



Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

ISSN: 2007-1124

[garcia.zeferino@inifap.gob.mx](mailto:garcia.zeferino@inifap.gob.mx)

Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias

México

Torres de la Cruz, Magdiel; Cortez Madrigal, Hipólito; Ortiz García, Carlos Fredy; Cappello García, Silvia; Pérez de la Cruz, Manuel

Cepas monospóricas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad sobre *Galleria mellonella* en Tabasco, México

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, vol. 5, núm. 2, abril-junio, 2014, pp. 171-180

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
Morelos, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265631172004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Cepas monospóricas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad sobre *Galleria mellonella* en Tabasco, México

## Monosporic strains of *Metarhizium anisopliae* and its pathogenicity to *Galleria mellonella* in Tabasco, Mexico

Magdiel Torres de la Cruz<sup>a</sup>, Hipólito Cortez Madrigal<sup>b</sup>, Carlos Fredy Ortiz García<sup>c</sup>, Silvia Cappello García<sup>a</sup>, Manuel Pérez de la Cruz<sup>a</sup>

### RESUMEN

La "polilla mayor de las ceras" *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) es ocasionalmente encontrada en colmenas y es la principal plaga de cera almacenada. El objetivo del presente estudio fue evaluar la patogenicidad de aislamientos monospóricos nativos de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella*. Se utilizaron cuatro aislamientos poliespóricos nativos (MaA1, MaA2, MaA3, MaA4). De cada aislamiento se obtuvieron 10 aislamientos monospóricos; así, un total de 40 aislamientos monospóricos se utilizaron para la prueba de patogenicidad, los cuales fueron conformados en cuatro grupos con base al aislamiento poliespórico de origen. El análisis estadístico aplicado separadamente a cada uno de los cuatro grupos mostró diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ) en la mortalidad de *G. mellonella*. Los aislamientos de *M. anisopliae* más patogénicos, y que superan el 80 % de mortalidad fueron: MaA4(5), MaA1(4) y MaA3(7), con 100.0, 88.9 y 83.3 %, respectivamente. Los resultados indican amplia variabilidad intra-específica de cultivos monospóricos del hongo *M. anisopliae* en cuanto a su patogenicidad hacia larvas de *G. mellonella*, demuestran la utilidad de cultivos monospóricos y su caracterización patogénica para la selección de aislamientos con características sobresalientes; así también, muestra el potencial del hongo para el desarrollo de bioinsecticidas contra la palomilla de la cera *G. mellonella*.

**PALABRAS CLAVE:** Apicultura, Hongos entomopatógenos, Polilla mayor de la cera.

### ABSTRACT

"Greater wax moth" *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) is occasionally found in beehives and is the main pest of stored wax. The objective of the present study was to evaluate the pathogenicity of native monosporic strains of *M. anisopliae* against *G. mellonella* larvae. Four polysporic indigenous isolates were used (MaA1, MaA2, MaA3, MaA4). Ten monosporic strains were obtained from each polysporic isolate. Thus, a total of 40 strains was obtained and used for the pathogenicity assay. Monosporic strains were formed into four groups based on parental polysporic isolates. Statistical analysis applied separately to each of the four groups of monosporic strains showed significant differences in *G. mellonella* mortality. The more pathogenic strains were MaA4(5), MaA1(4) and MaA3(7), with mortality of 100.0, 88.9 and 83.3 %, respectively. The results indicate wide intra-specific variability of monosporic strains of *M. anisopliae* in terms of their pathogenicity to larvae of *G. mellonella*. They also demonstrate the utility of monosporic strains and their pathogenic characterization for selection of isolates with outstanding features; as well as, the potential of the studied fungus for development of bioinsecticides against "greater wax moth" *G. mellonella*.

**KEY WORDS:** Apiculture, Entomopathogenic fungi, Greater wax moth, Monosporic strains.

Recibido el 14 de enero de 2013. Aceptado el 9 de julio de 2013.

<sup>a</sup> División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5. 86039. Tabasco, México. magtorre@colpos.mx. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. México.

<sup>c</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. México.

## INTRODUCCIÓN

En México, la apicultura representa una importante actividad dentro del sector pecuario<sup>(1)</sup>. De esta actividad dependen 42 mil productores, quienes en conjunto cuentan con aproximadamente dos millones de colmenas, y permiten que el país se ubique como el quinto productor y tercer exportador de miel en el mundo<sup>(2)</sup>. En Tabasco, la actividad apícola involucra a 167 productores, 230 apiarios y 2,800 colmenas<sup>(3)</sup> con una producción anual de 55.8 t de miel, ocupando el lugar 29 a nivel nacional<sup>(4)</sup>. De esta actividad se obtienen productos como miel, cera, propóleo, jalea real y apitoxina<sup>(5)</sup>.

