological, biochemical and molecular characteristic of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Journal of General Microbiology (139):1163-1169.
- Cabrera, T., M. Luján, T. Vázquez y M. Rodríguez, et al. (1990) Crecimiento y esporulación de cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* a diferentes temperaturas. Revista de Protección Vegetal. 13 (1): 109-115.
- Calderón A. y A. Ponce (1991) Control biológico de *Cosmopolites sordidus* (GermCastiñeiras.) con *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. Protección Vegetal 6(2-3):102-106.
- Carolino, A. T., A. R. Paula, C.P. Silva y T. M. Butt, et al. (2014) Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasites & Vectors 198 (7):1-7.
- Carrillo-Rayas, M. T. y A. Blanco-Labra (2009) Potencial y algunos mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Acta Universitaria. 19 (2): 40-49.
- Castiñeiras, A., A. Pérez, O. Obregón y I. Castañeda (1984) Virulencia de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Cylas formicarius elengatus* (Coleoptera: Curculionidae). Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas 7 (1):129-135.
- Castiñeiras, A., M. López, A. Calderón y T. Cabrera (1990 a) Tamaño muestral para pruebas de virulencia con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas. 13 (1): 87-95.
- Castiñeiras, A., M. López, A. Calderón, T. Cabrera y M. Luján (1990 b) Virulencia de 17 aislamientos de *Beauveria bassiana* y 11 de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Cosmopolites sordidus*. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas. 13(3):45-51.
- Dalla Pria, J. W., L. P. Teixeira, C. L. Messias, J. L. Acevedo y P. Magalhaes Lacava (2008). Bioassay of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). Brazilian Journal of Microbiology: 128-132.
- Delgado, F., Y. López y E. Giraldo (2001) Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo Integrado de Plagas (60): 43-49.
- Dong, Ch., J. Zhang, H. Huang, W. Chen y Y. Hu (2009) Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) to subterranean termite *Odonotermes formosanus*. Microbiological Research (164): 27-35.
- Driver, F., R. Milner y J. Trueman (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data Mycol. Res. (104): 134-150.
- Duarte, A., J.M. Menéndez, A. Fernández y J. Martínez (1992) Utilización del biopreparado *Metarhizium anisopliae* cepa Niña Bonita en plantaciones de *Pinus caribaea* para el control de *Rhyacionia frustrana*. Revista Forestal Baracoa 22(2):17-23.
- Feldhaar H y R. Gross (2008) Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. Microbes and infection (10): 1082-1088.
- Fernandes, É., C.A. Keyser, J.P. Chong, D. Rangel, M. Miller et al. (2010) Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. The Society for Applied Microbiology. Journal for Applied Microbiology (108): 115-128.
- Garisto-Donzelli, B. G., S.B. Krasnoff, A. Churchill y J. Vandenberg et al. (2010) Identification of a hybrid PKS-NRPS required for the biosynthesis of NG-391 in *Metarhizium robertsii*. Current Genetics (56):151-162.
- Gato, Y. (2015) Evaluación y caracterización de aislados de *Metarhizium spp.* con actividad biológica contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae) Fabricius en Cuba. Tesis de Maestría, Universidad de la Habana, Cuba.
- Hu, G. y R. J. St. Leger (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology (68):6383-6387.
- Huang B., C. Li, R.A. Humber, K.T. Hodge, M. Fan y Z. Li (2005) Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). Mycotaxon. 96, p. 362.
- International Mycological Association (IMA) (2016) MycoBank. Disponible en: [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org). Consultado 14-03-2016.
- Jiménez, J. y A. Calderón (1990) Efectividad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el combate de *Cosmopolites sordidus* en banano. Informe Final del Resultado 518.04.0.8. Programa Ramal Minag 1986-1990. INISAV, La Habana.
- Jiménez, J. y R. Fernández (1980) Efectividad de entomopatógenos para el control del picudo verde azul de los cítricos. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas 3(1):76-86.
- Kepler, R.M. y S.A. Rehner (2013) Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. Molecular Ecology Resources. DOI: 10.1111/1755-0998.12058
- Kepler, R., R. Humber, J. Bischoff, S. Rehner (2014) Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. Mycologia, 106 (4): 811-829.
- Liang, W., I. C. How, K. Choan, W. Teish, et al. (2002) Production

- of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and microbial Technology. 31: 321-328.
- Liang, Z.Q., A.Y. Liu y J.L. Liu (1991). A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. Acta Sinica 10: 257-262
- Liu Z., Z. Liang, A. Liu, Y. Yao y Z. Yu (2002). Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8 S rDNA sequences. Mycological Research. 106 (9): 1100-1108.
- Liu, Z.Y., Z.Q. Liang, A.J.S. Walley, J.Y. Yao y A.Y. Liu (2001) *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph *Metarhizium anisopliae* var *Majus*. Journal of Invertebrate Pathology. (78): 178-182
- Luján, M. (1988) Importancia del hongo *Metarhizium anisopliae* como insecticida microbiológico en el control de plagas nocivas. Boletín de reseñas. Protección de Plantas. (27)-28: 5-26.
- Luján, M.; O. Milán, T. Cabrera y T. Vázquez (1992) Propagación bifásica de diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae*. Su eficacia y capacidad epizootica sobre larvas de *Mocis latipes*. Protección de Plantas 2 (1):29-40.
