

00377
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**Caracterización genotípica de *Metarhizium
anisopliae* var. *acridum* por medio de
RAPD-PCR y determinación *in vitro* de su
virulencia en langosta (Orthoptera:
Acrididae)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CANO RAMÍREZ CLAUDIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MÉXICO, D.F.

Junio 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de abril de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Cano Ramírez Claudia**, con número de cuenta 501093570, y número de expediente 0, con la tesis titulada: "**Caracterización genotípica de Matarhizium anisopliae var. acridum por medio de RAPD-PCR y determinación in vitro de su virulencia en langosta (Orthoptera: Acrididae).**", bajo la dirección de la **Dra. Concepción Toriello Nájera**.

Presidente:	Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa
Vocal:	Dra. Margarita Hermelinda Villegas Ríos
Secretario:	Dra. Concepción Toriello Nájera
Suplente:	Dra. María del Rocío Reyes Montes
Suplente:	Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de mayo de 2003.


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

B

La caracterización fenotípica de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Micología Básica bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera. La caracterización genotípica se llevó en el laboratorio de Micología Molecular bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Reyes Montes. Ambos laboratorios se ubican en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Directora

Dra. Concepción Toriello Nájera

Coasesora

Dra. María del Rocío Reyes Montes

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico brindado a través de la beca que recibí de CONACYT por medio del proyecto de investigación G31451B.

Agradezco al M.en C. Víctor Hernández y a la Bióloga Angélica Berlanga del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-SAGARPA, Tecomán, Colima por brindar los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* utilizados para este estudio.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutoral por su valioso apoyo académico:

Dra. Concepción Toriello Nájera
Dra. María del Rocío Reyes Montes
Dr. Miguel Ulloa

Agradezco al Dr. Gerardo Zúñiga y la M. en C. Flor Rivera del Instituto Politécnico Nacional por su valiosa ayuda en el análisis de los datos obtenidos en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, por su apoyo incondicional, en todas mis decisiones y por corregirme cuando me he equivocado.

Agradezco a mis dos grandes amigos, Gammaliel Ábrego y Marisol Sandoval por su amistad, ayuda y por continuar juntos en este camino de la vida.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Micología Básica por su maravillosa amistad, compañerismo y ayuda: Biol. Hortensia Navarro, Q.F.B. Amelia Pérez, M. en C. Gina Cavallazi, Biol. Elena Montoya, Biol. Patricia Jiménez, Biol. David Basilio y Biol. Águeda Vásquez.

Agradezco a la Dra. Tere Mier, por confiar en mi y permitirme entrar en este grupo de trabajo

Agradezco a la Dra. Conchita Toriello, por aceptarme como su alumna, enseñarme, y confiar en mi.

Agradezco a la Dra. María del Rocío Reyes Montes por su valiosa enseñanza y por ser como es, una persona excepcional.

i. ÍNDICE

i. RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	10
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVO GENERAL	16
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Aislados fúngicos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> en estudio	18
2. Obtención de cultivos monospóricos	20
3. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos	21
a) <i>Crecimiento radial</i>	21
b) <i>Tamaño de los conidios</i>	21
c) <i>Esporulación</i>	21
d) <i>Análisis estadístico</i>	21
e) <i>Selección de cultivos monospóricos</i>	22
4. Bioensayo de virulencia de los monospóricos seleccionados en langosta	22
a) <i>Análisis estadístico</i>	23
5. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos seleccionados	24
a) <i>Extracción de DNA genómico</i>	24
b) <i>Análisis del DNA mediante electroforesis</i>	25
c) <i>Documentación de geles</i>	26
d) <i>Cuantificación de DNA</i>	26
e) <i>Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)</i>	26
• <i>Curva de oligonucleótidos</i>	28
• <i>Curva de DNA</i>	28
• <i>Curva de MgCl₂</i>	28

f) <i>Análisis de datos del RAPD-PCR</i>	29
VIII. RESULTADOS	31
1. Obtención de cultivos monospóricos	31
2. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos	31
a) <i>Crecimiento radial</i>	31
b) <i>Tamaño de los conidios</i>	32
c) <i>Esporulación</i>	33
d) <i>Selección de cultivos monospóricos</i>	33
3. Bioensayo de virulencia en langosta de los monospóricos seleccionados	35
4. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos	39
a) <i>Extracción de DNA genómico</i>	39
b) <i>Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)</i>	40
• <i>Curva de oligonucleótidos</i>	40
• <i>Curva de DNA</i>	41
• <i>Curva de MgCl₂</i>	42
c) <i>RAPD-PCR en las condiciones estandarizadas de los DNA's de los aislados y cepas estudiadas</i>	43
d) <i>Comparación entre el polimorfismo genético generado entre los DNA's de los cultivos polispóricos y monospóricos obtenidos de aislados de M. anisopliae var. acridum</i>	46
e) <i>Clasificación de aislados de M. anisopliae var. acridum de MX y cepas de referencia del género Metarhizium</i>	48
f) <i>Diversidad genética de los aislados de M. anisopliae var. acridum de MX y cepas de referencia del género Metarhizium</i>	53
g) <i>Relación entre polimorfismos del DNA y virulencia de los aislados estudiados</i>	53
IX. DISCUSIÓN	54
X. CONCLUSIONES	61
XI. LITERATURA CITADA	62
XII. ANEXOS	69

XIII. ÍNDICE DE TABLAS	76
XIV. ÍNDICE DE FIGURAS	77
XV. ÍNDICE DE ANEXOS	79

i. RESUMEN

El control biológico de poblaciones de insectos nocivos promete ser una herramienta eficaz para obtener alimentos sanos libres de componentes químicos. Este trabajo contribuye con la caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* de México (MX) con el objetivo de seleccionar los idóneos para la elaboración de un agente microbiano para el control biológico de la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* sin costo ecológico para los agroecosistemas. Se estudiaron 16 aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* de *S. piceifrons piceifrons* provenientes de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima. Se utilizaron once cepas de referencia del género *Metarhizium* de las colecciones ARSEF (EEUU) y CSIRO (Australia) que representan diez grupos (clados) taxonómicos de *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000). Se analizaron tres características fenotípicas, velocidad de crecimiento, tamaño de conidios, y esporulación, para la selección del cultivo monospórico de cada aislado original. Se estimó la virulencia del hongo por medio del tiempo letal medio (TLM) de los 16 cultivos monospóricos seleccionados. Los bioensayos de virulencia se llevaron a cabo en insectos adultos en estadio solitario de *S. piceifrons piceifrons*. La caracterización genotípica de los aislados de MX se llevó a cabo utilizando el método del polimorfismo del DNA amplificado al azar utilizando 14 oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR). Con los marcadores obtenidos se construyó una matriz de presencia (1) ausencia (0) y se calculó el índice de Jaccard obteniendo una matriz de similitud genética pareada entre los aislados. A partir de esta matriz se construyó un fenograma por medio del método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética para determinar el grado de relación entre la matriz del fenograma obtenido y la matriz de similitud original. Se estableció multidimensionalmente la relación de los cultivos monospóricos y cepas de referencia, usando el análisis de componentes principales (ACP) y árbol de tendido mínimo (ATM). La confiabilidad estadística del fenograma obtenido fue evaluada por el remuestreo de la matriz de similitud mediante el método de "bootstrap". Se estimó la diversidad genética de los cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia utilizando el índice de diversidad de Shannon. En la caracterización fenotípica se obtuvieron de 7 a 11 cultivos monospóricos a partir del cultivo original aislado del insecto para contar con poblaciones genéticamente homogéneas. Debido a que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$) en las tres características analizadas entre los cultivos originales y monospóricos obtenidos, la característica de selección del cultivo monospórico fue aquel que mostró la mayor esporulación. En la virulencia del hongo hacia la langosta por el tiempo letal medio se observaron diferencias significativas entre los 16 aislados, con un rango entre 5.8 a 12 días. En la caracterización genotípica, los patrones polimórficos de DNA genómico entre los 16 cultivos polispóricos y los monospóricos seleccionados fueron similares. Sin embargo, el DNA obtenido de los cultivos monospóricos presentaron una mejor amplificación y resolución que los cultivos polispóricos. Los patrones polimórficos de las cepas de referencia de cada uno de los 10 clados establecidos para *Metarhizium* mostraron patrones diferentes entre ellas. Las cepas de referencia

PAGINACIÓN DISCONTINUA

correspondientes al clado 7 de *M. anisopliae* var. *acridum* y la cepa del clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* presentaron similitudes con el patrón polimórfico de los aislados de MX. Los 14 oligonucleótidos utilizados amplificaron 371 marcadores bien definidos y repetibles en el DNA genómico de los cultivos originales, monospóricos seleccionados, y cepas de referencia. Con estos marcadores se construyó una matriz de presencia (1) ausencia (0), para calcular la matriz de similitud según el índice de Jaccard, y se obtuvo el fenograma correspondiente (UPGMA). En éste, se observó una agrupación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* de MX en un grupo separado de los 10 clados taxonómicos del género *Metarhizium* previamente reportados. El valor de "bootstrap" indica un 100% de relación entre los cultivos del hongo de MX. El grupo de aislados de MX mantuvo una relación muy estrecha con el clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* cepa 1184 (EH-527) aislada de Francia con una relación del 99% (valor del "bootstrap"), y con el clado 7 que corresponde a *M. anisopliae* var. *acridum*, cepas FI-985 (EH-530) de Australia y FI-987 (EH-535) de Nigeria, con una relación del 73%. Las cepas de referencia restantes presentaron una menor similitud con los cultivos de MX mostrando un valor de "bootstrap" del 57%. El coeficiente de correlación cofenética mostró un valor de $r = 0.99$ y $P = 0.0004$, demostrando que el fenograma generado no es producto del azar, sino un fenómeno biológico claro. Estos resultados de asociación entre el DNA de los aislados de MX y cepas de referencia se reafirmaron con el ACP y el ATM. El ACP indicó que los aislados de MX formaron un grupo diferente de las otras cepas de referencia estudiadas. El ATM mostró la relación directa entre los cultivos monospóricos de MX y las cepas de referencia de la variedad *acridum* (clado 7) y la relación de esta variedad con la cepa de referencia de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (clado 6) de Francia. La diversidad genética estimada fue de 0.25 en los cultivos originales y monospóricos seleccionados y de 0.34 para las cepas de referencia. Los resultados de los análisis fenotípicos y genotípicos sugieren que los aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* de MX estudiados presentan una alta variabilidad en la virulencia hacia la langosta, en el tamaño de los conidios y se sugieren los aislados MaPL40 (EH-502), MaPL16 (EH-489) y MaPL32 (EH-531) como candidatos para agentes microbianos para el control biológico de la langosta conformando un grupo diferente a los ya establecidos.

I. INTRODUCCIÓN

La constante lucha del hombre contra las plagas agrícolas causantes de grandes pérdidas económicas en el mundo ha provocado que se generen diferentes métodos de control, dentro de los cuales sobresalen el control químico y el biológico. El primero resultó eficiente en sus inicios pero con el tiempo la aplicación indiscriminada de insecticidas químicos y la continua e intensa presión selectiva indujeron la aparición de plagas resistentes. Además, estos químicos afectan de manera considerable el equilibrio del ecosistema, causando daños sobre la salud humana, doméstica y fauna silvestre. Por lo anterior, se ha buscado dar un mayor apoyo al control biológico, el cual emplea organismos que de manera natural controlan poblaciones de hospederos causantes de daño en la agricultura. Actualmente, a este tipo de control se le ha prestado mayor atención principalmente en el aprovechamiento de hongos entomopatógenos (Freeman, 1981; Roberts, 1989).

Dentro de los entomopatógenos más utilizados como agentes biocontroladores de plagas agrícolas en todo el mundo se encuentran las especies *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *M. flavoviride* Gams & Rosypal, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas.

En el género *Metarhizium* morfológicamente se reconocen tres especies y diversas variedades que son: *M. album* Petch, *M. anisopliae* con dos variedades var. *anisopliae* (Metsch) Sorokin y var. *majus* Tulloch y *M. flavoviride* con dos variedades var. *minus* Rombach y var. *flavoviride* Gams & Rozsypal (Tulloch, 1976; Rombach *et al.*, 1986; Rombach *et al.*, 1987; Samson *et al.*, 1988; Hawksworth *et al.*, 1995). Actualmente, el mismo género se ha clasificado en diez grupos (clados) con base en la aplicación de técnicas moleculares, entre otras, el RAPD-PCR, secuenciación de las regiones ITS, 28S, D3 del DNA ribosomal y algunas características fenotípicas como termotolerancia y tamaño de los conidios (Driver *et al.*, 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del género *Metarhizium* basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular.

Taxones reconocidos morfológicamente*	Taxones reconocidos molecularmente** Diez grupos (clados)
<p><i>M. album</i> (Petch)</p> <p><i>M. anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>anisopliae</i> (Metsch) Sorokin var. <i>majus</i> (Tulloch)</p> <p><i>M. flavoviride</i> (Gams & Roszypal) var. <i>minus</i> (Rombach) var. <i>flavoviride</i> (Gams & Roszypal)</p>	<p>(1) <i>M. album</i></p> <p>(2) <i>M. flavoviride</i> Tipo E</p> <p>(3) <i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i></p> <p>(4) <i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i></p> <p>(5) <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i></p> <p>(6) <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i></p> <p>(7) <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i></p> <p>(8) <i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i></p> <p>(9) <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i></p> <p>(10) <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i></p>

*Samson *et al.* (1988), Hawksworth *et al.* (1995), Tulloch (1976), Rombach *et al.* (1986), Rombach *et al.* (1987).

** Driver *et al.* (2000).

En este trabajo nos enfocaremos a *M. anisopliae* var. *acidum* (anteriormente *M. flavoviride*), que es un ascomiceto mitospórico. Presenta esporodoquios con fiálides en forma de clava (9-14 x 3-4.5 µm); conidios uninucleados, catenulados, basipetos, elipsoidales de (6.5 -)7.9 [-11] x 4.5 - 5.5 µm, y las masas de éstos presentan un color verde claro a verde amarillo (Figura 1a). La colonia del hongo es plana, pulverulenta, produce lentamente los conidios, y es de color verde-amarillo a verde olivo (Fig. 1b)(Rombach *et al.*, 1986). En el medio de cultivo agar de avena, la velocidad de crecimiento del hongo es lenta y la colonia alcanza 2.0 cm de diámetro en diez días a 20°C (Domsch & Gams, 1993). Este hongo fue inicialmente encontrado en escarabajos, saltamontes y suelos agrícolas de Alemania (Rombach *et al.*, 1986). Recientemente se ha aislado de acrididos como *Schistocerca gregaria* Forskol (Prior *et al.*, 1992) y *S. piceifrons piceifrons* (Walker) (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997). *M. anisopliae* var. *acidum* actualmente es considerado como un buen agente microbiano en el control de acrididos plaga, porque en condiciones climáticas adversas de alta temperatura y humedad relativa baja puede producir infección en estos insectos (Goettel *et al.*, 1995; Douglas *et al.*, 1999).

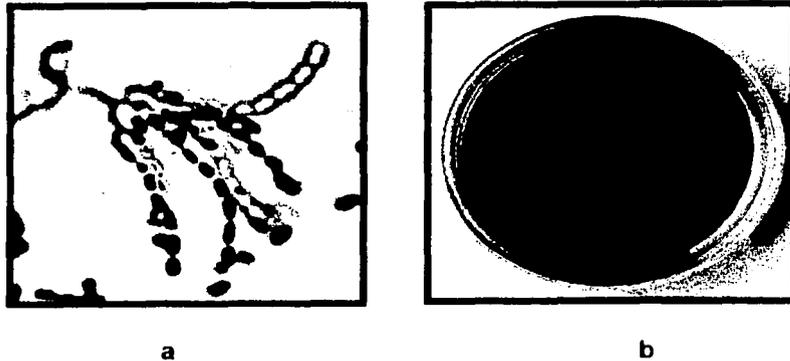


Figura 1. Morfología del hongo *M. anisopliae* var. *acridum*. 1a. Colonia del hongo en agar de papa y dextrosa, presentando un color verde y zonas amarillas. 1b. Conidióforo y conidios en cadena del hongo. Aumento = 1000X. Foto de Patricia Jiménez.

El proceso de infección de este hongo en el insecto, al igual que otros hongos entomopatógenos, consiste de diversas etapas como son: *i*) adhesión de los conidios, *ii*) penetración al insecto por medios mecánicos y de la producción de enzimas como proteasas y quitinasas, que facilitan la digestión de las capas más externas (epicutícula), y la degradación de las capas internas (procutícula y epidermis) hasta invadir el hemocele con la aparición de blastosporas, *iii*) diseminación del hongo en el interior del insecto y *iv*) salida del hongo al exterior del insecto y su posterior esporulación (Figura 2) (St Leger, 1995). Otras características relevantes que apoyan el uso de este hongo en el campo agrícola son su inocuidad al humano y medio ambiente así como su adaptación al ecosistema sin producir efectos negativos (Moore y Prior, 1993; Goettel *et al.*, 1995). Económicamente este microorganismo es de fácil manejo y producción (Jenkins y Prior, 1993; Jenkins y Goettel, 1997; Jenkins *et al.*, 1998), y se pueden obtener formulaciones sencillas para asperjarse con tecnología agrícola en uso y de bajo costo (Bateman *et al.*, 1993).

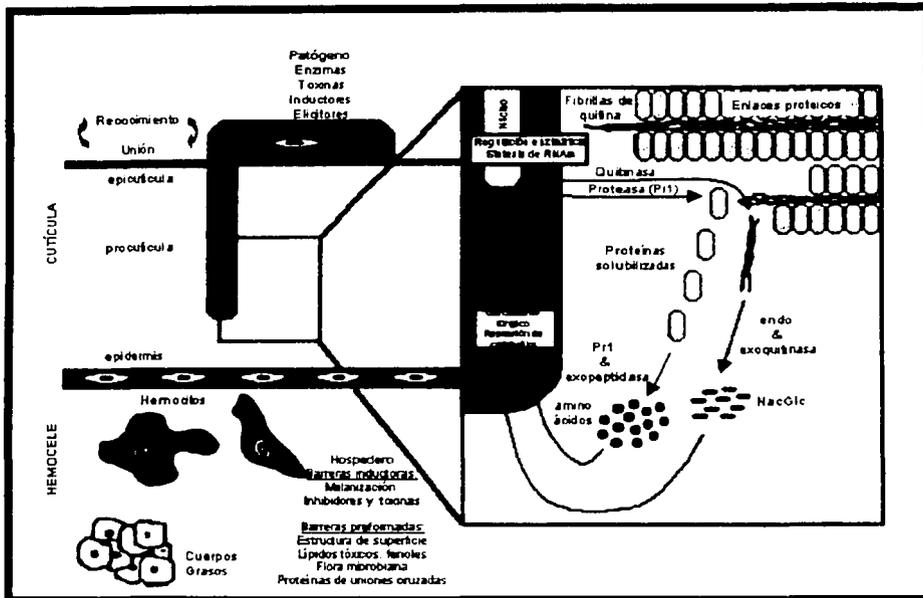


Figura 2. Diagrama que muestra el proceso de infección del hongo a través de la cutícula del insecto y las barreras del hospedero al patógeno. Modificado de St. Leger (1995).

La langosta *S. piceifrons piceifrons* considerada como una plaga potencial en el mundo y en MX, pertenece a los insectos del orden Orthoptera. Dentro de este orden se han registrado 12,500 especies, de las cuales 1080 de 223 géneros se han reportado para Norte América. Estos organismos tienen un cuerpo coriáceo de 10 - 50 mm, en ocasiones duro, alargado y cilíndrico. En MX, presenta dos generaciones anuales en la península de Yucatán, y una generación al año en otras regiones del país. Presenta tres estadios de desarrollo que son la etapa de huevo, ninfa y adulto. Tiene desplazamientos como esparción (movimiento del insecto en fase solitaria para cubrir sus necesidades alimentarias y otros requisitos), dispersión (movimiento de un mayor número de individuos para solventar sus necesidades de supervivencia y reproducción), y migración (movimiento masivo, el cual permite la mortalidad prematura de individuos que constituyen una población en exceso). Estos movimientos la hacen producir más

daños agrícolas, además de pasar de su fase solitaria a gregaria formando grandes mangas de insectos que arrasan con todos los vegetales y plantíos por donde pasan (SAGAR, 2000; SAGARPA, 2001). Algunas referencias donde se puede consultar mayor información sobre la biología y ecología de la langosta son Parker *et al.* (1967), Harvey (1983), Steedman (1990) y Barrientos *et al.* (1992).

En MX, la langosta llega a atacar hasta 400 especies vegetales dentro de las cuales encontramos el maíz, frijol, sorgo, arroz, soya, cacahuate, caña de azúcar, chile, tomate, cítricos, plátano, coco y pastizales. La langosta se distribuye en las entidades de menor altitud sobre el nivel del mar, como Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Figura 3). Con base en la distribución de este insecto se consideran cinco zonas gregarígenas principales que cubren una superficie aproximada de 20,000 ha, extendiéndose la zona de invasión a más de cinco millones de ha (SAGAR, 2000; SAGARPA, 2001). Las zonas gregarígenas son (Figura 3):

- I. **Yucatán.** Se encuentran dos áreas, la primera está dentro de la zona henequera de los estados de Yucatán y Campeche. La segunda y más importante, de la cual han provenido las mangas que han causado mayores daños en los cultivos agrícolas y de importancia pecuaria se localiza en los municipios de Dzilam González, Buctzotz, Panabá, Cenotillo y en menor grado San Felipe, Tizimin y Río Lagartos.
- II. **Tabasco.** Se localiza en los límites con los estados de Campeche y Chiapas y el Departamento de Flores de Guatemala, abarca los municipios de Tenosique, Balancán y Emiliano Zapata en Tabasco y la Libertad en Chiapas. Esta área permaneció inactiva por un tiempo más o menos largo aunque en la actualidad presenta actividad fuerte.
- III. **Veracruz.** Se ubica en los municipios de Medellín, Boca del Río, Alvarado, Tlalixcoyan y Tierra Blanca. Veracruz es la segunda zona en importancia y ha ocasionado invasiones graves en el mismo estado.
- IV. **Chahuites-Tapanatepec.** Se encuentra en los límites de Oaxaca y Chiapas, dentro del triángulo geográfico formado por los poblados de Salina

Cruz, Chahuities y Tapanatepec. Esta zona no ha tenido tan graves problemas con esta plaga como la zona anterior, pero ha causado invasiones en el Istmo de Tehuantepec y otros lugares del estado de Oaxaca.

- V. **San Luis Potosí-Tamaulipas.** Se encuentra en los límites de los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas, en los valles de la Sierra Nahola. El impacto que ha tenido en esta zona es menor que en las zonas anteriores pero ha dado lugar a las invasiones que se presentan en las Huastecas Potosina y Tamaulipeca.

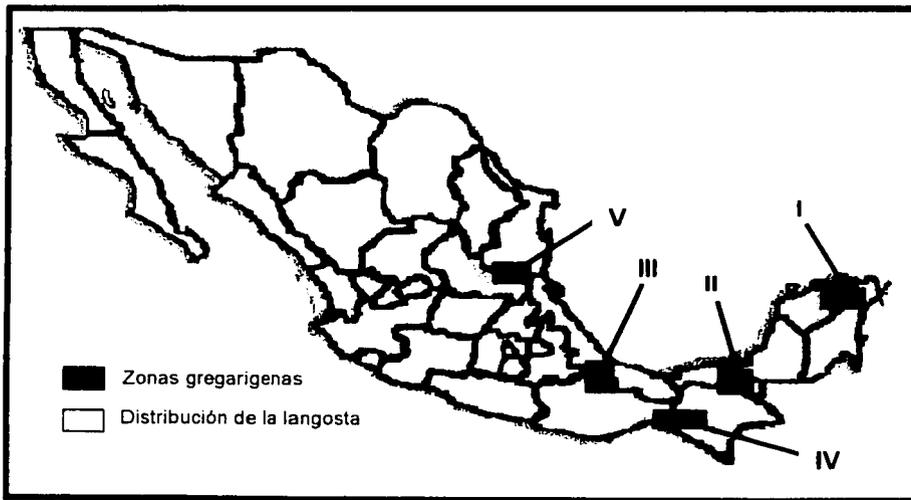


Figura 3. Distribución de la langosta en México y zonas gregarigenas de la langosta. I. Yucatán, II. Zona de los ríos, III. Veracruz, IV. Chahuities-Tapanatepec y V. San-Luis – Tamaulipas.

Actualmente, el medio de control para este insecto ha sido el químico. En MX, *S. piceifrons piceifrons* anualmente se combate en un promedio de 20,000 ha con aproximadamente 500 toneladas de paratión metílico en polvo al 3% invirtiéndose cerca de \$1,000,000 en insecticida y \$300,000 en mano de obra para su aplicación, con riesgo de que la plaga arrase 50 veces la superficie en que se combate si descienden las actividades de vigilancia y control (SAGAR, 2000;

SAGARPA, 2001). El paratión metílico es considerado como dañino para la salud humana por la OMS (Anónimo, 1995).

Por los efectos dañinos de los químicos a la salud humana, animal y al ambiente se necesitan alternativas eficientes contra los insectos plagas además de que intervengan en un equilibrio sano de los ecosistemas. El control biológico es una alternativa favorable para el control de plagas agrícolas, sin embargo, se requiere de amplios estudios multidisciplinarios sobre aspectos genéticos, fisiológicos y biológicos, entre otros, de los organismos utilizados en este control, para poder llegar a formulados eficientes para la aplicación en el campo agrícola, y que sean inocuos para el hombre, los animales y el ambiente.

II. ANTECEDENTES

Probablemente la langosta y el saltamontes (Orthoptera: Acrididae) son las plagas de insectos más importantes en los campos agrícolas de todo el mundo, principalmente en países como el Sur de África, Nigeria, China, Australia, Estados Unidos, Argentina, Guatemala, Brasil y México entre otros países (Harvey, 1983; Lomer *et al.*, 2001). En la mayoría de los casos, las autoridades de estas naciones han propuesto medidas de control preventivo contra estas plagas. Uno de los mayores desastres mundiales con la langosta del desierto fue la del Mar Rojo en los años 1986 y 1992, que duraron entre dos y tres años respectivamente (Showler *et al.*, 1991; Showler 1995). Otro desastre mundial se observó con la langosta migratoria *Locusta migratoria capito* (Sauss) en Madagascar en 1995, y con la langosta italiana *Calliptamus italicus* L. en Kazakhstan al Noroeste de China en 1997 (Lomer *et al.*, 2001). Ante estos antecedentes, estos países consideraron la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo, al analizar que este proceso generaría un excesivo gasto económico [en 1990 se registraron gastos de 26,000 millones de dólares distribuidos en 4.5 en Estados Unidos, 4.5 en el Oeste de Europa y 17 en el resto del mundo (Anónimo, 1995)], además del grave deterioro al ecosistema (Lomer *et al.*, 2001) se propusieron otras alternativas. Se desarrollaron organizaciones para controlar este problema agrícola, entre los que se encontraban el "Anti-Locust Research Center" que subsecuentemente fue nombrado "Center for Overseas Pest Research" creado en 1945 y que trabaja en conjunto con la FAO (Food and Agriculture Organization) de las Naciones Unidas, donde se han propuesto leyes políticas y económicas en las cuales se hacen especificaciones de medidas de control alternativas como la utilización de hongos entomopatógenos contra esta plaga (Lomer *et al.*, 2001).

El género *Schistocerca* del orden Orthoptera, inicialmente llegó a invadir países del continente americano (con excepción de Surinam y la Guayana Francesa) hasta el sur de los Estados Unidos. Se extendió posteriormente a América Central y México dominando la especie *S. piceifrons*. Este taxón fue dividido en dos subespecies: *S. piceifrons* ssp. *peruviana* Lynch Arrib., distribuida

en Perú y Ecuador, y *S. piceifrons* ssp. *piceiformis*, conocida comúnmente como langosta voladora, distribuida en Centroamérica y MX (Harvey, 1983).

En MX, la ssp. *piceifrons* fue registrada desde la época colonial donde hubo periodos de 5 hasta 9 años continuos de la plaga. Otra de las épocas en que se registró fue en los periodos de 1830-1836, 1845-1859, 1882-1887 y 1971-1977. A partir de esas fechas, este insecto se sigue presentado cada año ocasionando grandes pérdidas económicas y la destrucción de aproximadamente 400 especies de vegetales (Barrientos, 1990; SAGAR, 2000; SAGARPA, 2001). En nuestro país también se han creado organizaciones y leyes para el control de esta plaga. La SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) ha establecido la Norma Oficial Mexicana (NOM-049-FITO-1995) que se encarga de la campaña contra la langosta.

Una de las alternativas de control de este insecto plaga es el control biológico utilizando hongos entomopatógenos, en donde sobresale el género *Metarhizium*. Estos microorganismos fueron inicialmente detectados en homópteros y evaluados en Filipinas contra el delfácido del arroz *Nilaparvata lugens* Stal. Posteriormente, el hongo fue reportado en Australia y las Islas Galápagos (Goettel *et al.*, 1995). Durante el desarrollo del programa de control biológico de langosta y chapulines en África (LUBILOSA, Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux), *M. flavoviride* \equiv *M. anisopliae* var. *acridum* fue el entomopatógeno más común y con mayor dispersión en poblaciones de acrididos, actualmente, este país cuenta con un agente microbiano registrado llamado "Green Muscle™". Recientemente, el hongo fue aislado en Brasil, Madagascar (Goettel *et al.*, 1995) y México (Hernández - Velázquez *et al.*, 1997). Estudios posteriores demostraron que este hongo posee alta virulencia contra *S. gregaria* (Prior *et al.*, 1992) y las formulaciones obtenidas con este hongo han mostrado eficiencia en el control de la langosta en África (Jenkins *et al.*, 1998).

Diversos estudios con *M. anisopliae* var. *acridum* muestran diferente niveles de virulencia del hongo (Moore *et al.*, 1992; Bateman *et al.*, 1993). También se ha observado que factores como radiaciones solares y la temperatura ambiental influyen en el crecimiento normal del hongo y en su virulencia hacia el insecto

(Moore *et al.*, 1993; Matthew *et al.*, 1997). En un trabajo reciente se observó que *M. flavoviride* mostraba una mejor eficiencia como agente microbiano que *Beauveria bassiana* a temperaturas altas. Además las dos especies mostraron un crecimiento antagónico al crecerlas juntas (Douglas *et al.*, 1999).

En MX, el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Colima, lleva a cabo un programa de carácter regional y nacional contra insectos plaga de importancia económica, donde se evalúan aislados del hongo *M. anisopliae* var. *acridum* (SAGAR, 2000; SAGARPA, 2001). Asimismo en el estado de Campeche se evaluó el aislado MaPL40 del hongo en diferentes dosis y tipos de formulaciones, observándose una disminución en la población de ninfas de *S. piceifrons piceifrons* (Poot, 2000).

La aplicación de técnicas de biología molecular en hongos entomopatógenos han mostrado su utilidad en la taxonomía molecular de estos organismos. Una técnica molecular ampliamente usada para la tipificación de cepas que permite agrupar los aislados en estudio, es el polimorfismo de DNA amplificado al azar utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR). El primer estudio que empleó esta metodología en el género *Metarhizium* fue el de Cobb & Clarkson (1993). Utilizando 10 oligonucleótidos, caracterizaron 12 aislados de *M. anisopliae* y *M. flavoviride* de diferentes regiones geográficas y hospederos. Obtuvieron fragmentos de DNA de diferentes tamaños para cada aislado observando variabilidad genética entre ellos. Utilizando el índice de Jaccard y el método de agrupamiento, promedios aritméticos no ponderados (UPGMA), los aislados se separaron en dos grupos, nueve de los aislados se agruparon en *M. anisopliae* y dos aislados en *M. flavoviride*. Sin embargo, una cepa de Australia inicialmente reportada como *M. anisopliae* se agrupó en *M. flavoviride*. No lograron asociar el genotipo de los aislados con su origen geográfico y hospedero. Fegan *et al.* (1993) obtuvieron los patrones polimórficos de DNA mediante RAPD-PCR (utilizando 10 oligonucleótidos) de 30 aislados correspondientes a *M. anisopliae* var. *anisopliae* y un aislado de *M. anisopliae* var. *majus*, provenientes de diferentes hospederos y varios habitats de un campo de caña de azúcar en Australia. Los resultados indicaron un alto grado de diversidad genética entre los

aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y relación con el hábitat. Bidochka *et al.* (1994) caracterizaron 24 cepas de *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. bassiana* y aislados sin identificar de *Metarhizium* mediante RAPD-PCR (utilizando tres oligonucleótidos) e hibridación del DNA. Ellos obtuvieron patrones polimórficos que indicaron una alta variabilidad genética entre las cepas de *M. anisopliae* indicando especies crípticas, mientras que las cepas de *M. flavoviride* no mostraron variabilidad intraespecífica. Las cepas se agruparon en *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. bassiana* y los aislados sin identificar las caracterizaron como *M. flavoviride*. Encontraron una relación de los patrones de DNA con su hospedero, sin embargo, no encontraron asociación con su origen geográfico. Leal *et al.* (1994) caracterizaron por RAPD-PCR (utilizando 11 oligonucleótidos) 20 aislados de *M. anisopliae*, de los cuales cinco aislados correspondieron a Australia, Brasil, Finlandia y Filipinas, respectivamente. Los patrones polimórficos obtenidos fueron similares entre los aislados del mismo país y diferentes entre el resto de las regiones geográficas estudiadas. Los aislados se agruparon en cuatro grupos de acuerdo a su origen geográfico. El primer grupo formado por los aislados de Australia; el segundo grupo por los de Brasil; el tercer grupo lo formaron los aislados de Finlandia y tres aislados de Filipinas; y el cuarto grupo incluyó dos aislados de Filipinas que corresponden a *M. anisopliae* var. *majus*. Rakotonirainy *et al.* (1994) estudiaron la relación filogenética entre especies del género *Metarhizium* con base en las secuencias del RNA ribosomal 28S y patrones de isoenzimas. El análisis filogenético mostró la separación entre *M. flavoviride* y *M. anisopliae* y la diferencia de las cepas de *M. anisopliae* var. *majus*. Entre los estudios más relevantes de taxonomía molecular se encuentra la revisión del género *Metarhizium* por Driver *et al.* (2000). Ellos se basaron en el análisis filogenético de datos de secuenciación de las regiones ITS 28S y D3 del DNA ribosomal, patrones de RAPD-PCR (utilizando seis oligonucleótidos) y características fenotípicas como termotolerancia y tamaño de los conidios de 123 cepas de diferentes regiones geográficas y hospederos. El análisis filogenético agrupó a los aislados estudiados en 10 clados taxonómicos (Tabla 1). Las cepas se agruparon en su mayoría en *M. anisopliae* y se reconocieron cuatro variedades:

var. *anisopliae* (clado 9), var. *majus* (clado 10), var. *lepidiotum* (clado 8) y var. *acidum* (clado 7). De las cuales las dos primeras variedades ya habían sido descritas en la clasificación del género *Metarhizium* utilizando caracteres morfológicos (Tabla 1). Mientras que, las variedades *lepidiotum* y *acidum* son variedades nuevas con base en la secuencia de las regiones ITS. *M. album* (clado 1), *M. flavoviride* var. *flavoviride* (clado 6) y *M. flavoviride* var. *minus* (clado 5) fueron reconocidas y redefinidas. Se observaron dos variedades nuevas *M. flavoviride* var. *novazealandicum* (clado 3), *M. flavoviride* var. *pemphigum* (clado 4). Un nuevo clado fue formado por *M. flavoviride* Tipo E (clado 2) el cual debe ser estudiado de nuevo por presentar características diferentes a los demás clados. *M. flavoviride* fue redefinido en *M. anisopliae* var. *acidum*.

Bidochka *et al.* (2001) analizaron la genética de poblaciones de 83 aislados de *M. anisopliae* de un área forestal y un área agrícola en Ontario, Canada, utilizando aloenzimas, RAPD (utilizando tres oligonucleótidos) y RFLP-PCR del gen *prt1*. Los dos grupos fueron asociados con diferentes tipos de hábitat, no se encontró asociación con los insectos hospederos. El grupo del área forestal mostró en gran medida un crecimiento a temperaturas bajas (8°C), mientras que los aislados del grupo agrícola mostraron en su mayoría crecimiento a temperaturas altas (37°C) y resistencia a los rayos UV. En cada grupo observaron estructuras de reproducción recombinante y clonal con base en el estudio estadístico de las frecuencias alélicas de una proyección de 10,000 poblaciones teóricas.

En MX, carecemos de una caracterización fenotípica y genotípica de las especies de hongos entomopatógenos aislados en nuestro país y que podrían ser utilizados como agentes de control biológico. Este trabajo tiene como objetivo realizar una caracterización genotípica y de virulencia en langosta, de aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* en *S. piceifrons piceifrons* de MX.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La langosta *S. piceifrons piceifrons* es una de las plagas agrícolas más relevantes en el sureste del territorio nacional y es considerada como plaga potencial para otros estados de la vertiente del Golfo de México y del Pacífico. El alto potencial reproductivo de este organismo que llega a formar mangas de 3,000,000 de individuos que consumen en 24 horas 5 veces su peso, es decir 30 toneladas de vegetación, la convierte en una plaga terrible para los agricultores. El control químico contra esta plaga ha afectado a la salud humana, doméstica y fauna silvestre y además ha propiciado el desarrollo de resistencia en los insectos. Como control alternativo de manera preventiva e integral surge el hongo *M. anisopliae* var. *acidum* inocuo para el hombre y el ambiente, biorregulador natural de la langosta. Para lograr obtener un agente microbiano autóctono con base en conidios de *M. anisopliae* var. *acidum* aislado en MX, con alta virulencia para la plaga en las condiciones climáticas propias, se requieren de estudios básicos del hongo que contemplen sus características geno y fenotípicas. Este trabajo pretende contribuir a la caracterización de *M. anisopliae* var. *acidum* con el objetivo de seleccionar aquellos aislados de MX que sean los idóneos para la elaboración de un agente microbiano para el control de la plaga agrícola (*S. piceifrons piceifrons*) sin costo ecológico para los agroecosistemas.

IV. HIPÓTESIS

Los aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* de langosta *S. piceifrons piceifrons* de MX presentan patrones polimórficos de DNA genómico diferentes con respecto a los 10 clados descritos del género *Metarhizium*, así como variabilidad en la virulencia hacia la langosta.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genotípicamente aislados del hongo *M. anisopliae* var. *acidum* de MX y determinar su virulencia hacia la langosta por el tiempo letal medio (TLM) en condiciones de invernadero para seleccionar los aislados idóneos para la elaboración de un agente microbiano.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cultivos monospóricos de diversos aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* recolectados de la langosta en México pertenecientes a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Colima.
- Seleccionar cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* con base en la velocidad de crecimiento y esporulación similares o mayores al cultivo original.
- Obtener DNA de los cultivos originales y monospóricos seleccionados de los aislados en estudio. Y cepas de referencia del género *Metarhizium* provenientes de las colecciones de la "Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi", EEUU (ARSEF) y "Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization", Australia (CSIRO), correspondientes a los diez clados propuestos por Driver *et al.* (2000).
- Obtener los patrones de DNA de los aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*, de México, de los monospóricos seleccionados y de las cepas de referencia por medio del polimorfismo del DNA amplificado al azar utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR).
- Analizar y comparar los patrones de DNA de los aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* de México con su cultivo monospórico seleccionado. Asimismo comparar estos patrones polimórficos con las cepas de referencia.
- Determinar el grado de virulencia de los monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* var. *acidum* de México en langosta (*S. piceifrons piceifrons*) por el tiempo letal medio (TLM) y tiempo de sobrevivencia medio (TSM) en condiciones de invernadero.

- Sugerir los aislados de este hongo caracterizados genotípicamente que presenten la mayor virulencia en la langosta *S. piceifrons piceifrons* como los candidatos idóneos para la elaboración de un agente microbiano.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislados fúngicos de *M. anisopliae* var. *acidum* en estudio

Los aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* que se utilizaron en este trabajo se muestran en la tabla 2. Se aislaron de langosta (*S. piceifrons piceifrons*) y provienen de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima.

Se utilizaron once cepas de referencia del género *Metarhizium* (Tabla 3) de las colecciones ARSEF (EEUU) y CSIRO (Australia). Estas cepas representan los diez grupos (clados) taxonómicos de *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000). Todos los aislados y cepas de referencia se conservaron en agua destilada, aceite mineral (Droguería Cosmopolita, MX) a 4°C y en agua glicerizada al 10% en nitrógeno líquido a -196°C, y se mantienen en la colección de hongos en el laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Tabla 2. Hospedero, cultivo y origen de los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en estudio.

Clave UNAM	Clave CNRCB	Hospedero	Cultivo	Origen
EH-483	MaPL5	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-484	MaPL8	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-486	MaPL13	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-487	MaPL14	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-488	MaPL15	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-489	MaPL16	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-490	MaPL18	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-491	MaPL20	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-493	MaPL22	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-494	MaPL26	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-497	MaPL29	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-498	MaPL31	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-499	MaPL37	<i>S. piceifrons</i>	-----	Isla Socorro
EH-500	MaPL38	<i>S. piceifrons</i>	-----	Isla Socorro
EH-502	MaPL40	<i>S. piceifrons</i>	-----	Isla Socorro
EH-531	MaPL32	<i>S. piceifrons</i>	Pastos	Colima

Tabla 3. Características de las cepas tipo de referencia del género *Metarhizium* de acuerdo a Driver *et al.* (2000).

Clave UNAM	Clave ARSEF* CSIRO**	Nombre Original	Hospedero	Origen	Clado*** (Grupo)	Nombre Actual
EH-525	1941*	-----	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Filipinas	1	<i>M. album</i>
EH-529	2948*	<i>M. f.¹ var. minus</i>	Homoptera	Brasil	2	<i>M. flavoviride</i> Tipo E
EH-534	FI-698**	<i>M. a.² var. anisopliae</i>	Lepidoptera	Nueva Zelanda	3	<i>M. f.¹ var. novazealandicum</i>
EH-573	FI-72**	<i>M. a.² var. anisopliae</i>	<i>Pemphigus trehermi</i> (Homoptera)	Inglaterra	4	<i>M. f.¹ var. pemphigum</i>
EH-528	2037*	-----	<i>Niliparvata lugens</i> (Homoptera)	Filipinas	5	<i>M. f.¹ var. minus</i>
EH-527	1184*	-----	<i>Otiorynchus sulcatus</i> (Coleoptera)	Francia	6	<i>M. f.¹ var. flavoviride</i>
EH-535	FI-987**	<i>M. f.¹ var. minus</i>	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Orthoptera)	Nigeria	7	<i>M. a.² var. acridum</i>
EH-530	FI-985**	<i>M. a.² var. anisopliae</i>	<i>Austracris guttulosa</i> (Orthoptera)	Australia	7	<i>M. a.² var. acridum</i>
EH-532	FI-147**	<i>M. a.² var. anisopliae</i>	<i>Lepidiota consobrina</i> (Coleoptera)	Australia	8	<i>M. a.² var. lepidiotum</i>
EH-533	FI-1029**	-----	<i>S. gregaria</i> (Orthoptera)	Eritrea	9	<i>M. a.² var. anisopliae</i>
EH-526	1914*	-----	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Filipinas	10	<i>M. a.² var. majus</i>

*ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, USA.

** CSIRO = Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.

*** Clados de *Metarhizium* caracterizados geno y fenotípicamente por Driver *et al.* (2000).*M. f.¹* = *Metarhizium flavoviride**M. a.²* = *Metarhizium anisopliae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Obtención de cultivos monospóricos

Se obtuvieron cultivos monospóricos de pase 1 (primer aislamiento puro del insecto) de los aislados de langosta de *M. anisopliae* var. *acidum*, utilizando el método modificado de Goettel & Inglis (1997). Se colocó un triángulo de vidrio con tres portaobjetos en una caja de Petri de 14 cm de diámetro. A cada portaobjeto, se agregó 2.5 mL de agar (Bioxón, MX) al 1.5%, filtrado previamente y estéril. De cada aislado, se preparó una suspensión de conidios en 3 mL de Tween 80 (Droguería Cosmopolita) al 0.5% y se realizó un conteo en la cámara de Neubauer (Optik Labor, Alemania) para ajustar la suspensión a 1×10^4 conidios/mL. A partir de esta suspensión se agregaron 10 μ L a cada laminilla y se dispersaron en todo el agar. Se observó al microscopio óptico y se localizó un conidio, el cual se ubicó al centro del campo, se cerró la luz al mínimo, se subió el objetivo, y con un bisturí estéril se cortó un cuadro enmarcado por el círculo luminoso. Se verificó a diferentes aumentos que en el cuadro cortado hubiera un solo conidio, y el cuadro se pasó a una caja de Petri con agar de papa dextrosa (PDA) (Anexo 1) y se incubó a 28°C durante 7 días. Todo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y al tercer día de incubación se verificó en el microscopio estereoscópico que el cultivo provenía de un solo conidio (por la observación de una sola colonia incipiente) (Figura 4).

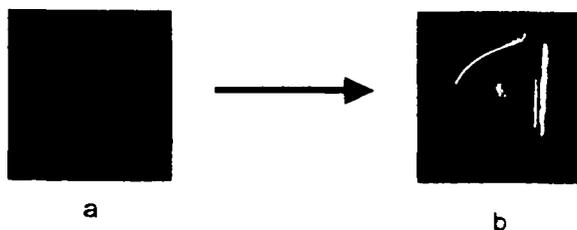


Figura 4. Proceso de obtención de un cultivo monospórico. a) Observación microscópica de un conidio de *M. anisopliae* var. *acidum*, aumento a 1000X. b) Observación al microscopio estereoscópico del crecimiento de una colonia a partir de un solo conidio. La observación se llevó a cabo al tercer día del crecimiento en APD.

3. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos

a) Crecimiento radial

El cultivo original y los monospóricos obtenidos se sembraron en cajas de Petri de 8.5 cm con PDA. En el centro de la caja se hizo un orificio de 6 mm de diámetro, con el extremo superior de una pipeta Pasteur. Se le agregaron 10 μL de una suspensión de 1×10^6 conidios/mL. Las cajas se incubaron a 28°C hasta que ya no se observó crecimiento en los monospóricos o cultivos originales. Esto se llevó a cabo por triplicado y se registró diariamente el diámetro de la colonia en mm en dos planos perpendiculares marcados previamente en el reverso de la caja para obtener la velocidad de crecimiento.

b) Tamaño de los conidios

Se midieron un mínimo de 30 conidios del cultivo original y de cada cultivo monospórico, registrando el largo y ancho en μm , por medio de un ocular calibrado, con un microscopio óptico Olympus CH-2. Esto se llevó a cabo al día catorce del crecimiento radial.

c) Esporulación

Al final del crecimiento radial del cultivo original y de cada monospórico se obtuvo una suspensión de conidios que se cuantificó en la cámara de Neubauer. A cada caja del ensayo de crecimiento radial se le agregaron 15 mL de Tween 80 al 0.5% estéril en la superficie de la placa, posteriormente se raspó con el asa micológica para extraer el máximo número de conidios para su conteo.

d) Análisis estadístico

Para seleccionar el cultivo monospórico a estudiar de cada aislado, se aplicó un tratamiento estadístico (ANOVA, $\alpha = 0.01$) a los datos promedio obtenidos en los tres ensayos anteriores.

e) Selección de cultivos monospóricos

Se seleccionó el monospórico con mayor similitud al cultivo original. Si no se observaron diferencias significativas en las tres características analizadas, el criterio de selección fue el monospórico que presentó la mayor esporulación.

Todos los monospóricos seleccionados así como los demás monospóricos obtenidos se conservaron en agua destilada, aceite mineral a 4°C y en agua glicerizada al 10% en nitrógeno líquido a -196°C, y se mantienen en la colección de hongos en el laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

4. Bioensayo de virulencia de los monospóricos seleccionados en langosta

Los bioensayos de virulencia se llevaron a cabo en el Departamento de Hongos Entomopatógenos en el CNRCB de Tecomán, Colima, bajo la dirección del M. en C. Víctor Hernández-Velázquez. Para los bioensayos, se colectaron ninfas en estado gregario correspondientes a *S. piceifrons piceifrons* de un campo agrícola en Tizimín, en Mérida, Yucatán, y en el campo agrícola de San Luis Potosí. Las ninfas se conservaron en jaulas de 70 x 70 x 60 cm y fueron criadas en el CNRCB en un área bioclimática y alimentadas con hojas tiernas de yuca (*Manihot esculenta*) hasta alcanzar la fase adulta joven en estado solitario, aproximadamente en tres semanas.

La metodología del bioensayo utilizada fue de acuerdo a Hernández-Velázquez *et al.* (2000). Se utilizaron conidios de los cultivos monospóricos de pase uno obtenidos de cultivos en PDA de dos semanas de incubación a 28°C. Posteriormente, se hizo una suspensión inicial en citrolina, aceite mineral derivado del petróleo, frecuente en el campo agrícola de MX (Hernández-Velázquez *et al.*, 2000), y se realizó un conteo en la cámara de Neubauer para ajustar la suspensión a 3.75×10^7 conidios/mL.

Se utilizaron 20 insectos por unidad experimental, con tres repeticiones por tratamiento, colocando cuatro insectos por bote de plástico (13 x 11.5 x 9.0 cm) de boca ancha de un litro de capacidad cubiertos con tela muselina. En cada recipiente se colocaron hojas de yuca y se cambiaron cada 24 horas. Se

seleccionaron insectos sanos de las jaulas de cría y se colocaron en bolsas de plástico de 22 X 23 cm. Cada insecto fue infectado en el pronotum con 2 μ L de la suspensión de conidios. Se tuvieron insectos testigos a los cuales se les inoculó citrolina sin conidios. Posteriormente, los recipientes fueron colocados en un área bioclimática a una temperatura que varió de 27 a 30°C y una humedad relativa que varió de 40 a 90%. Se registró la mortalidad, cada 24 h, los primeros dos días del experimento, y después cada 12 horas. Los insectos muertos se colocaron individualmente en cajas de Petri con papel filtro Whatman N° 4 de 90 mm de diámetro, se sellaron con parafilm, y se incubaron a 28°C.

a) Análisis estadístico

El bioensayo de virulencia se analizó con el porcentaje de mortalidad diaria acumulada. Con los datos de mortalidad diaria acumulada corregida con la fórmula de Abbot (Abbott, 1925) se determinó el tiempo letal medio (TLM) (tiempo en el cual se muere el 50% de los insectos)

$$\frac{X - Y}{X} \times 100$$

Donde:

X = Supervivencia de insectos testigo

Y = Supervivencia de insectos infectados (tratamiento)

También se determinó el tiempo de supervivencia medio (TSM) (tiempo en el cual sobrevive el 50% de los insectos) con base al método descrito en Bateman *et al.* (1996) de acuerdo a la fórmula:

$$TSM_{(t)} = \frac{\sum_{t=1}^N n_t (t - 0.5)}{N}$$

Donde:

n_t = Número de insectos que mueren el día t

t = Número de horas (12 h) en que se hace el registro de la mortalidad de los insectos.

N = Número total de insectos

5. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos seleccionados

a) Extracción de DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico de los aislados originales, de las cepas de referencia y de los monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* var. *acidum*. Todos los hongos se sembraron en medio líquido de Sabouraud adicionado con 10% de extracto de levadura (Anexo 1) durante 7 días a 28°C y 100 r.p.m.

El cultivo de cada hongo se filtró a través de papel filtro sobre un embudo Büchner. El micelio se lavó tres veces con agua desmineralizada estéril para eliminar componentes del medio. El micelio se colocó entre papel filtro para eliminar la mayor cantidad de humedad, y se transfirió a cajas de Petri estéril a -20°C hasta su uso. Para extraer el DNA genómico de los cultivos originales y monospóricos seleccionados, el micelio parcialmente seco se colocó en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido, el cual congela las células y permite romper la pared celular del hongo. Se colocaron 0.4 mL de micelio pulverizado en tubos de 1.5 mL. Se agregaron 0.6 mL de buffer de lisis (50 mM pH 7.1 Tris HCl -USB, Cleveland, Ohio-, 50 mM pH 8.1 EDTA -Boehringer Mannheim, Alemania-, 3% SDS -GIBCOBRL®, US-, 1% 2-mercaptoetanol -MERCK, Alemania-), se agitó firmemente hasta obtener una mezcla homogénea y se centrifugó a 20,000 X g por 5 min a 4°C. Al sobrenadante se le añadió ribonucleasa A (Quiagen, Alemania) a una concentración final de 50 µg/µL y se incubó a 37°C por 2 h. Se añadió proteinasa K (Dako, US) a una concentración final de 200 µg/mL, se agitó firmemente y la muestra se incubó en un termobloque (Fischer Scientific, US) a 55°C por 90 min. Se agregaron 500 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Invitrogen, Alemania) (25:24:1, v/v) y se agitó firmemente hasta obtener una muestra con un aspecto lechoso. Se centrifugó a 20,000 X g por 15 min a 4°C y se tomó la capa más superficial del sobrenadante la cual se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. El DNA se precipitó con 12.5 µL de 3.0 M de acetato de sodio (SIGMA, MX) por cada 500 µL de sobrenadante y dos volúmenes de etanol (J.T. Baker, MX) al 100% pre-enfriado a -20°C. Se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C hasta el siguiente día. Las muestras de DNA se

centrifugaron a 20,000 X g por 5 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y la pastilla de DNA se lavó con dos volúmenes de etanol (Baker) al 70% pre-enfriado a -20°C. La muestra se centrifugó a 20,000 X g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA. El DNA se resuspendió en 50 µL de agua de grado Milli-Q estéril (Millipore, US) y se disolvió a 55°C en el termobloque. Al DNA se le agregó RNasa A (Quiagen) a una concentración final de 10 mg/µL y se incubó por 2 h a 37°C. Posteriormente, el DNA se limpió con la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Invitrogen) y se precipitó con acetato de sodio, como se mencionó anteriormente. El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Debido a que el DNA de las cepas de referencia no se podía extraer, la técnica anterior se modificó en algunos pasos. Brevemente, al sobrenadante de micelio roto por nitrógeno líquido y con buffer de lisis igual que el descrito, se invirtió el orden de la adición de RNasa, proteinasa K y número de purificaciones con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En este caso, con las mismas condiciones anteriores se agregó primero la proteinasa K (Dako), seguido de la RNasa A (Quiagen) y dos lavados con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Invitrogen). El DNA de las cepas se almacenó de la misma manera a -20°C para su uso posterior.

b) Análisis del DNA mediante electroforesis

El DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa (GIBCOBRL®) al 0.8% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (SIGMA) en amortiguador TBE 0.5X (1.34 M tris base -USB-, 0.45 M ácido bórico -USB- y 0.025 M pH 8.0 EDTA -Boehringer Mannheim-). En cada pozo del gel se cargó la mezcla consistente de 2 µL de DNA y 2 µL de amortiguador de muestra concentrado 5X (0.125% azul de bromofenol, 25% glicerol). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 110 V durante 30 min.

c) Documentación de geles

El DNA de los geles se observó por tinción con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ usando un transiluminador de luz ultravioleta T1202 (Syngene, Cambridge). La imagen de los geles se capturó con un foto documentador Synoptics (Syngene) y se imprimió en una impresora térmica Sony 650 (Tokio). La imagen de los geles se invirtió con el programa GeneSnapTM (Syngene) para una óptima resolución.

d) Cuantificación de DNA

La concentración del DNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$ se llevó a cabo por comparación del DNA obtenido y diferentes concentraciones de DNA del fago lambda (10, 20, 50, 100 y 200 ng) (GIBCOBRL[®]), en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

e) Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

La caracterización genotípica de los aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* se llevó a cabo por una amplificación al azar utilizando 14 oligonucleótidos arbitrarios propuestos por Cobb & Clarkson (1993) y Driver *et al.* (2000) (Tabla 4). El método de RAPD-PCR se estandarizó mediante curvas de concentración de oligonucleótido, DNA y MgCl_2 . Se emplearon los programas de amplificación descritos por Cobb & Clarkson (1993) y Driver *et al.* (2000) (Tabla 5). Para la estandarización se emplearon los oligonucleótidos OPH-01 Y OPA-04 y DNA's correspondientes al aislado MaPL22 (EH-493) y la cepa de referencia ARSEF 1914 (EH-526) perteneciente a *M. anisopliae* var. *majus* del clado 10.

Tabla 4. Oligonucleótidos arbitrarios que se utilizaron en la técnica RAPD-PCR.

Oligonucleótidos		Fuente
F		
F06	5'-GGGAATTCGG-3'	Driver <i>et al.</i> (2000)
F07	5'-CCGATATCCC-3'	
F08	5'-GGGATATCGG-3'	
F10	5'-GGAAGCTTGG-3'	
H		
H01	5'-GGTCGGAGAA-3'	Driver <i>et al.</i> (2000)
H02	5'-TCGGACGTGA-3'	
O		
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'	Cobb & Clarkson. (1993)
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'	
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'	
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	
OPA010	5'-GTGATCGCAG-3'	
OPA016	5'-AGCCAGCGAA-3'	
OPA019	5'-CAAACGTCGG-3'	

Tabla 5. Programas de amplificación utilizados en la técnica de RAPD-PCR.

Driver <i>et al.</i> (2000)	Cobb & Clarkson (1993)*
Activación de la Taq polimerasa 94°C - 5 min	Activación de la Taq polimerasa 94°C - 5 min
Primer ciclo 94°C - 5 min 40°C - 2 min 72°C - 3 min	Primer ciclo 94°C - 5 min 32°C - 2 min 72°C - 2 min
39 ciclos 94°C - 1 min 40°C - 90 seg 72°C - 2 min	45 ciclos 94°C - 1 min 35°C - 1 min 72°C - 2 min

*Programa utilizado para el estudio

TEXIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- **Curva de oligonucleótido**

La curva de oligonucleótidos (QUIAGEN®, Operon®) se llevó a cabo con concentraciones de 50, 100 y 200 pmoles y con los dos programas de amplificación antes mencionados.

- **Curva de DNA**

Para la curva de DNA se emplearon las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ng/2 μ L y el programa de amplificación propuesto por Cobb & Clarkson (1993).

- **Curva de MgCl₂**

La curva de MgCl₂ (Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc.,US) se llevó a cabo con concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM y el programa de amplificación propuesto por Cobb & Clarkson (1993).

Con base en la estandarización del RAPD-PCR se llevaron a cabo amplificaciones empleando DNA's de los 16 cultivos originales, 16 cultivos monospóricos seleccionados y 11 cepas de referencia, utilizando la siguiente amplificación estandarizada:

El RADP-PCR de todas las muestras referidas se llevó a cabo con las siguientes condiciones: en tubos para PCR de 250 μ L en un volumen final de reacción de 25 μ L. La mezcla de reacción contenía buffer (1X) de PCR (Applied Biosystems), 2.5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Applied Biosystems), 200 pmoles de cada oligonucleótido (QUIAGEN®), 10 ng de DNA para los aislados de MX, cultivos monospóricos y las cepas ARSEF 1914 (EH-526) y FI-147 (EH-532) y 1 ng de DNA para las cepas de referencia restantes, 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), ajustando el volumen con agua desionizada de grado Milli Q estéril.

La amplificación del DNA se hizo en un termociclador i Cycler™ (Bio Rad, Hercules, CA). El programa de amplificación que se utilizó fue el propuesto por Cobb & Clarkson (1993).

Después de la amplificación los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio en amortiguador TBE 0.5X. Se utilizó una escalera de DNA de 123 pb (Invitrogen). La imagen se capturó como se describió anteriormente.

f) Análisis de datos del RAPD-PCR

El tamaño de los fragmentos amplificados se obtuvo de la siguiente manera: A partir de la fotografía impresa de cada uno de los patrones polimórficos obtenidos, se determinó la movilidad relativa (Rf) de la escalera de 123 pb y de los fragmentos amplificados obtenidos con cada uno de los oligonucleótidos. La movilidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

Rf = Distancia en cm de la migración del fragmento amplificado

Distancia en cm del centro del pozo hasta la mitad de la primera banda de la escalera de 123 pb

Con estos datos se graficó el valor de Rf (abscisa) contra los pesos moleculares de la escalera de 123 pb (ordenada). A partir de esta curva calibrada se estimó el peso molecular de los fragmentos amplificados obtenidos. Esto se llevó a cabo para cada oligonucleótido.

Con los pesos moleculares de los fragmentos amplificados en el DNA genómico de los 16 aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*, 16 cultivos monospóricos y las 11 cepas de referencia se construyeron tres matrices de presencia (1) ausencia (0): la primera matriz incluyó los marcadores de los cultivos originales, la segunda, los marcadores de los cultivos monospóricos, y la tercera, los marcadores de los cultivos monospóricos y cepas de referencia. Se calculó el grado de similitud de las matrices obtenidas utilizando el índice de Jaccard (Real & Vargas, 1996) obteniendo una matriz de similitud genética pareada entre los aislados para cada una de las matrices. A partir de cada matriz se construyó un fenograma por medio del método de promedios aritméticos no ponderados

(UPGMA). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética (Sneath & Sokal, 1973) para determinar el grado de relación entre cada matriz del fenograma obtenido y la matriz de similitud original. Se estableció multidimensionalmente la relación de los cultivos monospóricos y cepas de referencia usando el análisis de componentes principales y árbol de tendido mínimo. Los análisis anteriores se llevaron a cabo utilizando el programa NTSYS-pc (Numerical taxonomy and multivariate análisis system) versión 2.0 (Rohlf, 1993). La confiabilidad estadística de cada fenograma obtenido fue evaluada por el remuestreo de la matriz de similitud mediante el método de "bootstrap" de Efron (1982). La matriz de similitud fue aleatorizada 5000 veces utilizando los programas Tree View versión 1.6.6 y Free Tree. Se estimó la diversidad genética de los cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia utilizando el índice de diversidad de Shannon: $S = -\sum p_i \log_2 p_i$ donde p_i = frecuencia del marcador, presente (1) o ausente (0) considerando a cada marcador como un loci (Lewontin, 1972).

VIII. RESULTADOS

1. Obtención de cultivos monospóricos

Se obtuvieron cultivos monospóricos de 16 aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*. El número de cultivos monospóricos varió de 7 a 11 entre los aislados. En la figura 5 se compara el cultivo original MaPL13 (EH-486) con el cultivo monospórico número 1 observando que las características macroscópicas de la colonia son similares.

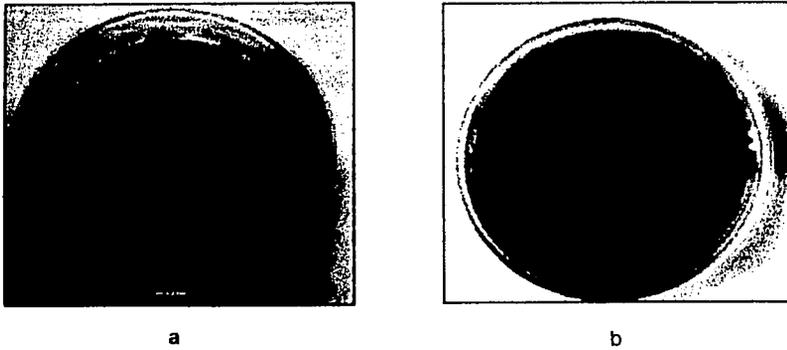


Figura 5. Comparación de un cultivo original de *M. anisopliae* var. *acidum* y un cultivo monospórico. a) Colonia del cultivo original MaPL13 (EH-486) y b) Cultivo monospórico obtenido de este aislado.

2. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos

a) Crecimiento radial

El tiempo promedio en el cual la colonia de los cultivos alcanzó la fase estacionaria de crecimiento fue entre los 15 y 18 días. La velocidad de crecimiento entre los cultivos originales y monospóricos estuvo en el rango de 2.8–4.9 mm/día. El análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre el crecimiento de los 16 cultivos originales y los monospóricos obtenidos. En el anexo 2 se muestran los resultados de la velocidad de crecimiento de cada cultivo original y los cultivos monospóricos obtenidos, así como el valor de P del análisis de varianza. En la figura 6 se muestra el comportamiento del crecimiento de los cultivos originales MaPL40 (EH-502) y MaPL32 (EH-531) y el de los cultivos monospóricos obtenidos.

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

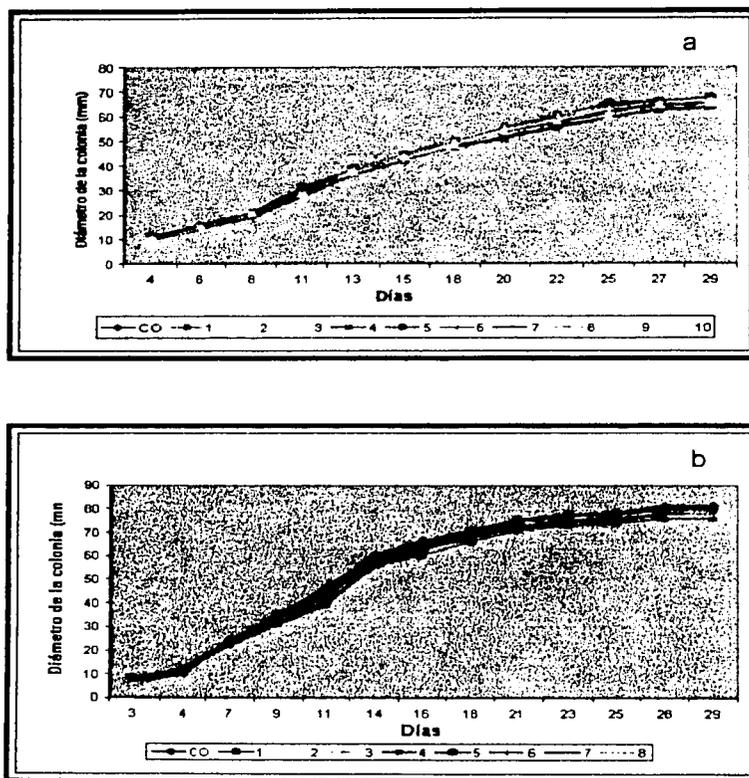


Figura 6. Comparación del crecimiento (mm diámetro de la colonia) del aislado MaPL40 (EH-502) cultivo original (CO) y de 10 cultivos monospóricos obtenidos (a) y del cultivo original MaPL32 (EH-531) y ocho cultivos monospóricos obtenidos (b).

b) Tamaño de los conidios

Se determinó el largo y ancho de los conidios en μm , de los cultivos originales y de los cultivos monospóricos obtenidos. El ancho de los conidios fue de $2.56 \mu\text{m}$ para todos los aislados, por lo que no fue sometido a un análisis de varianza, mientras que el largo de los conidios promedio osciló entre 5.0 y $6.5 \mu\text{m}$. Sin embargo, no existieron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre el tamaño de conidio del cultivo original y los cultivos monospóricos obtenidos (Anexo 2).

c) Esporulaci3n

La esporulaci3n expresada en conidios/mL, se llev3 a cabo a los 29 d3as de crecimiento tanto para los cultivos originales como para los cultivos monosp3ricos. La esporulaci3n obtenida entre los cultivos estuvo en el rango de 1.1 a 7.0 x 10⁸ conidios/mL. En esta caracter3stica fenot3pica el an3lisis de varianza indic3 que no existieron diferencias significativas ($P>0.01$) entre la esporulaci3n de los 16 cultivos originales y los monosp3ricos obtenidos. En el anexo 2 se muestran los valores de esporulaci3n de los cultivos monosp3ricos obtenidos de cada cultivo original.

d) Selecci3n de cultivos monosp3ricos

Debido a que el an3lisis de varianza indic3 que no existen diferencias significativas ($P>0.01$) entre los cultivos originales y los cultivos monosp3ricos, en las tres caracter3sticas fenot3picas analizadas, la esporulaci3n fue el factor determinante en la selecci3n del cultivo monosp3rico. Se seleccionaron aquellos que presentaron la m3s alta esporulaci3n.

En la tabla 6 se hace una comparaci3n entre el cultivo original y el cultivo monosp3rico seleccionado, con respecto a las tres caracter3sticas fenot3picas analizadas.

Tabla 6. Comparación entre el crecimiento, largo de conidios y esporulación del cultivo original y el cultivo monospórico seleccionado (MS) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

CULTIVO ORIGINAL	MS*	CRECIMIENTO 15-19 d (mm/día)	LARGO DE CONIDIOS 14 d μm	ESPORULACIÓN 29 d (conidios/mL)
EH-483		3.265	5.128	4.10×10^8
	8	3.258	5.128	6.20×10^8
EH-484		3.937	5.128	3.30×10^8
	6	3.864	5.128	5.20×10^8
EH-486		3.602	5.298	2.70×10^8
	7	3.628	5.123	4.20×10^8
EH-487		3.625	5.384	2.10×10^8
	4	3.676	5.128	3.00×10^8
EH-488		3.510	5.256	3.50×10^8
	7	3.742	5.213	4.40×10^8
EH-489		3.640	5.123	4.80×10^8
	1	3.757	5.213	5.80×10^8
EH-490		3.778	5.128	4.30×10^8
	1	3.579	5.123	4.90×10^8
EH-491		4.305	6.324	2.40×10^8
	8	4.327	6.068	2.90×10^8
EH-493		3.984	6.239	1.50×10^8
	1	3.848	5.897	2.70×10^8
EH-494		3.736	5.555	3.70×10^8
	4	3.747	5.298	7.00×10^8
EH-497		2.989	5.128	4.50×10^8
	7	3.179	5.128	6.80×10^8
EH-498		3.787	5.128	3.00×10^8
	8	3.8	5.128	6.90×10^8
EH-499		3.746	5.128	3.30×10^8
	10	3.543	5.17	3.10×10^8
EH-500		3.786	5.128	4.30×10^8
	2	3.602	5.128	6.30×10^8
EH-502		2.966	5.128	3.90×10^8
	8	2.944	5.128	4.10×10^8
EH-531		4.402	5.555	3.10×10^8
	8	4.508	5.726	6.40×10^8

MS* = Monospórico Seleccionado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Bioensayos de virulencia en langosta de los monospóricos seleccionados

Se determinó el TLM y TSM de los 16 cultivos monospóricos seleccionados de pase I correspondientes a los 16 cultivos originales de *M. anisopliae* var. *acidum*. Los bioensayos de virulencia se llevaron a cabo en insectos adultos en estadio solitario de *S. piceifrons piceifrons* colectados en campos agrícolas de los estados de Yucatán y San Luis Potosí. Los resultados obtenidos de TLM promedio (Tabla 7) permitieron clasificar arbitrariamente los 16 cultivos monospóricos en alta, media y baja virulencia con base al número de días en que matan el 50% de la población de insectos.

Se consideraron aislados de alta virulencia cuando el TLM fue menor a siete días; de media, cuando fue entre siete y diez días; y de baja cuando el TLM fue mayor de diez días. Los monospóricos de los aislados MaPL40 (EH-502), MaPL16 (EH-489) y MaPL18 (EH-490) fueron los más virulentos al necesitar 5 días para matar el 50% de los insectos. Los monospóricos de MaPL26 (EH-494) y MaPL31 (EH-498) presentaron un TLM medio de 7 y 8.14 días respectivamente. Mientras que los monospóricos de MaPL5 (EH-483) y MaPL15 (EH-488) fueron los menos virulentos hacia el insecto con un TLM de 10.7 y 12.1 días respectivamente. En la figura 7 se muestra el comportamiento de los valores del TLM en los 16 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* hacia la langosta.

Los resultados de TSM (Tabla 7) clasificaron los cultivos monospóricos con base al número de días en que sobrevive el 50% de la población de insectos. Los resultados fueron muy similares al TLM con excepción al monospórico del aislado MaPL31 (EH-498) quien mostro un TLM de 8.1 días y TSM de 5.3 días. En la figura 8 se muestra el comportamiento de los valores de TSM obtenido en los monospóricos analizados.

El análisis de varianza de los valores de TLM y TSM entre los 16 cultivos monospóricos mostraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el grado de virulencia hacia la langosta *S. piceifrons piceifrons*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.01$) entre los monospóricos de alta virulencia (MaPL40, MaPL16, MaPL18, MaPL32, MaPL8, MaPL29, MaPL20,

MaPL37 y MaPL14); media virulencia (MaPL26, MaPL22, MaPL38, MaPL31, MaPL13); y baja virulencia (MaPL5 y MaPL15).

El porcentaje de mortalidad acumulada, de insectos adultos infectados con cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum*, se muestra en la figura 9. Los aislados MaPL32 (EH-531) y MaPL16 (EH-489) presentaron el 100% de mortalidad a los ocho días de iniciado el bioensayo, mientras que los aislados MaPL5 (EH-483), MaPL13 (EH-486) y MaPL15 (EH-488) mataron el 100% de los insectos entre los 14 y 15 días.

Después de la muerte de los insectos por *M. anisopliae* var. *acidum* la coloración del insecto cambió de café a rojo y el crecimiento del hongo hacia el exterior fue generalmente en las extremidades. La esporulación inició en promedio al tercer día después de la muerte del insecto.

Tabla 7. Valores de tiempo letal medio (TLM) y tiempo de sobrevivencia medio (TSM) de los monospóricos seleccionados de los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* hacia la langosta *Schistocerca piceiformis piceifrons*.

AISLADO	TLM	TSM
EH-483 (MaPL5)*	10.75 (± 0.69)	9.34 (± 0.21)
EH-484 (MaPL8)**	6.59 (± 0.48)	5.96 (± 0.25)
EH-486 (MaPL13)*	9.53 (± 0.54)	9.2 (± 0.65)
EH-487 (MaPL14)**	6.98 (± 0.47)	6.31 (± 0.51)
EH-488 (MaPL15)*	12.18 (± 0.90)	10.38 (± 0.60)
EH-489 (MaPL16)**	5.7 (± 0.47)	5.28 (± 0.48)
EH-490 (MaPL18)**	5.75 (± 0.43)	5.28 (± 0.55)
EH-491 (MaPL20)**	6.75 (± 0.44)	6.21 (± 0.18)
EH-493 (MaPL22)**	7.12 (± 0.39)	6.35 (± 0.32)
EH-494 (MaPL26)**	7.06 (± 0.44)	6.18 (± 0.20)
EH-497 (MaPL29)*	6.71 (± 0.57)	7.27 (± 0.29)
EH-498 (MaPL31)**	8.14 (± 1.27)	5.31 (± 0.82)
EH-499 (MaPL37)*	6.87 (± 0.45)	6.52 (± 0.88)
EH-500 (MaPL38)*	7.64 (± 0.43)	7.95 (± 0.41)
EH-502 (MaPL40)*	5.57 (± 0.23)	4.98 (± 0.16)
EH-531 (MaPL32)*	6.23 (± 0.19)	6.26 (± 0.33)

*= Cultivos monospóricos aplicados en primer bioensayo (noviembre, 2001).

**= Cultivos monospóricos aplicados en segundo bioensayo (noviembre, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

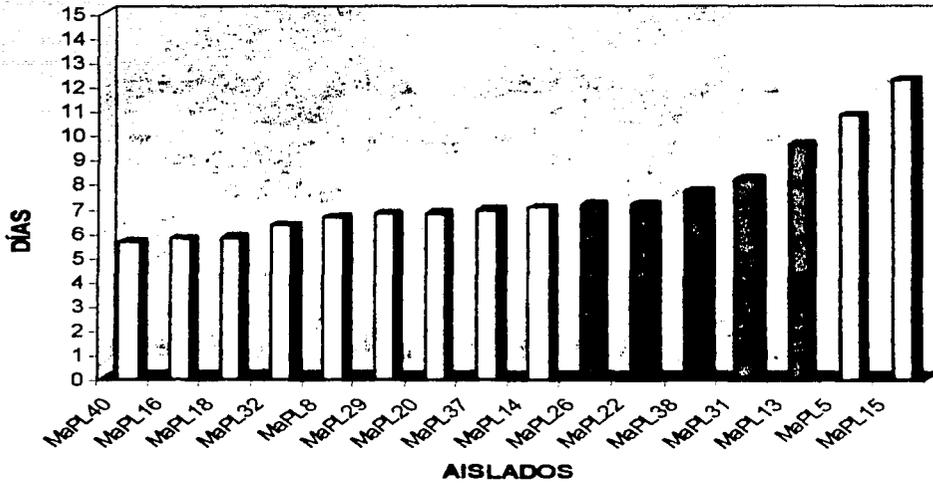


Figura 7. Tiempo letal medio (TLM) de los cultivos monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* var. *acridum* en insectos adultos de *S. piceifrons piceifrons*. Barras amarillas: virulencia alta; barras azules: virulencia media y barras moradas: virulencia baja.

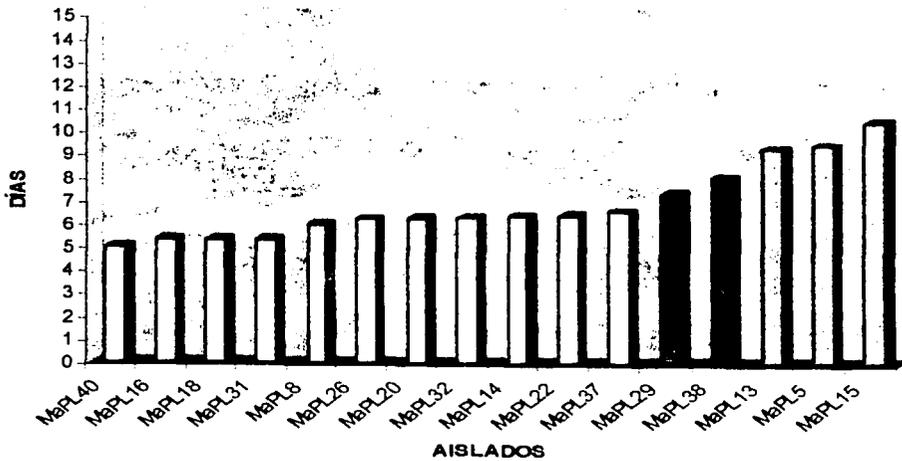


Figura 8. Tiempo de sobrevivencia medio (TSM) de los cultivos monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* var. *acridum* en insectos adultos de *S. piceifrons piceifrons*. Barras amarillas: virulencia alta; barras azules: virulencia media y barras moradas: virulencia baja.

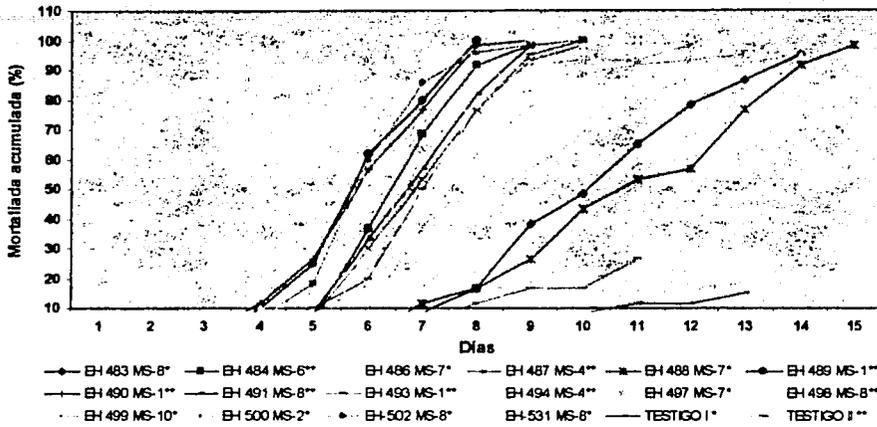


Figura 9. Porcentaje de mortalidad acumulada de insectos adultos de *S. piceifrons piceifrons* infectados con cultivos monospóricos de *M. anisopliae var. acridum*. * = Cultivos monospóricos aplicados en primer bioensayo (noviembre, 2001). ** = Cultivos monospóricos aplicados en segundo bioensayo (noviembre, 2002).

4. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos

a) Extracción de DNA genómico

El método de obtención de DNA planteado en el protocolo inicial fue modificado por el método que se describe en el apartado de materiales y métodos. Este método permitió obtener DNA genómico de 16 aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*, de 16 cultivos monospóricos seleccionados y de 11 cepas de referencia. Fue cuantificado con base en una comparación con diferentes concentraciones del DNA del fago lambda. En la figura 10 se muestra el análisis electroforético del DNA genómico obtenido de 15 cultivos originales (carriles 1-15) y 6 cultivos monospóricos seleccionados (carriles 16-21), de los cuales la concentración fluctuó entre 10 y 200 ng/ μ L. Cabe mencionar que la extracción del DNA de los cultivos monospóricos fue más sencilla que la de los originales, obteniendo un DNA de mejor calidad en comparación a los DNA's de los cultivos originales y cepas de referencia.

Fago λ

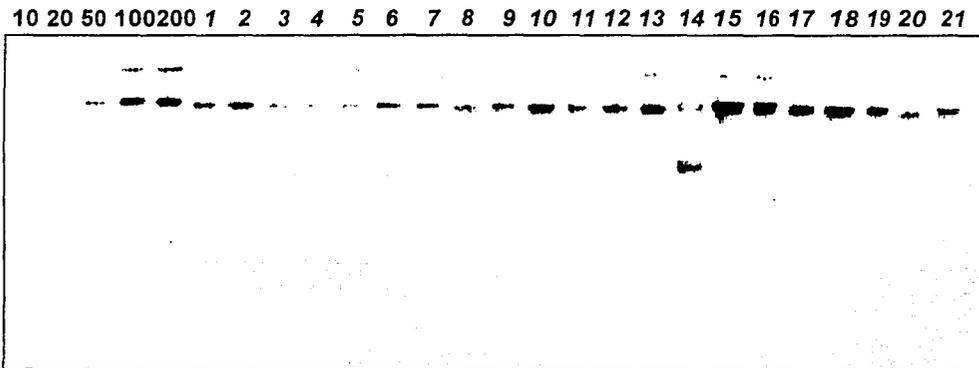


Figura 10. DNA genómico de cultivos originales y monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* var. *acidum*. Los carriles iniciales corresponden a concentraciones del fago lambda (10, 20, 50, 100 y 200 ng). Los carriles del 1 - 15 corresponden a DNA genómico de cultivos originales; del 16 - 21 a cultivos monospóricos. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 110 V durante 30 min, tinción con bromuro de etidio a 0.5 μ g/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución.

b) Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

El método de RAPD-PCR se estandarizó mediante curvas de concentración de oligonucleótido, DNA y $MgCl_2$. Se emplearon los programas de amplificación descritos por Cobb & Clarkson (1993) y Driver *et al.* (2000).

• Curva de oligonucleótido

Para la estandarización se emplearon los oligonucleótidos OPH-01 Y OPA-04 y DNA's correspondientes al aislado MaPL22 (EH-493) y una cepa de referencia 1914 (EH-526) del clado 10. La curva de oligonucleótidos se llevó a cabo con concentraciones de 50, 100 y 200 pmoles y el programa de amplificación de Driver *et al.* (2000). El resultado obtenido se muestra en la figura 11 observando que no existe amplificación con el oligonucleótido OPH-01, mientras que, con el OPA-04 ambos DNA's amplificaron a 50 pmoles. La curva se repitió empleando el programa de amplificación de Cobb & Clarkson (1993) y el resultado se muestra en la figura 12 observando una mejor amplificación y seleccionando la concentración de 200 pmoles de oligonucleótido. Se siguió empleando este programa de amplificación para la estandarización del método.

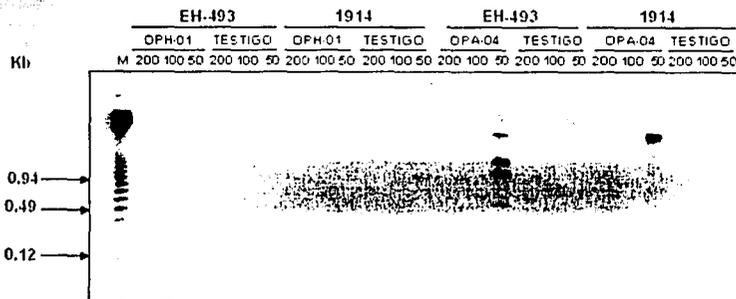


Figura 11. Curva de oligonucleótidos empleando el programa de amplificación de Driver *et al.* (2000). Se utilizaron los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04, el DNA genómico de EH-493 y 1914. M = escalera de DNA de 123 pb. Carriles con 200, 100 y 50 pmoles de oligonucleótido. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V durante 1 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución.

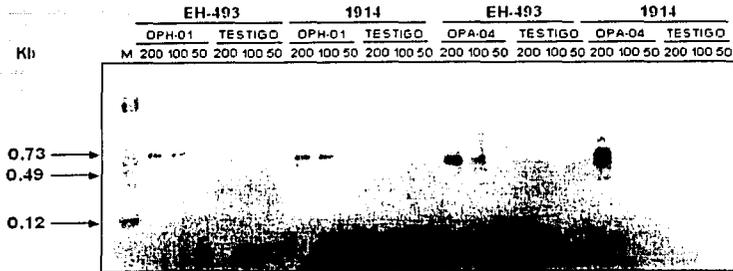


Figura 12. Curva de oligonucleótidos empleando el programa de amplificación de Cobb & Clarkson (1993). Se utilizaron los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04, el DNA genómico de EH-493 y 1914. M = escalera de DNA de 123 pb. Carriles con 200, 100 y 50 pmoles de oligonucleótido. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V durante 1 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La imagen fue invertida con el programa GenSnap™ de Syngene para una óptima resolución.

• Curva de DNA

Para la curva de DNA genómico se emplearon las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 $\text{ng}/2\mu\text{L}$ para los aislados y cultivos monospóricos de MX, y concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 50 $\text{ng}/2\mu\text{L}$ para las cepas de referencia. En la figura 13 se muestra el resultado del DNA con los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04 a 5, 10, 15, 20 $\text{ng}/2\mu\text{L}$ y DNA de los cultivos, monospóricos y la cepa de referencia: 1914 (EH-526) observando una buena amplificación a 10 ng de DNA con ambos oligonucleótidos. Sin embargo, para las nueve cepas de referencia restantes se empleó la concentración de 1 $\text{ng}/2\mu\text{L}$ de DNA genómico (Figura 14).

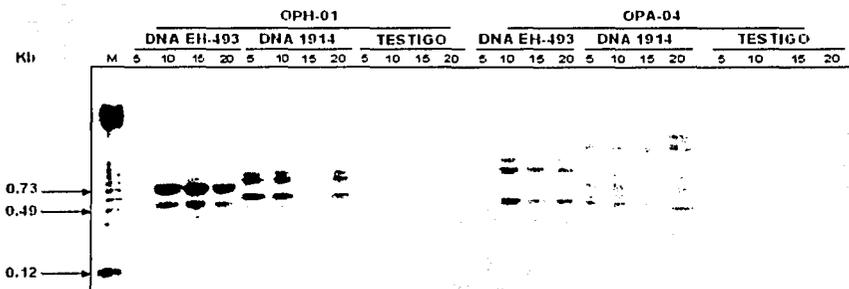


Figura 13. Curva de DNA genómico empleando los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04 y DNA de EH-493 y 1914. M = escalera de DNA de 123 pb. Carriles con 5, 10, 15, 20 $\text{ng}/2\mu\text{L}$ de DNA. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V durante 1 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución.

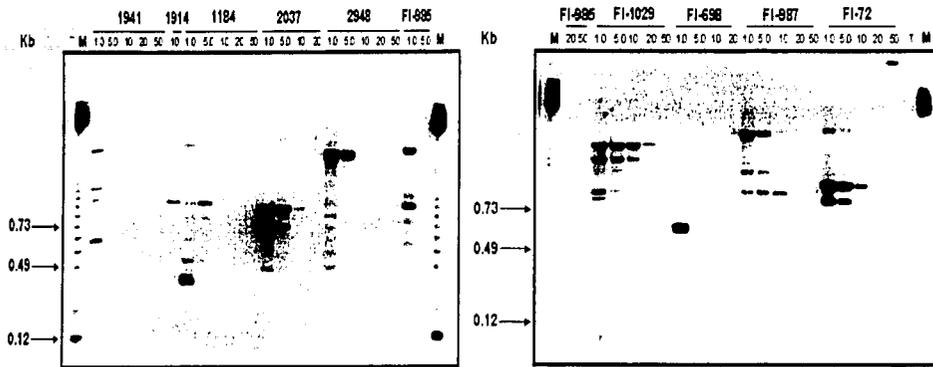


Figura 14. Curva de DNA genómico empleando el oligonucleótido OPA-04 y DNA de las cepas de referencia. M = escalera de DNA de 123 pb. Carriles con 1, 5, 10, 20 y 50 ng/2µL de DNA. T = testigo negativo. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V durante 1 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución.

• **Curva de MgCl₂**

La curva de MgCl₂ se llevó a cabo con concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM, y el resultado se observa en la figura 15 mostrando amplificación a las concentraciones de 1.5, 2.0 y 2.5 mM. Sin embargo, se eligió la concentración de 2.5 mM de MgCl₂ debido a que en el testigo negativo no se observa una amplificación inespecífica.

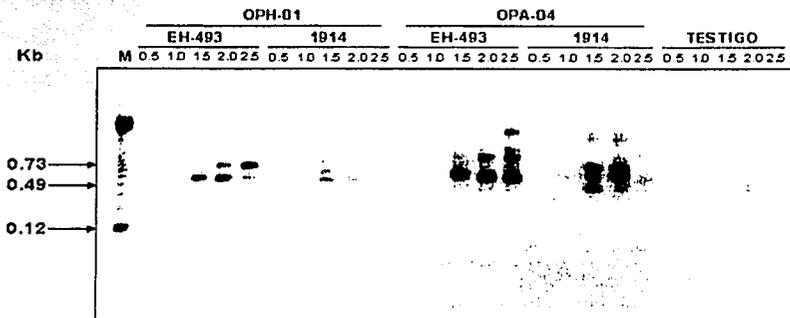


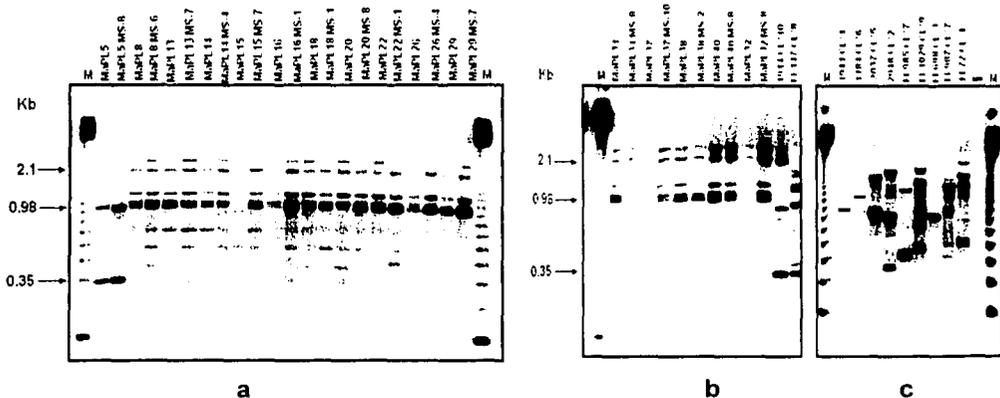
Figura 15. Curva de MgCl₂ empleando los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04 y DNA genómico de EH-493 y 1914. M = Escalera de DNA de 123 pb. Carriles con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM de MgCl₂. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V durante 1 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 mg/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con base en la estandarización del RAPD-PCR se llevaron a cabo amplificaciones empleando 14 oligonucleótidos con DNA's de los 16 cultivos originales, 16 cultivos monospóricos y 11 cepas de referencia.

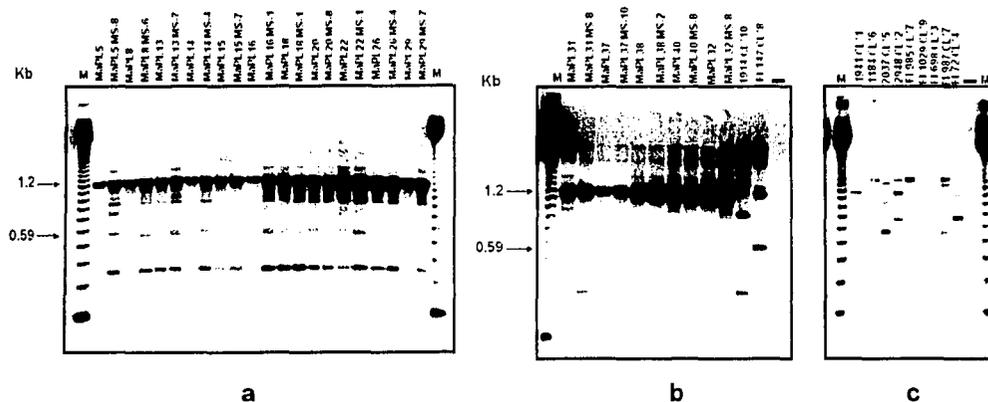
c) RAPD-PCR en las condiciones estandarizadas de los DNA's de los aislados y cepas estudiadas

Se obtuvieron 14 patrones polimórficos diferentes de DNA, entre los aislados de MX de *M. anisopliae* var. *acridum* y cultivos monospóricos al utilizar los 14 oligonucleótidos mencionados en Materiales y Métodos. El oligonucleótido OPA-09 presentó el mayor número de marcadores de RAPD-PCR (36 bandas) y OF-08 presentó el menor número de marcadores (17 bandas). En la figura 16 a y b se muestra el patrón polimórfico obtenido con OPA-08 donde se observan siete bandas bien definidas para los cultivos originales y monospóricos. En general, el patrón polimórfico fue similar entre los cultivos polisporicos y monospóricos (MS), con los oligonucleótidos ensayados, no obstante, los cultivos monospóricos presentaron una mejor amplificación y resolución que los cultivos originales como se observa con los oligonucleótido OPA-08 y OPA-05 en las figuras 16 y 17 a y b.



Figuras 16 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de *M. anisopliae* var. *acridum* y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género *Metarhizium* empleando el oligonucleótido OPA-08. M = escalera de DNA de 123 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 6 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución. CL* = número de clado al que corresponde la cepa. (-) = Testigo negativo de la reacción.

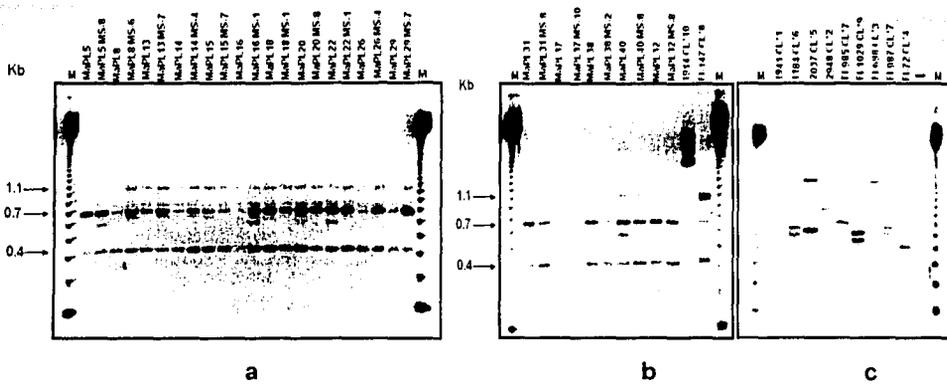
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



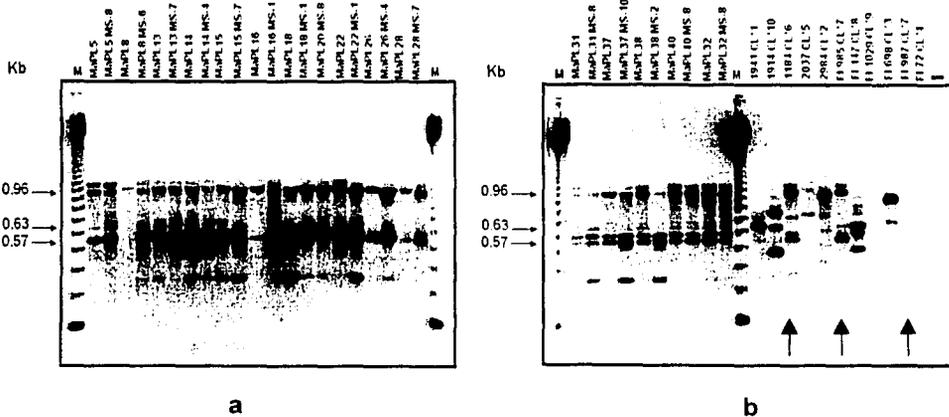
Figuras 17 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de *M. anisopliae* var. *acidum* y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género *Metarhizium* empleando el oligonucleótido OPA-05. M = escalera de DNA de 123 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 6 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución. CL* = número de clado al que corresponde la cepa. (-) = Testigo negativo de la reacción.

Las cepas de referencia de diferentes especies y variedades (10 clados CL1-CL10) del género *Metarhizium* mostraron un patrón polimórfico diferente entre ellas, así como, con los aislados de MX, utilizando los 14 oligonucleótidos (Figuras 16 b y c, 17 b y c, 18 b y c y 19 b). Sin embargo, las cepas FI-985 (EH-530) de Australia y FI-987 (EH-535) de Nigeria que corresponden al clado 7 de *M. anisopliae* var. *acidum* y la cepa 1184 (EH-527) de Francia del clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* comparten bandas con los aislados de MX con todos los oligonucleótidos analizados (Figura 19 b y 20 b) indicando que el patrón polimórfico de estas cepas muestran similitud con los aislados de MX.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

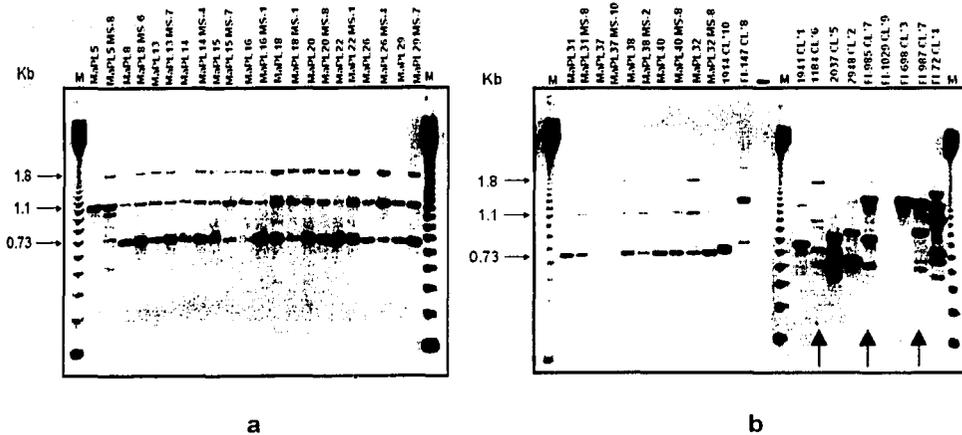


Figuras 18 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de *M. anisopliae* var. *acridum* y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género *Metarhizium* empleando el oligonucleótido OPH-02. M = escalera de DNA de 123 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 6 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución. CL* = número de clado al que corresponde la cepa. (-) = Testigo negativo de la reacción.



Figuras 19 a y b. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de *M. anisopliae* var. *acridum* y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género *Metarhizium* empleando el oligonucleótido OPA-04. M = escalera de DNA de 123 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 6 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución. CL* = número de clado al que corresponde la cepa. (-) = Testigo negativo de la reacción.

CON
FALLA DE ORIGEN



Figuras 20 a y b. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de *M. anisopliae* var. *acidum* y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez cladados (CL) del género *Metarhizium* empleando el oligonucleótido OPA-01. M = escala de DNA de 123 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 6 h, teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. La imagen fue invertida con el programa GenSnap de Syngene™ para una óptima resolución. CL* = número de clado al que corresponde la cepa. (-) = Testigo negativo de la reacción.

d) Comparación entre el polimorfismo genético generado entre los DNAs de los cultivos polisporicos y monospóricos obtenidos de aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*.

Los 14 oligonucleótidos amplificaron marcadores bien definidos y repetibles en el DNA genómico de los cultivos polisporicos, monospóricos y cepas de referencia. Estos marcadores fueron utilizados para construir dos matrices de presencia – ausencia; una matriz con los marcadores de los cultivos polisporicos, y otra con los cultivos monospóricos. Estas matrices fueron utilizadas para el análisis estadístico. Se obtuvieron 371 marcadores y a partir de los datos de cada una de las matrices se calculó la similitud utilizando el índice de Jaccard (Real & Vargas, 1996), obteniéndose dos fenogramas diferentes. Inicialmente, por un lado se agruparon los cultivos polisporicos, y por el otro, los monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum*, en dos fenogramas separados que se observan en la figura 21 a y b. Se mostró un mejor soporte de la agrupación en los cultivos monospóricos que en los cultivos polisporicos (originales), porque se observaron valores de "bootstrap" más altos, y las agrupaciones entre los monospóricos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Figura 21b) se observaron más cercanos entre ellos. En ambos fenogramas el coeficiente de correlación cofenética fue de 0.92 con una $P = 0.00004$. Esto indica que esta agrupación no es producto del azar si no es un evento biológico claro. En ambos árboles los aislados y cultivos monospóricos de MaPL5 (EH-483) y MaPL37 (EH-499) se separaron del resto de los aislados.

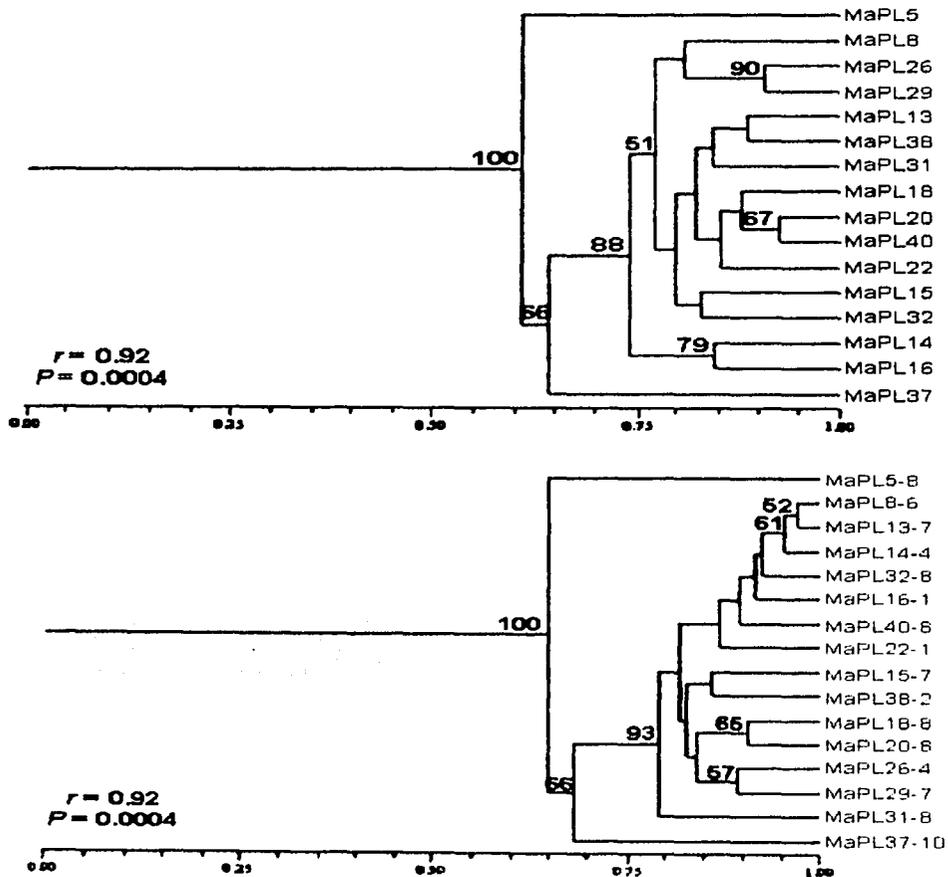


Figura 21. Fenogramas de similitud que muestran el resultado de los patrones de DNA de los cultivos polisporicos (originales) (a) y sus monospóricos (b) de los aislados de MX estudiados. El fenograma fue generado a partir de una matriz genética obtenida de la presencia - ausencia de 371 marcadores de RAPD-PCR, a partir de UPGMA. Los límites de confianza (valores del "bootstrap") fueron generados de 5000 aleatorizaciones del procedimiento de Efron (1982).

e) Clasificación de aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* de MX y cepas de referencia del género *Metarhizium*.

Debido a los resultados anteriores donde se observó la mejor agrupación de los aislados monospóricos, se llevó a cabo una matriz general donde se incluyeron los marcadores de los cultivos monospóricos y las cepas de referencia. Esta fue analizada estadísticamente como se mencionó en el inciso anterior. El fenograma obtenido mostró que los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* de MX formaron un grupo separado de los 10 clados taxonómicos reconocidos por Driver *et al.*, (2000) del género *Metarhizium* como se muestra en la figura 22. El valor de "bootstrap" indica un 100% de soporte entre los aislados monospóricos de MX. Este grupo de aislados de MX mantuvo una gran similitud con el clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* cepa 1184 (EH-527) de Francia con un soporte de 99% (valor del "bootstrap") y con el clado 7 que corresponde a *M. anisopliae* var. *acidum* cepas FI-985 (EH-530) de Australia y FI-987 (EH-535) de Nigeria con un soporte del 73%.

Las cepas de referencia restantes presentaron una menor similitud con los cultivos monospóricos de MX mostrando un valor de "bootstrap" de 57%. En el fenograma se observa la similitud que existe entre los clados 5, 3, 4 y 2 que corresponden a *M. flavoviride* con sus variedades *minus*, *novazealandicum*, *pemphigum* y Tipo E. Sin embargo, esta última variedad mostró un soporte de 82% con el clado 9 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* mantuvo una similitud alta con las cepas de *M. anisopliae* de las variedades *majus* (clado 10) y *lepidiotum* (clado 8). Estas dos últimas variedades de *M. anisopliae* mostraron un soporte del 95%. Por último la cepa 1941 (EH-525) de *M. album*, se separó totalmente de las demás cepas. La confiabilidad de la agrupación de estos aislados y cepas es indicada por el coeficiente de correlación cofenética al presentar un valor de $r = 0.99$ y $P = 0.0004$, demostrando que el fenograma generado no es producto del azar, sino un fenómeno biológico claro.

Estos resultados de asociación entre los cultivos monospóricos y cepas de referencia mostrados en el fenograma anterior (Figura 22) se reafirman con el análisis de componentes principales (ACP) y el árbol de tendido mínimo (ATM). El ACP indicó que los tres primeros componentes explicaron el 100% de la varianza acumulada entre los aislados de MX y cepas de referencia (Tabla 8) y se observó que los cultivos monospóricos de MX se agruparon independientemente con respecto a las otras cepas de referencia estudiadas (Figura 23). El ATM muestra la relación tridimensional entre los cultivos monospóricos de MX. Este grupo presentó entre ellos valores de distancia de 0.71 a 0.96 (Tabla 9), lo que demuestra su cercanía. También se observó su similitud directa con la cepa de referencia FI-985 de *M. anisopliae* var. *acridum* con una distancia de 0.22 (Figura 24). Asimismo, se advierte la similitud directa entre la cepa FI-987 de la variedad *acridum* con la cepa de referencia 1184 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* de Francia con una distancia de 0.29 (Tabla 9). En este análisis, la cepa de referencia FI-1029 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y la cepa 2948 de *M. flavoviride* Tipo E mostraron una distancia cercana como se observó en el fenograma (Figura 22). Los resultados obtenidos en estos análisis, indicaron una asociación entre los mismos cultivos monospóricos con su lugar geográfico, formando un grupo de *M. anisopliae* de MX.

Tabla 8. Componentes principales que explican las relaciones entre los cultivos monospóricos de MX y las cepas de referencia.

Número de Eigenvalue	Eigenvalue	%	% acumulado
1	5.28	30.64	30.64
2	1.24	7.19	37.84
3	1.06	6.15	44.00
4	0.99	5.74	49.75
5	0.93	5.44	55.19
6	0.93	5.40	60.60
7	0.88	5.16	65.76
8	0.83	4.87	70.63
9	0.77	4.48	75.39
10	0.73	4.28	79.39
11	0.69	4.03	83.43
12	0.64	3.72	87.15
13	0.41	2.42	89.58
14	0.36	2.10	91.68
15	0.27	1.26	93.25
16	0.23	1.36	94.61
17	0.18	1.05	95.67
18	0.15	0.92	96.59
19	0.15	0.87	97.47
20	0.10	0.59	98.06
21	0.93	0.54	98.60
22	0.84	0.48	99.09
23	0.05	0.32	99.42
24	0.052	0.30	99.72
25	0.030	0.17	99.90
26	0.016	0.09	>100%
27	0.000	0.00	>100%

Tabla 9. Valores de distancia que existen entre los cultivos monospóricos de MX y cepas de referencia.

Aislado/Cepa	Aislado/Cepa	Distancia
MaPL5-8	MaPL13-7	0.75
MaPL13-7	MaPL8-6	0.96
MaPL13-7	MaPL14-4	0.95
MaPL13-7	MaPL32-8	0.94
MaPL13-7	MaPL16-1	0.92
MaPL32-8	MaPL40-8	0.91
MaPL8-6	MaPL22-1	0.88
MaPL40-8	MaPL20-8	0.87
MaPL20-8	MaPL18-1	0.90
MaPL8-6	MaPL15-7	0.87
MaPL15-7	MaPL38-2	0.85
MaPL38-2	MaPL26-4	0.86
MaPL26-4	MaPL29-7	0.89
MaPL26-4	MaPL31-8	0.84
MaPL18-1	MaPL37-10	0.71
MaPL5-8	FI-985	0.22
FI-985	FI-987	0.34
FI-987	1184	0.29
1184	FI-1029	0.18
FI-1029	2948	0.22
2948	FI-698	0.15
2948	FI-72	0.13
FI-987	2037	0.11
FI-1029	FI-147	0.09
FI-147	1914	0.15
2948	1941	0.07

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

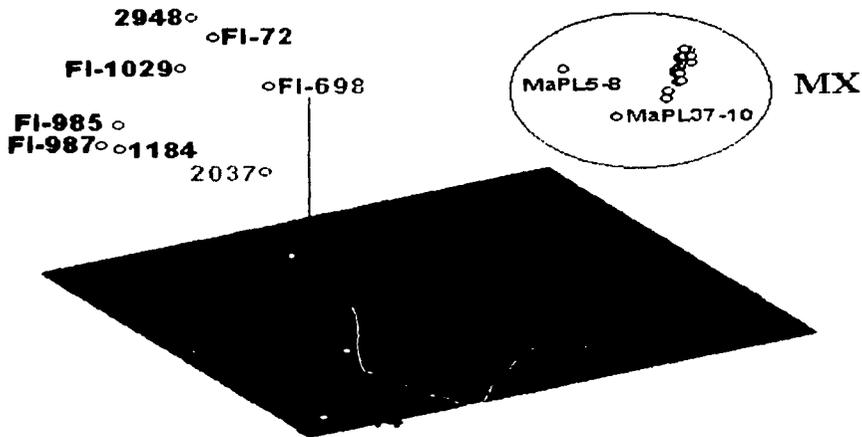


Figura 23. Análisis de componentes principales. Agrupa los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* de MX (círculo verde); cepas de referencia de *M. anisopliae* var. *acidum* (verde oscuro); *M. flavoviride* var. *flavoviride* (morado); seguido por los clados taxonómicos restantes del género *Metarhizium*.

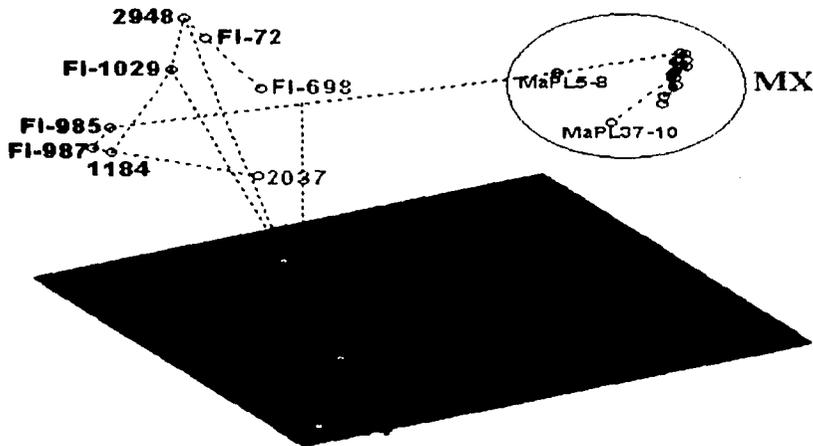


Figura 24. Árbol de tendido mínimo. Las líneas punteadas muestran la relación directa entre los aislados de MX (círculo verde) y cepas de referencia. Los números verdes muestran la relación directa entre los aislados de MX y las dos cepas de referencia de *M. anisopliae* var. *acidum* (verde) y la cepa de referencia de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (morado).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

f) Diversidad genética de los aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* de MX y cepas de referencia del género *Metarhizium*.

Se estimó la diversidad genética de los cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia utilizando el índice de Shannon (Lewontin, 1972). Los cultivos polispóricos y sus derivados monospóricos no presentaron diferencia genética entre estos dos grupos, porque el índice de Shannon mostró un valor igual de 0.25 para cada grupo. Mientras que el grupo formado por las cepas de referencia presentaron un valor de 0.31.

g) Relación entre polimorfismos del DNA y virulencia de los aislados estudiados.

De acuerdo con los resultados obtenidos del RAPD-PCR de los aislados de MX, no se pudo inferir ninguna relación con los resultados obtenidos de la virulencia en langosta de los aislados de MX.

IX. DISCUSIÓN

El control biológico de plagas agrícolas utilizando bioreguladores naturales para el control de poblaciones de insectos promete ser una herramienta eficaz para obtener alimentos sanos libres de componentes químicos (Headrick *et al.*, 2001; Quimby *et al.*, 2002).

Actualmente, países como África, Australia y Brasil emplean el control biológico para la regulación de la langosta y saltamontes utilizando el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* var. *acridum* (anteriormente *M. flavoviride*). En África, investigadores involucrados en el programa LUBILOSA obtuvieron el agente microbiano Green Muscle™ para el control de la langosta del desierto *S. gregaria*, y en Australia se desarrolló Green Guard™ por CSIRO, para el control de la langosta australiana *Chortoicetes terminifera* (Milner & Hunter, 2001; Milner, 2002). Lo interesante del desarrollo de ambos agentes fue que evaluaron aislados autóctonos de cada país, seleccionando el más adecuado al clima de la región, y el que exhibió la mayor virulencia hacia el insecto.

Para lograr que en MX se desarrolle un agente microbiano autóctono contra la langosta *S. piceifrons piceifrons* causante de grandes pérdidas económicas en el campo agrícola, se requiere de la búsqueda y selección de aislados fúngicos bien caracterizados altamente virulentos contra el insecto. Razón por la cual este trabajo se inició con la caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* de MX, reunidos en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997).

De acuerdo con Goettel & Inglis (1997) es necesario contar con poblaciones genéticamente homogéneas para tener un control de calidad estricto al producir un agente microbiano para su aplicación en el campo agrícola. Para iniciar este trabajo se obtuvieron cultivos monospóricos a partir del cultivo original del insecto para contar con este tipo de poblaciones. A pesar de que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los cultivos monospóricos obtenidos y el cultivo original así como entre los 16 aislados originales en cuanto a crecimiento, esporulación y tamaño de conidios, si se observó que fue más fácil la

obtención de DNA y purificación de estos cultivos, así como una mejor resolución en la amplificación de las bandas con el método de RAPD-PCR utilizado.