La miel es el principal producto de la colmena<sup>(6)</sup>, y la cera es uno de los productos más útiles de las abejas (*Apis mellifera* L.), que además se utiliza en la industria farmacéutica, odontología y cosmética<sup>(7)</sup>. La cera contiene nutrientes, polen y miel<sup>(8)</sup>, por lo que es atacada por diversas especies de insectos, plaga entre las que destaca la "polilla mayor de las ceras" *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *G. mellonella* es considerada una de las plagas de la cera más devastadoras y económicamente importante en el mundo<sup>(9)</sup>. En su fase larvaria, este lepidóptero se alimenta de la cera de las colmenas, causando destrucción de los panales. En su desplazamiento, las larvas perforan galerías que recubren con seda. Cuando los ataques son severos, las colonias con baja población de abejas pueden abandonar la colmena; sin embargo, cuando se enfrenta a poblaciones normales de abejas dentro de una colonia, éstas no son capaces de causar daño económico<sup>(10)</sup>.

El principal daño causado por *G. mellonella* se presenta sobre materiales que han sido almacenados durante el periodo de receso de la actividad apícola, sin ninguna protección contra las polillas<sup>(11)</sup>, y representa pérdidas entre el 30 y 50 % del valor de cada colmena<sup>(12)</sup>. Por otro lado, los excrementos y restos de seda producidos por larvas de *G. mellonella* bajan la calidad de la cera, obligando

## INTRODUCTION

In Mexico, beekeeping is an important activity within the livestock sector<sup>(1)</sup>. Of this activity depend 42 thousand producers, who have approximately two million hives, and allow the country placed as the fifth producer and third largest exporter of honey in the world<sup>(2)</sup>. In Tabasco, the beekeeping activity involves 167 producers, 230 apiaries and 2,800 hives<sup>(3)</sup> with an annual honey production of 55.8 t, occupying the place 29 at national level<sup>(4)</sup>. This activity results in products such as honey, wax, propolis, royal jelly and apitoxine<sup>(5)</sup>.

Honey is the main product of the hive<sup>(6)</sup>, and the wax is one of the most useful products from bees (*Apis mellifera* L.), which is also used in the pharmaceutical industry, dentistry and cosmetic<sup>(7)</sup>. The wax contains nutrients, pollen and honey<sup>(8)</sup>, by what it is attacked by various species of pest insect notably the "greater wax moth" *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *G. mellonella* is considered the pest of the wax more devastating and economically important in the world<sup>(9)</sup>. In its larval stage, this moth feeds on wax from beehives, causing destruction of the combs. In its displacement, the larvae bore the galleries covering with silk. When the attacks are severe, the colonies with low bees population leave the hive; however, when confronted with normal bees populations in a colony, these are not capable of causing economic damage<sup>(10)</sup>.

The main damage caused by *G. mellonella* is presented on materials that have been stored during the recess of the beekeeping activity, without any protection against moths<sup>(11)</sup>, and represents losses between 30 and 50 % of the value of each hive<sup>(12)</sup>. Moreover, the excrements and silk remnants produced by larvae of *G. mellonella* lowers the wax quality, forcing the beekeeper to melt it; however, this procedure is only a partial problem solution, since part of this waste manage to pass the filter<sup>(11)</sup>.

The presence of *G. mellonella* obliges the producer to spray the wax using insecticides<sup>(7)</sup>.

al apicultor a fundirla; sin embargo, este procedimiento constituye sólo una solución parcial al problema, ya que parte de estos desechos logran traspasar los filtros<sup>(11)</sup>.

La presencia de *G. mellonella* obliga al productor a fumigar la cera utilizando insecticidas<sup>(7)</sup>. Esto representa una amenaza latente para la exportación de miel, al detectarse la presencia de residuos tóxicos, lo cual puede restringir su ingreso a ciertos mercados<sup>(13)</sup>. Además, el control químico no es lo suficientemente efectivo debido al difícil acceso a larvas y adultos que se encuentran en las galerías (túneles), inducen resistencia, y matan insectos benéficos<sup>(14)</sup>.

Un sistema de control más sustentable e inocuo es requerido, y el uso de enemigos naturales de insectos es una alternativa de ser evaluada contra *G. mellonella*<sup>(15)</sup>. Al respecto, larvas silvestres de *G. mellonella* son susceptibles a infecciones fúngicas<sup>(15)</sup> y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* han sido evaluados con resultados positivos<sup>(7)</sup>; sin embargo, la mayoría de los trabajos se han centrado a evaluar esta alternativa para el control de *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) y *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae)<sup>(16,17,18)</sup>.

En Tabasco se cuenta con aislamientos nativos de *M. anisopliae*<sup>(19)</sup> que pueden ser evaluados para el control de *G. mellonella*; sin embargo, es necesario seleccionar las mejores cepas para el desarrollo de bioinsecticidas. Una forma de lograrlo consiste en desarrollar cultivos monospóricos, ya que permiten seleccionar las mejores características de las cepas silvestres<sup>(20)</sup>; por lo que, el objetivo del presente estudio fue evaluar la patogenicidad de aislamientos monospóricos nativos de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención de aislamientos de Metarhizium anisopliae*

Se utilizaron cuatro aislamientos poliespóricos nativos (MaA1, MaA2, MaA3, MaA4),

This represents a threat to the export of honey, since the presence of toxic waste in it can restrict its entering to certain markets<sup>(13)</sup>. In addition, chemical control is not effective enough because of the difficult access to larvae and adults who are in the galleries (tunnels), induced resistance, and killing of beneficial insects<sup>(14)</sup>.

A more sustainable and safe control system is required, and the use of natural enemies of insects is an alternative to be evaluated<sup>(15)</sup>. In this regard, wild larvae of *G. mellonella* are susceptible to fungal infections<sup>(15)</sup> and the entomopathogen fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* have been evaluated with positive results<sup>(7)</sup>; however, most of the works have focused for evaluating this alternative for the control of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) and *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae)<sup>(16,17,18)</sup>.

In Tabasco there are native isolates of *M. anisopliae*<sup>(19)</sup> which can be evaluated for the control of *G. mellonella*; however, is necessary to select the best strains for the development of bioinsecticides. A way to accomplish this is to develop monosporic strains, since allow the selection of the best features from the wild strains<sup>(20)</sup>; hence, the objective of the present study was to evaluate the pathogenicity of native monosporic isolates of *M. anisopliae* over the *G. mellonella* larvae.

## MATERIALS AND METHODS

### *Obtaining isolates of Metarhizium anisopliae*

Four native polysporic isolates (MaA1, MaA2, MaA3, MaA4), belonging to the entomopathogenic fungi collection from the Entomology Laboratory of the Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco were used. All the strains were multiplied in Sabouraud dextrose-Agar medium + 0.1% yeast extract (ADS + YE) culture<sup>(21)</sup>.

### *Production of monosporic culture*

Ten monosporic<sup>(22)</sup> isolates were obtained from each polysporic isolate. Thus, a total of 40

pertenecientes a la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Todas las cepas se multiplicaron en el medio de cultivo Agar-Dextrosa de Sabouraud + 0.1% de extracto de levadura (ADS + EL)<sup>(21)</sup>.

#### *Obtención de cultivos monospóricos*

De cada aislamiento poliespórico se obtuvieron 10 aislamientos monospóricos<sup>(22)</sup>. Así, un total de 40 aislamientos monospóricos se utilizaron para la prueba de patogenicidad. A cada aislamiento se le asignó la clave correspondiente al aislamiento de origen, más el número consecutivo (entre paréntesis) del aislamiento monospórico<sup>(23)</sup>.

#### *Obtención de larvas de G. mellonella*

Panales de cera infestados naturalmente con larvas de *G. mellonella* se obtuvieron del apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Pupas de la palomilla se transfirieron a frascos de vidrio de 2 L de capacidad. A su vez, los adultos emergidos se transfirieron a nuevos frascos de vidrio de 2 L para permitir el apareamiento y oviposición. Las poblaciones de palomillas se mantuvieron a  $30 \pm 1$  °C y 70 % de humedad relativa. Las larvas de *G. mellonella* se alimentaron con dieta artificial de acuerdo con Realpe et al<sup>(24)</sup>. Para la elaboración de 1 kg de dieta, se mezclaron 464 g de salvado de maíz y 69 g de levadura seca. De forma separada, 67 g de cera de abejas fueron derretidos y adicionados a la primera mezcla. Posteriormente, 207 g de glicerina y 193 g de miel de abejas se adicionaron a la mezcla. Esta mezcla se colocó en recipientes cerrados y se conservó a 4 °C hasta su uso<sup>(24)</sup>.

#### *Preparación de suspensión de esporas de M. anisopliae*

Se utilizaron cultivos de aislamientos monospóricos de 15 días de edad. Los conidios se cosecharon de la superficie del cultivo bajo condiciones asépticas, inundando la caja Petri

monosporic strains was used for pathogenicity testing. Each isolate was assigned with the key of the corresponding isolate of origin, plus the consecutive number (in parentheses) from the monosporic isolate<sup>(23)</sup>.

#### *Obtainig G. mellonella larvae*

Wax honeycombs naturally infested with larvae of *G. mellonella* were obtained from the Apiary of the Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. The moth pupae were transferred to glass bottles of 2 L capacity. At the same time, emerged adults were transferred to a new 2 L glass bottles to allow mating and oviposition. The populations of moths were incubated at  $30 \pm 1$  °C and 70 % relative humidity. The larvae of *G. mellonella* were fed with an artificial diet in accordance with Realpe et al<sup>(24)</sup>. For the production of 1 kg of diet, 464 g of corn bran and 69 g of dry yeast were mixed. Separately, 67 g of beeswax was melted and added to the first mixture. Subsequently, 207 g of glycerin and 193 g of honey were added to the mix. This mixture was placed in sealed containers and kept at 4 °C until their use<sup>(24)</sup>.

