

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

89

FACULTAD DE CIENCIAS

Propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae*
de langosta (Orthoptera: Acrididae) en México,
en diferentes medios y condiciones de cultivo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A:
MARÍA PATRICIA JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

DIRECCIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CONCEPCION TORIELLO NÁJERA



MÉXICO, D.F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR

Noviembre 2003

^



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: María Patricia Jiménez Gutiérrez

FECHA: 03/ Noviembre/ 2003

FIRMA: [Firma]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* de langosta (Orthoptera: Acrididae) en México, en diferentes medios y condiciones de cultivo"

realizado por **María Patricia Jiménez Gutiérrez**

con número de cuenta 9557612-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Concepción Toriello Nájera

Propietario

Dr. Teófilo Herrera Suárez

Propietario

Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor *Carmen*

Suplente

M. en C. Celia Elvira Aguirre Acosta *C. Elvira Aguirre A.*

Suplente

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco *[Firma]*

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Micología Básica bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera. Dicho laboratorio se ubica en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Directora
Dra. Concepción Toriello Nájera

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico de CONACYT, en el proyecto de investigación G31451B, a través de la beca que recibí.

Agradezco a la Dr. Conchita Toriello Nájera la oportunidad para formar parte de su armonioso grupo de trabajo, sus enseñanzas, comprensión y confianza.

Al Dr. Teófilo Herrera, a la Dra. Maria del Carmen Villaseñor, al Dr. Joaquín Cifuentes y a la M. en C. Elvira Aguirre por sus oportunas sugerencias y el tiempo prestado a la revisión de este trabajo.

A mis compañeras del laboratorio de Micología Básica, Q.F.B. Amelia Pérez, Biol. Hortensia Navarro, M. en C. Claudia Cano, M. en C. Gina Caballazi, Q.F.B. Guadalupe Olivares y Q.F.B. Fabiola Vega, por compartir sus conocimientos y experiencia, además de su gran amistad y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Agradezco a mi madre por regalarme la dicha de existir.

A los pilares de mi vida, Magdalena Morales, José Gutiérrez y Albertina Gutiérrez por estar junto a mi y apoyarme siempre.

A mis hermanos, Miguel A. Gutiérrez, Jorge A. Gutiérrez y Guadalupe Rodríguez por apoyarme y enseñarme tanto, pero sobre todo por llenar mi vida de alegría y satisfacciones.

A mis maravillosas tías, Margarita Gutiérrez, Audelia Gutiérrez, Ma. Luisa Gutiérrez y Rosa Gutiérrez por hacerme parte de su vida y brindarme su amor.

A mi tío J. Manuel Gutiérrez por ser mi ejemplo de entereza, fortaleza y por todo su amor.

A toda mi familia por estar siempre conmigo, dar luz y alegría a mi vida, a mis tías Guillermina, Esther, San, a mis primos, Dianis, Susy, Manolo, Jenny, Lili, Dany, Lauris, Lluvia, Alex, Rosy, Martha y a la joya que más luz tiene Victor Manuel.

A mis hermosos sobrinos Nara, Cristian, Lilibeth, Lalito y Josué.

A Erick Daniel Villamil Ramírez por fazer á minha vida multicolor, com seus ocorrências e locuras, ensinar-me a ser melhor pessoa, dar para mim seu tempo e encher-me de amor. Mais só todo, por compartilhar meus sonhos e forjar as fundações de nossu futuro.

Agradecimientos

A mis dos grandes tesoros Mayra Martínez y Elena Montoya, por escucharme, apoyarme, corregirme, aguantarme, comprenderme, por su amor, pero sobre todo por estar aquí.

A los grandes cómplices de mi vida y excepcionales seres humanos Tehua Osnaya, Jacinto Alquicira, Iván Delgado, Edgar Tejada, Rodrigo Zunzunegui y Aarón Espíndola por todo su amor y comprensión.

A David Basilio por su apoyo, gran paciencia, excepcional amistad y por estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos:

Ivonne Arciniega, Víctor López, Susana Grimaldo, Carlos Machuca, Jorge Limón, Bruno Iván Islas, Rodrigo Vidal, Alfredo Aguayo.

A Jorge Sahaza y Roberto Suárez por obsequiarme su gran amistad y compartir conmigo la locura de los hongos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	11
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVO GENERAL	18
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	18
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Material fúngico de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en estudio	19
2. Suspensión de conidios	20
3. Ensayos preliminares para obtener el medio de cultivo y las condiciones óptimas de crecimiento	20
a) Medios de cultivo probados	20
b) Condiciones ensayadas	20
c) Elaboración del medio de cultivo seleccionado	21
d) Determinación de proteínas y carbohidratos	21
4. Obtención y monitorización de blastosporas durante el ensayo	21
5. Medición de estructuras fúngicas	22
6. Análisis estadístico	22
VIII. RESULTADOS	25
1. Medios de cultivo líquidos	28
2. Medios de cultivo sólidos	32
3. Condiciones de cultivo probadas	33
4. Determinación de proteínas y carbohidratos	37
5. Cuantificación de propágulos fúngicos	37
a) Cuantificación de blastosporas	37
b) Cuantificación de conidios sumergidos	41
5. Tamaño de propágulos fúngicos en medio IP y APD	44
IX. DISCUSIÓN	46
X. CONCLUSIONES	51

XI. BIBLIOGRAFÍA	52
XII. ANEXOS	61
XIII. ÍNDICE DE TABLAS	77
XIV. ÍNDICE DE FIGURAS	79
XV. ÍNDICE DE ANEXOS	81

RESUMEN

En México se requiere de un agente microbiano para controlar plagas de importancia económica, como la langosta *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons*, donde el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* se muestra como una alternativa viable. Para ello es preciso investigar las condiciones óptimas de cultivo del hongo para su producción en masa. Se estudiaron 16 cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, de aislamientos de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima. Para seleccionar un medio de cultivo económico, fácil de preparar y donde se produzca el mayor número de propágulos fúngicos, se probaron 11 medios de cultivo líquido y 3 sólidos. Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo como temperatura, pH y agitación orbital. Una vez seleccionado el medio y las condiciones óptimas de cultivo, se observó la producción de propágulos fúngicos cada 24 h, por un periodo de 120 h. Posteriormente, se determinaron los aislamientos que producen el mayor número de propágulos y finalmente se comparó el tamaño de los propágulos obtenidos en medio de cultivo líquido con los obtenidos en cultivo sólido. De los ensayos preliminares para obtener las condiciones de cultivo óptimas, se encontró que el pH en un rango de 5.4 a 7, no fue relevante. El medio y las condiciones de cultivo donde se obtuvo el mayor número de propágulos fúngicos fueron: medio infusión de papa (IP), sin agitación y a 37 °C. Por primera vez se observó el fenómeno del dimorfismo en este hongo a esta temperatura. El hongo es capaz de producir blastosporas por endosporas, gemación y fisión binaria. Además produce conidios sumergidos a partir de las 48 h de incubación a 37 °C. El aislamiento con mayor producción de blastosporas resultó ser el aislamiento EH-502, con 9.3×10^6 /ml a las 96 h de incubación, que al compararlo con los demás aislamientos mostró diferencia significativa ($P < 0.01$). El aislamiento con mayor producción de conidios sumergidos fue EH-498, con un valor de 73×10^6 /ml a las 96 h de incubación, donde el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.01$). Referente al tamaño de las estructuras observadas en los medios ensayados, se encontró que las blastosporas miden en promedio $6.61 \times 9.84 \mu\text{m}$ y los conidios sumergidos $2.97 \times 5.35 \mu\text{m}$. En cuanto al tamaño de los propágulos en medios de cultivo líquido y sólido, el análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas ($P = 0.01$). Los resultados sugieren que el medio y las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de blastosporas son: medio IP, sin agitación y a 37°C. Se encontró que los aislamientos EH-498 y EH-502, son los que producen el mayor número de propágulos fúngicos, en el medio y las condiciones de cultivo descritas.

I. INTRODUCCIÓN

En todo el mundo el hombre sostiene una lucha constante contra plagas agrícolas como langostas, chapulines, escarabajos, mosca blanca y mosca pinta que causan grandes daños a los cultivos, pudiendo provocar hambrunas y enormes pérdidas económicas entre la población. Esto ha generado el surgimiento de diferentes métodos de control. Entre ellos, el químico, físico, mecánico, cultural y biológico (Pereyra, 2001).

La langosta (Orthoptera: Acrididae) es una de las grandes plagas, entre otras, en terrenos de cultivo, praderas, y aún en zonas áridas del mundo. Por el gran daño que causa es el único insecto mencionado en la biblia y en historias orales del Sahel (Lomer *et al.*, 1999).

Entre los insectos que arrasan los cultivos destaca en México, la langosta que llega a atacar desde 20,000 hasta 1,000,000 de ha de diferentes cultivos (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación -SAGARPA-, 2001).

En los métodos de control para ésta sobresalen el químico y el biológico. El primero comenzó siendo muy eficiente aunque con el paso del tiempo y la aplicación indiscriminada trajo consigo una fuerte presión sobre el ambiente e insectos provocando el desarrollo de resistencia en estos últimos. La gran cantidad de químicos usada es controversial debido al costo y consecuencias ambientales (Scanlan *et al.*, 2001). Estos productos utilizados para el control de plagas agrícolas específicas, afectan inevitablemente especies que no son plaga y a las cuales no están dirigidas las operaciones de control (Barrientos *et al.*, 1992); son altamente dañinos para el ambiente, para el hombre y otros animales. Cada año cerca de un millón de personas padecen por residuos de plaguicidas químicos y se les atribuyen numerosas muertes, lo que incrementa la problemática acerca de su seguridad (Deshpande, 1999). Trujillo (1975) señala que los químicos más usados contra la langosta son: Dieldrín, Dieldrex, Malatión y Diazinón, sin embargo, la mayoría han sido prohibidos en diversos países y en México. Ahora, deben usarse exclusivamente los plaguicidas químicos autorizados por la

Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) (DIARIO OFICIAL, 1998). Actualmente, en nuestro país se combaten en promedio 20,000 ha con 500 toneladas de paratión metílico, considerado dañino por la OMS (Anónimo, 1995). En su aplicación se invierten \$300,000 con el riesgo de que la plaga arrase 50 veces la superficie en que se combate si descienden las actividades de vigilancia y control (SAGARPA, 2001).

Por lo anterior, se han buscado otras alternativas viables, poniendo especial énfasis en el control biológico, que emplea organismos que se introducen en la población del insecto plaga, se mantienen y dispersan por si mismos, controlándola de manera natural (Hernández-Velázquez, 2001). Una alternativa al problema se encuentra en los agentes microbianos que son ambientalmente seguros (Deshpande, 1999).

En México, el control legal para la plaga de la langosta se implementó con la Norma Oficial Mexicana NOM-049-FITO-1995 de la SAGARPA en donde se establece la campaña contra ésta, aplicable en todo el territorio nacional (Ramírez *et al.*, 2001).

La langosta es un insecto perteneciente al orden Orthoptera, con 12,500 especies registradas en 1080 géneros. Entre estas, se encuentra *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons*, que representa un grave problema en México por ser polífaga, ya que puede atacar hasta 400 especies de vegetales, entre ellas, maíz, soya, cacahuate, caña de azúcar, frijol, sorgo, arroz, plátano, chile, tomate, coco, cítricos y pastizales. El 69 % del daño a los cultivos lo producen las mangas, constituidas por insectos en gran densidad en una superficie que puede variar de menos de 1 m² a varios km², con una movilidad elevada y generalmente coordinada, que pueden llegar a rebasar los mil millones de individuos (SAGAR, 2000). El 23 % del daño lo ocasionan las mangas maduras y el 8 % las ninfas (Overseas Development Natural Resources Institute, 1988).

Se reconocen cinco zonas gregarigenas en México (Fig. 1), que cubren una superficie de 20,000 ha, y las zonas de invasión llegan a abarcar hasta 5 millones de ha de cultivos agrícolas y pastizales. Los cultivos más afectados son maíz,

frijol, henequén, hortalizas, pastizales y vegetación en general, con pérdidas que van desde el 20 hasta el 100 % del cultivo (SAGAR, 2000).

Las zonas gregarígenas en el país son las siguientes:

1.- Yucatán. Se encuentran dos áreas, una en la zona henequenera entre Yucatán y Campeche, y la más importante porque de ella provienen las mangas que causan los mayores daños a los cultivos agrícolas, en los municipios de Dzilam González, Buctzotz, Panabá y Cenotillo. En menor importancia de daño están San Felipe, Tizimín y río Lagartos.

2.- Veracruz. Es la segunda en importancia, en municipios de Medellín, Boca del río, Alvarado, Tlalixcoyan y Tierra Blanca.

3.- Chahuities-Tepanatepec. Entre los límites de Oaxaca y Chiapas, en los poblados de Salina Cruz, Acuites y Tepanatepec.

4.- San Luis-Tamaulipas. En los Valles de la Sierra Nahola; que han provocado invasiones en la Huasteca Potosina y Tamaulipeca.

5.- Tabasco. En los municipios de Tenosique, Balancán, Emiliano Zapata en Tabasco y La Libertad en Chiapas. Zona que estuvo inactiva pero actualmente tiene fuerte actividad.



Fig. 1. Zonas gregarígenas de langosta *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* en México (SAGAR, 2000).

La langosta en México, presenta dos generaciones anuales en Yucatán y una al año en otras regiones del país; con tres estadios de desarrollo: huevo, ninfa y adulto (Fig. 2).

