

Selección de aislados de hongos Anamórficos entomopatógenos para el control de *Reticulitermes grassei* (Isoptera: Rhinotermitidae)

C. SANTIAGO-ALVAREZ, R. SANTOS-QUIRÓS, P. VALVERDE-GARCÍA, E. QUESADA-MORAGA

La patogeneidad y virulencia de cuatro aislados autóctonos de hongos Anamórficos entomopatógenos, dos de cada una de las especies, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Met.) Sorok., para obreros de la termita subterránea *Reticulitermes grassei* Clément, se determinó en bioensayo de laboratorio por aplicación tópica de esporas. Aunque todos resultaron patogénicos, no mostraron la misma virulencia, a tenor de los valores de mortalidad y tiempos medios de supervivencia. El aislado EAMa 01/121-Su de *M. anisopliae* fue el más activo, con una DL₅₀ de 1.4×10^6 esporas/ml (equivalente a 4.2×10^3 esporas/insecto), y TL₅₀ de 5.8 a 2.2 d para las dosis 3.76×10^6 y 3.76×10^7 esporas/ml (equivalentes a 1.12×10^4 y 1.12×10^5 esporas/insecto) respectivamente. Además, al aplicar al sustrato, viruta de madera y papel de filtro, una dosis de esporas próxima a la DL₇₀ (5×10^7 esporas/ml), se alcanzó un 93.44 % de mortalidad y un TL₅₀ de 3.9 días. Se discute el potencial de este aislado para el control de *R. grassei* a corto y largo plazo y los factores que pueden incidir en el mismo.

C. SANTIAGO-ALVAREZ, R. SANTOS-QUIRÓS, P. VALVERDE-GARCÍA, E. QUESADA-MORAGA. Cátedra de Entomología Agrícola. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edf. C4. 14071 Córdoba. e-electrónico: cr1saalc@uco.es

Palabras clave: Isoptera, *Reticulitermes grassei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, patogeneidad, virulencia, control biológico, termitas.

INTRODUCCIÓN

Las termitas, orden Isoptera, insectos sociales que habitan con preferencia en las zonas tropicales y subtropicales, son un conjunto de algo más de 2400 especies, la mayor parte de ellas entran en la consideración de beneficiosas aunque algunas, aproximadamente un 10 %, originan cuantiosos daños (SILVESTRI, 1939; CHIAPPINI *et al.*, 2001). A este grupo se adscribe el reducido número de especies presentes en la Europa meridional, *Kaloterms flavivollis* (Fabricius) y *Cryptotermes brevis* (Johnson) de la familia Kalotermitidae junto a las temibles termitas subterráneas del género *Reticulitermes* de la familia Rhinotermitidae (BONNEMAISON,

1962; CEBALLOS, 1962; PELEKASIS, 1981; TREMBLAY, 1995). Éstas se alimentan de cualquier tipo de material que contenga celulosa, comprometen estructuras y construcciones de madera, en obra civil o patrimonio histórico-artístico, archivos, museos, bibliotecas, etc. (KRAEMER-KOELLER, 1973; YELA, 1997; GAJU *et al.*, 2002; CHIAPPINI *et al.*, 2001) y en la mayoría de los casos su presencia no se descubre hasta que los daños resultan irreparables debido a que respetan la superficie de los objetos atacados (KRAEMER-KOELLER, 1973; CEBALLOS, 1962).

En España, los daños de las termitas subterráneas que tradicionalmente se han atribuido a *Reticulitermes lucifugus* (Rossi) (CEBALLOS, 1962; KRAEMER-KOELLER,

1973), especie que hoy sabemos restringida a Francia e Italia (CLÉMENT, *et al.* 2001), ahora se adjudican a *R. banyulensis* Clément, en el este peninsular y Baleares y *R. grassei* Clément en el norte, oeste y sur de la Península (CLÉMENT *et al.*, 2001). La contención de la acción devastadora de estos insectos sinantrópicos se consigue con el adecuado empleo de insecticidas químicos de amplio espectro de acción (MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, 2004), pero, ante los riegos que comportan para el hombre y animales domésticos, se buscan alternativas más seguras.

Las múltiples interacciones que el comportamiento social de las termitas impone a los individuos de una colonia exaltan, para tal fin, a los hongos entomopatógenos los cuales, actúan por contacto al infectar a los hospedantes por vía tegumentaria (FERRÓN, 1985; SHA y PELL, 2003), se pueden transmitir horizontalmente en las poblaciones (SUN *et al.*, 2003), son fáciles de producir en masa a nivel industrial (WRAIGHT *et al.*, 2001) y cumplen las exigencias de seguridad (VESTERGAARD *et al.*, 2003). Las especies de hongos entomopatógenos anamórficos, *Beauveria bassiana* (Balsam.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Met.) Sorok., que se aíslan con relativa frecuencia del suelo (MARANHÃO y SANTIAGO-ALVAREZ, 2003), son las que mejor se avienen para ser alternativa a los insecticidas químicos en el control de las termitas (GRACE, 1997; RATH, 2000), a pesar de que su presencia en la tierra de los termiteros parece ser casual (MILNER *et al.*, 1998b) y no el fruto de la adaptación a estos insectos (SCHMID-HEMPEL, 1998).

El presente trabajo tiene por objeto descubrir, entre los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, existentes en nuestra colección, provenientes del suelo e insectos, alguno que muestre patogeneidad y virulencia elevadas para las especies de termitas españolas. Recientemente, hemos constatado la eficacia de varios de estos aislados para el control de cucarachas (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2004), y dada la proximidad filogenética entre ambos órdenes, nos propusimos

evaluar también su potencial para el control de *R. grassei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los individuos de *R. grassei* utilizados en este trabajo fueron recolectados de tutores de madera en un jardín de la urbanización "Hacienda El Carmen", situada en el término municipal de Tomares (Sevilla). Para el transporte y posterior mantenimiento en el insectario del Grupo de Investigación "Entomología Agrícola" (AGR 163) de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de la Universidad de Córdoba, acondicionado a 25 ± 5 °C, 50-60% H.R., se usaron cajas de plástico de 30 x 30 x 30 cm, con tapa agujereada, recubiertas por el exterior con plástico negro para evitar iluminación. Como fuente de alimento y refugio se les proporcionó suficiente cantidad de madera extraída de los mencionados tutores que cada 2 días se procedía a rociar con agua para asegurar un grado óptimo de humedad.

Los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* empleados (Cuadro 1) forman parte de la colección del Grupo de Investigación "Entomología Agrícola" (AGR 163) y son mantenidos en estría de Agar Malta (AM) a 4° C. Para obtener cultivos en crecimiento activo, se sembraron esporas en el centro de placas Petri con AM, las cuales se incubaron a 25° C en oscuridad durante 20 días, luego se inundaron con 4 ml de agua + tritón X-100 (0.05%) y con la ayuda de una espátula estéril se desprendieron las esporas. Las suspensiones de esporas, transferidas a recipientes de cristal de 5 ml de capacidad, se titularon con la ayuda de un hematocímetro (Cámara de Malassez) y se guardaron en frigorífico a 4 °C hasta su empleo.

Método de bioensayo

La actividad de los aislados fúngicos sobre los obreros de *R. grassei* se determinó de manera directa, por aplicación tópica de las esporas sobre el tegumento de los insectos.

tos, o indirecta, por aplicación de las esporas al sustrato.

Aplicación tópica

La susceptibilidad de *R. grassei* a los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* se determinó por aplicación tópica de 1.47×10^5 esporas por insecto de cada uno de los aislados. Obreros individualizados de *R. grassei*, inmovilizados por frío, recibieron en el primer tergito abdominal, por medio de un microaplicador, 3 μ l de una suspensión de esporas en agua + Tritón X-100 (0.05%) de la concentración anterior. Acto seguido, en grupos de 10, se dispusieron en placas Petri, acondicionadas con un disco de papel de filtro de 70 mm de diámetro, humedecido con agua estéril, y un trozo de depresor de madera esterilizado, para alimento y refugio. Del mismo modo se procedió con los insectos testigo los cuales recibieron igual volumen de agua + Tritón X-100 (0.05%).

La patogenicidad y virulencia de cada aislado se determinaron con una sola dosis de esporas/insecto (1.47×10^5), 5 placas por aislado y el experimento completo se repitió una vez. El bioensayo se prolongó durante 8 días, en cada uno de los cuales se rehumedecía el papel de filtro, y se anotaban los individuos vivos a la vez que se extraían los muertos.

Para determinar la Dosis Letal Media (DL_{50}) de un aislado se establecieron cuatro concentraciones de esporas en progresión geométrica de razón 10 (3.76×10^4 hasta 3.76×10^7), se emplearon 4 placas por dosis, 10 obreros por placa, y el experimento completo se repitió una vez. En este caso el bioensayo se prolongó durante 10 días.

Las placas, en todos los casos, se introdujeron dentro de cajas de 7 x 15 x 24 cm, en plástico opaco, con tapadera fenestrada, y se colocaron en insectario en las condiciones arriba indicadas.

Los insectos muertos se desinfectaron externamente por inmersión, durante 1 min., en una solución de hipoclorito sódico al 1%, luego se lavaron dos veces con agua estéril,

y posteriormente se pasaron a cámara húmeda a 25 °C y en completa oscuridad. A los 5-7 días aproximadamente, se procedió a la evaluación de los insectos que presentaban en el exterior de su cuerpo crecimiento del hongo entomopatógeno.

Aplicación en el sustrato

Se dispusieron 4 placas Petri, en cada una de las cuales se dispuso, a partes iguales entre 0.5 g de viruta de madera esterilizada y el papel de filtro que tapizaba su fondo, 1 ml de una suspensión de esporas en agua + Tritón X-100 (0.05 %) de concentración conocida (5×10^7 esporas/ml) y se depositaron 10 obreros por placa. Para el tratamiento de los insectos testigo se procedió de modo análogo pero con 1 ml de agua + Tritón X-100 (0.05). El bioensayo se prolongó durante 10 días y el resto de operaciones fueron idénticas a las descritas anteriormente.

Análisis de datos

Se usaron los siguientes programas informáticos para análisis estadístico: Statistix 7.0®, para determinar valores medios y compararlos mediante test LSD; SPSS 8.0® para Windows (SPSS Inc., 1997), con el objeto de analizar valores de Tiempo Medio de Supervivencia mediante procedimiento Kaplan-Meier, compararlos con la ayuda del test Log-rank, calcular las DL_{50} por análisis probit. Los TL_{50} se obtuvieron mediante análisis probit de datos correlacionados según el método de THRONE *et al.*, (1995).

RESULTADOS

Patogenicidad y virulencia de los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Los valores de mortalidad observados en cada uno de los tratamientos estuvieron por encima del 10 % de mortalidad natural acaecida en el testigo (Cuadro 2), además los aislados pertenecientes a *M. anisopliae* superaron a los de *B. bassiana* aunque la diferencia no alcanzó significación, la cual es patente respecto al testigo, con la excepción del aislado EABb 90/2-Dm (Cuadro 2). Por otro



Figura 1. Cadáver de obrero de *R. grassei* micosado por el aislado EAMa 01/121-Su de *M. anisopliae*

lado, cuando los individuos muertos fueron puestos en cámara húmeda, no aparecieron insectos micosados ni entre los del testigo ni entre los del aislado EABb 90/2-Dm (Cuadro 2), pero lo hicieron en los restantes aislados en porcentajes variables sin que la diferencia muestre significación estadística.

En cuanto a los Tiempos Medios de Supervivencia (TMS) de los insectos tratados, todos los aislados los acertaron en distinto grado con respecto al testigo (Cuadro 3): el valor más bajo se obtuvo con el aislado EAMa 01/121-Su y el más elevado con el aislado EABb 90/2-Dm. La comparación mediante test Log-rank ($P \leq 0,05$) indica que tal acortamiento fue significativo para todos los aislados con relación al testigo, y para el aislado EAMa 01/121-Su respecto a los dos de *B. bassiana* (Cuadro 4). Tanto por los porcentajes de mortalidad y de insectos micosados (Fig. 1) como por el valor tan bajo del TMS el aislado EAMa 01/121-Su se eligió para los estudios posteriores.

Actividad biológica del aislado EAMa 01/121-Su

La actividad biológica del aislado EAMa 01/121-Su para obreros de *R. grassei* se determinó, basándose en experimentos preliminares, con cuatro dosis crecientes de esporas, $3,76 \times 10^4$, $3,76 \times 10^5$, $3,76 \times 10^6$ y $3,76 \times 10^7$ esporas/ml (equivalentes a $1,12 \times 10^2$, $1,12 \times 10^3$, $1,12 \times 10^4$ y $1,12 \times 10^5$ esporas/insecto). La mortalidad aumentó en relación directa con la dosis de esporas aplicadas (Cuadro, 5), lo que permitió ajustar la recta de regresión log dosis-mortalidad Probit (Fig. 2) que proporcionó una DL_{50} de $1,4 \times 10^6$ esporas/ml, equivalente a $4,2 \times 10^3$ esporas/insecto (pendiente \pm EE = $0,73 \pm 0,08$, $c^2 = 14,87$). Los TL_{50} calculados para las dosis $3,76 \times 10^6$ y $3,76 \times 10^7$ esporas/ml ($1,12 \times 10^4$ y $1,12 \times 10^5$ esporas/insecto) fueron 5,81 días (límites fiduciales: 5,10, 6,92 d.; pendiente \pm EE = $2,31 \pm 0,28$; $c^2 = 0,69$) y 2,19 días (límites fiduciales: 1,66, 2,68 d.; pendiente \pm EE = $3,05 \pm 0,26$; $c^2 = 11,39$) respectivamente.

Eficacia insecticida por aplicación al sustrato

Para evaluar la actividad insecticida del aislado EAMa 01/121-Su por contacto 1ml de una suspensión acuosa que contenía 5×10^7 esporas, se repartió al 50 % sobre viruta de depresor y sobre el papel de filtro que tapizaba la placa Petri, a continuación se

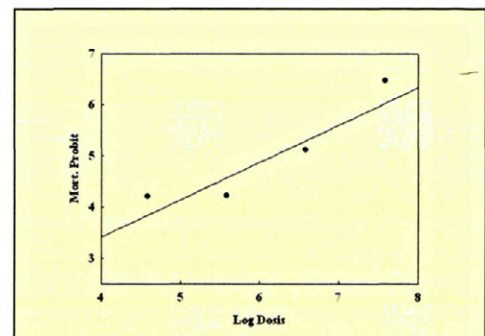


Figura 2. Recta de regresión logaritmo dosis-mortalidad Probit para obreros de *R. grassei* tratados por contacto con EAMa 01/121-Su

Cuadro 1. Aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados sobre *R. grassei*

Aislado	Especie fúngica	Fecha de aislamiento	Origen	
			Insecto/Suelo	Localidad
EABb 90/2-Dm	<i>Beauveria bassiana</i>	1990	<i>Docioctaurus maroccanus</i>	La Serena (Badajoz)
EABb 93/14-Tp	<i>Beauveria bassiana</i>	1993	<i>Thaumtopoea pytiocampa</i>	Córdoba
EAMa 01/58-Su	<i>Metarhizium anisopliae</i>	2001	Suelo de trigo	Hinojosa del Duque (CO)
EAMa 01/121-Su	<i>Metarhizium anisopliae</i>	2001	Suelo de algodón	Marchena (SE)

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad y micosis producidos por los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en obreros de *R. grassei* (1.47×10^5 esporas/insecto) por aplicación tópica

Tratamiento	% Mortalidad	% Micosis
Testigo	10.00 ± 00.00 a	0.00 ± 0.00 a
EABb 90/2-Dm	51.00 ± 31.00 ab	0.00 ± 0.00 a
EABb 93/14-Tp	70.70 ± 0.69 b	10.00 ± 10.00 a
EAMa 01/58-Su	94.45 ± 5.55 b	12.50 ± 0.00 a
EAMa 01/121-Su	90.00 ± 10.00 b	18.05 ± 6.95 a

Medias seguidas de la misma letra en cada columna indican que no existieron diferencias significativas en un test LSD (P=0.05)

Cuadro 3. Análisis Kaplan-Meier del tiempo medio de supervivencia (TMS) en días de obreros de *R. grassei* infectados por aplicación tópica con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1.47×10^5 esporas/insecto) a los 8 días de la infección. EE (error estándar).

Tratamiento	TMS ± EE	Int. Conf. 95%
Testigo	7.45 ± 0.38	6.70, 8.20
EABb 90/2-Dm	5.24 ± 0.64	3.98, 6.50
EABb 93/14-Tp	4.76 ± 0.65	3.50, 6.03
EAMa 01/58-Su	4.00 ± 0.48	3.06, 4.94
EAMa 01/121-Su	3.74 ± 0.55	2.67, 4.81

Cuadro 4. Comparación de los TMS de los distintos aislados mediante el estadístico Log-rank y su significación (P≤0.05 indica diferencias significativas)

	Testigo	EABb 90/2-Dm	EABb 93/14-Tp	EAMa 01/58-Su
EABb 90/2-Dm	8.29 P=0.0040			
EABb 93/14-Tp	14.33 P=0.0002	0.74 P=0.3883		
EAMa 01/58-Su	27.03 P<0.0001	4.91 P=0.0267	1.98 P=0.1592	
EAMa 01/121-Su	25.24 P<0.0001	4.89 P=0.0270	1.77 P=0.1831	0.00 P=0.9954

añadió el correspondiente número de obreros. La mortalidad alcanzada fue del 93.44 %, si bien la mortalidad del testigo fue bas-

tante elevada, 32.5 %. No obstante, la diferencia entre los TMS, 8.20 d para el testigo y 5.61 d para los insectos tratados (Cuadro 6)

Cuadro 5. Mortalidad (media \pm error estándar) de obreros de *R. grassei* causada por el aislado EAMa 01/121-Su por aplicación tópica

¹ Tratamiento	² Individuos observados	% Mortalidad
Testigo	71	8.78 \pm 6.11
3.76 x 10 ⁴	70	21.56 \pm 5.37
3.76 x 10 ⁵	73	22.20 \pm 5.75
3.76 x 10 ⁶	73	54.69 \pm 8.11
3.76 x 10 ⁷	71	92.85 \pm 3.80

¹ Esporas/ml² Número efectivo

es altamente significativa y el tiempo letal medio (TL₅₀) es de tan solo 3.97 días, con límites fiduciales inferior y superior de 3.40 y 4.47 días respectivamente (pendiente \pm EE = 3.73 \pm 0.51; χ^2 = 0.016). Los insectos muertos se pasaron a cámara húmeda donde aparecieron individuos micosados entre los del tratamiento.

DISCUSIÓN

Las infecciones naturales debidas a hongos anamórficos entomopatógenos no son frecuentes en termitas subterráneas (SCHMID-HEMPPEL, 1998), aunque están presentes en su medio (JACKSON *et al.*, 2000) y se tiene constancia de la susceptibilidad que manifiestan las castas de varias especies (SUN *et al.*, 2002) a las que ahora se agrega *R. grassei* cuyos obreros la muestran con *B. bassiana* y *M. anisopliae*. La escasa o nula incidencia natural de las micosis en termitas subterráneas, se atribuye al comportamiento defensivo de las colonias que eliminan a los individuos enfermos por canibalismo, por enterramiento o por aislamiento (ZOBERI, 1995), sin embargo las condiciones ambientales de los termiteros, temperatura moderada, humedad

alta y ausencia de luz, son propicias para el crecimiento, supervivencia y propagación de estos hongos (KRAMM *et al.*, 1982; IGNOFFO, 1992). Así, para lograr el control biológico de las termitas subterráneas por medio de hongos anamórficos entomopatógenos, se debe procurar el incremento en la colonia, por inoculación, de la densidad de propágulos infectivos de un aislado fúngico previa selección por su eficacia (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que los aislados de *M. anisopliae* son los más virulentos para *R. grassei* tanto si consideramos los porcentajes de mortalidad como si hacemos la consideración de los TMS, lo que viene a confirmar que esta especie es la mejor adaptada para el control de termitas subterráneas (SUN *et al.*, 2002). Trabajos futuros nos permitirán evaluar si la respuesta de la población de termitas empleada en nuestro estudio, procedente de Tomares (Sevilla), puede generalizarse a otras poblaciones de *R. grassei* en su área de distribución de la Península Ibérica. Por otro lado, la selección de aislados fúngicos para su empleo práctico no sólo debe fundarse en los niveles de mortalidad sino también en la

Cuadro 6. Actividad insecticida del aislado EAMa 01/121-Su para obreros de *R. grassei* aplicado al substrato.

Tratamiento	TMS \pm EE	Int. Conf. 95%
Testigo	8.20 \pm 0.47 a	7.28, 9.12
EAMa 01/121-Su	5.61 \pm 0.32 b	4.98, 6.24

Los datos indican tiempo medio de supervivencia (TMS) y su Error Estándar (EE). Valores seguidos de la misma letra en cada columna no presentaron diferencias significativas en un test Log-rank ($P \leq 0.05$)

capacidad para producir abundante cantidad de esporas sobre un elevado porcentaje de los cadáveres del hospedante (ALMEIDA *et al.* 1997). A este respecto, nuestros aislados, transcurrida la fase de crecimiento saprofitico dentro de los cadáveres, una vez muertos los hospedantes por la acción concomitante de las toxinas secretadas durante la fase del ligero crecimiento vegetativo (ENGLISH *et al.*, 2001; SHAH y PELL, 2003), presentan dificultades para atravesar el tegumento y emerger a la superficie como pone de manifiesto el bajo porcentaje de insectos infectados que mostraron micosis franca. Esto puede ser debido a que los aislados empleados en este trabajo no están adaptados a la especie, por lo que cabe la posibilidad de mejorar esta aptitud por sucesivos pasos sobre *R. grassei* (QUESADA-MORAGA y VEY, 2003).

La vida subterránea de estas termitas hace difícil la inoculación directa del patógeno sobre el mayor número posible de miembros de la colonia; aquélla se fía a la adquisición por éstos de esporas dispuestas en trampas con cebo atrayente de cuya dispersión y extensión para producir epizootias en la población de termitas se responsabilizan las interacciones sociales (JACKSON *et al.*, 2000). La operatividad del método está sujeta a que la carga de esporas que lleva el cebo no sea excesiva y provoque el rechazo de los termes que deben salir infectados de la trampa. Nuestros resultados señalan al aislado de *M. anisopliae*, EAMa01/121-Su, con óptimo

térmico de actividad en 31 °C (MARANHÃO, 2003) y elevada virulencia frente a la cucaracha alemana *B. germanica* (QUESADA *et al.*, 2004), como el más idóneo para el control de *R. grassei*, dado que presenta un moderado valor de la DL_{50} , 4.2×10^3 esporas por insecto, inferior a las dosis letales medias obtenidas para una serie de aislados de la misma especie probados sobre *C. formosanus* y *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (SUN *et al.*, 2003; MILNER *et al.*, 1998a).

La aplicación al sustrato de una dosis de esporas/ml del aislado EAMa 01/121-Su, equivalente a la DL_{70} , originó una mortalidad del 93.44%, tras 10 d. de observación, es similar a la alcanzada sobre *Cryptotermes brevis* con otro aislado de *M. anisopliae* en un ensayo de idénticas características tras 4 semanas de observación (NASR y MOEIN, 1997). Este valor unido al tiempo letal medio, 4 d., y al tiempo medio de supervivencia, 5.6 d., representan propiedades adecuadas del aislado EAMa 01/121-Su para aplicarlo al suelo en forma de cebo, tras la localización del correspondiente termitero. Sin embargo, con la finalidad de confirmar su utilidad, se requieren estudios adicionales que incluyan factores como altas temperaturas, tolerancia frente a sustancias volátiles propias de los termiteros o incluso efecto fungistático de otros microorganismos del suelo, mecanismos defensivos sociales y demográficos de los termes y posibilidad de transmisión horizontal.

ABSTRACT

SANTIAGO-ÁLVAREZ C., R. SANTOS-QUIRÓS, P. VALVERDE-GARCÍA, E. QUESADA-MORAGA. 2005. Selection of entomopathogenic Anamorphic fungi isolates for the control of *Reticulitermes grassei* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 299-307.

Pathogenicity and virulence of four autochthonous isolates of Anamorphic entomopathogenic fungi, two from each other species, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Met.) Sorok., against workers of the subterranean termite *Reticulitermes grassei* Clément, were determined at laboratory bioassays by topical application of spores. Although all isolates were pathogenic, appeared differences in virulence among them, regarding mortality and average survival time values. Isolate EAMa 01/121-Su from *M. anisopliae* was the most active one, showing a LD_{50} of 1.4×10^6 spores/ml (equivalent to 4.2×10^3 spores/insect) and a LT_{50} of 5.8 to 2.2 days, for the doses 3.76×10^6 and 3.76×10^7 spores/ml (equivalent to 1.12×10^4 y 1.12×10^5 spores/insect) respectively. Moreover, when a dose near to LD_{70} (5×10^7 spores/ml) was applied into the substrate, sterile filter paper and wood shavings, the workers mortality reach 93.44%

and the LT₅₀ was 3.9 days. The potential of the EAMa 01/121-Su strain for the short and long term control of *R. grassei* is discussed.

Key words: Isoptera, *Reticulitermes grassei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity, virulence, biological control, termite.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, J.E.M., ALVES, S.B., PEREIRA, R.M. 1997. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1958). *Journal of Applied Entomology*, **121**: 539-544.
- BONNEMAISON, L. 1962. Les ennemis animaux des plantes cultivées et des forêts. Editions Sep París. Vol. I, 599 pp.
- CEBALLOS, G. 1962. Elementos de entomología general. E.T.S.I.M. Madrid. 330 pp.
- CLÉMENT, J.-L., BAGNÈRES, A.-G., UVA, P., WILFERT, L., QUINTANA, A., REINHARD, J., DRONNET, S. 2001. Biosystematics of *Reticulitermes* termites in Europe: morphological, chemical and molecular data. *Insectes soc.*, **48**: 202-215.
- CHIAPPINI, E., LIOTTA, G., REGUZZI, M. C., BATISTI, A. 2001. Insetti e Restauro. Legno, carta, tessuti, pella-me e altri materiali. Calderini Edagricole. Bolonia. 260 pags.
- FERRON, P., 1985. Fungal Control. En: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. (Kerkut, G.A., Gilbert L.I. Eds.) Pergamon Press, pp. 313-346.
- GAJU, M., NOTARIO, M.J., MORA, R., ALCAIDE, E., MORENO, T., MOLERO, R., DE ROCA, C.B. 2002. Termite damage to buildings in the province of Cordoba, Spain. *Sociobiology*, **40**(1): 75-85.
- GRACE, J. K. 1997. Biological control strategies for suppression of termites. *J. Agric. Entomol.*, **14**:281-289.
- IGNOFFO, C.M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomol.*, **75**: 516-525.
- INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential (Butt, T.M., Jackson, C. y N. Magan Eds.). CABI Publishing, pp. 23-69.
- JACKSON, T. A., ALVES, S. B., PEREIRA, R. M. 2000. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. En: Biological control: Measures of success. (Gurr, G., Wratten, S. Eds.). Kluwer Academic Publishers. Boston, pp. 271-296.
- KRAEMER-KOELLER, G. 1973. Tratado de la previsión del papel y de la conservación de bibliotecas y archivos. Dirección General de Archivos y Bibliotecas. Serv. Publ. Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid. Tomo I y Tomo II.
- KRAMM, K.R., WEST, D.F. 1982. Termite Pathogens: Effects of Ingested *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, **40**: 7-11.
- MARANHÃO, E. A. A. 2003. Utilización de hongos entomopatogénos para el control de "moscas blancas" (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos hortícolas. Tesis Doctoral. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Córdoba, 203 pp.
- MARANHAO, E. A. A., SANTIAGO-ALVAREZ, C. 2003. Occurrence of entomopathogenic fungi in soils from different parts of Spain. *IOBC wprs Bulletin*, **26**(1): 59-62.
- MILNER, R.J., STAPLES, J.A., LUTTON, G.G. 1998a. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological Control*, **11**: 240-247.
- MILNER, R.J., STAPLES, J.A., HARTLEY, T.R., LUTTON G.G., DRIVER, F., WATSON, J.A.L. 1998b. Occurrence of *Metarhizium anisopliae* in nests and feeding sites of Australian termites. *Mycological Research*, **102**: 216-220.
- MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. 2004. Registro de materias activas de uso ambiental y en higiene alimentaria. Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo. http://www.msc.es/Diseno/medioAmbient/ambiente_productos_quimicos.htm.
- NASR, F.N., MOEIN, S.I.M. 1997. New trend of the use of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sokorin and *Verticillium indicum* (Petch) Gams as entomopathogens to the termite *Cryptotermes brevis* (Walker) (Isoptera, Kalotermitidae). *Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, **70**(1):13-16.
- PELEKASSIS, K. E. D. 1981. Mathimata georgikis entomologias (Tratado de Entomología Agrícola). Atenas. Tomo A. 357 pp.
- QUESADA-MORAGA, E., SANTOS-QUIRÓS, R., VALVERDE-GARCÍA, P., SANTIAGO-ALVAREZ, C. 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German Cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.*, **87**:51-58.
- QUESADA-MORAGA, E., VEY, A. 2003. Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production of macromolecular toxins against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology*, **13**:323-340.
- RATH, A.C. 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Science and Technology*, **10**(5): 563-581.
- SCHMID-HEMPEL, P. 1998. Parasites in social insects. Princeton University Press. NJ. 409 pp.
- Shah, P.A., Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**:413-423.
- SILVESTRI, F. 1939. Compendio di Entomologia Applicata. Parte Speciale. Vol. I. Tipografia Bellavista. Portici. 972 pp.

- SPSS Inc, 1997. SPSS 8.0 for Windows. SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11 th floor. Chicago. Illinois 60606.
- SUN, J., FUXA, J.R., HENDERSON, G. 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, **81**: 78-85.
- SUN, J., FUXA, J.R., HENDERSON, G. 2003. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **84**(1): 38-46.
- THRONE, J. E., WEAVER, D. K., CHEW, V., BAHER, J. E. 1995. Probit analysis of the correlated data: Multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* **8**:1510-1512.
- TREMBLAY, E. 1995. Entomologia Applicata. Vol. II. Parte 1. 3ª Ediz. Liguori Editore. Nápoles. 407 pp.
- VESTERGAARD, S., CHERRY, A., KELLER, S. y GOETTEL, M. 2003. Safety of Hyphomycete fungi as microbial control agents. En: Environmental impacts of microbial insecticides. Need and methods for risk assessment. (Hokkanen, H. M. T., Hajek, A. E. Eds.). Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, pp. 35-62.
- WRAIGHT, S.P., JACKSON, M.A., DE KOCK, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential (Butt, T.M., Jackson, C. y N. Magan Eds.). CABI Publishing, pp. 253-288.
- YELA, J.L. 1997. Insectos causantes de daños al patrimonio histórico y cultural: caracterización, tipos de daño y métodos de lucha (Arthropoda: Insecta). *Bol. S.E.A.*, **20**:111-122.
- ZOBERI, M. H. 1995. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mycologia*, **87**: 354-359.

(Recepción: 21 mayo 2004)

(Aceptación: 17 enero 2005)