#### *Preparation of spore suspension of M. anisopliae*

Cultures of monosporic isolates 15-d of age were used. Conidia were harvested from the surface of the crop under aseptic conditions, flooding the Petri with sterile distilled water (SDW) + dispersant at 0.1% (inex ®), and scraping the colony with a scalpel. Suspension was filtered with clinical gauze to separate the mycelium and conidia stirred for 10 min on a magnetic stirrer (Thermolyne ®, Artur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA). The conidia were counted in a Neubauer chamber, and its concentration was estimated using the formula  $C = (Cc) (4 \times 10^6) (Df/80)$ , where: C= number of conidia ml<sup>-1</sup>; Cc= average number of conidia counted in the neubauer chamber and Df= dilution factor<sup>(25)</sup>.

con agua destilada estéril (ADE) + dispersante al 0.1% (inex®), y raspando la colonia con un bisturí. La suspensión se filtró con gasa clínica para separar el micelio y los conidios agitados durante 10 min en un agitador magnético (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA). El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer y su concentración estimada mediante la fórmula  $C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd/80)$ , donde: C= número de conidios ml<sup>-1</sup>; Cc= número promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer y, Fd= factor de dilución<sup>(25)</sup>.

### Pruebas de patogenicidad

Con base al aislamiento poliespórico de origen, cuatro grupos de 10 aislamientos monospóricos fueron conformados. Por cada aislamiento monospórico, 10 larvas del cuarto instar de *G. mellonella* se sumergieron durante 5 s en una suspensión de  $2 \times 10^7$  conidios/ml<sup>-1</sup> de acuerdo con Toriello *et al*<sup>(26)</sup> e Ibarra<sup>(27)</sup>. Inmediatamente después, las larvas se colocaron en cámara húmeda que consistió de una caja Petri con papel filtro húmedo en su interior. Posteriormente se incubaron a  $25 \pm 1$  °C y se registró la mortalidad diaria durante ocho días. Las larvas muertas se removieron e incubaron en cámara húmeda individual a  $25 \pm 1$  °C para confirmar el desarrollo micelial y la producción conidial de *M. anisopliae* sobre la cutícula del insecto. Como testigo se utilizaron 10 larvas inmersas sólo en ADE+ inex® (0.1%). Tres repeticiones por aislamiento monospórico y testigo se establecieron. La mortalidad obtenida (%) se corrigió mediante la fórmula de Abbott<sup>(28)</sup>. Los datos obtenidos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Cada grupo de aislamientos monospóricos (conformado en base al aislamiento poliespórico de origen), fue sometido, de forma independiente, a un análisis de varianza (ANVA). La prueba de separación de medias se corrió con un margen de error de 0.05 (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS<sup>(29)</sup>.

### Pathogenicity test

Based on the polysporic isolate of origin, four groups of 10 monosporic strains were formed. For each monosporic strain, 10 fourth larval instar of *G. mellonella* were immersed for 5 sec on a suspension of  $2 \times 10^7$  conidia/ml<sup>-1</sup> according to Toriello *et al*<sup>(26)</sup> and Ibarra<sup>(27)</sup>. Immediately later, larvae were placed in a moist chamber, which consisted of a Petri dish with wet filter paper inside. They were subsequently incubated at  $25 \pm 1$  °C and daily mortality was recorded for 8 d. The dead larvae were removed and incubated in an individual moist chamber at  $25 \pm 1$  °C to confirm the mycelia development and conidial production of *M. anisopliae* on the cuticle of the insect. As control, 10 larvae were immersed only in SDW + inex ® (0.1%). Three replicates per isolate and control were established. Obtained mortality (%) was corrected by Abbott's formula<sup>(28)</sup>. The data were transformed to the arcsine of the square root of the ratio. Each group of monosporic isolates (formed in base on the polysporic isolate of origin), was submitted, independently, to an

Cuadro 1. Mortalidad de *Galleria mellonella* inducida por aislamientos monospóricos de *Metarhizium anisopliae*, obtenidos del aislamiento poliespórico MaA1 (%)

Table 1. Mortality of *Galleria mellonella* induced by monosporic isolates of *Metarhizium anisopliae*, obtained from the polysporic MaA1 isolate (%)

Polysporic isolate MaA1	
Monosporic strains	Mortality (Mean $\pm$ SD)
MaA1(4)	88.96 $\pm$ 1.81 a
MaA1(5)	76.67 $\pm$ 15.28 ab
MaA1(6)	73.33 $\pm$ 15.28 abc
MaA1(2)	73.60 $\pm$ 5.56 abc
MaA1(9)	66.67 $\pm$ 15.28 abc
MaA1(3)	64.75 $\pm$ 5.02 abc
MaA1(7)	60.00 $\pm$ 10.00 bc
MaA1(10)	54.82 $\pm$ 5.01 bcd
MaA1(8)	43.33 $\pm$ 11.55 cd
MaA1(1)	24.33 $\pm$ 5.13 d

abcd Means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferencias significativas se encontraron en la mortalidad de *G. mellonella* al analizar cada uno de los cuatro grupos de cultivos monospóricos. Así, en los cepas monospóricas obtenidas del aislamiento poliespórico MaA1 la mortalidad fluctuó del 24 al 89 % ( $F= 9.18$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.001$ ) (Cuadro1). En este grupo, el aislamiento monospórico más virulento fue MaA1(4) (88.9 %) sin mostrar diferencias significativas con el MaA1(5), MaA1(6), MaA1(2), MaA1(9) y MaA1(3); el menos virulento fue el MaA1(1) (24.3 %) sin diferencias significativas con los aislamientos MaA1(10) y MaA1(8).

En cuanto a los 10 aislamientos monospóricos provenientes del aislamiento poliespórico MaA2, la mortalidad fluctuó entre 14.8 y 76.6 % ( $F= 10.36$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.001$ ) (Cuadro 2). El aislamiento con mayor virulencia fue MaA2(1) (76.7 %) sin diferencias significativas con MaA2(7) MaA2(5) MaA2(10) MaA2(3) MaA2(4) y MaA2(8), en tanto que el aislamiento menos virulento fue el MaA2(9) (14.8 %), sin mostrar diferencias con el aislamiento MaA2(2).

Respecto a los aislamientos monospóricos derivados del aislamiento poliespórico MaA3, la mortalidad fluctuó entre 19.9 y 83.3 % ( $F= 6.36$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.003$ ) (Cuadro 3). El aislamiento que causó mayor mortalidad fue MaA3(7) (83.3 %), sin diferencias estadísticas con MaA3(2), MaA3(1), MaA3(8), MaA3(9), MaA3(4), MaA3(10), MaA3(3); el tratamiento menos patogénico hacia larvas de *G. mellonella* fue el monospórico MaA3(6) (19.9 %), sin diferenciarse de los aislados MaA3(3) y MaA3(5).

Con respecto a los aislamientos provenientes del aislamiento poliespórico MaA4, la mortalidad fluctuó del 10 al 100 % ( $F= 6.06$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.001$ ) (Cuadro 4). MaA4(5) fue el aislamiento que causó mayor mortalidad (100 %), y MaA4(10) fue el que causó menor mortalidad (10 %). Los ocho aislamientos restantes formaron dos grupos intermedios.

analysis of variance (ANOVA). The separation of means was tested with a margin of error of 0.05 (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) using the SAS statistical program<sup>(29)</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

Significant differences were found in the mortality of *G. mellonella* analyzing each of the four groups of monosporic culture (Table 1). Thus, in the strains obtained from the polysporic isolate MaA1, mortality ranged from 24 to 89 % ( $F= 9.18$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.001$ ). In this group, the most virulent isolate was MaA1(4) (88.9 %) without significant differences with the MaA1(5), MaA1(6), MaA1(2), MaA1(9) and MaA1(3); the least virulent was the MaA1(1) (24.3 %) without differences with isolates MaA1(10) and MaA1(8).

In terms of the ten monosporic strains arising from polysporic isolated MaA2, mortality ranged from 14.8 to 76.6 % ( $F= 10.36$ ,  $gl= 9$ ,  $P<0.001$ ) (Table 2). Isolate with the greater virulence was MaA2(1) (76.7 %) without significant

Cuadro 2. Mortalidad de *Galleria mellonella* inducida por aislamientos monospóricos de *Metarhizium anisopliae*, obtenidos del aislamiento poliespórico MaA2 (%)

Table 2. Mortality of *Galleria mellonella* induced by monosporic isolates of *Metarhizium anisopliae*, obtained from the polysporic MaA2 isolate (%)

Polysporic isolate MaA2	
Monosporic strains	Mortality (Mean $\pm$ SD)
MaA2(1)	76.67 $\pm$ 11.55 a
MaA2(7)	73.60 $\pm$ 5.56 ab
MaA2(5)	66.67 $\pm$ 15.28 ab
MaA2(10)	63.33 $\pm$ 11.55 abc
MaA2(3)	60.00 $\pm$ 15.32 abc
MaA2(4)	60.00 $\pm$ 0.00 abc
MaA2(8)	50.00 $\pm$ 10.00 abc
MaA2(6)	44.82 $\pm$ 5.01 bc
MaA2(2)	34.59 $\pm$ 5.05 cd
MaA2(9)	14.82 $\pm$ 5.01 d

abcd Means without a common superscript differ ( $P<0.05$ ).

Los resultados indican una amplia variabilidad intraespecífica de cultivos monospóricos del hongo *M. anisopliae* en cuanto a su patogenicidad hacia larvas de *G. mellonella*. Lo anterior demuestra la utilidad de cultivos monospóricos y su caracterización patogénica en la selección de aislamientos con características sobresalientes; así también, muestra el potencial del hongo estudiado para el desarrollo de bioinsecticidas contra *G. mellonella*.

Con base en los resultados, los aislamientos de *M. anisopliae* más patogénicos hacia *G. mellonella* fueron MaA4(5), MaA1(4) y MaA3(7). Estos aislamientos superaron el 80 % de mortalidad con 100.0, 88.9 y 83.3 %, respectivamente. Resultados similares fueron encontrados por Neupane<sup>(30)</sup>, el cual obtuvo cepas de *M. anisopliae* con mortalidad de 96.6 % sobre *G. mellonella*, después de 10 días de haberse aplicado a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios ml<sup>-1</sup>. Así también, Khalid *et al*<sup>(7)</sup> y Klingen *et al*<sup>(31)</sup> obtuvieron cepas con mortalidad del 100 % sobre *G. mellonella*, a

differences with MaA2(7), MaA2(5), MaA2(10), MaA2(3), MaA2(4) and MaA2(8), while the least virulent isolate was the MaA2(9) (14.8 %), without differences with the MaA2(2) isolate.

Regarding the monosporic strains arising from polysporic isolated MaA3, mortality ranged from 19.9 to 83.3 % ( $F = 6.36$ ,  $gl = 9$ ,  $P < 0.003$ ) (Table 3). The isolate that caused increased mortality was MaA3(7) (83.3 %), with no statistical differences with MaA3(2), MaA3(1), MaA3(8), MaA3(9), MaA3(4), MaA3(10), MaA3(3); the treatment less pathogenic to larvae of *G. mellonella* was the monosporic MaA(6) (19.9 %), without differentiation from the isolates MaA3(3) and MaA3(5).

The mortality of monosporic strains arising from polysporic MaA4 ranged from 10 to 100 % ( $F = 6.06$ ,  $gl = 9$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 4). MaA4(5) was the isolate which caused higher mortality (100 %), and MaA4 10) the lower mortality (10 %). The remaining eight isolates formed two intermediate groups.

Cuadro 3. Mortalidad de *Galleria mellonella* inducida por aislamientos monospóricos de *Metarhizium anisopliae*, obtenidos del aislamiento poliespórico MaA3 (%)

Table 3. Mortality of *Galleria mellonella* induced by monosporic isolates of *Metarhizium anisopliae*, obtained from the polysporic MaA3 isolate (%)

Polysporic isolate MaA3	
Monosporic strains	Mortality (Mean $\pm$ SD)
MaA3(7)	83.33 $\pm$ 5.77 <sup>a</sup>
MaA3(2)	69.96 $\pm$ 10.00 <sup>ab</sup>
MaA3(1)	69.96 $\pm$ 10.00 <sup>ab</sup>
MaA3(9)	63.33 $\pm$ 11.87 <sup>ab</sup>
MaA3(8)	59.80 $\pm$ 10.01 <sup>ab</sup>
MaA3(4)	56.67 $\pm$ 5.77 <sup>ab</sup>
MaA3(10)	54.82 $\pm$ 5.01 <sup>ab</sup>
MaA3(3)	53.33 $\pm$ 11.55 <sup>abc</sup>
MaA3(5)	49.82 $\pm$ 0.31 <sup>bc</sup>
MaA3(6)	19.90 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>

abcd Means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 4. Mortalidad de *Galleria mellonella* inducida por aislamientos monospóricos de *Metarhizium anisopliae*, obtenidos del aislamiento poliespórico MaA4 (%)

Table 4. Mortality of *Galleria mellonella* induced by monosporic isolates of *Metarhizium anisopliae*, obtained from the polysporic MaA4 isolate (%)

Polysporic isolate MaA4	
Monosporic strains	Mortality (Mean $\pm$ SD)
MaA4(5)	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
MaA4(3)	80.21 $\pm$ 10.01 <sup>b</sup>
MaA4(4)	80.21 $\pm$ 10.01 <sup>b</sup>
MaA4(9)	70.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
MaA4(1)	46.67 $\pm$ 5.77 <sup>c</sup>
MaA4(7)	40.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
MaA4(6)	40.00 $\pm$ 10.00 <sup>c</sup>
MaA4(8)	39.93 $\pm$ 10.00 <sup>c</sup>
MaA4(2)	30.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
MaA4(10)	10.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>

abcd Means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ).



una concentración de  $5.5 \times 10^6$  y  $3.6 \times 10^6$  conidios/ml<sup>-1</sup>, respectivamente. En nuestro estudio la mortalidad obtenida fue con una dosis de  $2 \times 10^7$  conidios/ml<sup>-1</sup> y la mortalidad se obtuvo a los ocho días, por lo que nuestras cepas pueden ser consideradas para el control de *G. mellonella* en México. Sin embargo, la abeja debe ser considerada como organismo no blanco; por lo que, la dosis utilizada en la presente investigación debe ser evaluada sobre abejas.