- Meneses, R., G. Echevarría y S. Monzón (1980) Efectividad de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin en el control de *Lissorhoptrus brevis* (Suffr) (Coleoptera: Curculionidae). Centro Agrícola 7(1):107-120.
- Meneses, R.; S. Monzón y M. Núñez (1981) Viabilidad de las esporas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en agua y su virulencia sobre *Lissorhoptrus brevis* (Coleoptera: Curculionidae). Agrotecnia de Cuba 13(1):53-67.
- Metschnikoff, E. (1879) Diseases of wheat chafers Zapiski imperatorskogo Obschestva Sel'skogo Hoziatstva Juznoi Roosi God sorok devyaty. pp 21-50.
- Monzón, A. (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) (63): 95 – 103.
- Niassy, S., N. Maniania, S. Subramanian y L. Gitonga, et al. (2012) Selection of promising fungal biological control agents of the western thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande)". Letters in Applied Microbiology. (54): 487-493.
- Niassy, S.; S. Subramanian, S. Ekesi, J. Bargul, et al. (2013) Use of *Metarhizium anisopliae* chitinase genes for genotyping and virulence characterization. BioMed Research International. Article ID 465213, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/465213>.
- Obando, J., A. Bustillo, U. Castro y N. Mesa (2013) Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). Revista Colombiana de Entomología. 39(1):26-33.
- Ojeda-Chi, M., M. Rodríguez-Vivas, R.I., E. Galindo-Velasco y R. Lezama-Gutiérrez (2011) Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revista Mexicana Ciencia. Pecu. 2(2):177-192.
- Onofre, S., C. Miniuk, N. Monteiro y J. Azevedo (2001) Grow and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimens Scientia Agricola. 58 (3): 613-616.
- Ortiz-Caton, M. y R. Alatorre-Rosas (1996) Factores que influyen sobre el impacto de los hongos entomopatógenos en el control de la mosquita blanca. Simposio Control Biológico de Mosquita Blanca. XIX Congreso Nacional de Control Biológico. Culiacan Sin. Nov. 1996. 34-39.
- Padilla-Mello, G., M. Bernal-Urbe, P. Vélez-Arango y E. Montoya-Restrepo (2002) Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. Cenicafe. 51 (1): 28-40.
- Perinotto, W., P. Golo, C. Coutinho Rodrigues y F. Sá et al. (2014) Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology (203):189-196.
- Pucheta, M., A. Flores, S. Rodríguez y M. De la Torre (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Inter ciencia, 31(012):856-860.
- Rath, A., C. Carr y B. Graham (1995) Characterization of *Metarhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (API50CH). Journal of Invertebrate Pathology (65) 152-161.
- Rath, A.C., T.B. Koen y H.Y. Yipt (1992) The influence of abiotic factors in the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmania pasture soils. Mycologia 96 (5): 378-384.
- Reddy, G., Z. Zhao y R. Humber (2014) Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). Journal of Invertebrate Pathology. 122: 10-15.
- Roberts, D. y R. J. St. Leger (2004) *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. Advances in Applied Microbiology (54):1-58.
- Roberts, D.W. y Humber, R.A. (1981) Entomogenous fungi. En: Cole, G.T y Kendrick, B (Eds) Biology of conidial fungi. Academic Press, New York.
- Rombach M.C.; R. A. Humber y C. Evans (1987) *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf- and planthoppers. Transactions of the British Mycological Society (88):451-459.
- Rombach, M., R. Humber y D. Roberts (1986) *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. Mycotaxon 27:87-92.
- Sanivada, S. M. y M. Challa (2014) Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. Journal Biopesticide (7):33-37.
- Sedighi, N., H. Abbasipour, H. Askary y A. Gorjan (2013) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*

- anisopliae* var. *major* in different stages of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. Journal of Insect Science (13):150.1-9.
- Sorokin, N. (1883) Plant parasites of man and animals as causes of infectious diseases. (2): 268-291.
- Souza, R., R. Azevedo, A. Lobo y D. Rangel (2014) Conidial water affinity is an important characteristic for termotolerance in entomopathogenic fungi Biocontrol Science and Technology. (24):4. 448-461.
- St. Leger, R.J., Ch. Wang y W. Fang. (2011) News perspectives on insect pathogens. Fungal Biology Reviews (25): 84-88.
- Strasser, H., A. Vey y T. Butt (2000) ¿Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. Biology Science and Technology (10): 717-735.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-ard J.J., Shrestha y J.W. Spatafora (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology. 57: 5-59.
- Torres, M., H. Cortéz, C. Ortiz, S. Capello y A. de la Cruz (2013) Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aneolamia postica*, en Tabasco, México. Revista Colombiana de Entomología. 39 (1):40-46.
- Tulloch, M (1976) The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society (66): 407-411.
- Wang, B., Q. Kang, Lua, Y., L. Bai y Ch. Wang (2012) Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. PNAS. 109 (4):1287-1292.
- Wang, C., A. Skrobek, T. Butt (2004) Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology (85):168-174.
- Yousef, M., M. Lozano-Tovar, D. Garrido-Jurado y I. Quesada-Moraga (2013) Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. Journal of Economic Entomology 106 (3):1119-1125.
- Zhao, H., C. Xu, H-L. Lu, X. Chen, R. J. St. Leger y W Fang (2014) Host-to-Pathogen Gene Transfer Facilitated Infection of Insects by a Pathogenic Fungus. PLoS Pathog 10(4): 1-10.
- Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 17 (9): 879-920.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández