

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



EFECTOS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN LA
SOBREVIVENCIA DE LA CHICHARRITA DEL MAÍZ *Dalbulus*
maidis (Homoptera:Cicadellidae), VECTOR DE *Spiroplasma kunkelii*.

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

SOREL JIMENA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, JUNIO 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. SOREL JIMENA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
PRESENTE.

Manifiesto a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título "Efectos de hongos entomopatógenos en la sobrevivencia de la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), vector de *Spiroplasma kunkelii*", para obtener la Licenciatura en Biología.

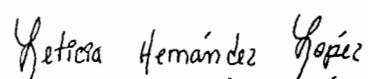
Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DR. GUSTAVO MOYA RAYGOZA**.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 10 de abril del 2003


DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. **DR. GUSTAVO MOYA RAYGOZA**.-Director del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
PRESENTE.**

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de Titulación,
modalidad: **TESIS E INFORMES**
opción: **TESIS**

con el título: **Efectos de hongos entomopatógenos en la sobrevivencia de la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), vector de *Spiroplasma kunkelii***
que realizó el (la) pasante: **Sorel Jimena Hernández Jiménez** con número de
código: **699000082** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a
su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la
presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 3 de junio del 2004


Gustavo Moya Raygoza
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



EXCLUSIVO COMITÉ DE TITULACIÓN

SINODALES

FIRMA

1.- Dr. Gil Virgen Calleros

2.- M.C. J. Jesús Ruiz Moreno

3.- M.C. Luis Villaseñor Ibarra

SUPL. M.C. Hilda Cuevas Contreras

Un agradecimiento muy especial a CONACYT por apoyar el proyecto con clave 38689-B titulado, "Interacción entre insectos vectores de enfermedades a plantas, patógenos y enemigos naturales: un estudio pionero" por otorgarme una beca para participar en este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO al Dr. Gustavo Moya por darme la oportunidad de demostrar que soy capaz de llevar acabo una responsabilidad de este tipo como fue realizar mi tesis e ir en contra de su naturaleza y confiar en mí.

A mis padres por todo, por la vida que me dieron, por el apoyo que tengo de ellos y por su cariño, y sobre todo por que me han enseñado, a enfrentar los momentos más difíciles de mi vida y salir adelante, muchas gracias papas.

A mis hermanos por que me alentaron a salir adelante y ser parte fundamental de mi vida.

A mi tío Jesús por que nunca me ha dejado sola y siempre esta conmigo.

A Armando por haber estado conmigo en esos instantes y apoyarme siempre, aun sin tener la obligación de hacerlo.

Y finalmente a todas las personas que me ayudaron para realizar este trabajo, como mis sinodales y mi asesora en el Centro Nacional de Referencia de Control Biologico; Angélica Berlanga Padilla que sin todos ellos no hubiera sido posible la elaboración del mismo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi padres, a mi director de tesis, a mis hermanos y a mis amigos.

Y a las personas que me ayudaron del Centro Nacional de Referencia Control Biológico.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
INDICE DEL CONTENIDO.....	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	3
Chicharrita (<i>Dalbulus maidis</i>).....	3
Patógeno (<i>Spiroplasma kunkelii</i>).....	4
Interacción Patógeno – Vector.....	5
Hongo entomopatógeno (<i>Metarhizium anisopliae</i>).....	6
Interacción Hongo Entomopatógeno – Vector.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
ANALISIS ESTADÍSTICO.....	10
RESULTADOS.....	13
Porcentaje de sobrevivencia de adultos de <i>Dalbulus maidis</i>	13
Porcentaje de sobrevivencia de ninfas de <i>Dalbulus maidis</i>	15
Porcentaje promedio de sobrevivencia de ninfas y adultos de <i>Dalbulus maidis</i>	17
Porcentaje de sobrevivencia de adultos de <i>Dalbulus maidis</i> a los 20 días de aspersión.....	19
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	23
LITERATURA CITADA.....	24

RESUMEN

Se efectuó un estudio bajo condiciones de laboratorio para determinar el efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (aislamiento M366) en la sobrevivencia de adultos y ninfas de la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* antes y después de adquirir la bacteria *Spiroplasma kunkelii* que causa el achaparramiento del maíz. La sobrevivencia de las chicharritas adultas y ninfas fue afectada negativamente cuando hospedan a *S. kunkelii* y *M. anisopliae*. Por otro lado, *M. anisopliae* afecta por igual la sobrevivencia de las chicharritas cuando estas tienen poco tiempo (un día) o mucho tiempo (20 días) de haber adquirido a *S. kunkelii*.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cultivos más importantes para nuestro país. Uno de los problemas que se presentan en este cultivo es la presencia de plagas como es la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae). Este insecto es un vector importante debido a que transmite la enfermedad conocida como el “achaparramiento del maíz” (Barnes, 1954).

Además el maíz es el producto agrícola de mayor importancia para los pueblos Mesoamericanos, por ser su principal fuente alimenticia. La producción de este cereal es disminuida por las ninfas y adultos de *D. maidis* considerada la plaga más importante del maíz en América Latina, debido a que transmite eficientemente tres patógenos; entre los que se encuentra la bacteria *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) que provoca la enfermedad del “achaparramiento del maíz”.

Dalbulus maidis está ampliamente distribuida, encontrándose desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina (Nault y Bradfute, 1979).

Uno de los recursos para controlar a *D. maidis* es el uso de hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* (Mitch.) Sorokin, ya que se ha encontrado que este hongo tiene una alta patogenicidad sobre ninfas y adultos de *D. maidis* cuando no son portadores de la bacteria *S. kunkelii* (Ibarra, 2003).

Sin embargo no existen reportes sobre las interacciones hongo (*M. anisopliae*) - patógeno (*S. kunkelii*) - vector (*D. maidis*). El conocimiento de esta interacción permitirá

establecer si el hongo afecta el desarrollo del patógeno dentro del vector. Esto establecerá resultados de estrategias de manejo para agricultores de maíz en México y América Latina, ya que gran número de ellos se dedican a la producción de maíz para subsistir.

El presente trabajo pretende mostrar como el hongo *M. anisopliae* interacciona con el patógeno *S. kunkelii* dentro del vector *D. maidis*, y si es afectada la sobrevivencia de adultos y ninfas de *D. maidis*.

2. OBJETIVOS

1.-Determinar la sobrevivencia de adultos y ninfas de *D. maidis* cuando primero adquieren la bacteria *S. kunkelii* y luego son atacados por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* y cuando primero son atacados por el hongo entomopatógeno y luego adquieren la bacteria.

2.-Determinar la sobrevevencia de adultos de *D. maidis* asperjados con *M. anisopliae* a uno y 20 días después de adquirir la bacteria.



3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

3.1 Chicharrita (*Dalbulus maidis*).

Dalbulus maidis se clasifica dentro de la clase Insecta, orden Homóptera y familia Cicadellidae (Nault, 1990). La chicharrita del maíz es un insecto pequeño de 3.0 a 4.4 mm de largo cuando está en estado adulto. Su distribución se da desde el sur de los E.U.A. hasta Argentina, pasando por México, Centro América y las Islas del Caribe. *Dalbulus maidis* se encuentra distribuida en todas las altitudes donde se cultiva maíz (Nault, 1990), sin embargo predomina en altitudes menores a los 750m (Barnes, 1954).

Los individuos de *D. maidis* necesitan de 23 días a 26° C y 50% de humedad relativa para llegar a estado adulto desde la ovoposición. Antes de llegar a ser adultos necesitan pasar por cinco estadios ninfales. Tanto ninfas y adultos de esta especie son eficientes transmisores de la bacteria, espiroplasma del maíz (*S. kunkelii*) (Nault, 1990).

Se demostró que los adultos *D. maidis* viven de 26 a 51 días a 21° C. También se estudio el tiempo promedio de sobrevivencia para los estadios ninfales I – V que vario de 11.6 a 33.6 días a 10° C para el estadio I, 6.3 – 13.3 días a 15.6° C para el estadio II, 2.5 – 3.8 días a 26.7° C para el estadio III, 2.4 – 4.4 días a 32.2° C para el estadio IV, y por último de 2.3 -4.8 días a 32.2 °C para el estadio V. Las longevidades mayores para adultos fueron a temperaturas de 15.6° C y las más bajas a 32.2° C (Sharma *et al.*, 2001). *Dalbulus maidis* en condiciones favorables incluye tasas de desarrollo rápido durante los

estadios ninfales y la utilización que hacen los adultos de la primera generación de la vena media del maíz para poner sus huevesillos, es un requisito previo para el desarrollo de una segunda generación vigorosa. Puesto que el hábitat del maíz es corto, las chicharritas se especializan en el maíz pasando sus etapas de supervivencia del invierno como adultos móviles (Madden *et al.*, 1986). La adopción del maíz como huésped, hecha por *D. maidis*, se piensa que ocurrió cuando se domesticó por primera vez el maíz a partir de sus parientes teosintes (Nault, 1990).

3.2 Patógeno (*Spiroplasma kunkelii*).

Se clasifica dentro de la clase Mollicutes y orden Mycoplasmatales, su morfología es de tipo filamentosa y helicoidal (Whitcomb, 1981), mide 0.2 – 0.25 x 3 – 15 micras, tiene movimientos contráctiles, a menudo con cuerpos esféricos unidos, no posee pared celular y es relativamente pequeño en comparación con otras bacterias, sólo contiene de 580 kb a 2,200 kb de secuencia genómica (Purcell, 1982).

Spiroplasma kunkelii es muy frecuente en el floema del maíz; donde es succionada por *D. maidis*. Este vector tiene una asociación de simbiosis con el patógeno debido a que es transportado de planta a planta por *D. maidis*, a cambio el espiroplasma le proporciona al vector resistencia a bajas temperaturas y capacidad para sobrevivir durante el invierno Mexicano (Nault, 1990).

La enfermedad que ocasiona *S. kunkelii* en el maíz es llamada “achaparramiento del maíz,” que se caracteriza por formar áreas cloróticas en la base de las hojas, para después formar bandas amarillas a lo largo de las mismas, en este caso, también se acortan los entrenudos, presentándose enanismo y mazorcas estériles, así como una ramificación excesiva en las raíces; si la infección es tardía las mazorcas quedan con pocas semillas. Entre más temprana sea la infección se presentarán los síntomas más severos. La sintomatología varía según las condiciones climáticas, el cultivar y la presencia conjunta con otros patógenos (Purcell, 1982).

Spiroplasma kunkelii pasa por las siguientes estructuras de *D. maidis*. Primero atravesando el epitelio, sobreviviendo en la hemolinfa, después cruza las células epiteliales llegando a las glándulas salivales y desde donde es inoculado en la planta mientras la chicharrita succiona la savia (Özbek *et al.*, 2003).

3.3 Interacción Patógeno – Vector.

Ebbert y Nault (1994) reportaron que la exposición de tres poblaciones de *D. maidis* al *S. kunkelii*, sobre la sobrevivencia de *D. maidis* de elevaciones bajas tienen mayor porcentaje de sobrevivencia cuando se mantuvieron bajo tres regímenes alimenticios (sin alimento, con avena, o con maíz) que simulan el comienzo de la estación seca. El espiroplasma recibe el beneficio de ser dispersado más rápido y eficientemente por las poblaciones de *D. maidis* de altitudes bajas, mientras que las poblaciones del insecto de altitudes bajas son beneficiadas al incrementar su sobrevivencia, lo que posiblemente les

permite encontrar su planta hospedera primaria (maíz), que se cultiva con irrigación durante la estación seca.

En un estudio reciente se encontró que los adultos de la especie *D. maidis* infectados por *S. kunkelii* son significativamente más tolerantes a temperaturas bajo cero que los insectos no infectados. También se determinó que era más probable que las hembras de la especie *D. maidis* infectadas por *S. kunkelii* respondieron al escape más rápido, que las no infectadas (Nault, 1990).

3.4 Hongo Entomopatígeno (*Metarhizium anisopliae*).

Metarhizium anisopliae se clasifica en su fase sexual dentro de la clase Euscomycetes, subclase Pyreromycetidae, orden clavicipitales y familia Clavicipitacea pero en su fase asexual (anamorfa) se clasifica como un Deuteromicete (Herrera y Ulloa, 1998).

Las enfermedades fungosas de insectos son muy comunes, y en ocasiones lo suficientemente severas como para causar epizootias que llegan a eliminar casi completamente una población de insectos (Herrera y Ulloa, 1998). La interacción que ocurre entre el hongo y el insecto es extremadamente compleja y depende de interacciones específicas entre el hospedero y el entomopatígeno (Hejek y Leger, 1994).

El primer intento de control microbiano con *M. anisopliae* fue realizado por Metschnikoff en 1879 para control de larvas del curculiónido *Cleonus punctiventris* Germ en remolacha azucarera. En 1884 Krassiltschik, continuó con estos estudios obteniendo

un control de 50 a 80% del insecto después de 10 a 15 días de aplicación. Apartir de esa época, con la diversidad de variedades y razas de *M. anisopliae* que se reportan, se han realizado estudios sobre su efecto en diversas especies de insectos, ya que es reportado como un patógeno natural de más de 200 especies de insectos de diferentes ordenes, incluyendo plagas de importancia económica. *Metarhizium anisopliae* tiene un registro de hospedantes de 26 géneros de insectos de los cuales 20 especies han sido identificadas (McCoy *et al.*, 1988).

El manejo de *M. anisopliae* se realiza mediante esporas en latencia, pasando a una fase infectiva que inicia cuando las esporas se pegan a los insectos, germinando y penetrando en la cutícula mediante la producción de enzimas. La reproducción interna es muy rápida y el hongo se establece en el hospedero donde hay invasión de tejidos y del hemocele, producción de toxinas y muerte. Después de la muerte del insecto (5 – 8 días) se inicia un proceso de micelación y esporulación que depende de las condiciones ambientales con una humedad relativa alta. La enfermedad causada por los entomopatógenos se desarrolla en corto tiempo y la plaga presenta síntomas de poca movilidad, baja actividad alimentaria, parálisis desorientación, cambio de color y finalmente la muerte (Orius, 2001).

Los adultos infectados por *M. anisopliae* presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras, dejan de efectuar las oviposturas; las ninfas infectadas disminuyen sus movimientos, mueren y se tornan momificadas. Tanto adultos como ninfas presentan inicialmente un crecimiento micelial blanco sobre su

cuerpo que cuando esporula se torna verde, debido probablemente a que las condiciones en que habitan son inadecuadas para el proceso de esporulación del hongo (Alves, 1986).

3.5 Interacción Hongo Entomopatógeno - Vector.

Ibarra, (2003) reporto que el aislamiento M362 de *M. anisopliae* variedad *acridium* produjo una mortalidad en 10.5 días, matando significativamente más rápido a los adultos de *D. maidis* que otros aislamientos. En otros estudios se ha encontrado que esta especie de hongo puede matar a otros homópteros en menos días, debido a que los afidos son muertos a los 7 días después de la aspersión (Hall, 1980).

El tiempo promedio mínimo en matar de este aislamiento (M362) fue de 11.0 días. Lo anterior significa que este aislamiento podría matar al vector antes de que este transmita al patógeno *S. kunkelii*, debido a que es necesario un periodo de latencia (tiempo que es adquirido) de entre dos y tres semanas para que *D. maidis* transmita al patógeno (Ibarra, 2003).

Los resultados de la aplicación *M. anisopliae* en ninfas de la Mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala provoco un descenso con un promedio al inicio de la prueba de 45.7% de ninfas por metro cuadrado en el área tratada, donde la densidad del insecto fue disminuyendo semanalmente a 42.7%, 13.3%, 3.1% hasta 1.2% ninfas por metro cuadrado al final de la prueba, a las cinco semanas de la primera aplicación del hongo (Toriello *et al.* , 1999).

Aparentemente la fase del insecto más sensible al ataque del hongo es el adulto, debido a que se encuentran más frecuentemente micomizados, sin embargo altos índices poblacionales de insectos que mueren en esa fase fueron infectados en un estadio ninfal (Alves, 1986).

Pero como se ha visto en otros experimentos por ejemplo en huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae) que fueron infectados con *M. anisopliae* bajo condiciones controladas. Se encontró que no hubo efecto patogénico en los huevos de *A. varia* y sobre las ninfas causó una mortalidad promedio de 46.1% y en el testigo fue 20.9%. La mortalidad en los huevos se presentó cuando se roció la cepa de *M. anisopliae* ocho días antes de su eclosión, causando una mortalidad de 58.5%. Al aplicarlo al momento de la eclosión, la mortalidad fue del 34.1%. La mortalidad promedio en el testigo de esta prueba fue del 20.9% (Arango *et al.*, 1994).

4. MATERIALES Y METODOS

El aislamiento o biotipo utilizado para este experimento fue el M366 del hongo *M. anisopliae*, debido a que este aislamiento resultó tener buenos efectos contra adultos de *D. maidis* que no poseían la bacteria *S. kunkelii* (Ibarra, 2003). La colonia de *D. maidis* usada en los experimentos fue obtenida de un cultivo de maíz, localizado en Colima, Colima. La variedad de maíz utilizada en los experimentos fue Tuxpeño.

La preparación de la solución con esporas del hongo se efectuó de la siguiente manera. Las esporas del aislamiento se diluyen en 500 ml. de agua estéril y se agregan 2 ó 3 gotas de Estravon 80, como dispersante. De la anterior solución se colocó una gota en la cámara de Beuwer y se realizó el conteo de esporas en el microscopio. Se determinó en el microscopio el número de esporas/ml. y se realizaron diluciones para llegar a una concentración de esporas a 1×10^7 .

El experimento se realizó dentro de un cuarto de cría que estuvo acondicionado a $25^{\circ} \text{C} \pm 2$, 50% de humedad relativa y un foto período de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Los experimentos se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en Tecoman, Colima.

Determinar la sobrevivencia de adultos de *D. maidis* cuando primero adquieren la bacteria *S. kunkelii* y luego son atacados por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* biotipo M366 y cuando primero son atacados por el hongo entomopatógeno y luego adquieren a la bacteria.

Un grupo de adultos de *D. maidis* de una semana de edad fueron puestos en un período de adquisición de 72 horas, en plantas de maíz con síntomas de *S. kunkelii*. Un segundo grupo fue confinado a plantas de maíz sanas también por 72 horas. Después del anterior período los adultos de ambos grupos se pasaron a plantas de maíz sanas. De estos dos grupos se tuvieron cinco tratamientos; el primero, fue representado por adultos que adquirieron *S. kunkelii* y luego se les aplicó un hongo entomopatógeno, el segundo fueron adultos que se les aplicó el hongo y luego adquirieron a *S. kunkelii*, el tercero fueron

adultos que adquirieron *S. kunkelii*, pero no se les aplicó el hongo, el cuarto fueron adultos que no adquirieron *S. kunkelii* pero sí se les aplicó el hongo y el quinto fueron adultos que no adquirieron a *S. kunkelii* y no se les aplicó el hongo (individuos sanos).

A los individuos bajo los cinco tratamientos se les determinó su sobrevivencia, cada 24 horas. En cada tratamiento se usaron 12 cajas tipo botella. Cada botella contenía una plántula de maíz con cinco individuos de *D. maidis*. Por lo tanto se tuvieron 60 chicharritas por tratamiento.

Determinar la sobrevivencia de ninfas de *D. maidis* cuando primero adquieren la bacteria *S. kunkelii* y luego son atacadas por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* biotipo M366 y cuando primero son atacadas por el hongo entomopatógeno y luego adquieren a la bacteria.

Un grupo de ninfas de *D. maidis* de una semana de edad fueron puestas en un período de adquisición de 72 horas, en plantas de maíz con síntomas de *S. kunkelii*. Un segundo grupo fue confinado a plantas de maíz sanas también por 72 horas. Después del anterior período las ninfas de ambos grupos se pasaron a plantas de maíz sanas. De estos dos grupos se tuvieron cinco tratamientos; el primero, fue representado por ninfas que adquirieron *S. kunkelii* y luego se les aplicó un hongo entomopatógeno, el segundo fueron ninfas que se les aplicó el hongo y luego adquirieron a *S. kunkelii*, el tercero fueron ninfas que adquirieron *S. kunkelii*, pero no se les aplicó el hongo, el cuarto fueron ninfas que no adquirieron *S. kunkelii* pero sí se les aplicó el hongo y el quinto fueron ninfas que no adquirieron a *S. kunkelii* y no se les aplicó el hongo (individuos sanos).

A los individuos bajo los cinco tratamientos se les determinó su sobrevivencia, cada 24 horas. En cada tratamiento se usaron 12 cajas tipo botella. Cada botella contenía una plántula de maíz con cinco individuos de *D. maidis*. Por lo tanto se tuvieron 60 chicharritas por tratamiento.

Determinar la sobrevivencia de adultos de *D. maidis* asperjados con *M. anisopliae* biotipo M366 a uno y veinte días después de adquirir la bacteria.

Un grupo de adultos de *D. maidis* se pusieron en un tiempo de adquisición por 72 horas en plantas de maíz enfermas por *S. kunkelii*. Un segundo grupo fue confinado a plantas de maíz sanas. Después ambos grupos fueron pasados a plantas de maíz sanas. De estos dos grupos se tuvieron dos tratamientos; el primero fue representado por adultos que adquirieron *S. kunkelii* y luego se les aplicó el hongo entomopatógeno a los 20 días después de la adquisición y el segundo fueron adultos que no se les aplicó el hongo (individuos sanos).

Un tercer grupo de adultos de *D. maidis* se puso en un tiempo de adquisición por 72 horas en plantas de maíz enfermas por *S. kunkelii*. Un cuarto grupo fue confinado a plantas de maíz sanas. Después ambos grupos fueron pasados a plantas de maíz sanas. De estos dos grupos se tuvieron dos tratamientos; el primero fue representado por adultos que adquirieron *S. kunkelii* y luego se les aplicó el hongo entomopatógeno a un día después de la adquisición y el segundo fueron adultos que no se les aplicó el hongo (individuos sanos).

A los individuos bajo los cuatro tratamientos se les determinó su sobrevivencia, cada 24 horas. En cada tratamiento se usaron 12 cajas tipo botella. Cada botella contenía una

plántula de maíz con cinco individuos de *D. maidis*. Por lo tanto se tuvieron 60 chicharritas por tratamiento.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de varianza fue utilizado para hacer las comparaciones de los porcentajes de sobrevivencia y promedio de días en morir. Las diferencias entre las medias fueron determinadas con la prueba Tukey a un nivel de $P = 0.05$. Ambas pruebas fueron efectuadas con el programa Olivares 1994.

6. RESULTADOS

6.1 Porcentaje de sobrevivencia de los adultos de *Dalbulus maidis* durante los primeros 25 días después de ser asperjados con *Metarhizium anisopliae*.

El porcentaje de sobrevivencia de los adultos de *D. maidis* fue diferente entre los cinco tratamientos (Figura 1), donde se observó que el porcentaje mas alto fue en el tratamiento cinco, siendo el de los adultos sanos con un 100% de sobrevivencia hasta el día seis llegando al 80.4% en el día 25. En el tratamiento tres, los adultos que sólo adquirieron la bacteria *S. kunkelii*, mostraron un porcentaje de sobrevivencia de 100%,

nada más el primer día y a partir del día 12 hasta el día 25 tuvieron un 48.3% de sobrevivencia. En el tratamiento cuatro, los adultos que se les asperjó *M. anisopliae* sin adquirir la bacteria *S. kunkelii*; presentaron un porcentaje de 100% los primeros cuatro días, llegando al 16.7% a partir del día 22 hasta el día 25. En el tratamiento dos donde los adultos primero se les asperjó *M. anisopliae* y después adquirieron *S. kunkelii* mostraron un porcentaje de sobrevivencia de 100% únicamente el primer día, llegando a un 8.3% de sobrevivencia a partir del día 22 hasta el día 25 (Foto 1). Por último, en el tratamiento uno, los adultos que adquirieron *S. kunkelii* y después se les asperjó *M. anisopliae* tuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 100% hasta el día tres y un 0.0% a partir del día 15 hasta el día 25.

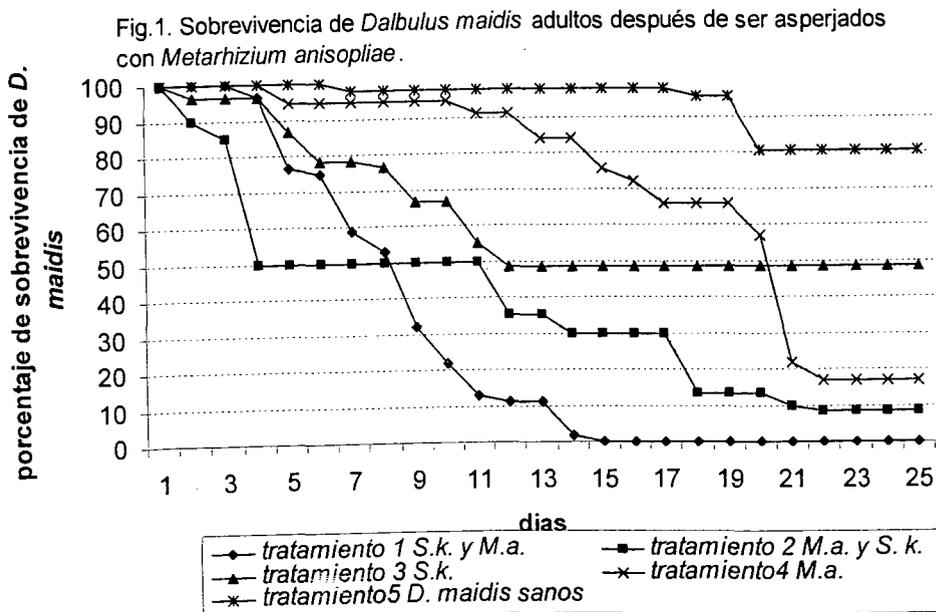


Foto. 1. Chicharrita adulta con micelio a los 25 días de ser asperjada con *M. anisopliae* (Tratamiento dos).



6.2 Porcentaje de sobrevivencia de las ninfas de *Dalbulus maidis* durante los primeros 25 días después de ser asperjados con *Metarhizium anisopliae*.

El porcentaje de sobrevivencia de ninfas de *D. maidis* fue diferente entre los cinco tratamientos (Figura 2), donde se observó que el porcentaje más alto fue del tratamiento cinco, siendo el de las ninfas sanas con un 100% de sobrevivencia hasta el día seis declinando a partir del día siete con un 85% al día 25. El tratamiento que le siguió, fue el tres de las ninfas que sólo adquirieron la bacteria *S. kunkelii*, teniendo un porcentaje de

sobrevivencia de 100%, nada más el cuarto día y apartir del día 12 hasta el día 25 tuvo un 66.6% de sobrevivencia. El siguiente tratamiento fue el cuatro, el de los adultos que se les asperjo *M. anisopliae* sin adquirir la bacteria *S. kunkelii*; con un porcentaje de 100% los cinco primeros días, llegando al 5% apartir del día 16 hasta el día 25. El penúltimo tratamiento fue el dos, donde las ninfas primero se les asperjo *M. anisopliae* y después adquirieron *S. kunkelii* con un porcentaje de sobrevivencia de 100% los primeros dos días, llegando a un 3.3% de sobrevivencia apartir del día 13 hasta el día 25. Por último esta el tratamiento uno de los adultos que adquirieron *S. kunkelii* y después sen les asperjo *M. anisopliae* con un porcentaje de sobrevivencia del 100% hasta el día dos y con un 0% a partir del día 18 hasta el día 25 (Foto 2).

Fig. 2. Sobrevivencia de *Dalbulus maidis* ninfas después de ser asperjadas con *Metarhizium anisopliae*.

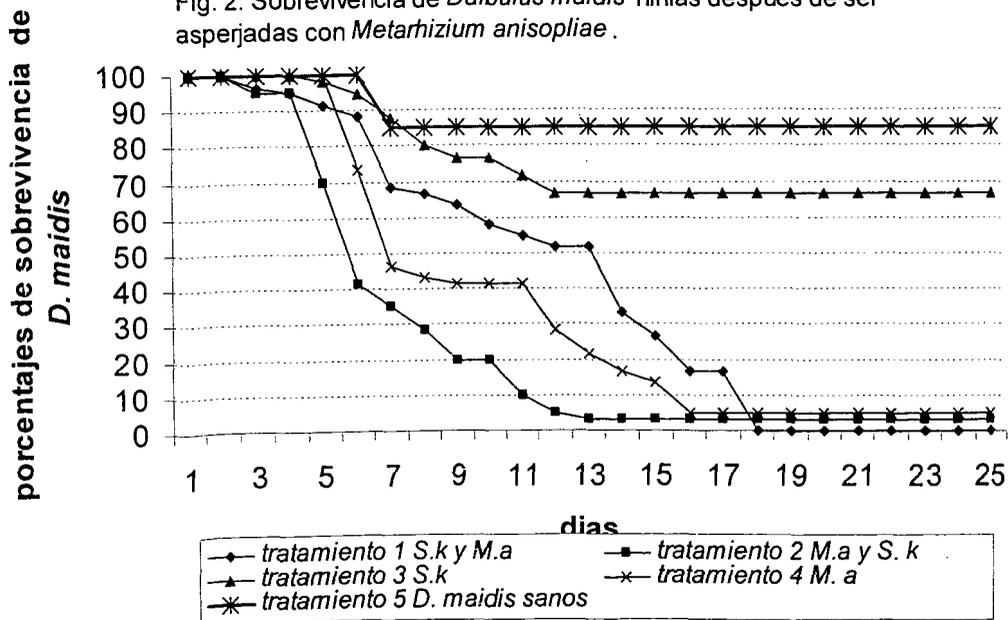
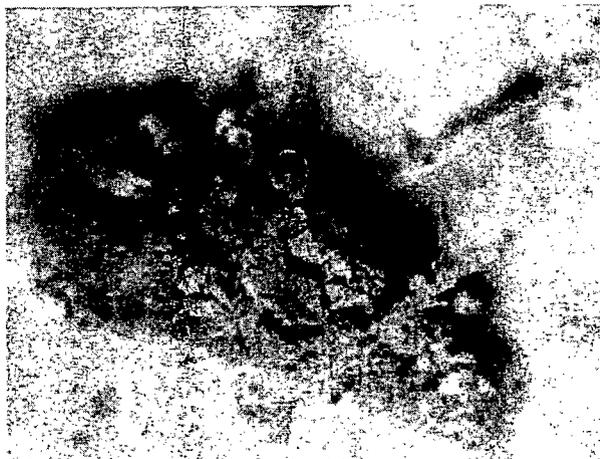


Foto. 2. Chicharrita ninfa con micelio a los 25 días de ser asperjada con *M. anisopliae* (Tratamiento uno).



6.3 Porcentaje promedio de sobrevivencia a los 25 días de aspersión en ninfas y adultos de *D. maidis*.

El promedio de sobrevivencia de las ninfas tuvo una significativa diferencia entre tratamientos (Cuadro 1). El más alto promedio fue del tratamiento tres y cinco con un promedio de 69.6% y 85.0%, respectivamente. Mientras que los que presentaron menor sobrevivencia fueron el tratamiento cuatro teniendo un promedio de 5.0%, el tratamiento

dos con un promedio de 3.3%, y el tratamiento uno con un promedio de 0.0% de sobrevivencia.

El promedio de sobrevivencia de los adultos entre tratamientos fue significativamente diferente (Cuadro 1). El más alto promedio fue para el tratamiento cinco con un 80.4%, mientras que los que tuvieron menor promedio de sobrevivencia fueron el tratamiento cuatro teniendo un promedio de 16.7%, el tratamiento dos con un promedio de 10.0% y el tratamiento uno con un promedio de 0.0% de sobrevivencia.

Cuadro 1. Porcentaje promedio de sobrevivencia en ninfas y adultos a los 25 días de aspersión de *Metarhizium anisopliae*.

Ninfas				
Trata. 1	Trata.2	Trata. 3	Trata. 4	Trata. 5
<i>S. k. + M.a.</i>	<i>M.a + S.k</i>	<i>S.k.</i>	<i>M.a</i>	<i>D. maidis</i> sanos
0.0 (B)	3.3 (B)	69.6 (A)	5.0 (B)	85.0 (A)
n=50	n=60	n=50	n=60	n=60
Adultos				
Trata. 1	Trata.2	Trata. 3	Trata. 4	Trata. 5
<i>S. k. + M.a.</i>	<i>M.a + S.k</i>	<i>S.k.</i>	<i>M.a</i>	<i>D. maidis</i> sanos
0.0 (B)	10.0 (B)	48.0 (AB)	16.6 (B)	80.4 (A)
n=50	n=60	n=50	n=60	n=60

n= número de individuos probados.

Promedio con letras iguales son significativamente similares con la prueba Tukey a un nivel de P = 0.05.

6.4 Porcentaje de sobrevivencia de adultos de *D. maidis* asperjados con *M. anisopliae* a uno y 20 días después de adquirir *S. kunkelii*.

No existió diferencia en los porcentajes de sobrevivencia entre adultos de 20 días (Figura 3) y un día (Figura 4) después de adquirir *S. kunkelii*. En los adultos de 20 días después de adquirir *S. kunkelii*, y donde se asperjo el hongo *M. anisopliae*, el porcentaje fue de 100% los primeros dos días, descendiendo a partir del día cinco. En cambio en el testigo hubo una sobrevivencia del 100% hasta el día 20.

En los adultos con un día después de adquirir *S. kunkelii*. El testigo tuvo un porcentaje de sobrevivencia de 100% hasta el día cinco y descendiendo a 67.8% a partir del día 15 hasta el día 20, por lo contrario en los adultos donde se asperjo el hongo el porcentaje fue de 100% hasta el día tres y descendiendo a partir del día cinco.

Fig. 3. Sobrevivencia de *Dalbulus maidis* adultos asperjados con *Metarhizium anisopliae* a los 20 días después que los adultos adquirieron la bacteria.

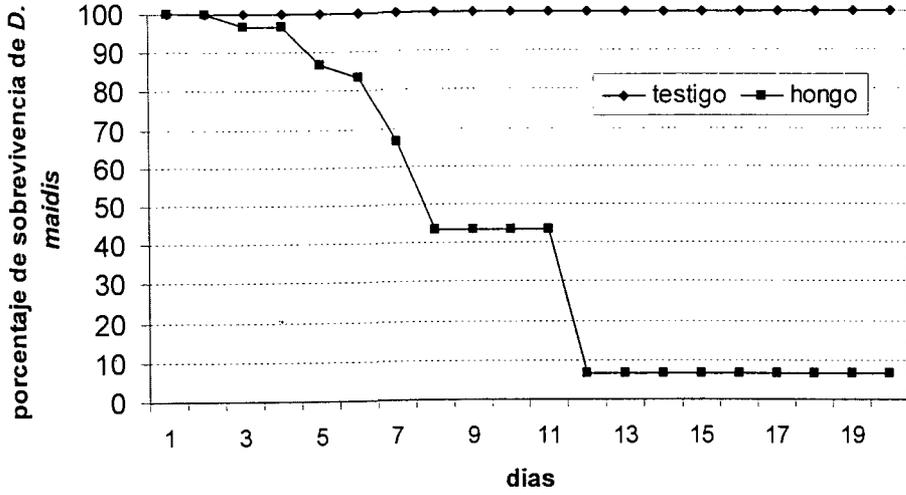
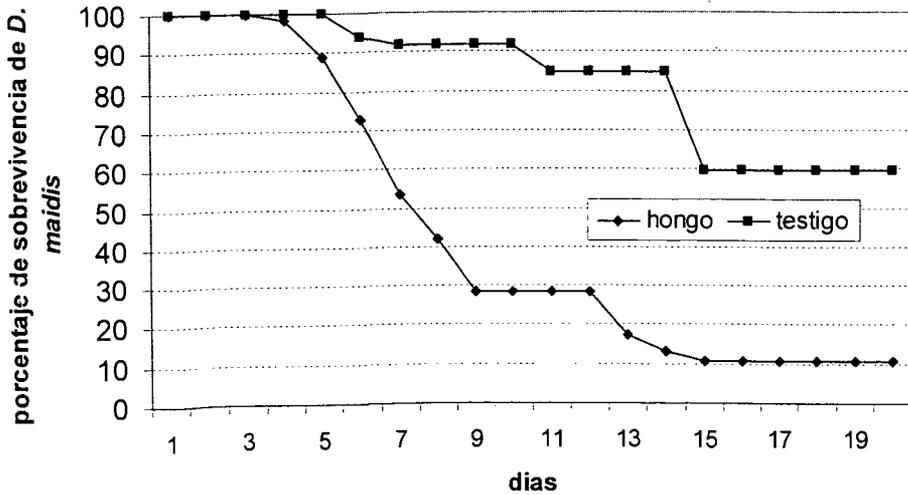


Fig. 4. Sobrevivencia de *Dalbulus maidis* adultos asperjados con *Metarhizium anisopliae* a un día después que los adultos adquirieron la bacteria.



7. DISCUSION

La sobrevivencia de la chicharrita del maíz *D. maidis* es afectada negativamente cuando hospeda a la bacteria *S. kunkelii* y al hongo entomopatógeno *M. anisopliae*. Lo anterior fue encontrado en este estudio cuando los adultos de la chicharrita primero adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron asperjados con *M. anisopliae* y cuando primero fueron asperjados con *M. anisopliae* y luego adquirieron a *S. kunkelii*. El anterior patrón también se encontró cuando ninfas de la chicharrita primero adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron asperjadas con *M. anisopliae*. Resultados similares han sido reportados en insectos que son habitados por dos patógenos. Tal es el caso de las termitas *Coptotermes formosanus* (Shiraki) (Isoptera: Rhinotermitidae), quienes tienen una relación simbiótica con una bacteria xilófaga, que se encuentra en el intestino medio. Al aplicar el hongo *M. anisopliae* sobre termitas con la bacteria, estas tuvieron entre un 98.6% y 100% de mortalidad (Lecuona *et al.*, 1996). El mismo efecto negativo sobre un insecto huésped ha sido reportado en los homópteros de las familias Aleyrodidae y Coccidae, los que son portadores del virus de la tristeza de los cítricos y son asperjados con el hongo *Aschersonia aleyrodis* (Lecuona *et al.*, 1996).

Los anteriores resultados son positivos para tratar de controlar las poblaciones de *D. maidis* en cultivos de maíz, debido a que los individuos portadores de *S. kunkelii* descrecen en sobrevivencia mas rápido que los individuos que no tienen la bacteria cuando ambos son asperjados con *M. anisopliae*. Por lo tanto, la dispersión o propagación

de la bacteria en un cultivo de maíz podría ser disminuida debido a que el hongo mata más rápido a los individuos vectores.