Huevo. Con forma de grano de arroz, longitud de 5-8 mm y diámetro de 1.5 a 2 mm, color amarillo a pardo. Cada hembra oviposita entre 80-150 ootecas cilíndricas, con 90 huevecillos cada una. El período de incubación en laboratorio es de 28 días y en el campo de 15 a 21 (Astacio, 1995 a).

Ninfa (juveniles o saltones). Se desplazan mediante saltos, los órganos sexuales aún no están desarrollados. De color verde-amarillo o rosado con manchas negras acentuadas. Tiene 6 mudas, en machos cada una de 10 días y en hembras 9 (Astacio, 1995 b). La primera muda es más susceptible a los insecticidas y la sexta más resistente.

Adulto. Presenta una franja blanca desde el pronoto hasta el ala. Franja subocular triangular y de color café que cubre parte de la gena. Tubérculo proesternal verticalmente pubescente. El ala con manchas rectangulares negras. Franja rosada que recorre la parte lateral del pronoto. De color amarillo en la madurez sexual. El macho mide 41-51 mm y la hembra 51-62 mm de largo. La oviposición es diurna con duración de 15 a 110 minutos (SAGAR, 2000). El ciclo biológico de este insecto, de acuerdo a los meses y estaciones del año, se muestra en la fig. 3, donde se pueden observar los ciclos de cópula, oviposición y saltones.

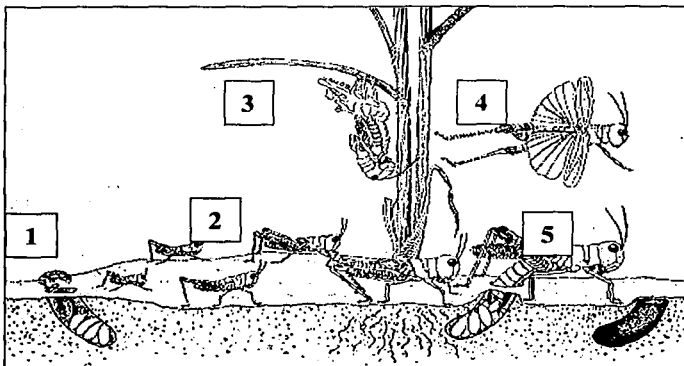


Fig. 2. Ciclo de vida de la langosta *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons*
1. Eclosión, 2. Muda, 3. Adulto, 4. Imago, 5. Oviposición.

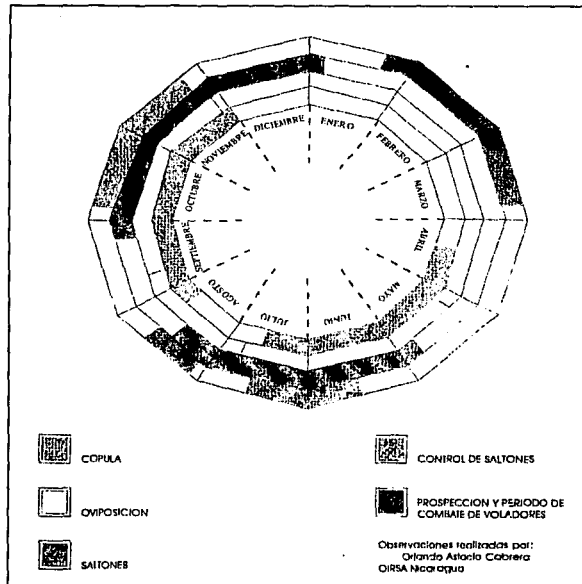


Fig. 3. Ciclo biológico de *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* de acuerdo a los meses y estaciones del año. Tomado de: Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA).

Entre los enemigos naturales de *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* se encuentran: depredadores como *Crotophaga sulcirostris* y *Bufo platyperas*; parásitos como *Sarcophaga caridei*, *Eutrobimidium* sp. y *Nosema locustae*, que reducen la fecundidad, la oviposición y viabilidad de huevecillos (Harvey, 1983); bacterias como *Proteus vulgaris* y *Streptococcus* sp. (Trujillo, 1975); y hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, seguros para el ambiente, inocuos para el hombre y que pueden utilizarse en el control biológico de esta plaga dentro de un manejo integrado de plagas (MIP) (SAGAR, 2000).

Las medidas de control usadas tradicionalmente, como desvío de mangas, destrucción de ootecas, inundación de áreas de oviposición y siembra de plantas repulsivas no han sido suficientes para regular esta plaga.

Se estima que los costos de campaña contra langosta y saltamontes en México son en promedio de US\$ 500,000 por año. Estos podrían reducirse en 30-40 % si se enfatizan las técnicas de monitoreo, se introduce el uso de biomodelos para predecir brotes o infestaciones, y se utilizan agentes microbianos como estrategia

de manejo permanente. La introducción de nuevas tecnologías generaría una estrategia de manejo integrado sostenible, mucho menos costosa que la alternativa del control químico (Barrientos & Milner, 2001).

Dentro de los organismos utilizados en el control biológico de plagas agrícolas, resalta el grupo de hongos entomopatógenos que es heterogéneo y comprende más de 85 géneros. Sólo un bajo porcentaje se considera por su potencial como agente de control microbiano (Hajek & St. Leger, 1994). Virtualmente todos los órdenes de insectos son susceptibles a enfermedades fúngicas (Hajek & St. Leger, 1994). Los hongos pueden ser aplicados en forma de conidios o micelio (Pereyra, 2001). Infectan al establecer contacto con el insecto plaga sin la necesidad de ser ingeridos (Deshpande, 1999).

Los entomopatógenos más utilizados como agentes biocontroladores de plagas agrícolas en todo el mundo son: *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill; *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *M. flavoviride* Gams & Rosypal, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas (Bateman, 1997; Milner, 1997).

Metarhizium flavoviride está constituido por dos variedades var. *flavoviride* Gams & Rozsypal y var. *minus* Rombach (Tulloch, 1976; Rombach *et al.*, 1986; Rombach *et al.*, 1987; Samson *et al.*, 1988; Hawksworth *et al.*, 1995). En la actualidad con técnicas de biología molecular como RAPD-PCR, secuencia de las regiones ITS, 28S, D3 del DNA ribosomal, y características fenotípicas como termotolerancia y tamaño de los conidios, el mismo género se ha clasificado en diez grupos (clados). *Metarhizium flavoviride* se ha reubicado en el clado siete, como *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Driver *et al.*, 2000). En la tabla 1 se muestran las especies reconocidas tradicionalmente en micología, y los clados actuales correspondientes por micología molecular.

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

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

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

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

El entomopatógeno *M. anisopliae* var. *acidum* (*M. anisopliae* var. *acidum*) (antes *M. flavoviride*) es una buena alternativa para el control microbiano de langosta dentro de un manejo integrado de plagas. Se ha observado que este hongo aun en condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa produce infección en los acrididos (Goettel *et al.*, 1995; Douglas *et al.*, 1999); penetra directamente a través de la cutícula del insecto, y no es necesario que permanezca en el ambiente (Hernández-Velázquez, 2001). Es inocuo para el humano y otros vertebrados, tiene gran adaptación al ecosistema sin producir efectos negativos (Moore & Prior, 1993; Goettel *et al.*, 1995), ofrece fácil manejo para su producción (Jenkins & Prior, 1993), y posee virulencia específica contra insectos taxonómicamente relacionados (Prior *et al.*, 1992). Está adaptado a zonas tropicales y subtropicales; bajo condiciones adversas produce conidios dentro de la cavidad del hospedero (Goettel *et al.*, 1995).

Metarhizium anisopliae var. *acidum* es un hongo mitospórico (no se le conoce forma sexual), con conidios elipsoidales de 7-9 X 4.5-5.5 µm; dispuestos en columnas, formados por cadenas de conidios enteroblásticos en sucesión basípeta (Fig. 4). En medio de cultivo artificial presenta colonias amarillo o verde olivo (Samson, 1988; Domsch & Gams, 1993).



Fig. 4. Fiálide de *M. anisopliae* var. *acridum* en forma de candelabro con conidios enteroblásticos en sucesión basipeta.

El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos se ilustra en la fig. 5 y consiste en general de: a) adhesión del conidio a la cutícula del insecto; b) penetración del hongo por medio de enzimas que degradan la cutícula (St. Leger, 1995), y la formación del apresorio, que es un hinchamiento aplanado originado del tubo de germinación del conidio, que se adhiere a la superficie del hospedero antes de penetrarlo con la hifa infectiva. Con las clavijas de infección la primera barrera que penetra el hongo es la epicutícula, después las estructuras infectivas se expanden lateralmente en las capas externas de la procutícula y forman placas de penetración que se distribuyen vertical o lateralmente; c) diseminación dentro del insecto. El micelio se ramifica en el hemocele y forma propágulos fúngicos como: cuerpos hifales, hifas y/o blastosporas; d) salida del hongo al exterior y esporulación. El período de infección descrito es aproximadamente de 6-7 días (Charnley & St. Leger, 1991).

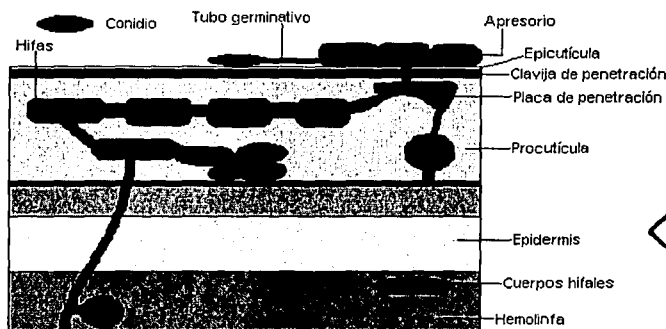


Fig. 5. Proceso infeccioso en hongos entomopatógenos (modificado de Charnley & St. Leger, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Entre los investigadores que estudian los hongos entomopatógenos el término blastospora se aplica comúnmente a cuerpos hifales, producidos en el hemocele del insecto, o en cultivo sumergido, por un proceso de gemación hifal, excluyendo la formación de fialoconidios. En taxonomía fúngica este término describe todo tipo de propágulo generado de un desarrollo blástico, este no excluye las fialosporas enteroblásticas (Fargues *et al.*, 2001).

II. ANTECEDENTES

Desde la Biblia se hace mención de la langosta como una plaga devastadora en los cultivos agrícolas; este insecto atrae la atención del público por las grandes nubes voladoras que llega a formar (Lomer *et al.*, 2001). En América las referencias más antiguas sobre ella son las de los Aztecas y Mayas (SAGAR, 2000). Los colonizadores españoles registraron 16 hambrunas en Yucatán, la primera en 1535 y en 1835 la última (Barrientos *et al.*, 1992).

La langosta es una plaga importante en países como el Sur de África, Nigeria, China, Australia, Estados Unidos, Argentina, Guatemala, Brasil y México (Harvey, 1983; Lomer *et al.*, 2001). Durante muchos años (1930-1970), langostas y saltamontes fueron controlados con productos químicos, organoclorados, más comúnmente con dieldrin (Barrientos, 1990). Actualmente se controla con insecticidas químicos, que en 1990 causaron gastos de 26,000 millones de dólares, distribuidos aproximadamente 4.5 en Estados Unidos, 4.5 en el Oeste de Europa y 17 en el resto del mundo (Anónimo, 1995), y que causaron un grave deterioro al ecosistema (Lomer *et al.*, 2001). En respuesta a los problemas ambientales surgen alternativas como el control biológico por hongos entomopatógenos, en especial *M. anisopliae* var. *acridum*. Para poder llevar a cabo de manera integral esta alternativa, se establecieron diversos organismos internacionales encargados del control de esta plaga como: "Center for Overseas Pest Research" en 1945, "Food and Agriculture Organization" de la Naciones Unidas (FAO) en 1953. Actualmente estos trabajan estrechamente con el proyecto multidisciplinario e internacional "Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux" (LUBILOSA), creado en 1992.

El primer intento para usar *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de insectos fue en 1880, por Krassilstchikin en Rusia; y en 1922, en Australia, Illingworth importó *M. anisopliae* de Hawaii, para controlar larvas de escarabajos de la caña de azúcar (Milner, 2002 b).

Inicialmente *M. flavoviride* fue detectado en homópteros y evaluado 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). El género *Metarhizium* ha sido aislamiento de langostas como: *Schistocerca gregaria* Forskol (Prior *et al.*, 1992) y *S. piceifrons* ssp. *piceifrons* (Walter) (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997).

Actualmente se producen diversos agentes microbianos alrededor del mundo, particularmente en África (Lomer *et al.*, 1999), Australia (Milner, 2002 a, 2000 b), Canadá (Douglas & Goettel, 2001), China (Feng *et al.*, 1994), y en América Latina (Aquino *et al.*, 1977; Alves & Pereira, 1989; Antía-Londoño *et al.*, 1992).

En 1992, Gran Bretaña inició el programa LUBILOSA registrando en el año 2000 el agente microbiano "Green Muscle" en Sudáfrica y África Occidental. Este fue desarrollado multidisciplinariamente entre el CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International), diversas instituciones de Europa y gobiernos de África. El efecto del agente ha sido demostrado bajo condiciones de campo contra la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*, langosta café *Locustana pardalina*, saltamontes senegalés *Oedaleus* o *Senegalensis* y langosta arbórea *Anacridium* sp., entre otras (Barrientos & Milner, 2001). Este agente microbiano se produce bajo el método bifásico en donde el inóculo se obtiene en un medio líquido, luego se siembra en arroz estéril, donde se da la conidiación (Jenkins *et al.*, 2001).

En Brasil (1993) se inició un proyecto de investigación en EMBRAPA (Corporación de Investigación de Agricultura Brasileña) con el objetivo específico de desarrollar bioplaguicidas para controlar chapulines basados en entomopatógenos, especialmente hongos. *M. anisopliae* var. *acridum* resultó el candidato más promisorio como agente controlador (Magalhães *et al.*, 2002). Actualmente se trata un área de 108,000 ha con este entomopatógeno (Magalhães & Faria, 2001).

En Australia, la Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) desarrolló otro insecticida biológico Green Guard™, cuyo registro está en trámite. Es utilizado operacionalmente para el control de la langosta australiana *Chortoicetes terminifera* Walker, langosta migratoria *Locusta migratoria linnaeus* y saltamonte *Phaulacridum vittatum* Sjösted (Barrientos & Milner, 2001). BioCane™

es otro micoplaguicida basado en conidios de *M. anisopliae* que se usa para controlar escarabajos de la caña de azúcar en Australia (Milner, 2002 a; 2000 b).

En Canadá, se ha visto que *M. flavoviride* tiene numerosos beneficios en el control de langosta, especialmente si es usado en combinación con *Beauveria bassiana* (Douglas & Goettel, 2001).

Debido a su fácil producción, rango de hospedero, capacidad para disparar epizootias y otros criterios ecológicos, *Metarhizium anisopliae* es una de las especies más frecuentemente empleadas en la producción a gran escala (Grimm, 2001).

Diversos productos basados en los conidios de *Metarhizium anisopliae* han sido elaborados y son vendidos comercialmente por compañías privadas como: Koppert, Mycotech, Natural Plant Protection, Agriculture y Ecoscience, Biological Control Products. Estos últimos constituyen apenas el 0.1 % del total de microinsecticidas en el mercado (Anónimo, 1995). Sin embargo, rara vez estas compañías llevan a cabo estudios básicos y costosos de la biología de estos microorganismos, para una aplicación y funcionamiento óptimo (Jenkins *et al.*, 1998).

En 1996, en México el Gobierno Federal, los Gobiernos Estatales y los productores, por medio de los organismos auxiliares de Sanidad Vegetal, conjuntaron esfuerzos para realizar actividades de manejo integrado de la langosta. La atención fitosanitaria para el control de esta plaga se lleva a cabo apoyada en la norma oficial mexicana NOM-049-fito-1995, a través de acciones como exploración, muestreo, control cultural, control biológico y químico y actividades de capacitación y divulgación que van encaminadas a la lucha oportuna en contra de este insecto (Ramírez *et al.*, 2001). En los últimos 10 años se ha trabajado en la búsqueda de entomopatógenos potencialmente útiles para el control de langosta. En 1999, bajo esta norma, se trataron los estados de Yucatán, Tabasco, Campeche, San Luis Potosí, Veracruz, Chiapas y Quintana Roo (Hernández-Velázquez & Berlanga, 1998; Barrientos & Milner, 2001).

Entre los requerimientos básicos para la producción comercial y uso exitoso de hongos como agentes de control de insectos se encuentran: 1) crecimiento rápido

del hongo: abundante esporulación y alta virulencia sobre la plaga a controlar del aislamiento seleccionado; 2) costos de producción mínimos, desarrollando un medio de cultivo que sea simple en composición, barato, disponible en cantidades suficientes, con un proceso de producción fácil y con un mínimo de labor; 3) compatibilidad con la tecnología de aplicación, formulación y largo tiempo de almacenamiento sin pérdida significativa de viabilidad y virulencia (Feng *et al.*, 1994).

La mayoría de las industrias que producen hongos como agentes microbianos utilizan dos fases de cultivo (Fig. 6); la líquida, en matraces o fermentadores donde se obtiene micelio y propágulos fúngicos en su máximo crecimiento exponencial. La sólida, para la producción de conidios en sustrato sólido, como por ejemplo arroz (Samsinakova *et al.*, 1981; Bartlett & Jaronski, 1988; Vimala, 1994). Este sistema bifásico permite un rápido crecimiento del hongo y disminución en el tiempo de producción (Jenkins *et al.*, 1998).

Los medios de cultivo líquidos ofrecen una reducción en el tiempo de obtención de propágulos fúngicos, y por consiguiente también las etapas de producción a gran escala, disminuyendo el riesgo de colonización del sustrato por microorganismos contaminantes, optimizando el espacio y aumentando la superficie de contacto entre el medio y los conidios (Jenkins *et al.*, 1998).

Para que el mercado de agentes microbianos aumente se requieren intensas investigaciones sobre la biología de los agentes potenciales para el control biológico, poniendo énfasis en las características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos de cada región geográfica. De esta manera, se podría impulsar su utilización como control microbiano dentro de programas de manejo integrado de plagas.

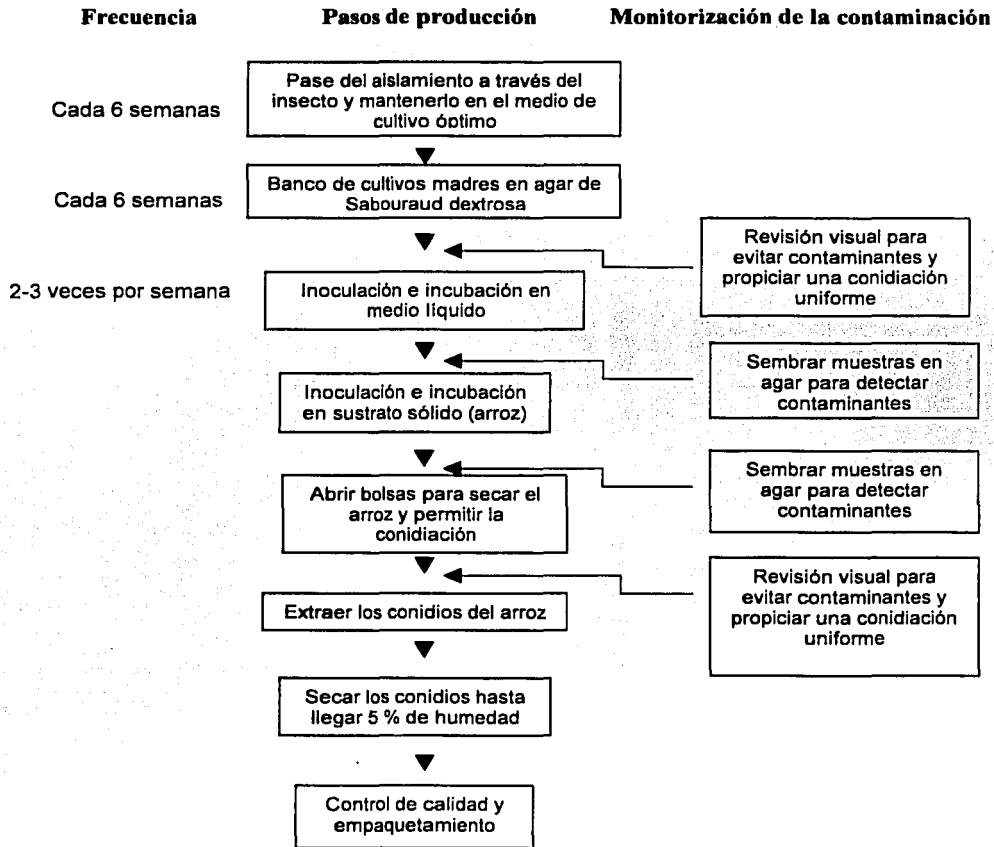


Fig. 6. Diagrama que muestra el método bifásico para la producción masiva de conidios, que sirven como ingrediente activo para un agente microbiano.

III. JUSTIFICACION

En México, *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* es una de las plagas agrícolas de mayor importancia, ya que puede atacar desde 20,000 hasta 1, 200,000 ha. Para controlarla se usan métodos químicos que provocan daños a la salud humana, al ecosistema y resistencia en la plaga. Por ello, se han buscado alternativas dentro de un manejo integrado de plagas donde *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* funcione como un controlador microbiano de la langosta. Para optimizar su producción en masa se recomienda el uso de medios líquidos de cultivo, porque ofrecen un cultivo homogéneo, mayor disponibilidad de nutrientes, más esporas en menor tiempo y a menor costo. El uso de este agente microbiano en México podría reducir la plaga a niveles sin relevancia económica.

IV. HIPÓTESIS

La composición adecuada del medio de cultivo y las condiciones de incubación óptimas para *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* aislado de *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* en México, propiciarán la mayor producción de propágulos fúngicos en medios líquidos.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas del hongo para obtener la máxima producción de propágulos fúngicos en un medio de cultivo líquido.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar el medio de cultivo líquido, económico, de fácil elaboración y en donde se produzca el mayor número de propágulos fúngicos.
- Identificar las condiciones de temperatura, pH y agitación necesarias para obtener la mayor producción de propágulos fúngicos.
- Comparar y seleccionar el aislamiento que produce el mayor número de propágulos fúngicos en el menor tiempo de incubación.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

Los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* utilizados en este estudio se muestran en la tabla 2, y fueron proporcionados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) de Tecomán, Colima. Todos ellos aislados de *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* de pastos.

Tabla 2. Cultivos y origen de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* estudiados

UNAM	CNRCB	Origen
EH-483/8	MaPL5	Colima
EH-484/6	MaPL8	Colima
EH-486/7	MaPL13	Colima
EH-487/4	MaPL14	Colima
EH-488/7	MaPL15	Colima
EH-489/1	MaPL16	Colima
EH-490/1	MaPL18	Colima
EH-491/8	MaPL20	Colima
EH-493/1	MaPL22	Colima
EH-494/4	MaPL26	Colima
EH-497/7	MaPL29	Colima
EH-498/8	MaPL31	Colima
EH-499/10	MaPL37	Isla Socorro
EH-500/2	MaPL38	Isla Socorro
EH-502/8	MaPL40	Isla Socorro
EH-531/8	MaPL32	Colima

Cada aislamiento muestra el cultivo monospórico seleccionado del original respectivo

Todos los experimentos se hicieron con cultivos monospóricos seleccionados y derivados de cada aislamiento (Cano *et al.*, 2002). Estos están conservados en agua destilada y aceite mineral a 4 °C, y en glicerina al 10 % en nitrógeno líquido a -196 °C, en la Colección de Cultivos del Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Los aislamientos se mantienen en agar (1.5 %) papa (30 %) dextrosa (2 %) (APD), para llevar a cabo los experimentos.

Suspensión de conidios

A partir de cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* incubados 7 días a 28 °C en APD se hicieron suspensiones de conidios. A cada tubo se le agregaron 4 ml de Tween 80 estéril al 0.5 %, removiendo cuidadosamente los conidios con un asa micológica. La suspensión se homogeneizó en un vórtex (Fisher Scientific, Nueva York, USA), los conidios se contaron en una cámara de Neubauer (Optik Labor-Bright Line, Alemania) y la suspensión se ajustó a 1×10^8 conidios/ml. Se sembró 1 ml de esta suspensión en un matraz con 75 ml del medio. El matraz se incubó a 37 °C durante 120 h sin agitación. Se utilizaron tres matraces para cada aislamiento.

Ensayos preliminares para obtener el medio de cultivo y las condiciones óptimas de crecimiento.

Medios de cultivo probados

Se hicieron ensayos preliminares con los aislamientos EH-500 y EH-502. Se probaron los medios de cultivo líquido: Adameck, Dextrosa/Extracto de levadura y peptona de caseína (DEL), infusión de papa (IP), infusión de papa con asparagina, infusión de papa modificado, Jackson, Sabouraud, Vogel, Vogel modificado, Extracto de levadura/glucosa (YG).

El aislamiento EH-502 se probó con los medios sólidos: APD, Paris y Sabouraud. La mayoría de ellos reportados para la producción en masa de propágulos fúngicos. La composición química de estos medios se muestra en la tabla 3 (líquidos) y la tabla 4 (sólidos).

Condiciones ensayadas

Se probaron temperaturas de 28 °C y 37 °C, pH's inicial y ajustado a 7, agitación orbital a 80 y 110 rpm (Boekel Grant ORS 200, Pennsylvania, USA) y sin agitación, por un periodo de 120 h. Se reportan todos los resultados a excepción de los de pH's y agitación a 80 rpm.

De acuerdo al resultado de los ensayos preliminares, se seleccionó el medio de cultivo IP a 37 °C y sin agitación.

Elaboración del medio de cultivo seleccionado

Medio líquido de infusión de papa (IP). Se pesaron 300 g de *Solanum tuberosum* y se agregó un litro de agua destilada. Se llevó a ebullición hasta el cocimiento de la papa. Se filtró varias veces con gasa para eliminar todos los residuos. A la infusión obtenida se le agregaron 20 g de glucosa (Droguería Cosmopolita, México, D.F), se aforó con agua destilada a 1 litro. Se agregaron 75 ml del medio a matraces Erlenmeyer de 250 ml. El medio se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Después de esterilizar se midió el pH del medio.

Determinación de proteínas y carbohidratos en el medio de cultivo seleccionado

En el medio de cultivo IP, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y la de carbohidratos con el método de Dubois (Dubois *et al.*, 1951).

Obtención y monitorización de blastosporas durante el ensayo

Se tomaron 10 ml de cada matraz a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Estos se diluyeron con agua destilada en proporción 1:1, y después se sonicaron durante 4 min a 150 watts (Sonicador Branson modelo 250/450 Branson Ultrasonic Corporation, USA) para disgregar los propágulos fúngicos y poder llevar a cabo el conteo de propágulos. Se tomaron cinco alícuotas de cada muestra. Se contó el número de propágulos fúngicos en una cámara de Neubauer en un microscopio óptico (Olympus CH-2, Japón). Se completaron 15 lecturas para cada aislamiento en cada tiempo del experimento, y se fotografiaron las estructuras pertinentes. Se calcularon los promedios de los 15 datos, y se graficaron en curvas de crecimiento. Se determinó el aislamiento con la mayor, media y menor producción de propágulos fúngicos.