Conociendo la variación fenotípica que presentan los hongos mitosporicos, incluyendo *M. anisopliae* var. *acridum*, es fundamental contar con cultivos monospóricos de la cepa seleccionada para la producción masiva, ya que de esta forma se puede controlar el hongo en cuestión, al principio y al final de la línea de producción, así como después el monitoreo de cepas específicas en el campo agrícola.

Inicialmente la clasificación del género *Metarhizium* se llevaba a cabo, entre otros parámetros, por el tamaño de los conidios (Rombach *et al.*, 1986), reportando para *M. flavoviride* (actualmente *M. anisopliae* var. *acridum* de acuerdo al trabajo de Driver *et al.*, 2000) un tamaño de conidios entre (6.5) 7 - 9 (11) x 4.5 - 5.5 μm . Driver *et al.* (2000) en el trabajo sobre revisión taxonómica del género *Metarhizium*, encontró que el tamaño de los conidios para *M. anisopliae* var. *acridum* fue de 4.5 (± 0.41) x 2.6 (± 0.6) μm . No obstante, la cepa FI-985 de Australia tiene un mayor tamaño de conidios, 7.6 (± 0.78) x 2.9 (± 0.37) μm , aunque pertenezca a esta variedad. En nuestro trabajo, el tamaño de los conidios obtenido para los aislados de MX, osciló entre 5.0 - 6.5 x 2.5 μm , resultado que concuerda parcialmente con Driver *et al.* (2000). El tamaño de los conidios de los aislados de MX, también se podrían clasificar dentro del clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (6.2 x 2.5 μm), clado 3 de *M. flavoviride* var. *novazealandicum* (6.0 \pm 0.48 x 2.4 \pm 0.19 μm) o clado 4 de *M. flavoviride* var. *pemphigum* (5.4 \pm 0.47 x 2.4 \pm 0.43 μm) de la clasificación reciente de *Metarhizium* (Driver *et al.*, 2000). Rombach *et al.* (1986) plantea que la diferencia en el tamaño de conidios para *M. flavoviride* var. *flavoviride* podría deberse al hecho que las cepas provienen de hospederos y países diferentes.

Otra característica fenotípica evaluada fue la virulencia de los cultivos monospóricos seleccionados en la langosta *S. piceifrons piceifrons* en condiciones de invernadero. Las herramientas que se emplearon para evaluar el grado de virulencia de los aislados fue el tiempo letal medio (toma en cuenta el número de insectos que sobreviven durante el bioensayo) y tiempo de sobrevivencia medio

(toma en cuenta el número de insectos muertos durante el bioensayo) (Bateman *et al.*, 1996). Se emplearon estos parámetros para conocer el tiempo que requiere el hongo para matar al hospedero, debido a que la virulencia del hongo es un aspecto importante para poder seleccionar los aislados más virulentos y que pueden ser los adecuados para llegar a funcionar como agente microbiano. Otro procedimiento utilizado para evaluar la virulencia es la concentración letal media (CL_{50}) en la cual se determina la concentración de conidios que mata el 50% de los insectos en un tiempo determinado. Para esta prueba se necesita una cantidad de insectos muy grande, para poder probar cinco diferentes concentraciones de conidios de cada aislado para cada prueba. En virtud de que se estudiaron 16 aislados se optó por el TLM y TSM, ya que no se requiere de tantos insectos.

La variabilidad en la virulencia hacia la langosta encontrada entre los 16 aislados estudiados (5.8 a 12 días de TLM) (Cano *et al.*, 2002) apoyan la necesidad de estudiar siempre esta característica antes de seleccionar cualquier aislado como controlador de la plaga. Los datos obtenidos en los bioensayos de *S. piceifrons piceifrons* concuerdan con los resultados de Hernández-Velázquez *et al.* (1998, 2000) quienes encontraron que el aislado MaPL40 (EH-502) fue el más virulento (TLM de 5 días) hacia la langosta en condiciones de laboratorio y la mortalidad del 100% de los insectos ocurrió al séptimo día. En nuestro trabajo se encontró el 100% de mortalidad al día ocho con el aislado MaPL32 (EH-531); aislado que Hernández-Velázquez *et al.* (2000) también reporta con alta virulencia hacia la langosta de MX. Por otra parte, Milner (2002) evaluó la virulencia de la cepa FI-985 (ingrediente del agente microbiano Green Guard™) hacia la langosta australiana presentando valores de mortalidad de 4 - 5 días. Bateman (1997) también reporta que el tiempo de mortalidad media es de 5 días para la cepa del agente microbiano Green Muscle™ hacia la langosta y saltamontes de África. Los resultados de virulencia del hongo hacia la langosta en el campo agrícola son diferentes, debido a que las condiciones en el campo no se pueden controlar (Berlanga-Padilla & Hernández-Velázquez, 2002). Por otro lado, se comparó la virulencia (con base en CL_{50}) de dos aislados de *M. anisopliae* var. *acidum* (MaPL32 y MaPL40) de MX con la cepa FI-985 de Australia hacia la langosta *S.*

piceifrons piceifrons en condiciones de invernadero (Barrientos & Milner, 2001). Se emplearon tres concentraciones de 10^3 , 10^4 y 10^5 conidios por insecto. Se evaluaron 5 temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35°C) en el bioensayo. Los resultados indicaron que los aislados de MX fueron muy virulentos hacia el insecto a una temperatura de 35°C con la primera dosis, mientras que la cepa de Australia fue virulenta a esta temperatura pero con la tercera dosis, mostrando que se necesitaba una mayor cantidad de conidios para el mismo efecto. Esto indica la relevancia de la selección de aislados en cuanto a las condiciones climáticas de cada país, para lograr un control microbiano adecuado.

En la caracterización genotípica los aislados de MX se evaluaron con 14 oligonucleótidos arbitrarios propuestos en trabajos previos del género *Metarhizium* (Cobb & Clarkson, 1993; Driver *et al.*, 2000). En el estudio se incluyeron cepas de referencia de *Metarhizium* correspondientes a los 10 clados taxonómicos propuestos por Driver *et al.* (2000) para su comparación con los aislados de MX. Varios estudios indican que la técnica de RAPD-PCR es una herramienta útil para obtener una caracterización inicial de los aislados de hongos entomopatógenos correspondientes tanto del género *Metarhizium* (Cobb & Clarkson, 1993; Fegan *et al.*; 1993, Bidochka *et al.*, 1994; Leal *et al.*, 1994; Driver *et al.*, 2000), como para otros i.e., *Paecilomyces* (Tigano-Milani *et al.*, 1995; Cantone & Vandenberg, 1998; Obornik *et al.*, 2000) y *Beauveria* (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Castrillo *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, no se conoce ningún trabajo de caracterización genotípica donde se comparen los patrones polimórficos de DNA entre cultivos polisporicos y monospóricos de hongos entomopatógenos, a pesar de la relevancia de contar con poblaciones genéticamente homogéneas para estos estudios. En nuestro trabajo se observó que los patrones polimórficos de DNA genómico entre los 16 cultivos polisporicos y monospóricos seleccionados fueron similares, no encontrando ninguna variabilidad genotípica entre ellos ya que mostraron el mismo índice de Shannon (Lewontin, 1972). Sin embargo, los cultivos monospóricos obtenidos en este trabajo siempre presentaron una mejor

amplificación y resolución que los cultivos polisporicos, por lo cual se recomienda llevar a cabo estos estudios con monosporicos de las cepas en estudio.

En la presente investigación, los aislados de MX de *M. anisopliae* var. *acridum* formaron un grupo separado (con un valor de "bootstrap" de 100%) de las cepas de referencia, que corresponden a los 10 clados taxonómicos del género *Metarhizium* (Driver *et al.*, 2000). Los aislados de MX mostraron una similitud más estrecha con la cepa de *M. flavoviride* var. *flavoviride* (99%), mientras que con las cepas de la variedad *acridum* la similitud fue menor (73%). Este resultado también lo observó Driver *et al.* (2000) en su revisión taxonómica del género *Metarhizium* quien menciona textualmente que el RAPD-PCR confirma el alto grado de homogeneidad genética de los aislados de acrididos así como su cercana relación taxonómica con aislados de *M. flavoviride* var. *flavoviride*. Sin embargo, el árbol de tendido mínimo indica que los aislados tienen una gran similitud con la variedad *acridum*. El coeficiente de correlación cofenética obtenido indica la solidez y robustez de los datos obtenidos ($r= 0.99$, $P=0.0004$). Un estudio previo de los aislados MaPL40 (EH-502) y MaPL32 (EH-531) con base en las secuencias de DNA, indicaron corresponder a la variedad *acridum* ya que las secuencias eran similares con la cepa FI-985 de Australia, del clado 7 de la variedad *acridum* según Driver *et al.* (2000) (Barrientos *et al.*, 2001). Los trabajos anteriores a la revisión taxonómica del género *Metarhizium* de Driver *et al.* (2000) agrupa la cepa FI-985 de Australia (anteriormente *M. anisopliae*) como *M. flavoviride* con base en marcadores de RAPD-PCR (Cobb & Clarkson, 1993). Bidochka *et al.* (1994) agrupa la cepa FI-987 de Nigeria, Green Muscle™ (actualmente *M. anisopliae* var. *acridum*) dentro del grupo de *M. flavoviride* no sólo con marcadores de RAPD-PCR sino también con la hibridación de un fragmento obtenido por PCR de esta cepa, indicando que esta sonda es específica de *M. flavoviride*. Esta problemática de caracterización de los aislados de MX indica que se requiere secuenciar las regiones ITS o las regiones IGS como lo hicieron Pantou *et al.* (2003) para poder discernir con una mejor precisión la identificación de estos aislados.

En general, los patrones polimórficos de DNA de los aislados de MX mostraron un agrupamiento de todos los aislados. La relación entre el patrón

polimórfico del DNA y el origen geográfico, en el género *Metarhizium*, no ha sido encontrada por varios autores (Cobb & Clarkson, 1993; Bidochka *et al.*, 1994; Driver *et al.*, 2000). Sin embargo, Fegan *et al.* (1993) estudió 30 aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. anisopliae* var. *majus*, de diferentes habitats de un campo de caña de azúcar en Australia por medio de RAPD-PCR. Encontraron que los aislados se agruparon de acuerdo a su hábitat. Leal *et al.* (1994) caracterizaron por RAPD-PCR 20 aislados de *M. anisopliae*, de los cuales cada cinco aislados correspondieron a Australia, Brasil, Finlandia y Filipinas respectivamente. Los patrones polimórficos obtenidos fueron similares entre los aislados del mismo país y diferentes entre el resto de las regiones geográficas estudiadas. Los aislados se agruparon en cuatro grupos de acuerdo a su origen geográfico. Bidochka *et al.* (2001) analizaron la genética de poblaciones de 83 aislados de *M. anisopliae* de un área forestal y un área agrícola en Ontario, Canada, utilizando aloenzimas, RAPD y RFLP-PCR del gen de la proteasa *pr1*. Los dos grupos fueron asociados con los dos tipos de hábitat. Además, al llevar a cabo la genética de poblaciones de los aislados, menciona que aunque *M. anisopliae* es haploide y mitospórico, encontraron poblaciones recombinantes basado en el análisis de frecuencias alélicas de 10,000 poblaciones teóricas a partir de los 83 aislados de *M. anisopliae*. Ellos sugieren la existencia de diferentes procesos de intercambio genético, como la parasexualidad. Este fenómeno, en el género *Metarhizium*, fue reportado desde 1980 por Al-Aidroos (1980) y Messias & Azevedo (1980) en condiciones de laboratorio. En el género *Paecilomyces*, este proceso también se ha encontrado en ensayos de laboratorio (Riba y Ravelojoana, 1984).

Leal-Bertioli *et al.* (2000), infectaron simultáneamente al insecto *Phaedon cochleariae* (Coleoptera: Chrysomelidae) con dos cepas distintas de *M. anisopliae*. Al realslar las dos cepas del insecto encontraron diferencias en el DNA de cada una por electroforesis de esterasas, digestión total del DNA genómico utilizando enzimas de restricción y RAPD-PCR. Cuando infectaron al insecto independientemente con cada cepa no observaron recombinación del DNA. Estos autores mencionan que el intercambio genético observado al infectar el mismo insecto con las dos cepas simultáneamente, podría ser explicado por procesos de

diploidización, mutación, delección, translocación, flujo de elementos extranucleares (que frecuentemente están asociados con partículas semejantes a virus), transferencia de DNAs repetitivos como transposones y/o plásmidos de DNAs mitocondriales. Otra vía que podría explicar la variabilidad genética en organismos mitospóricos es la transferencia horizontal de genes descrita por Walton (2000). La transferencia horizontal de genes es el proceso por el cual la información genética de un organismo es incorporada dentro del genoma de otro organismo y este último puede o no ser de la misma especie. Este proceso ha sido muy importante en la evolución de procariontes y de hongos, y se presenta sobre todo en genes mitocondriales, pero también se ha observado en menor grado en genes nucleares (Walton, 2000). Bidochka *et al.* (1994) menciona que la clonalidad de *M. flavoviride* (actualmente *M. anisopliae* var. *acridum*) sugiere un origen común y quizás una historia evolutiva reciente en comparación a *M. anisopliae*.

Este tipo de estudios sobre caracterización genotípica de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga permite conocer la estabilidad genética del organismo, tener un mejor control de calidad en la línea de producción del agente microbiano que será aplicado en el campo, y en un futuro distinguir entre la(s) cepas aplicadas, de aquellas cepas de las poblaciones silvestres.

X. CONCLUSIONES

- Los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* de MX formaron un grupo aparte de los 10 clados del género *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000). El grupo mostró una relación estrecha tanto con el clado 7 de *M. anisopliae* var. *acridum* como con el clado 6 de *M. flavoviride* var. *flavoviride*.
- Los patrones polimórficos de DNA genómico entre los cultivos polisporicos y monospóricos fueron similares no encontrándose variabilidad genética. Los cultivos monospóricos presentaron una mejor obtención, purificación y amplificación del DNA.
- Los resultados de la virulencia entre los 16 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* hacia la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* en condiciones de invernadero permiten sugerir los aislados MaPL40 (EH-502), MaPL16 (EH-489) y MaPL32 (EH-531) como candidatos idóneos para la formulación de un agente microbiano.
- Los patrones polimórficos de DNA genómico no mostraron ninguna relación con la variabilidad de la virulencia encontrada en los diferentes cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

XI. LITERATURA CITADA

- **Abbott, W. S.** 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**:265-267.
- **Al-Aidroos, K.** 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can J Gen Cytol* **22**: 309-314.
- **Anónimo.** 1995. Potential markets for biological pest control in Mexico.
- **Barrientos, L. L.** 1990. La langosta centroamericana (*Schistocerca piceifrons* Walker, 1870) (Orthoptera: Acrididae) plaga mayor de la agricultura en el sureste de México. Impacto y Significancia. *Biotam* **2**(2):31-37.
- **Barrientos, L. L., O. A. Cabrera, F. A. Bonilla, y O. P. Martínez.** 1992. Manual Técnico sobre la langosta voladora (*S. piceifrons* Walker, 1870) y otros Acridicideos de Centro América y sureste de México. FAO, OIRSA. 200 p.
- **Barrientos, L. L., y R. J. Milner.** 2001. Uso actual y potencial de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para el control biológico de acridoideos en América Latina, p. 43 - 48. En: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Yucatán, Mer., Octubre 2-5.
- **Bateman, R. P., M. Carey, D. Moore, y C. Prior.** 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann Appl Biol* **122**:145-152.
- **Bateman, R., M. Carey, D. Batt, C. Prior, Y. Abraham, D. Moore, N. Jenkins, y J. Fenlon.** 1996. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biocontrol Sci Technol* **6**:549-560.
- **Bateman, R.** 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook Agric* **26** (1):13-18.
- **Berlanga-Padilla, A., y V. M. Hernández-Velázquez.** 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M.

- anisopliae* var. *acidum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. Manejo Integrado de Plagas 63:51-55.
- **Bidochka, M. J., M. A. McDonald, R. J. St Leger, y D. W. Roberts.** 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet* 25:107-113.
 - **Bidochka, M. J., A. M. Kamp, M. Levender, J. Dekoning, y J. N. Amritha de Croos.** 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species?. *Appl Environ Microbiol* 67: 1335-1342.
 - **Cano, R. C., G. K. García, V. M. Hernández, A. M. Berlanga, y C. Toriello.** 2002. Diferencia en la virulencia de cultivos monospóricos de aislados de México de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en la langosta *Schistocerca piceifrons*, p. 407. En: Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología. Guzmán, G., & G. Mata (eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México.
 - **Cantone, F., y J. Vandenberg.** 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res* 102:209-215.
 - **Castrillo, L. A., J. D. Vandenberg, y S.P. Wraight.** 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J Invert Pathol* 82:75-83.
 - **Cobb, B. D., y J. M. Clarkson.** 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 112:319-3.
 - **Domsch, K. H., y W. Gams.** 1993. Compendium of soil fungi. Traute – Heidi Anderson. Vol. I. p. 413.
 - **Douglas, G. L., G. M. Guke., L. M. Kawchuk, y M. S. Goettel.** 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol Control* 14:111-120.
 - **Driver, F., R. J. Milner, y J. W. H. Trueman.** 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* 104:134-150.

- **Efron, B.** 1982. The Jackknife, the Bootstrap and other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.
- **Fegan, M., M. Manners, D. J. Maclean, A. G. Irwin, y S. Z. Samuels.** 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J Gen Microbiol* **13**:2075-2081.
- **Freeman, T. E.** 1981. Use of conidial fungi in biological control. *Biol Conidial Fungi* **2**:143-165.
- **Goettel, M. S., D. L. Johnson, y S. D. Inglis.** 1995. The role of fungi in the control of grasshoppers. *Can J Bot* **73**:71-75.
- **Goettel, M. S., y S. D. Inglis.** 1997. Fungi: Hyphomycetes, p. 213- 248. In: L. A. Lacey (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London.
- **Harvey, A. W.** 1983. *Schistocerca piceifrons* (Walker) (Orthoptera: Acrididae), the swarming locust of tropical America: a review. *Bull Ent Res* **73**:171-184.
- **Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, y D. N. Pegler.** 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. International Mycological Institute, Cab International, Cambridge.
- **Headrick, D. H., y R. D. Goeden.** 2001. Biological control as a tool for ecosystem management. *Biol Control* **21**:249-257.
- **Hernández – Velázquez, V. M., A. M. Berlanga, y E. G. Garza.** 1997. Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia* **4**(9):45-46.
- **Hernández – Velázquez, V. M., y A. Berlanga - Padilla.** 1998. Efecto de dos temperaturas sobre la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* y *Bauveria bassiana* en adultos de "langosta" *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker, p. 239 –241. En: Memoria del XXXIII Congreso Nacional de Entomología. Acapulco, Gro., 24 al 27 mayo.
- **Hernández – Velázquez, V. M., A. M. Berlanga, y L. Barrientos.** 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium flavoviride* to control the

Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons*) (Orthoptera: Acrididae). *J Orthopt Res* 9:223-227.