Por otro lado, el hongo *M. anisopliae* afecta por igual la sobrevivencia de la chicharrita del maíz cuando esta tiene poco tiempo (un día) o mucho tiempo (20 días) de haber adquirido la bacteria *S. kunkelii*. Es esperado que a mayor tiempo de haber adquirido la bacteria exista mayor cantidad de esta dentro del vector (Nault, 1994) y posiblemente mayor protección contra entomopatógenos como *M. anisopliae*. Sin embargo, los resultados de este estudio no sostienen esa hipótesis, debido a que ambos grupos (un día y 20 días) mostraron una sobrevivencia similar al aplicarles *M. anisopliae*. Es posible que la bacteria no tenga un efecto en el sistema inmunológico del insecto, por lo tanto la cantidad de bacteria no es un factor que impida la invasión del hongo dentro del vector. Sobre ese respecto, en otro caso de estudio se reportó que la infección del huésped *Drosophila* por *Spiroplasma* no induce y no inhibe la respuesta inmune del huésped (Hurst *et al.*, 2003).

Lo anterior es de gran utilidad en términos de control debido a que los individuos patogénicos dentro de una población podrían ser disminuidos más rápidamente.

8. CONCLUSIONES

1. El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* afectó drásticamente la sobrevivencia de la chicharrita del maíz aun cuando esta lleva en su cuerpo a la bacteria *S. kunkelii*.
2. El hongo *M. anisopliae* afecta por igual la sobrevivencia de la chicharrita cuando esta tiene un día y 20 día de haber adquirido la bacteria *S. kunkelii*. Por lo tanto una mayor cantidad de bacteria (20 días) no implica una mejor defensa contra organismos patogénicos como *M. anisopliae*.

9. LITERATURA CITADA

- Alves, S. B. 1986. Fungos Entomópatogénicos. Control Microbiano de Insectos. Edt. Manole. Brasil. 417 pp.
- Arango, G. L., C. Torres, y S. L. Lapionte. 1994. Patogenicidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre huevos y ninfas *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae). Revista Colombiana de Entomología 20: 43-46.
- Barnes, D. 1954. Biología, ecología y distribución de las chicharritas, *Dalbulus elimatus* (Ball) y *Dalbulus maidis* (DeL. & W.) Folleto Técnico, Número 11. Secretaria de Agricultura y Ganadería, Oficina de Estudios Especiales, México, D. F. 112 pp.
- Ebbert, M. A., y L. R. Nault. 1994. Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). Environmental Entomology 23: 634- 644.
- Hejek, A. E., y R. J. St Leger. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
- Hall, R. A. 1980. Comparison of laboratory infection of aphids by *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 95: 159-162.
- Herrera T., y M. Ulloa. 1998. El reino de los hongos, Ed. Fondo de cultura económica, México. Pp. 392 – 393.
- Hurst, G. D. D., Anbutsu, H. Kutsukake, y M. Fukatsu, T. 2003. Hidden from the host: *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune

response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Molecular Biology* 12: 93-97.

- Ibarra, A. G. 2003. Efecto de hongos entomopatógenos en la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Homoptera: Cicadellidae). Universidad de Guadalajara. 28 pp.
- Lecuona, R., E. Papierok B, y Riba G. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. 143-150 pp. *In* Microorganismos patógenos empleados en el control microbial de insectos plaga. R. E Lecuona (ed.). Argentina. 338 pp.
- Madden, L. V., L. R. Nault, S. E. Heady, y W. E. Styer. 1986. Effect of temperature on the population dynamics of three *Dalbulus* Leafhoppers species. *Ann. Appl. Biol.* 108:475- 751.
- McCoy, C.W., R.A., Samson, y D. G. Boucias. 1988. Entomogenous fungi. *In* Ignoffo, C. M. (Ed.). Handbook of natural pesticides. Vol. 5. Microbial insecticides. Part A. Entomogenous, Protozoa and Fungi. Boca Raton, CRC Press Inc. Florida 343 pp.
- Nault, L. R., y O. E. Bradfute. 1979. Corn stunt: Involvement of a complex of leafhopper – borne pathogens. *In: Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*, K. Maramorosch & K. F. Harris Eds. Academic Press, New York, USA. pp.561 – 586.
- Nault, L. R. 1990. Evolution of an insect pest: Maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica* 35: 165-175.

- Nault L. R. 1994. Transmission biology, vector specificity and evolution of planthopper transmitted plant viruses. In: Planthoppers their ecology and management, R. F. Denno y T. J. Prefect Eds. Capman & Hall, New Yrk, USA.Pp. 429- 448.
- Olivares, S.E.1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5, Facultad de Agronomía, UANL, Nuevo León.
- Orius, 2001. Revizada en Mayo del año 2003.
[<http://OriusBiótecnologíaBienvenidos.htm>].
- Özbek, E., S. A. Miller, T. Neulia, y S. A. Hogenhout. 2003. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. Journal of Invertebrate Pathology 82: 107-175.
- Purcell, A.H. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathology 20: 397- 417.
- Sharma *et al.*, 2001. Revizada en marzo del año 2003.
[<http://SharmaInsectospredadores.htm>].
- Toriello, C., H. Navarro – Barranco, M.L. Almengor, y T. Mier. 1999. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como Bioinsecticida contra la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala.1999. Revista Mexicana de Micología 15: 119-121.

- Whitcomb, R. F. 1981. The biology of *Spiroplasma*. Annu. Rev. Entomol. 26: 397
- 427.