Medición de estructuras fúngicas

Para determinar el largo y ancho de los propágulos fúngicos en un medio de cultivo líquido y otro sólido, los aislamientos con la mayor, media y menor producción de propágulos fueron sembrados en cajas de Petri con medio sólido de APD y en un matraz con medio líquido de IP. Se tomaron muestras cada 24 y hasta las 120 h para medir los propágulos (un mínimo de 15 por muestra) a una magnificación de 400 X, con un ocular calibrado (1 división=2.564 μm) en un microscopio óptico (Olympus CH-2, Japón).

Finalmente se calcularon los promedios, determinando el rango de largo y ancho de los propágulos fúngicos.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para determinar las significancias, en la producción de propágulos fúngicos de los 16 aislamientos, y en la talla de propágulos en medio de cultivo sólido y líquido.

Tabla 3. Componentes (g/L) de los medios de cultivo líquidos ensayados para la obtención de propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Ingredientes	Adamek	DEL	Infusión de papa	Infusión de papa con asparagina	Infusión de papa modificado	Jackson	Paris	Vogel	Vogel modificado	YG
KH_2PO_4	-	-	-	-	-	2	0.36	-	-	-
$\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0.3	0.60	-	-	-
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	-	1.42	-	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	0.037	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
CaCl_2	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-
NH_4NO_3	-	-	-	-	-	-	0.70	-	-	-
NH_4SO_4	-	-	-	-	-	-	-	6	6	-
Casaminoácidos	-	-	-	-	-	13.2	-	-	-	-
Glucosa	20	40	20	20	80	80	20	5	5	10
Asparagina	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-
Infusión de maíz	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptona de caseína	-	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	20	10	-	-	-	-	5	-	20	20
Infusión de papa c.b.p	-	-	700	700	700	-	-	-	-	-
Mezcla de vitaminas	-	-	-	-	-	3.15	-	-	-	-
Tween 80	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG 200	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-

7E81S CON
BATA DE ORIGEN

Tabla 4. Componentes (g/L) de los medios de cultivo sólidos ensayados para la obtención de propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Ingredientes	APD	Paris	Sabouraud
KH_2PO_4	-	0.36	-
$\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	0.60	-
Na_2HPO_4	-	1.42	-
KCl	-	1	-
NH_4NO_3	-	0.70	-
Glucosa	20	20	40
Peptona de caseína	-	-	10
Extracto de levadura	-	5	-
Infusión de papa c.b.p	700	-	-
Agar	15	15	15

TESIS CCN
FALTA DE ORIGEN

VIII. RESULTADOS

Después de realizar los ensayos preliminares para obtener el medio y las condiciones de cultivo óptimas en la producción de propágulos fúngicos, se encontró que el pH no fue relevante. Los ensayos con el pH original y el pH que se ajustó a 7 no mostraron diferencias (Tabla 5).

Tabla 5. Crecimiento de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* EH-502 en medios de cultivo líquidos con pH 7, o el pH original del medio, ensayados para la obtención de propágulos fúngicos

Medio	Horas	Con agitación, pH 7						Con agitación, pH original del medio					
		28° C			37° C			28° C			37° C		
		P	C	B	P	C	B	P	C	B	P	C	B
Adamek	24	++	+	-	++	++	-	+++	+	+	+++	+	+
	48	+++	+	+	++	++	-	+++	+	+	+++	-	+
	72	+++	+	+	+++	+	+	+++	++	++	+++	+	++
	96	++	++	++	+	++	++	++	+	++	++	-	+++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
DEL	24	NR	NR	NR	++	++	-	NR	NR	NR	+	+++	-
	48	NR	NR	NR	++	+	+	NR	NR	NR	+++	+	++
	72	NR	NR	NR	+++	+	+	NR	NR	NR	+	-	++
	96	NR	NR	NR	++	++	++	NR	NR	NR	++	+	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Infusión de papa	24	++	++	-	++	++	-	+	++	-	++	+	+
	48	++	+	+	++	++	+	++	++	+	+++	+	++
	72	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	++	+++	+	++
	96	++	++	++	++	++	++	+++	+	++	++	++	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+++	++	++	++	++	++
Jackson	24	+++	++	-	++	++	-	+++	+	+	++	+	+
	48	+++	++	+	++	++	+	+++	+	++	+	++	++
	72	+++	+	+	+++	+	+	+++	++	++	+	++	++
	96	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++	+
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

* Datos cualitativos para los que se tomó como referencia el aislamiento que produjo en mayor número de estructuras fúngicas.

+ = Número bajo de propágulos fúngicos, ++ = Número medio de propágulos fúngicos,

+++ = Número alto de propágulos fúngicos, - = Sin propágulos y NR = No realizado.

P = pellets

C = conidios

B = blastosporas

Todos los medios se probaron a 37 °C. Algunos de ellos se ensayaron a 28 °C, con (100 rpm/min) y sin agitación.

En todos los medios probados se observaron las siguientes estructuras: conidios de forma elipsoidal (Fig. 7-A), conidios sumergidos de forma elipsoidal más pequeños que los sembrados originalmente (Fig. 7-B), blastosporas globosas

ESTILO CON
TUBOS CON
ESTILO CON

(Fig. 7-C), dividiéndose por endosporas (Fig. 7-D), por fisión binaria (Fig. 7-E) y por gemación (Fig. 7-F), pocos cuerpos hifales de forma alargada con mayor grosor que una hifa (Fig. 7-G), clamidosporas apicales como estructuras redondas con pared gruesa (Fig. 7-H) y clamidosporas intercalares (Fig. 7-I).

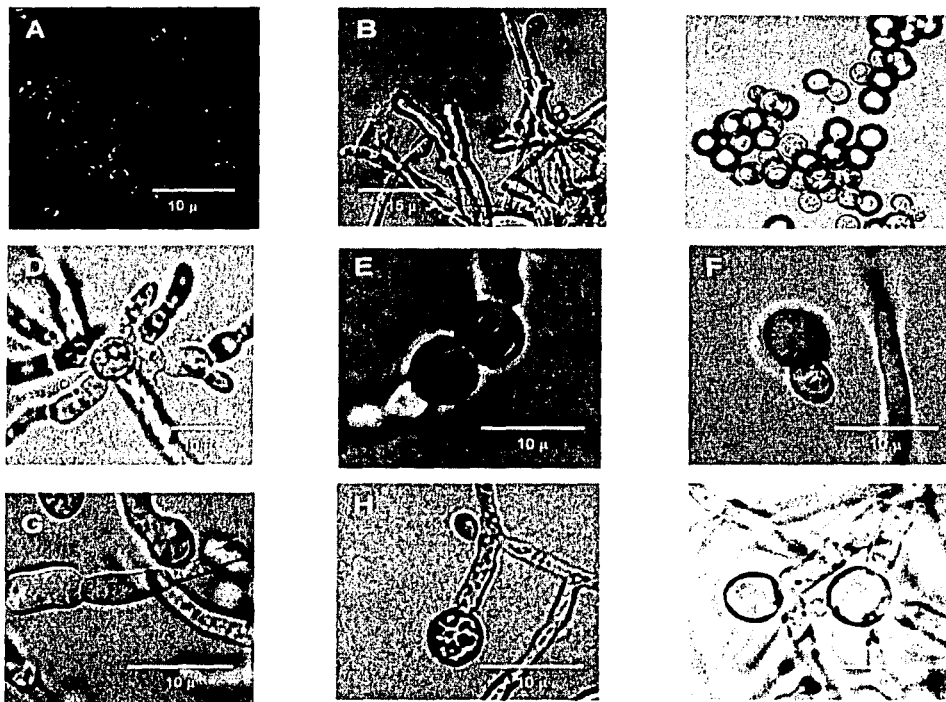


Fig. 7. Estructuras observadas en el aislamiento EH-502 durante 120 h de incubación. A) Conidios elipsoidales, B) Conidios sumergidos, C) Blastosporas, D) Blastosporas dividiéndose por endosporas, E) por fisión binaria, F) por gemación, G) Cuerpos hifales, H) Clamidospora apical y I) Clamidosporas intercalares.

La tabla 6 muestra resultados cualitativos obtenidos al ensayar 10 medios de cultivo líquidos con el aislamiento EH-502 de *M. anisopliae* var. *acridum*, que fueron los mismos para el aislamiento EH-500.

TESIS CON
FALLA LE ORGEN

Tabla 6. Crecimiento de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* EH-502 en los medios de cultivo líquidos probados para la obtención de propágulos fúngicos

Medio	Horas	Con agitación						Sin agitación					
		28° C			37° C			28° C			37° C		
		P	C	B	P	C	B	P	C	B	P	C	B
Adamek	24	++	+	+	++	+	+	-	+++	-	-	++	+
	48	+++	+	+	++	-	+	+	++	+	+	++	+
	72	+++	++	++	+++	+	++	+	++	+	+	+	++
	96	+++	+	++	++	-	+++	+	++	++	+	+	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
DEL	24	NR	NR	NR	+	+++	-	NR	NR	NR	-	+++	-
	48	NR	NR	NR	+++	-	+	NR	NR	NR	-	++	-
	72	NR	NR	NR	+	-	++	NR	NR	NR	+	++	++
	96	NR	NR	NR	++	+	++	NR	NR	NR	+	+	+
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Infusión de papa	24	+	++	-	++	+	+	-	++	-	-	++	+
	48	++	++	+	+++	+	++	-	++	-	-	+	++
	72	++	+	++	+++	+	++	-	+++	-	-	+	+++
	96	+++	+	++	++	++	++	+	+++	+	-	+	+++
	120	+++	++	++	++	++	++	+	+++	+	+	++	+++
Infusión de papa con asparagina	24	NR	NR	NR	+	+++	-	NR	NR	NR	-	+++	-
	48	NR	NR	NR	++	+	+	NR	NR	NR	+	+	+
	72	NR	NR	NR	+++	+	++	NR	NR	NR	-	+	++
	96	NR	NR	NR	+++	-	+	NR	NR	NR	-	+	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Infusión de papa modificado	24	+	++	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+++	-
	48	++	++	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	++	+
	72	++	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	++	+
	96	+++	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	++	+
	120	+++	++	++	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	++	++
Jackson	24	+++	+	+	++	+	+	-	++	+	-	++	+
	48	+++	+	++	+	++	++	-	++	+	+	++	++
	72	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	++	++
	96	++	+	++	+	++	+	+	++	++	+	+	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Paris	24	NR	NR	NR	+	+++	+	NR	NR	NR	-	+++	+
	48	NR	NR	NR	++	+	+	NR	NR	NR	-	+	+
	72	NR	NR	NR	+++	++	+	NR	NR	NR	++	+++	++
	96	NR	NR	NR	+++	++	++	NR	NR	NR	+	++	+
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Vogel	24	++	+	-	NR	NR	NR	-	+++	-	-	+++	+
	48	+++	+	+	NR	NR	NR	-	++	+	-	+++	+
	72	+++	+	+	NR	NR	NR	-	++	+	-	++	+
	96	++	++	++	NR	NR	NR	+	+	++	-	++	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Vogel modificado	24	-	+++	-	-	+++	-	NR	NR	NR	-	+++	-
	48	+	++	-	+	++	+	NR	NR	NR	-	++	-
	72	++	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	-	+	+
	96	++	++	+	++	+	++	NR	NR	NR	-	+	++
	120	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
YG	24	+	++	-	+	++	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	48	++	+	-	++	++	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	72	++	+	-	++	++	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	96	+++	+	+	+++	++	++	NR	NR	NR	NR	NR	NR

* Datos cualitativos para los que se tomó como referencia el aislamiento que produjo en mayor número de estructuras fúngicas.

+ = Número bajo de propágulos fúngicos, ++ = Número medio de propágulos fúngicos, +++ = Número elevado de propágulos fúngicos, - = Sin propágulos y NR = No realizado.

P = pellets

C = conidios

B = blastosporas

TEJES CCN
FALLA DE ORIGEN

Medios de cultivo líquidos

El medio **Adamek**, se ha referido para la producción de esporas sumergidas de *Metarhizium flavoviride* (Stephan & Zimmermann, 1998). Transcurridas 96 h de incubación a 28 °C y con agitación mostró la mayor producción de pelotillas de micelio "pellets", que consisten en una colonia esferoidal desarrollada en un cultivo líquido, particularmente en un cultivo con agitación (Ulloa y Hanlín, 2000) (Fig. 8). La mayor producción de blastosporas fue a 37 °C sin agitación.



Fig. 8. Exterior de un pellet del aislamiento EH-502 a las 72 h, en medio Adamek a 28 °C con agitación.

Medio **DEL**, se ha reportado para la producción de conidios sumergidos (Jenkins & Prior, 1993). En este medio se observó una producción media de blastosporas (Fig. 9) a 37 °C con y sin agitación (72 h de incubación). A 37 °C con agitación se observaron cuerpos hifales (Fig. 10).



Fig. 9. Blastosporas (▲) del aislamiento EH-500 a las 72 h, en medio DEL a 37 °C sin agitación.

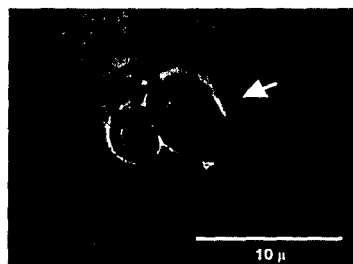


Fig. 10. Cuerpo hifal (▲) del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio DEL a 28 °C con agitación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Infusión de papa, se utilizó como prueba porque en experimentos anteriores se observaron propágulos fúngicos en APD (agar papa dextrosa). Desde las 72 y

hasta las 120 h del experimento se encontró la máxima producción de blastosporas, a 37 °C y sin agitación (Fig. 11).

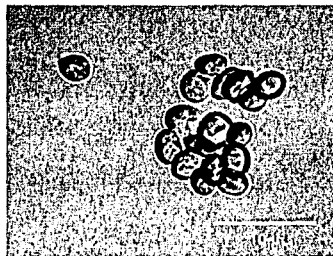


Fig. 11. Blastosporas del aislamiento EH-500 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación.

Infusión de papa con asparagina, esta última ofrece una fuente de nitrógeno que enriquece el medio aumentando así la cantidad de propágulos. En agitación y a 37 °C después de 72 h de incubación se observó la máxima producción de pellets laxos. Los propágulos fúngicos fueron pocos en todas las condiciones probadas.

Infusión de papa modificado, adicionado de glucosa al 4 % para reducir la actividad del agua y favorecer la formación de propágulos fúngicos (Kleespies & Zimmermann, 1992). A 37 °C y sin agitación se encontró una producción media de conidios, que se mantuvo constante desde las 48 hasta las 120 h del experimento. Fueron pocas las blastosporas observadas en las condiciones ensayadas.

Medio de **Jackson**, produce blastosporas tolerantes a la desecación en *Paecilomyces fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997). Se encontró una producción media de conidios y blastosporas a 37 °C con y sin agitación (Fig. 12).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

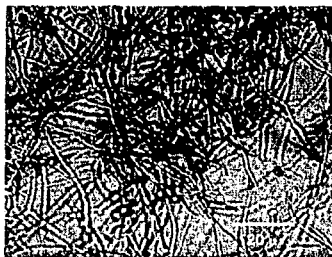


Fig. 12. Micelio y propágulos del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio Jackson a 37 °C sin agitación.

Medio de **Paris**, medio sintético que se ha probado con *Beauveria brogniartii*, en la que se reporta la obtención de blastosporas (Jenkins & Prior, 1993). Este medio mostró a 37 °C con y sin agitación una producción mínima de blastosporas desde las 24 h. Predominaron los conidios desde las 48 hasta las 96 h del experimento.

Medio de **Vogel**, es usado para obtener propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae*. A 28 °C y en agitación se observaron muchos pellets (Fig. 13). La mayor producción de conidios se encontró a 37 °C sin agitación.

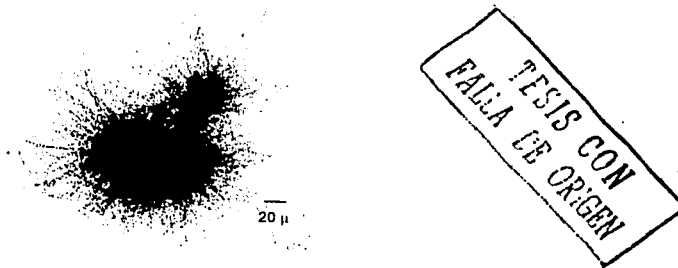


Fig. 13. Pellet del aislamiento EH-500 a las 72 h, en medio Vogel a 28 °C con agitación.

Medio de **Vogel modificado**, se ha reportado para obtener blastosporas de *Beauveria bassiana* (Humphreys *et al.*, 1989). Se obtuvo una producción media de conidios en todas las condiciones probadas y pellets laxos (Fig. 14).

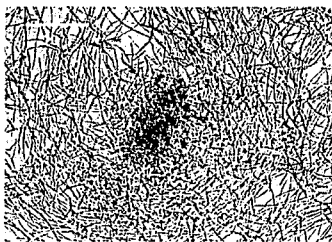


Fig. 14. Pellet laxo del aislamiento EH-500 a las 72h, en medio Vogel modificado a 28 °C con agitación.

El medio **YG**, se ha ensayado para producir propágulos fúngicos en masa de *Beauveria bassiana* (Humphreys *et al.*, 1989). La mayor cantidad de conidios se observó a 37 °C sin agitación, y las blastosporas fueron pocas en las condiciones probadas.

La tabla 7 muestra los resultados cualitativos al ensayar 3 medios de cultivo sólidos. Los medios se probaron a 37 °C con el aislamiento EH-502 de *M. anisopliae* var. *acidum*.

Tabla 7. Crecimiento del aislamiento EH-502 de *Metarhizium. anisopliae*. var. *acidum* en los medios de cultivo sólidos a 37 °C probados para la obtención de propágulos fúngicos

Medio	Horas	Micelio	Pellets	Conidios	Blastosporas
APD	24	+	+	++	+
	48	+	+	+	++
	72	++	+	+	++
	96	++	+	++	+
	120	++	+	++	++
Paris	24	+	+	+	++
	48	++	+	+++	+
	72	++	++	+	+
	96	++	++	+	+
	120	++	+	+	+
Sabouraud	24	+	+	+	+
	48	++	+++	++	+
	72	++	++	+++	++
	96	+	+	+	+
	120	+	+	+	+

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

* Datos cualitativos para los que se tomó como referencia el aislamiento que produjo en mayor número de estructuras.

+ Número bajo de propágulos fúngicos.

++ = Número medio de propágulos fúngicos.

+++ = Número alto de propágulos fúngicos.

Medios de cultivo sólidos

APD, se utilizó porque en experimentos anteriores se observaron propágulos fúngicos. La máxima producción de blastosporas (Fig.15) se encontró entre las 48 y 72 h de incubación a 37 °C.

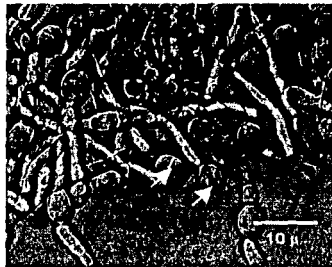


Fig. 15. Estructuras (blastosporas) del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio APD a 37 °C.

El medio **Paris**, es usado para obtener propágulos fúngicos de *Beauveria brogniartii*. A 37 °C, mostró la mayor producción de blastosporas a las 72 h y de conidios a las 48 h (Fig.16).

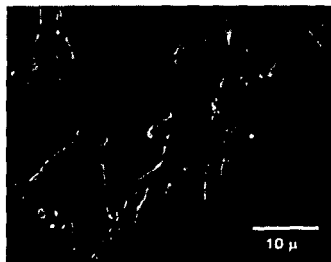
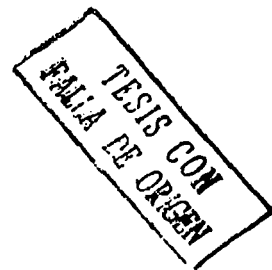


Fig. 16. Micelio y blastosporas del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio Paris a 37 °C.



Sabouraud, se utilizó como prueba, a pesar de que es un medio rico que favorece la formación de micelio. Se encontró la producción máxima de blastosporas a las 48 h de incubación y de conidios a las 72 h (Fig. 17). Dichas producciones fueron inferiores a la mayoría de los medios probados.

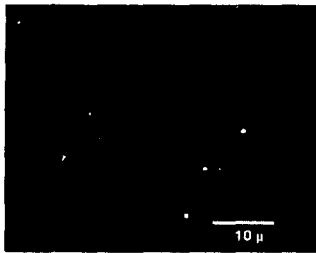


Fig. 17. Blastospora gemando y conidios del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio Sabouraud, a 37 °C.

Condiciones de cultivo probadas

Con respecto a las condiciones de cultivo, se encontró que a 37 °C las blastosporas se observaron más definidas (Fig. 18) y en mayor número que a 28 °C (Fig. 19). Dicha temperatura fue seleccionada para realizar las curvas de crecimiento de los distintos aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

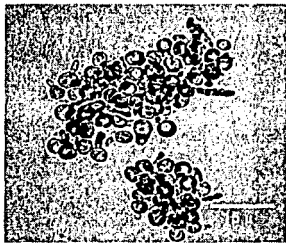


Fig. 18. Blastosporas del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación.

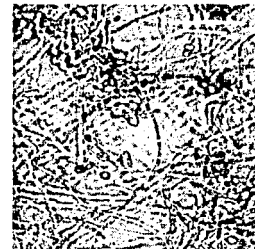


Fig. 19. Propágulos del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 28 °C y 110 rpm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto a la agitación, los aislamientos que se incubaron a 110 rpm mostraron una rápida germinación de los conidios sembrados a las 0 horas (Fig. 20-A). A las 48 h los tubos germinativos empezaron a formar pellets (Fig. 20-B). A las 96 h de incubación predominaron los pellets (Fig. 20-C); únicamente fue posible observar algunas estructuras al exterior de estos (Fig. 20-D). Por lo tanto para obtener y cuantificar blastosporas es preferible el cultivo sin agitación.

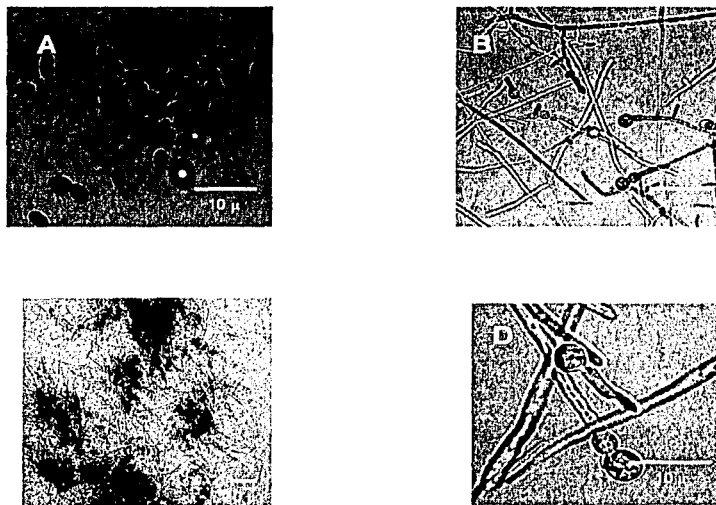


Fig. 20. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio IP a 37 °C con agitación.
 A) Conidios sembrados (0 h), B) Conidios germinando (48 h), C) Pellets (96 h) y
 D) Propágulos apicales al exterior de un pellet (96 h).

El medio líquido infusión de papa (IP), a 37 °C, sin agitación, resultó ser el medio y las condiciones óptimas, para la mayor producción de blastosporas (Fig. 21). Es de bajo costo, requiere de ingredientes accesibles como papa blanca *Solanum tuberosum*, glucosa, agua destilada y es de fácil de preparación.

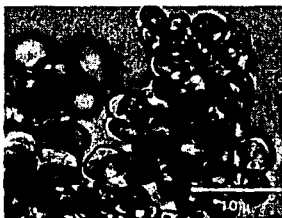


Fig. 21. Blastosporas del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como resultado de la selección del medio de cultivo y condiciones óptimas para la obtención de blastosporas se pudo observar la secuencia de eventos morfológicos del hongo, desde la siembra de conidios hasta la producción de blastosporas, durante 120 h.

En el medio de cultivo líquido IP a 37 °C y sin agitación, los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum* mostraron cambios morfológicos a lo largo de 120 h de incubación. La fig. 22 muestra los eventos ocurridos con el aislamiento EH-502. Conidios de forma elipsoidal sembrados a las 0 h (Fig. 22-A), conidios ensanchándose y algunas blastosporas (Fig. 22-B) a las 24 h, pocos conidios germinan y producen endosporas a las 24 h (Fig. 22-C), blastosporas dividiéndose por fisión binaria (Fig. 22-D) o por gemación (Fig. 22-E). A las 96 h de incubación predominaron las blastosporas (Fig. 22-F); en pocas ocasiones se observaron conidios sumergidos (Fig. 22-G) y cuerpos hifales (Fig. 22-H).

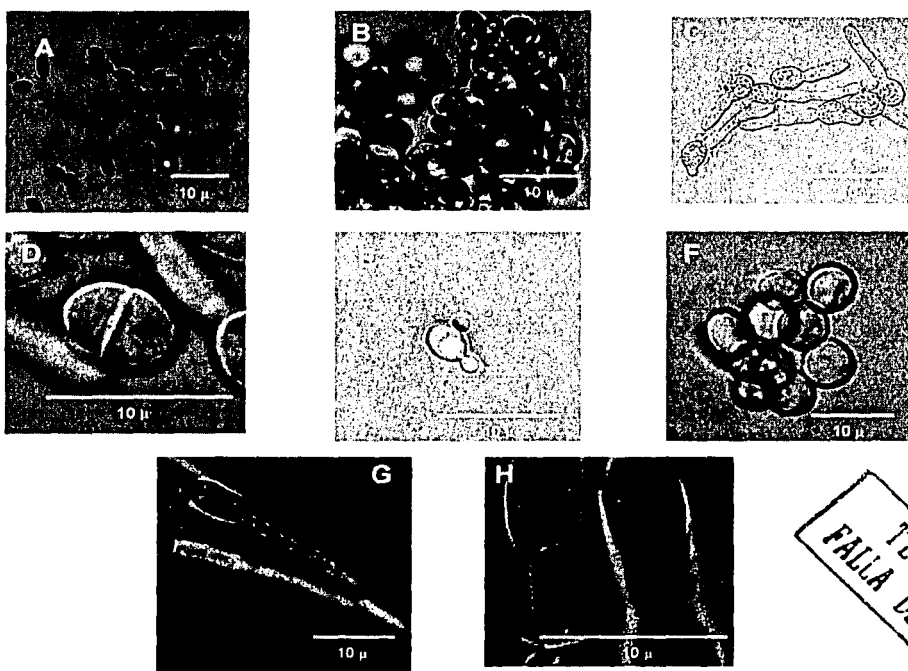


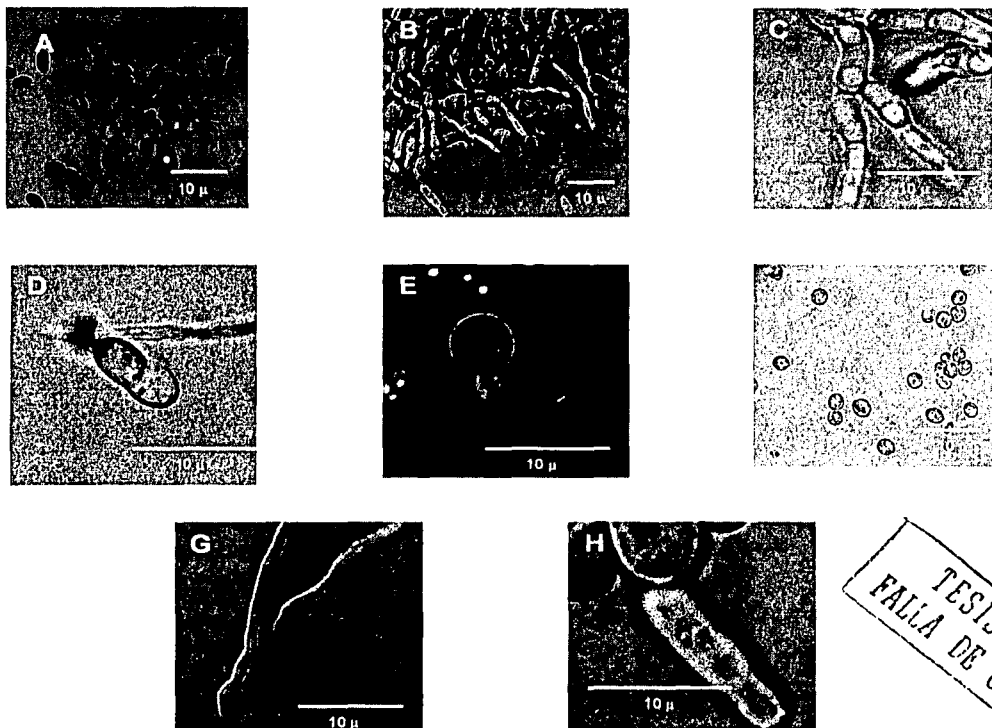
Fig. 22. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio líquido IP a 37 °C sin agitación.

A) Conidios (0h), B) Conidios ensanchados y blastosporas (24 h), C) Conidios germinados produciendo endosporas (24 h), D) Blastospora dividiéndose por fisión binaria (72 h), E) por gemación (48h), F) Blastosporas (96 h), G) Conidio sumergido (96 h) y H) Cuerpos hifales (96 h).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el medio sólido APD a 37 °C y sin agitación, se observaron claramente los diferentes propágulos fúngicos, ya que se eliminan todos los residuos de la

infusión de papa; esto permitió el seguimiento de los cambios morfológicos ocurridos en *M. anisopliae* var. *acidum* durante 120 h de incubación (Fig. 23). A) Conidios elipsoidales (0 h), B) Conidios germinando, C) formación de endosporas, D) blastospora dividiéndose por fisión, E) por gemación. A las 96 h de incubación predominan las blastosporas (F) y pocas veces se observaron conidios sumergidos (G) y cuerpos hifales (H).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 23. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio sólido APD a 37 °C. A) Conidios (0h), B) Conidios germinando, C) Blastosporas formándose por endosporas (24 h), D) por fisión binaria (48 h), E) por gemación (72h), F) Blastosporas (96 h), G) Conidios sumergidos (96 h) y H) cuerpos hifales (72 h).

En el medio de cultivo líquido IP y en el medio de cultivo sólido APD, se observó la misma secuencia de cambios morfológicos para producir conidios sumergidos. La fig. 24 muestra la secuencia para el aislado EH-491 de *M.*

anisopliae var. *acridum*. La zona apical de un tubo germinativo comienza a ensancharse (Fig. 24-A), en el extremo de la hifa se aprecia la forma típica de un conidio (Fig. 24-B) y conidio próximo a desprenderse (Fig. 24-C) así como conidios sumergidos (Fig. 24-D). Este proceso ocurre entre las 48 y 120 h de incubación.

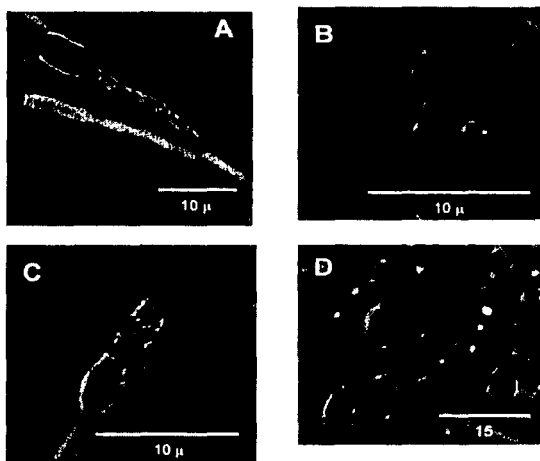


Fig. 24. Formación de conidios sumergidos en el aislamiento EH- 491 en medio IP, 37 °C y sin agitación. A) La zona apical del micelio se empieza a ensanchar, B) El futuro conidio se define y ensancha aún más, C) Conidio sumergido próximo a separarse del micelio, D) Conidios sumergidos.

Determinación de proteínas y carbohidratos en el medio de cultivo seleccionado

El medio de cultivo IP tiene una concentración de proteínas de 1.95 g/L y de carbohidratos de 250 g/L.

Cuantificación de propágulos fúngicos

Cuantificación de blastosporas

El resultado del estudio de la cuantificación de las blastosporas en los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*, se encuentra en la tabla 8 que muestra el número de blastosporas formadas de los diferentes aislamientos a lo largo de 120 h de incubación en el medio IP sin agitación a 37 °C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Tiempo de incubación y producción de blastosporas de 16 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en el medio líquido IP a 37 °C.

Aislado	Tiempo (h) y concentración ($N^{\circ} \times 10^6$ /ml) de blastosporas en <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>				
	24	48	72	96	120
EH-483	0.2	1.1	3.8	6.3	0.7
EH-484	0.2	1.6	1.8	3.8	5.7
EH-486	0.03	0.3	1.8	2.2	3
EH-487	0.03	0.4	5.6	8.6	3.6
EH-488	0	1.5	4.2	2.2	4.2
EH-489	0.1	2.2	2.2	7	3.3
EH-490**	0.3	1	4.6	5.8	6.4
EH-491	0.1	1.2	1.9	5.9	1
EH-493***	0	0.2	2.2	1.8	1.8
EH-494	0.2	1.2	2	5.3	4.2
EH-497	0.3	1.3	2.1	8.6	6
EH-498	0.6	2.6	5.9	9	5.7
EH-499	0.3	1.2	0.7	3.6	4
EH-500	0.3	1.3	2.8	2.7	3.7
EH-502*	4	5.4	6.1	9.3	11
EH-531	0.3	4	3.7	3.3	2.8

* Aislamiento con la mayor producción de blastosporas. ** Aislamiento con la media producción de blastosporas, *** Aislamiento con la menor producción de blastosporas.

El medio se sembró con conidios para obtener una concentración final de 1×10^6 células/ml (0 h). A las 24 h se distinguió el aislamiento EH-502 que mostró el mayor número de blastosporas (concentración de 4×10^6 /ml), en comparación con los aislamientos EH-488 y EH-493 que aún no habían formado blastosporas. Los aislamientos restantes mostraron valores semejantes entre ellos con un rango de 0.03 a 0.6 blastosporas/ml. A las 48 h de incubación los aislamientos EH-502 y EH-531 muestran la mayor concentración de blastosporas; estas concentraciones duplican los valores de los demás aislamientos. En este momento el aislamiento EH-502 mostró la máxima producción de blastosporas. La menor producción de blastosporas para esta hora se observó en el aislamiento EH-493. Los otros trece aislamientos tienen valores que van de 0.3 a 2.6×10^6 blastosporas/ml. Al tercer día de incubación (72 h), EH-502 continua siendo el aislamiento con la mayor concentración de blastosporas de 6.1×10^6 /ml, seguido del aislamiento EH-498 5.9×10^6 /ml. La mayoría de los aislamientos tienen concentraciones por debajo de 4×10^6 /ml, valor que el aislamiento EH-502 mostró tan sólo a 48 h de haber iniciado el experimento. Los aislamientos EH-488 y EH-493 presentaron su máxima producción de blastosporas. La menor concentración se observó en el aislamiento EH-499, con 0.7×10^6 /ml. EH-502 tiene el mayor número de

blastosporas, 9.3×10^6 /ml, a las 96 h de incubación. Siete aislamientos presentaron el pico de producción de blastosporas en este momento, con valores que van de 5.3 a 9×10^6 /ml. La menor concentración correspondió a la del aislamiento EH-493 con 1.8×10^6 /ml. A las 120 h de incubación, el aislamiento EH-502 incrementa el número de blastosporas, hasta llegar a su máxima producción con un valor de 11×10^6 /ml. Cinco aislamientos presentaron la máxima producción de blastosporas, con concentraciones bajas comparadas con las de EH-502, pues van de 3 a 6.4×10^6 /ml, casi la mitad de la concentración de la de EH-502. Ocho aislamientos disminuyen la producción de blastosporas. El aislamiento EH-493 mostró a lo largo del experimento la mínima producción de blastosporas (1.8×10^6 /ml). El análisis de varianza de un solo factor reveló que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) en la producción de blastosporas entre los 16 aislamientos estudiados.

En la tabla 9 se observa el tiempo (h) en que se registraron los valores más altos en la producción de blastosporas para los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* probados.

Tabla 9. Tiempo y concentración de la máxima producción de blastosporas en los 16 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* estudiados en el medio líquido IP a 37 °C

Aislados	Máxima producción de blastosporas en <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	
	Concentración N° X10 ⁶ /ml	Tiempo (h)
EH-483	6.3	96
EH-484	5.7	120
EH-486	3	120
EH-487	8.6	96
EH-488	4.2	72
EH-489	7	96
EH-490**	6.4	120
EH-491	5.9	96
EH-493***	2.2	72
EH-494	5.3	96
EH-497	8.6	96
EH-498	9	96
EH-499	4	120
EH-500	3.7	120
EH-502*	11	120
EH-531	4	48

* Aislamiento con la mayor producción de blastosporas, ** Aislamiento con la media producción de blastosporas, *** Aislamiento con la menor producción de blastosporas.

El aislamiento que reveló la mayor concentración de blastosporas en el menor tiempo en todos los ensayos, fue EH-502 ($9.3 \times 10^6/\text{ml}$ a las 72 h de incubación) (Fig. 25) que aumentó hasta las 120 h del experimento llegando a una concentración de $11 \times 10^6/\text{ml}$.

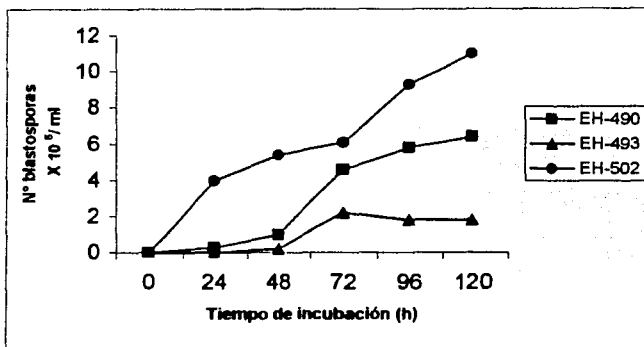


Fig. 25. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* con la máxima, media y mínima producción de blastosporas, durante 120 h de incubación, a 37 °C.

El aislamiento EH-498 a las 72 h mostró la máxima concentración de blastosporas ($9 \times 10^6/\text{ml}$), con un valor muy cercano al que tuvo EH-502 a la misma hora. El aislamiento EH-490, presentó la producción media de blastosporas con un valor de $6.4 \times 10^6/\text{ml}$ (Fig. 25), registrado a las 120 h del experimento. Después de 96 h de incubación, los aislamientos EH-483 y EH-491 también mostraron valores medios en la producción de blastosporas, observando 6.3 y $5.9 \times 10^6/\text{ml}$ respectivamente. A lo largo del experimento, EH-493, se mantuvo como el menor productor de blastosporas (Fig. 25), mostrando la máxima concentración a las 72 h ($2.2 \times 10^6/\text{ml}$), casi cinco veces menor que EH-502. Cabe resaltar que el aislamiento EH-531 fue el primero en llegar a la máxima producción de blastosporas ($4 \times 10^6/\text{ml}$ a las 48 h de incubación), aunque mostró un valor casi tres veces menor al aislamiento que produce más blastosporas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.01$) en el tiempo que ocurre la máxima producción de blastosporas entre los 16 aislamientos *M. anisopliae* var. *acidum* estudiados.

En el anexo 3, se muestran las figuras con la producción de blastosporas ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) en los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* durante 120 h de incubación.

Cuantificación de conidios sumergidos

En la tabla 10 se muestra la producción de conidios sumergidos de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* estudiados durante 120 h de incubación en IP a 37 °C.