De acuerdo con lo anterior, dos características claves de un bioinsecticida son deseables: alta virulencia contra la plaga y poca o nula virulencia contra organismos no objetivo<sup>(7)</sup>. Esto es particularmente importante en el caso del control de *G. mellonella*, ya que cualquier patógeno que perjudica a la colonia de abejas de miel no sería aceptable, independientemente de su virulencia contra *G. mellonella*. Al respecto, Neupane<sup>(30)</sup> evaluó cepas virulentas de *M. anisopliae* sobre adultos de abejas (*A. mellifera*) a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml<sup>-1</sup>, con resultados positivos al no encontrar efecto significativo sobre la mortalidad de las abejas, por lo tanto, su aplicación para controlar *G. mellonella* en colmenas infectadas puede ser practicada sin riesgos de afectar la colonia de abejas. Además, *M. anisopliae* presenta bajo riesgo para humanos y otros mamíferos<sup>(7)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los resultados indican amplia variabilidad intra-específica de cultivos monospóricos de *M. anisopliae* en cuanto a su patogenicidad hacia larvas de *G. mellonella*; demuestran la utilidad de cultivos monospóricos y su caracterización patogénica para la selección de aislamientos con características sobresalientes; con potencial para el desarrollo de bioinsecticidas contra la palomilla de la cera *G. mellonella*. Hasta ahora, los resultados son alentadores; sin embargo, es necesario realizar estudios sobre ecología de *M. anisopliae* en las condiciones de Tabasco, multiplicación masiva de los aislamientos promisorios, técnicas y tiempo de aplicación en relación con el ciclo de vida de la abeja.

The results indicate a wide intra-specific variability from monosporic isolates of the fungi *M. anisopliae* in terms of their pathogenicity to larvae of *G. mellonella*. The above shows the usefulness of monosporic cultures and their pathogenic characterization for isolates selection with outstanding features; as well as the potential of the fungus studied for the development of bioinsecticides against *G. mellonella*.

Based on the results, *M. anisopliae* isolates most pathogenic to *G. mellonella* were MaA4(5), MaA1(4) and MaA3(7); these isolates exceeded 80 % mortality with 100.0, 88.9 and 83.3 %, respectively. Similar results were found by Neupane<sup>(30)</sup>, which obtained strains of *M. anisopliae* with mortality of 96.6 % on *G. mellonella*, after 10 d of being applied to a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia ml<sup>-1</sup>. Khalid et al<sup>(7)</sup> and Klingen et al<sup>(31)</sup> also found strains with 100 % mortality on *G. mellonella*, with concentrations of  $5.5 \times 10^6$  and  $3.6 \times 10^6$  conidia/ml<sup>-1</sup>, respectively. In our study the mortality obtained was with a dose of  $2 \times 10^7$  conidia/ml<sup>-1</sup> and mortality was obtained at 8 d, so our strains can be considered adequate for control of *G. mellonella* in Mexico. However, the bee must be considered as non-target organism; so, the doses used in this study should be evaluated on bees.

Accordingly, two key features for a desirable bioinsecticide are: high virulence against the plague and little or no virulence against the non-target organisms<sup>(7)</sup>. This is particularly important in the case of the *G. mellonella* control, since any pathogen that affects the colony of honey bees will not be acceptable, regardless of their virulence against *G. mellonella*. In this regard, Neupane<sup>(30)</sup> evaluated virulent strains of *M. anisopliae* on adult bees (*A. mellifera*) at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/ml<sup>-1</sup>, with positive results finding no significant effect on mortality of bees, therefore, its application to control *G. mellonella* in infected hives can be practiced safely without affecting the colony. In addition, *M. anisopliae* presents low risk to humans and other mammals<sup>(7)</sup>.