- **Jenkins, N. E., y C. Prior.** 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol Res* 97:1489-1494.
- **Jenkins, N. E., y M. S. Goettel.** 1997. Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Mem Entomol Soc Can* 171:37-48.
- **Jenkins, N. E., G. Heviefó, J. Langewald, A. J. Cherry, y C. J. Lomer.** 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia of mitosporic fungi for use as mycopesticides. *Biocontrol Inf News Serv* 19:21N-31N.
- **Leal, S. C., D. J. Bertioli, T. M. Butt, y J. F. Peberdy.** 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycol Res* 98:1077-1081.
- **Leal-Bertioli, S., T. Q. Nutt, J. F. Peberdy, y D. J. Bertioli.** 2000. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co-infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. *Mycol Res* 104:409-414.
- **Lewontin, R. C.** 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biol* 6:381-398.
- **Lomer, C. J., R. P. Bateman, D. L. Johnson, J. Langewald, y M. Thomas.** 2001. Biological Control of Locusts and Grasshoppers. *Ann Rev Entomol* 46:667-702.
- **Matthew, B. T., y N. E. Jenkins.** 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegates*. *Mycol Res* 101:1469-1447.
- **Messias, C. L., y J. L. Azevedo.** 1980. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Trans Brit Mycol Soc* 75:473- 477.
- **Milner, R. J., y D. M. Hunter.** 2001. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *J Orthopt Res* 10:271-276.
- **Milner, R.** 2002. Green Guard. *Biopesticides*. 20-24 p.

- **Moore, D., M. Reed, G. Le Patourel, Y. J. Abraham, y C. Prior.** 1992. Reduction of feeding by the desert locust *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. *J Invertebr Pathol* **60**:304-307.
- **Moore, D., P. D. Bridge, P. M. Higgins, R. P. Bateman, y C. Prior.** 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Ann Appl Biol* **122**:605-616.
- **Moore, D., y C. Prior.** 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News Inform* **145**:31N-40N.
- **Obornik, M., M. Klic, y L. Zizka.** 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Can J Bot* **78**:1150-1155.
- **Pantou, M. P., A. Mavridou, y M. A. Typas.** 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fung Genet Biol* **38**:159-174.
- **Parker, J. R., y R.V. Connin.** 1967. Langostas sus hábitos y perjuicios. Centro Regional de ayuda Técnica. Agencia para el desarrollo internacional (A:I:D). México. 3 – 30 p.
- **Poot, P. M. A.** 2000. Validación de un hongo patógeno a la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Walker 1870)(ORTHOPTERA: ACRIDIDAE) bajo condiciones de campo en el estado de Campeche, México. Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma Chapingo, México. 79 p.
- **Prior, D., C. J. Lomer, H. Herren, A. Paraiso, C. Kooyman, y J. J. Smith.** 1992. The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locust and grasshoppers, p. 8 - 18. In Lomer, C. J., C. Prior (eds.), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wallingford, Inglaterra.
- **Quimby, P. C., L. R. King, y W. E. Grey.** 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agric Ecosyst Environ* **88**:147-152.

- **Rakotonirainy, M. S., M. L. Cariou, Y. Brygoo, y G. Riba.** 1994. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isoenzyme comparison. *Mycol Res* **98**:225-230.
- **Real, R., y J. M. Vargas.** 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Syst Biol* **45**:380-385.
- **Rholf, F.** 1993. NTSYS-pc v 2.0. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Applied Biostatistics. Setuket, New York.
- **Riba, G., A. M. Ravelojoana.** 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown and Smith. *Can J Microbiol* **30**:929-926.
- **Rombach, M. C., R. A. Humber, y D. W. Roberts.** 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. *Mycotaxon* **27**:87-92.
- **Rombach, M. C., R. A. Humber, y H. C. Evans.** 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers. *Trans Brit Mycol Soc* **88**:451-459.
- **Roberts, D. W.** 1989. World picture of biological control of insects by fungi. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **84**: 89-100.
- **SAGAR.** 2000. Manejo integrado de langosta y chapulín. Sagar, México D.F.
- **SAGARPA.** 2001. Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. 2-5 Octubre, Yucatán, Mer. México.
- **Samson, R. A., H. C. Evans, y J. P. Latgé.** 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, The Netherlands.
- **Showler, A. T., y C. S. Potter.** 1991. Synopsis of the 1986-1989 desert locust (Orthoptera: Acrididae) plague and the concept of strategic control. *Am Entomol* **37**:109-110.
- **Showler, A. T.** 1995. Locust (Orthoptera: Acrididae) outbreak in Africa and Asia 1992-1994: an overview. *Am Entomol* **41**:179-184.
- **Sneath, P. H. A., y R. R. Sokal.** 1973. Taxonomic Structure, p. 188- 305. In: W. H. Freeman (ed.), Numerical taxonomy, San Francisco.

- **Steedman, A.** 1990. Locust Handbook. Natural Resources Institute, Overseas Development Administration.
- **St Leger, R. L.** 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can J Bot* **73** (Suppl. 1):S1119-S1125.
- **Tigano – Milani, M., R. Honeycutt, L. Lacey, R. Assis, M. McClelland, B. Sobral.** 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J Invertebr Pathol* **65**:274-282.
- **Tulloch, M.** 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans Brit Mycol Soc* **66**:407-411.
- **Walton, J. D.** 2000. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fung Genet Biol* **30**:167-171.
- **Wang, C., D. Ding, S. Wang, Z. Li.** 2000. Genetic analysis on cross incubation of *Beauveria bassiana*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **40**:545-550.
- **Wang, C. S., Z. Z. Li, T. M. Butt.** 2002. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* **80**:29-34.

XII. ANEXOS

Anexo I. Medios de cultivo utilizados

Medio y componentes Individuales	Concentración (g/L)	pH final
Agar de Papa Dextrosa (APD)		5.6
Infusión de Papa *	300.0	
Dextrosa (Droguería Cosmopolita)	20.0	
Agar (Bioxón)	15.0	
* Se prepara hirviendo 300 gr de papa blanca en 300 mL de agua destilada hasta su cocción y se filtra en varias capas de gaza. El medio se esterilizó 15 min a 121°C.		
Medio Líquido Sabouraud adicionado con 10% de extracto de levadura		6.7
Peptona de caseína (Bioxón)	10.0	
Dextrosa (Droguería Cosmopolita)	40.0	
Extracto de levadura (Droguería Cosmopolita)	10.0	
El medio se esterilizó 15 min a 121°C.		

ENCLOSURE WITH
FALLA DE ORIGEN

Anexo 2. Resultados de la velocidad de crecimiento, tamaño de los conidios y esporulación de los aislados originales y sus monospóricos.

AISLADO EH-483	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.265	5.128	4.10E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.284	5.128	3.00E+08	
2	3.314	5.085	3.70E+08	
3	3.272	5.128	3.30E+08	
4	3.303	5.128	3.50E+08	
5	3.105	5.128	3.50E+08	
6	3.104	5.128	4.90E+08	
7	3.24	5.213	5.20E+08	
8	3.258	5.128	6.20E+08	8
PROMEDIO	3.235	5.13	4.10E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.661$	No $P = 0.417$	No $P = 0.065$	

AISLADO EH-484	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.937	5.128	3.30E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	4.034	5.128	2.90E+08	
2	4.036	5.128	3.10E+08	
3	3.921	5.128	3.40E+08	
4	3.486	5.128	3.70E+08	
5	3.598	5.128	4.00E+08	
6	3.864	5.128	5.20E+08	6
7	4.074	5.128	2.40E+08	
PROMEDIO	3.859	5.128	3.53E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.500$	No $P = 0.461$	No $P = 0.340$	

AISLADO EH-486	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.602	5.298	2.70E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.49	5.64	3.20E+08	
2	3.323	5.427	3.70E+08	
3	3.681	5.341	3.30E+08	
4	3.523	5.128	2.80E+08	
5	3.565	5.512	3.50E+08	
6	3.638	5.213	3.80E+08	
7	3.628	5.213	4.20E+08	7
8	3.55	5.128	4.10E+08	
9	3.654	5.213	3.90E+08	
10	3.63	5.213	2.60E+08	
PROMEDIO	3.5682	5.3028	3.51E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.691$	No $P = 0.537$	No $P = 0.633$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLADO EH-487	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.625	5.384	2.10E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.726	5.213	1.40E+08	
2	3.782	5.128	1.80E+08	
3	3.758	5.384	2.00E+08	
4	3.676	5.128	3.00E+08	4
5	3.707	5.128	2.50E+08	
6	3.667	5.298	1.10E+08	
7	3.691	5.213	3.00E+08	
8	3.742	5.213	2.90E+08	
PROMEDIO	3.718	5.213	2.21E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.550$	No $P = 0.455$	No $P = 0.665$	

AISLADO EH-488	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.51	5.256	3.50E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.564	5.17	2.10E+08	
2	3.596	5.128	3.20E+08	
3	3.641	5.298	2.90E+08	
4	3.778	5.213	2.50E+08	
5	3.551	5.213	1.40E+08	
6	3.838	5.298	3.40E+08	
7	3.742	5.213	4.40E+08	7
8	3.727	5.128	4.10E+08	
9	3.797	5.128	3.70E+08	
10	3.706	5.128	3.30E+08	
PROMEDIO	3.694	5.1917	3.10E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.654$	No $P = 0.495$	No $P = 0.599$	

AISLADO EH-489	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.64	5.213	4.80E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.757	5.213	5.80E+08	1
2	3.757	5.128	4.70E+08	
3	3.681	5.298	4.70E+08	
4	3.59	5.128	2.90E+08	
5	3.621	5.213	3.20E+08	
6	3.706	5.341	3.60E+08	
7	3.131	5.298	3.40E+08	
8	3.63	5.128	2.40E+08	
9	3.726	5.213	2.30E+08	
PROMEDIO	3.622	5.217	3.67E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.675$	No $P = 0.624$	No $P = 0.978$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLADO EH-490	VELOCIDAD 15-18 d mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.778	5.128	4.30E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.579	5.213	4.90E+08	1
2	3.833	5.213	3.40E+08	
3	3.487	5.128	2.70E+08	
4	3.629	5.213	2.00E+08	
5	3.667	5.128	2.50E+08	
6	3.753	5.298	3.90E+08	
7	3.679	5.213	2.80E+08	
8	3.7481	5.298	2.60E+08	
9	3.808	5.298	2.30E+08	
PROMEDIO	3.687	5.222	3.01E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No P = 0.610	No P = 0.402	No P = 0.931	

AISLADO EH-491	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	4.305	6.324	2.40E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	4.351	6.128	1.60E+08	
2	4.396	6.495	2.00E+08	
3	4.231	5.469	1.30E+08	
4	4.305	5.298	1.30E+08	
5	4.418	5.982	2.20E+08	
6	4.189	5.384	2.30E+08	
7	4.462	5.298	1.80E+08	
8	4.327	6.068	2.90E+08	8
9	4.453	5.811	2.00E+08	
PROMEDIO	4.348	5.77	1.93E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No P = 0.510	No P = 0.589	No P = 0.832	

AISLADO EH-493	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.984	6.239	1.50E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.848	5.897	2.70E+08	1
2	4	5.811	1.90E+08	
3	4.014	5.726	1.30E+08	
4	3.944	5.469	1.50E+08	
5	3.98	5.64	1.40E+08	
6	3.904	5.469	2.10E+08	
7	3.981	5.384	1.90E+08	
8	4.015	5.555	1.70E+08	
9	3.872	5.555	1.40E+08	
PROMEDIO	3.95	5.611	1.77E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No P = 0.586	No P = 0.596	No P = 0.918	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLADO EH-494	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.736	5.555	3.70E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.716	5.64	3.90E+08	
2	3.686	5.384	4.30E+08	
3	3.767	5.384	5.80E+08	
4	3.747	5.298	7.00E+08	4
5	3.707	5.128	3.80E+08	
6	3.702	5.213	4.70E+08	
7	3.555	5.555	5.10E+08	
8	3.651	5.298	3.30E+08	
9	3.58	5.213	4.30E+08	
PROMEDIO	3.679	5.345	4.69E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.662$	No $P = 0.510$	No $P = 0.498$	

AISLADO EH-497	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	2.989	5.128	4.50E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	2.994	5.128	4.90E+08	
2	2.954	5.128	4.30E+08	
3	2.889	5.128	4.80E+08	
4	3.242	5.128	4.80E+08	
5	3.133	5.128	5.40E+08	
6	3.1	5.128	5.60E+08	
7	3.179	5.128	6.80E+08	7
8	3.012	5.128	5.90E+08	
9	3.272	5.128	4.80E+08	
PROMEDIO	3.086	5.128	5.26E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.694$	No $P = 0.442$	No $P = 0.151$	

AISLADO EH-498	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.787	5.128	3.00E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.75	5.128	3.80E+08	
2	3.768	5.128	3.20E+08	
3	3.777	5.128	3.80E+08	
4	3.666	5.128	5.30E+08	
5	3.754	5.128	4.90E+08	
6	3.828	5.128	5.70E+08	
7	3.727	5.128	5.30E+08	
8	3.8	5.128	6.90E+08	
9	3.805	5.128	5.10E+08	8
PROMEDIO	3.763	5.128	4.89E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.609$	No $P = 0.442$	No $P = 0.027$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLADO EH-499	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.746	5.128	3.30E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.801	5.427	2.20E+08	
2	3.943	5.128	1.50E+08	
3	3.913	5.128	2.50E+08	
4	3.802	5.17	1.50E+08	
5	3.901	5.128	1.90E+08	
6	3.919	5.213	1.40E+08	
7	4.018	5.128	2.10E+08	
8	3.877	5.128	1.50E+08	
9	3.728	5.213	1.60E+08	
10	3.543	5.17	3.10E+08	10
PROMEDIO	3.8445	5.1833	1.93E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.691$	No $P = 0.490$	No $P = 0.922$	

AISLADO EH-500	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	3.786	5.128	4.30E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.588	5.128	4.80E+08	
2	3.602	5.128	6.30E+08	2
3	3.624	5.128	4.20E+08	
4	3.573	5.128	5.20E+08	
5	3.444	5.128	5.10E+08	
6	3.657	5.128	3.30E+08	
7	3.675	5.128	3.50E+08	
8	3.474	5.128	3.80E+08	
9	3.495	5.128	4.00E+08	
10	3.74	5.128	3.70E+08	
11	3.624	5.128	3.50E+08	
PROMEDIO	3.59	5.128	4.31E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.772$	No $P = 0.535$	No $P = 0.892$	

AISLADO EH-502	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	2.966	5.128	3.90E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	2.995	5.128	3.90E+08	
2	3.039	5.128	3.70E+08	
3	2.971	5.128	4.10E+08	
4	2.866	5.128	3.30E+08	
5	2.778	5.128	2.80E+08	
6	2.95	5.128	3.90E+08	
7	2.928	5.128	2.90E+08	
8	2.944	5.128	4.10E+08	8
9	2.889	5.128	2.90E+08	
10	3.106	5.128	3.60E+08	
PROMEDIO	2.9466	5.128	3.52E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.807$	No $P = 0.482$	No $P = 0.800$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLADO EH-531	VELOCIDAD 15-18 d Mm/día	CONIDIOS** 14 d µm largo	ESPORULACIÓN 29 d Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	4.402	5.555	3.10E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	3.953	5.897	3.30E+08	
2	4.741	5.469	4.90E+08	
3	4.26	5.469	4.10E+08	
4	4.903	5.811	4.00E+08	
5	4.175	5.469	3.70E+08	
6	4.221	5.555	6.10E+08	
7	4.175	5.469	5.50E+08	
8	4.508	5.726	6.40E+08	8
PROMEDIO	4.367	5.608	4.75E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.461$	No $P = 0.473$	No $P = 0.020$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

XIII. ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación del género <i>Metarhizium</i> basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular	4
2. Hospedero, cultivo y origen de los aislados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> en estudio	18
3. Características de las cepas tipo de referencia del género <i>Metarhizium</i> de acuerdo a Driver <i>et al.</i> (2000)	19
4. Oligonucleótidos arbitrarios que se utilizaron en la técnica RAPD-PCR	27
5. Programas de amplificación utilizados en la técnica de RAPD-PCR	27
6. Comparación entre el crecimiento, largo de conidios y esporulación del cultivo original y el cultivo monospórico seleccionado (MS) de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	34
7. Valores de tiempo letal medio (TLM) y tiempo de sobrevivencia medio (TSM) de los monospóricos seleccionados de los aislados de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> hacia la langosta <i>Schistocerca piceifrons piceifrons</i>	36
8. Componentes principales que explican las relaciones entre los cultivos monospóricos de MX y las cepas de referencia	51
9. Valores de distancia que existen entre los cultivos monospóricos de MX y cepas de referencia	51

XIV. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Morfología del hongo <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	5
2. Diagrama que muestra el proceso de infección del hongo a través de la cutícula del insecto y las barreras del hospedero al patógeno	6
3. Distribución de la langosta en México y zonas gregarígenas de la langosta	8
4. Proceso de obtención de un cultivo monospórico	20
5. Comparación de un cultivo original de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y un cultivo monospórico	31
6. Comparación del crecimiento (mm diámetro de la colonia) del aislado MaPL40 (EH-502) cultivo original (CO) y de 10 cultivos monospóricos obtenidos (a) y del cultivo original MaPL32 (EH-531) y ocho cultivos monospóricos obtenidos (b)	32
7. Tiempo letal medio (TLM) de los cultivos monospóricos seleccionados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en insectos adultos de <i>S. piceifrons piceifrons</i>	37
8. Tiempo de sobrevivencia medio (TSM) de los cultivos monospóricos seleccionados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en insectos adultos de <i>S. piceifrons piceifrons</i>	37
9. Porcentaje de mortalidad acumulada de insectos adultos de <i>S. piceifrons piceifrons</i> infectados con cultivos monospóricos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	38
10. DNA genómico de cultivos originales y monospóricos seleccionados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	39
11. Curva de oligonucleótidos empleando el programa de amplificación de Driver <i>et al.</i> (2000)	40
12. Curva de oligonucleótidos empleando el programa de amplificación de Cobb & Clarkson (1993)	41
13. Curva de DNA genómico empleando los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04 y DNA de MaPL22 (EH-493) y 1914	41
14. Curva de DNA genómico empleando el oligonucleótido OPA-04 y DNA de nueve cepas de referencia	42

15. Curva de MgCl ₂ empleando los oligonucleótidos OPH-01 y OPA-04 y DNA genómico de MaPL22 (EH-493) y 1914	42
16 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género <i>Metarhizium</i> empleando el oligonucleótido OPA-08	43
17 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género <i>Metarhizium</i> empleando el oligonucleótido OPA-05	44
18 a, b y c. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género <i>Metarhizium</i> empleando el oligonucleótido OPH-02	45
19 a y b. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género <i>Metarhizium</i> empleando el oligonucleótido OPA-04	45
20 a y b. Patrón polimórfico de 16 aislados y sus monospóricos seleccionados (MS) de MX de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> y de 11 cepas de referencia provenientes de los diez clados (CL) del género <i>Metarhizium</i> empleando el oligonucleótido OPA-01	46
21. Fenogramas que muestran el resultado de los patrones de DNA de los cultivos polispóricos (originales) (a) y sus monospóricos (b) de los aislados de MX estudiados	47
22. Fenograma que muestra las relaciones entre los cultivos monospóricos de MX y cepas de referencia del género <i>Metarhizium</i>	49
23. Análisis de componentes principales	52
24. Árbol de tendido mínimo	52

XV. ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios de cultivo utilizados	69
ANEXO 2. Resultados de la velocidad de crecimiento, tamaño de los conidios y esporulación de los aislados originales y sus monospóricos	70