Tabla 10. Tiempo de incubación y número de conidios de 16 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en el medio líquido IP a 37 °C

Aislado	Tiempo (h) y concentración ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) de conidios sumergidos en <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>					
	0	24	48	72	96	120
EH-483	15	13	25	14	22	16
EH-484***	25	21	20	15	14	15
EH-486	18	15	18	11	29	16
EH-487	49	48	47	42	65	32
EH-488	15	13	13	11	54	54
EH-489	42	38	46	29	39	24
EH-490	31	27	31	26	34	36
EH-491**	52	48	51	46	34	58
EH-493	24	21	25	17	28	18
EH-494	36	30	24	28	33	17
EH-497	37	34	28	26	38	29
EH-498*	56	53	21	18	73	19
EH-499	47	45	44	32	39	16
EH-500	19	14	12	11	16	23
EH-502***	98	95	55	51	39	40
EH-531	43	39	37	37	32	55

* Aislamiento con la mayor producción de conidios sumergidos, ** Aislamiento con la media producción de conidios sumergidos, *** Aislamiento con la menor producción de conidios sumergidos.

Es importante mencionar que la máxima producción de conidios sumergidos se tomó en cuenta a partir de que cada aislamiento aumentó la concentración de conidios. Este periodo fue variable entre los 16 aislamientos. Transcurridas 48 h de incubación, se distinguió el aislamiento EH-483 por presentar la mayor concentración de conidios, aumentando a $25 \times 10^6/\text{ml}$. Todos los aislamientos disminuyen el número de conidios a las 72 h de haber iniciado el experimento, con excepción del aislamiento EH-494 que aumentó a $28 \times 10^6/\text{ml}$. Después de 96 h de haber iniciado el experimento, el aislamiento EH-498 fue el que presentó la mayor producción de conidios sumergidos con $73 \times 10^6/\text{ml}$. Aunque EH-488

también mostró un valor significativo en la producción de conidios sumergidos de $54 \times 10^6/\text{ml}$. Algunos aislamientos aumentaron considerablemente la producción de conidios, entre ellos, EH-487 ($65 \times 10^6/\text{ml}$), EH-488 ($54 \times 10^6/\text{ml}$), y EH-531 ($55 \times 10^6/\text{ml}$). Finalmente a las 120 h de incubación la mayoría de los aislamientos disminuyen la producción de conidios sumergidos, como EH-487 y EH-498 de 32 y $19 \times 10^6/\text{ml}$ respectivamente. El único aislamiento que a esta hora mostró un notable aumento fue EH-491 a $58 \times 10^6/\text{ml}$. El análisis estadístico de un solo factor mostró diferencias significativas ($P < 0.01$) en la producción de conidios sumergidos para los 16 aislamientos estudiados de *M. anisopliae* var. *acidum*, a lo largo de 120 h de incubación en IP a 37°C .

La tabla 11 muestra los valores más altos (considerados a partir de las 48 h de incubación) en la producción de conidios sumergidos para los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum* estudiados.

Tabla 11. Concentración y tiempo de máxima producción de conidios sumergidos en 16 aislamientos estudiados de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en el medio líquido IP a 37°C

Aislados	Máxima producción de conidios sumergidos en <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	
	Concentración $\text{N}^\circ \times 10^6/\text{ml}$	Tiempo (h)
EH-483	25	48
EH-484***	15	120
EH-486	29	96
EH-487	65	96
EH-488	54	96
EH-489	39	96
EH-490	36	120
EH-491**	58	120
EH-493	28	96
EH-494	33	96
EH-497	38	96
EH-498*	73	96
EH-499	39	96
EH-500	23	120
EH-502***	40	120
EH-531	55	120

* Aislamiento con la mayor producción de conidios sumergidos.

** Aislamiento con la media producción de conidios sumergidos.

*** Aislamiento con la menor producción de conidios sumergidos.

El aislamiento que mostró la máxima producción de conidios en el menor tiempo fue EH-498 con un valor de 73×10^6 a las 96 h de incubación (Fig. 26). Dicho valor supera a la mayoría de los aislamientos estudiados, ya que el siguiente en la máxima producción fue EH-488 con 54×10^6 conidios sumergidos/ml. El análisis de varianza de un solo factor realizado a los datos muestra diferencias significativas ($P < 0.01$) en el tiempo en que se produce la máxima cantidad de conidios en los diferentes aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*.

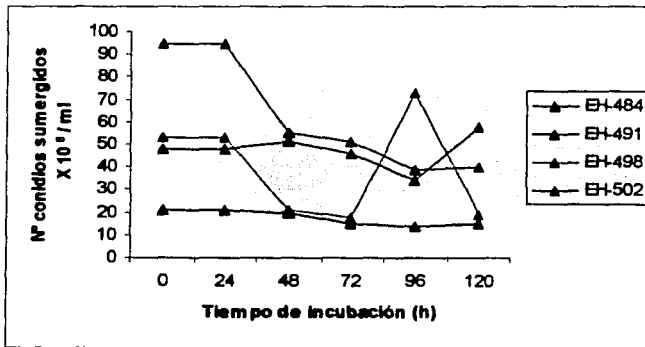


Fig. 26. Aislamientos de *Metarthizium anisopliae* var. *acidum* con la máxima, media y mínima producción de conidios sumergidos, durante 120 h de incubación, a 37 °C.

La producción media de conidios se observó en el aislamiento EH-491 (58×10^6 conidios/ml). Trece de los 16 aislamientos presentaron valores por debajo de este último. Es importante mencionar que a esta hora (96 h) la mayoría de los aislamientos mostraron su máxima producción de conidios. Los aislamientos EH-502 y EH-484 presentaron una mínima producción de conidios con un valor de 40 y 15×10^6 células/ml respectivamente (120 h).

Durante los ensayos con todos los aislamientos se observaron diferentes morfologías como se describió con anterioridad. Sin embargo, se observó un fenómeno interesante en algunos aislamientos. Al comparar la producción de conidios sumergidos en el aislamiento que produce el mayor número de

blastosporas, se observó que a medida que aumenta el número de blastosporas disminuye el número de conidios (Fig. 27).

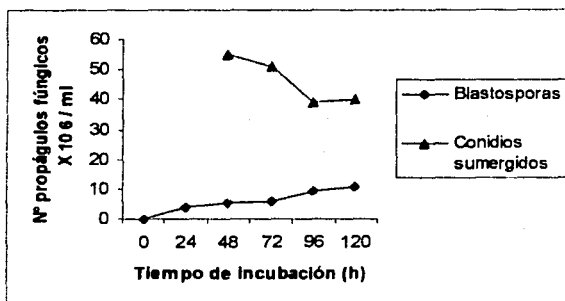


Fig. 27. Comparación de la producción de blastosporas y conidios sumergidos en el aislamiento EH-502 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante 120 h de incubación.

Cuando se comparó la producción de blastosporas con la de conidios sumergidos, en el aislamiento que exhibió el mayor número de conidios sumergidos, se encontró un gran aumento en el número de conidios sumergidos en comparación con el de las blastosporas (Fig. 28).

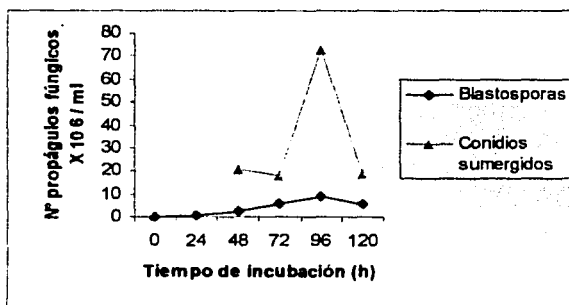


Fig. 28. Comparación de la producción de conidios sumergidos y blastosporas en el aislamiento EH-498 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante 120 h de incubación.

Tamaño de propágulos fúngicos en medio IP y APD

Por otro lado la tabla 12 muestra el tamaño (largo y ancho en μm) de los distintos propágulos fúngicos encontrados en los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* estudiados. De acuerdo a las estructuras observadas en todos los

medios ensayados, se observaron conidios de forma elipsoidal de aproximadamente $5.46 \times 3.83 \mu\text{m}$, conidios sumergidos de forma elipsoidal de $2.97 \times 5.35 \mu\text{m}$, blastosporas globosas de aproximadamente $6.61 \times 9.84 \mu\text{m}$ y muy pocos cuerpos hifales de forma alargada con mayor grosor que una hifa (Tabla 12). El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas ($P = 0.01$) en cuanto al tamaño de los propágulos en los diferentes aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*, ni en los propágulos obtenidos en medios de cultivo líquido y sólido ensayados.

Tabla 12. Tamaño (μm) de blastosporas y conidios en aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en medio IP y APD.

		Medio APD		Medio APD	
Blastosporas	Largo(μm)	2.89 (± 0.09)* - 3.84 (± 0.79)	2.72 (± 0.03) - 3.28 (± 0.034)		
	Ancho(μm)	2.68 (± 0.06) - 3.33 (± 0.03)	2.58 (± 0.03) - 3.17 (± 0.04)		
Conidios	Largo(μm)	1.39 (± 0.03) - 2.09 (± 0.058)	1.58 (± 0.03) - 1.99 (± 0.001)		
	Ancho(μm)	1.16 (± 0.01) - 1.44 (± 0.03)	1.24 (± 0.06) - 1.51 (± 0.02)		

* = media \pm desviación estándar. Para cada aislado se midieron 15 estructuras.

IX. DISCUSIÓN

Ante la necesidad de proteger la calidad del ambiente, el reto es desarrollar estrategias para el control de plagas de importancia económica, que tengan bajo impacto ambiental negativo y efectividad en el control de la plaga. Entre estas estrategias se encuentra la utilización de agentes microbianos en el control biológico de plagas. El entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* actualmente se emplea para controlar poblaciones de langosta y saltamontes en África (la cepa IMI-330189 en "Green Muscle"®) (Jenkins *et al.*, 2001) y en Australia (la cepa FI-985 en "Green Guard"®) (Milner, 2002 a; 2000 b).

En México, se requiere un agente microbioal autóctono para controlar la langosta *S. piceifrons* ssp. *piceifrons*. En la selección de un agente microbioal deben considerarse varios factores, entre ellos, la virulencia hacia el insecto, especificidad de hospederos, producción masiva de esporas (para aplicar dosis suficientes en el campo), etc. (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997). Por ello, la relevancia de la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* en México.

El ingrediente activo de un agente microbioal son los conidios (Bowers, 1982; Hernández-Velázquez *et al.*, 1997). En medio de cultivo sólido, la mayoría de los hongos producen conidios aéreos y en cultivo líquido blastosporas, lo que es el fenómeno del dimorfismo. Varios hongos mitospóricos también producen conidios en cultivo sumergido (Hildebrand & McCain, 1978; Lascaris & Deacon, 1994). El método más económico empleado para la producción en masa de propágulos fúngicos de los entomopatógenos, es el difásico, donde micelio y blastosporas son producidas en cultivo líquido por periodos cortos y posteriormente transferidos a un sustrato sólido para la producción de conidios aéreos (Samsinakova *et al.*, 1981; Bartlett & Jaronski, 1988; Vimala, 1994; Hedgecock *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1998). Esto permite un rápido crecimiento del hongo y disminución en el tiempo y costo de producción, relevante para la empresa comercial.

Para optimizar el proceso de producción en masa de un hongo, deben considerarse los requerimientos óptimos de nutrientes, pH, actividad del agua,

sustrato, temperatura, luz, agitación, aereación y período de incubación (Bartlett & Jaronski, 1988; Jenkins *et al.*, 1998; Kleespies & Zimmermann, 1992; Deshpande, 1999). Los medios de cultivo líquido y sólido evaluados en los ensayos preliminares de nuestro trabajo, están reportados para la producción de propágulos en diferentes hongos entomopatógenos.

Los resultados preliminares de este estudio revelaron que todos los medios de cultivo probados con agitación, muestran gran cantidad de "pellets", especialmente los adicionados con extracto de levadura. Estos son considerados medios ricos en nutrientes que promueven la fase vegetativa de crecimiento micelial del hongo (Adamek, 1983). Varios autores obtienen gran producción de pellets y algunos reportan que la adición de Tween 80 y PEG 200 suprime la formación de estos (Inch *et al.*, 1986; Inch & Trinci, 1987; Humphreys *et al.*, 1989; Jackson & Cliquet, 1995; Fargues *et al.*, 2001). Klesspies & Zimmerman (1992) también reportaron incremento en la producción de blastosporas y disminución en la formación de pellets con el PEG. En nuestro caso, al agregar Tween 80 y PEG 200 los pellets no disminuyeron en número pero fueron menos compactos; esto presumiblemente porque la variedad del hongo y las condiciones de agitación probadas fueron distintas a las reportadas por otros investigadores, por ejemplo, 200 rpm (Inch *et al.*, 1986), 180 rpm (Klesspies & Zimmerman, 1992; Stephan & Zimmermann, 1998), 90 rpm (Fargues *et al.*, 2001), en comparación a 110 rpm que usamos para este trabajo.

Otras estructuras encontradas en gran cantidad en los resultados preliminares, fueron los conidios sumergidos en el medio de cultivo DEL con caseína hidrolizada. Braga *et al.* (1999) también encontraron conidios sumergidos con caseína hidrolizada y sugieren que puede ser debido a que este reactivo acelera la germinación e incrementa la tasa de crecimiento, así el hongo puede usar fácilmente los aminoácidos producidos por hidrólisis, que constituyen gran parte de la cutícula del insecto (proteínas y quitina). Esta propiedad de hidrólisis de péptidos representa una adaptación fisiológica de los entomopatógenos según diversos autores (St. Leger *et al.*, 1986 y 1987; Andersen *et al.*, 1995). Los hongos que atacan insectos, utilizan efectivamente enzimas extracelulares que degradan

la cutícula, como proteasas (PR1 y PR2), quitinasas y lipasas (Charnley & St. Leger, 1991), implicadas en la virulencia del hongo.