## LITERATURA CITADA

1. Cajero A, Villamar L, Ortega A, Segura C, Tanus E, Castañeda E, Vázquez R. Situación de la Apicultura en México. México: Publicaciones del Centro de Estadísticas Agropecuarias (SAGAR). 2000.
2. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de miel. 2da. ed. Gobierno Federal. 2009.
3. SEDAFOP. Secretaría de Desarrollo Agropecuario Forestal y Pesca. Censo apícola del estado de Tabasco. División de especies menores. Gobierno del estado de Tabasco [en prensa] 2010.
4. OEIDRUS. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable en el Estado de Tabasco [en línea]: <http://oeidrustab.gob.mx>. Consultado 22 de nov, 2012.
5. Pérez-Sato JA, Hughes OH, Couvillon MJ, Ratnieks LW. Improved technique for introducing four-day old virgin queens to mating hives using artificial and natural queen cells for introduction. J Api Res 2007;46(1):28-33.
6. Cholojan AP. Caracterización de los subsistemas de producción en diez municipios del departamento de Sacatepéquez [tesis licenciatura]. Guatemala, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala; 1998.
7. Khalid AH, Mohamed AAA, Ahmed YA, Saad SE, Jin HJ. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. Phytoparasitica 2012;40(2):117-126.
8. Ebadi R, Gary NE, Lorenzen K. Effect of carbon dioxide and low temperature narcosis on honey bees. J Environ Entomol 1980;(9):144-147.
9. Haewoon O, Young M, Chang Y. Developing periods of damage patterns of combs by the wax moth, *Galleria mellonella*. J Api Res 1995;10(1):5-10.
10. Neira M. Sanidad apícola, principales enfermedades y enemigos de las abejas en Chile [tesis licenciatura]. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile; 2006.
11. Artigas J. Entomología económica. Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). Concepción, Chile: Universidad de Concepción. 1994.
12. Zamorano-Neumann DE. Uso de *Bacillus thuringiensis* L. como agente de control de larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [tesis licenciatura]. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile; 2009.
13. Universidad de la Frontera. Estrategia Competitiva Internacional Para la Industria Apícola: Organización Industrial, Condiciones de Oferta y Demanda, Estructura de Mercado, Conducta y Performance. Temuco, Chile. 2004.
14. Prasad A, Syed N. Evaluating prospects of fungal biopesticide *Beauveria bassiana* (Balsamo) against *Helicoverpa armigera* (Hubner): An ecosafe strategy for pesticidal pollution. Asian J Exp Biol Sci 2010;3(1):596-601.
15. Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. Mycopathologia 2008;165(1):1-3.
16. Shaw K, Davidson G, Clark SJ, Ball BV, Pell JK, Chandler D, Sunderland KD. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honey bee, *Apis mellifera*. Biol Control 2002;24:266-276.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The results indicate broad intra-specific variation of *M. anisopliae* monosporic culture in terms of their pathogenicity to the larvae of *G. mellonella*. Demonstrate the usefulness of monosporic cultures and their pathogenic characterization for the selection of isolates with outstanding features, with the potential for the development of bioinsecticides against wax moth *G. mellonella*. So far, the results are encouraging; however, it is necessary to carry out studies on ecology of *M. anisopliae* in Tabasco, massive multiplication of promising isolates, techniques and time of application in relation to the life cycle of the bee.

*End of english version*

17. Pirali KK, Teixeira DSJA., Razzaghi AM, Nazemnia M. A field experiment to assess the rate of infestation in honey bee populations of two *Metarhizium anisopliae* isolates on *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). J Arthropod Borne Dis 2013;7(1):15-22
18. Seyoum E. *Namusana H*. Evaluation of indigenous fungal isolates and *Metarhizium anisopliae* var. acridum against adult lesser wax moth, *Achroia grisella* (L) (Pyralidae: Lepidoptera) Ethiopian J Sci 2010;33(1):1-7.
19. Torres de la Cruz M. Selección de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Match.) Sorokin, para el manejo del salivazo de la caña de azúcar en México [tesis maestría]. Estado de México, México: Colegio de Postgraduados; 2006.
20. Soper RS, Ward MG. Production, formulation and application of fungi for insect control. En: Papavizas, GC editor. Biological control in crop production 1st ed. Totowa, New Jersey: Allanhead, Osman and Co.; 1980:161-180.
21. Feng MG, Johnson JB, Kish LP. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species or cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). Environ Entomol 1990;19(3):815-820.
22. Estrada VMN, Vélez APE, López NJC. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafe 1997;48(1):59-65.
23. Cortez MH, Alatorre RR, Mora AG, Bravo MH, Ortiz GCF, Aceves NLA. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. Biocontrol 2003;48(3):321-334.
24. Realpe AFJ, Bustillo PAE; López NJC. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Cenicafe 2007;58(2):142-157.

25. Lipa JJ, Slizynski K. Wskazówki metodyczne I terminologia dowożnaczańa snedniej dawki swiertelnej (LD<sub>50</sub>) W Patologii Owadow i toksykologii. Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin 1973;15(1):59-83.
26. Toriello C, Montoya SE, Zavala RM, Navarro BH, Basilio HD, Hernández VV, Mier T. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae) Rev Mex Mic 2008;28:57-66.
27. Ibarra AG, Moya RG, Berlanga PA. Efecto de Beauveria bassiana y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). Folia Entomol Mex 2005;44(1):1-6.
28. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 1925;18(2):265-267.
29. SAS. SAS/STAT User´s Guide (Release 6.03). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 1998.
30. Neupane BP. Evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on honeybee (*Apis mellifera* L.) and its pest greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) [tesis maestria]. Chitwan, Nepal: Tribhuvan University; 2005.
31. Klingen I, Meadow R, Aandal T. Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with Norwegian isolates of insect pathogenic fungi. J Appl Entomol 2002;126(5):231-237.