Metarhizium anisopliae var. *acidum* produce el mayor número de propágulos sumergidos en el medio líquido IP que contiene glucosa. Por lo tanto, puede ser la fuente de carbono elegida para la producción de blastosporas a gran escala (Inch *et al.*, 1986). Este fenómeno de mayor producción de blastosporas en medios con glucosa también se ha visto en *P. fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997).

Kleespies & Zimmermann (1992) y Deshpande (1999) mencionan que la temperatura y el pH son importantes parámetros de producción de propágulos. Con respecto al pH los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con las observaciones hechas por Vega *et al.* (1997) donde el pH no es un factor decisivo en la producción de propágulos. En relación a la temperatura, el rango reportado para una buena esporulación en sustrato líquido de *M. anisopliae* var. *acidum*, es entre 25 y 28 °C. En este trabajo encontramos que la temperatura óptima para la producción de propágulos en medio líquido es 37 °C. El fenómeno de obtención de propágulos sumergidos a 37 °C, es la primera vez que se describe para este hongo. Probablemente está relacionado con el hospedero, en este caso, las langostas, ya que son capaces de aumentar su temperatura hasta 42 °C por exposición al sol dentro de su ciclo biológico (SAGAR, 2000). Ouedraogo *et al.* (2002), mencionan que durante la exposición a la luz solar, la temperatura corporal de una langosta infectada puede aumentar hasta 46 °C. Estos autores sugieren que la termorregulación puede inducir la síntesis de proteínas en la hemolinfa del insecto, que le ayudan a reducir la infección por el hongo y también pudiera inhibir el crecimiento de *Metarhizium* reduciendo su eficacia (Scanlan *et al.*, 2001).

Poco se conoce de la morfología y los factores que regulan el desarrollo de los hongos entomopatógenos, especialmente en relación a la fase de levadura de hongos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* (Alves *et al.*, 2002). En la mayoría de trabajos publicados para producción de propágulos fúngicos, no se describen claramente los propágulos encontrados, razón por la que se ha generado una gran confusión con respecto a estas

estructuras. Es hasta el año 2001 en Fargues *et al.* donde se muestran fotografías de las estructuras que ellos denominan blastosporas. En este trabajo, se tomaron fotos de todas las estructuras que se observaron en los diferentes medios de cultivo, y se denominaron de acuerdo a la nomenclatura micológica (Ulloa y Hanlin, 2000). Entre ellas están los conidios sumergidos, blastosporas dividiéndose por endosporas, por fisión binaria y por gemación, cuerpos hifales, clamidosporas apicales e intercalares que se pueden ver en la figura 7.

Se ha reportado que entre 24 y 28 °C en medio sólido los propágulos que se observan son cadenas de conidios enteroblásticos en sucesión basípeta de fiálides elongadas (Jenkins & Prior, 1993; Jackson *et al.*, 1997; Fargues *et al.*, 2001). En comparación, en medio de cultivo líquido, a temperaturas menores de 30°C se obtienen blastosporas y cuerpos hifales, derivados generalmente por un proceso de gemación hifal o alternativamente hifas que se ensanchan para formar cadenas de células semejantes a levaduras (Inch *et al.*, 1986; Kleespies & Zimmerman, 1992; Jenkins & Prior, 1993; Jackson *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1998; Stephan & Zimmerman, 1998; Fargues *et al.*, 2001).

En un hongo patógeno del hombre, *Sporothrix schenckii*, la transición de hifa a levadura puede ser de dos formas: 1) por formación de levaduras o blastosporas en los septos de las hifas ramificadas y 2) por formación de estructuras parecidas a oidios, seguidos de la fragmentación hifal que da lugar a células levaduriformes (Garrison, 1985; Maresca & Kobayashi, 1989). Garrison, (1985) confirmó esta descripción con microscopía electrónica de barrido y transmisión. En el actual trabajo se utiliza el término de endospora (Ulloa y Hanlin, 2000) para referirnos a la formación de blastosporas por oidios reportados por Garrison (1985).

Los resultados de este trabajo sobre crecimiento y producción de propágulos sumergidos en los 16 aislados de *M. anisopliae* var. *acidum*, muestran una gran variación en el crecimiento y la forma de los propágulos fúngicos. El número de propágulos varió significativamente ($P < 0.01$) de acuerdo al aislamiento y a las condiciones de cultivo usadas. La diferenciación celular encontrada también varió de manera considerable, ya que los cambios morfológicos ocurren a diferentes tiempos en los aislamientos estudiados.

La concentración más alta de blastosporas y de conidios encontradas, están dentro de las reportadas para propágulos fúngicos sumergidos (Inch *et al.*, 1986; Kleespies & Zimmerman, 1992). La alta producción de blastosporas en el aislamiento EH- 502 puede deberse en parte al hecho de que este aislamiento no forma "pellets".

El tamaño de los conidios de los aislamientos estudiados se encuentra dentro del rango reportado para *Metarhizium* (Jenkins & Prior, 1993; Driver *et al.*, 2000). Concuerda con los tamaños propuestos por Driver *et al.* (2000) para la variedad *acridum* y la variedad *flavoviride*. Este es el primer estudio donde se reporta el tamaño de las blastosporas (6.61 X 9.84 μm), por lo tanto no hay ningún dato numérico para comparar.

Es interesante notar que el aislamiento EH-502 (MaPL40) que produjo la mayor cantidad de blastosporas, es el mismo reportado por Hernández-Velázquez *et al.* (1997, 2000) como el más virulento para la langosta, en bioensayos de invernadero. Por otro lado, el aislamiento EH-498 (MaPL31) que se encontró como el que produjo la mayor cantidad de conidios sumergidos en las condiciones estudiadas, es uno de los aislados con virulencia media hacia la langosta, de acuerdo a los bioensayos en invernadero llevados a cabo por Cano (2003).

El conocimiento de la fase de levadura puede proveer señales para el uso más eficiente de los hongos entomopatógenos, con implicaciones en la producción en masa, uso en programas de control microbial y en estudios de virulencia.

Este trabajo contribuye de manera importante al conocimiento de las condiciones básicas de producción de propágulos fúngicos de aislados de México, que pueden incidir en la selección de un aislado particular como agente microbiano para el control biológico de la langosta, tomando en consideración también otros parámetros básicos (virulencia) que aunados a estos resultados llevarían a una selección segura del aislamiento en cuestión.

El fenómeno de dimorfismo a 37 °C encontrado para *M. anisopliae* var. *acridum* por primer vez en este trabajo, propició que la autora quisiera profundizar en el tema, el cual es actualmente su proyecto de investigación en la maestría.

X. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo líquido infusión de papa (IP), es el óptimo para la producción de blastosporas, por ser el que mostró la mayor producción, el más económico y de fácil preparación.
- El medio de cultivo líquido DEL, resulto ser el óptimo para la producción de conidios sumergidos.
- Las condiciones seleccionadas para obtener el mayor número de blastosporas son: 37 °C, sin agitación.
- Los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*, mostraron diferencias significativas ($P < 0.01$) en el tiempo y concentración en que se producen los propágulos fúngicos.
- El aislamiento EH-502 (MaPL40) es el mayor productor de blastosporas.
- El aislamiento EH-498 (MaPL31) es el mayor productor de conidios.
- El mayor productor de blastosporas, es también el menor productor de conidios. En este aislamiento el número de blastosporas es inversamente proporcional al de los conidios.
- En los 16 aislamientos estudiados, no existieron diferencias significativas ($P > 0.01$) en el tamaño de los conidios.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- **Adamek, L.** 1983. Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiol* **10**: 225-257.
- **Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A. & Pereyra, R. B.** 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J Invertebr Pathol* **81**: 70-77.
- **Alves, S. B. & Pereira, R. M.** 1989. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in plastic trays. *Ecossistema* **14**:188-192.
- **Andersen, S. O., Hojrup, P. & Roepstorff, P.** 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem Mol Biol* **26**: 153-176.
- **Anónimo.** 1995. Potential markets for biological pest control in Mexico.
- **Antía-Londoño, O. P., Posada-Florez, F., Bustillo-Pardey, F. & González-García, M. T.** 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Cenicafé Avances Técnicos* **182**: 188-192.
- **Aquino, M. L. N., Vital, A. F., Cavalcanti, V. L. B. & Nascimento, M. G.** 1977. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin en sacos de polipropileno. *Bol Téc CODECAP* **5**: 7-11.
- **Astacio, C. O.** 1995 a. Las langostas voladoras que causan daños a los cultivos y especies forestales existentes en Centroamérica. OIRSA. Managua, Nicaragua.
- **Astacio, C. O.** 1995 b. Nuevas alternativas de la lucha antiacridiana. Vigilancia Antiacridiana Regional. Nota informática 01. OIRSA. Managua, Nicaragua.
- **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. & Milner, R. J.** 2001. Uso actual y potencial de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* para el control biológico de acridoideos en América

- Latina, p. 43-48. *In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker.* SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Barrientos, L. L., Cabrera, O. A., Bonilla, F. A. & Martínez, O. P.** 1992. Manual Técnico sobre la langosta voladora (*S. piceiforms* Walker, 1870) y otros Acridoideos de Centro América y Sureste de México. FAO, OIRSA.
 - **Bartlett, M. C. & Jaronski, S. T.** 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. *In: Burgess, M.N. (ed) Fungi in biological control systems.* Manchester University Press, Manchester, UK. pp. 61-85.
 - **Bateman, R.** 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook Agric* **26** (1): 13-18.
 - **Bowers, R. C.** 1982. Commercialization of microbial biological control agents, pp. 157-173. *In: Charudattan, R. & H. L. Walker (eds.), Biological control of weeds with plant pathogens.* Jonh Wiley & Sons, Inc. New York.
 - **Braga, J. U. L., Destéfano, R. H. R. & Messias, C. L.** 1999. Oxigen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *J Invertebr Pathol* **74**: 112-119.
 - **Cano, R. C.** 2003. Caracterización genotípica de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* por medio de RAPD-PCR y determinación *in vitro* de su virulencia en langosta (Orthoptera: Acrididae). Tesis de Maestría de la Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F., México.
 - **Cano, R. C., García, G. K., Hernández, V. M., Berlanga, A. M. & Toriello, C.** 2002. Diferencia en la virulencia de cultivos monospóricos de aislados de México de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en la langosta *Schistocerca piceifrons*, p. 407. *In: Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología.* Guzmán, G., & G. Mata (eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México.
 - **Charnley, A. K. & St. Leger, R. J.** 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *In: Cole, G. T. & Hoch, H. C. (eds.), The fungal spore and disease|. Initiation in plants and animals.* Plenum Press, New York, pp. 267-283.

- **Deshpande, M. V.** 1999. Mycopesticide production by fermentation: Potencial and challenges. *Critic Rev Microbiol* **25**: 229-243.
- **Domsch, K. H. & Gams, W.** 1993. Compendium of soil fungi. Traute-Heidi Anderson. Vol. I. p. 413.
- **Douglas, G. I., Guke, G. M., Kawchuk, L. M. & Goettel, M. S.** 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol Contr* **14**:111-120.
- **Douglas, G. I. & Goettel, M. S.** 2001. Development of hyphomycetes for control of grasshoppers in Canada, p. 31. *In*: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Driver, F., Milner, R. J. & Trueman, J. W. H.** 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* **104**:134-150.
- **Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F.** 1951. Colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**: 167.
- **Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G. & Quimby, P.** 2001. Effect of liquid cultura media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* **154**: 127-138.
- **Feng, M. G., Poprawski, T. J. & Khachatourians, G. G.** 1994. Production, formulation and application of the entomo-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol* **4**: 3-34.
- **Garrison, G. R.** 1985. Cytological and ultrastructural aspects of dimorphism. *In*: Fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans. Szaniszlo, J. P. & L. J. Harris (Eds.). Plenum Press, New York. pp 15-47.
- **Goettel, M. S., Johnson, D. L. & Inglis, S. D.** 1995. The role of fungi in the control of grasshoppers. *Can J Bot* **73**:71-75.

- **Grimm, C.** 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protec* **20**: 623-630.
- **Hajek, A. E. & St. Leger, R. J.** 1994. Interactions between fungal pathogen and insect hosts. *Ann Rev Entomol* **39**: 293-322.
- **Harvey, A. W.** 1983. *Schistocerca piceifrons* (Walker) (Orthoptera: Acrididae), the swarming locust of tropical America: *Rew Bull Ent Res* **73**: 171-184.
- **Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. & Pegler, D. N.** 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th edition. Wallingford, UK. CAB INTERNATIONAL, 616 pp.
- **Hedgecock, S., Moore, D., Higgins, P. M. & Prior, C.** 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Sci Technol* **5**: 371-377.
- **Hernández-Velázquez, V. M.** 2001. Estrategia de control biológico *Schistocerca piceifrons* Walker, p. 16. In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga, A. M. & Garza, E. G.** 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. & Berlanga, A.** 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. In: Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Entomología. Acapulco, Gro., 24 al 27 Mayo.
- **Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga, A. M. & Barrientos, L.** 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.

- **Hildebrand, D. C. & McCain, A. H.** 1978. The use of various substrates for large scale production of *Fusarium oxysporum* .f. sp. *cannibis* inoculum. *Phytopathology* **68**: 1099-1101.
- **Humphreys, A. M., Matewale, P. A., Trinci, P. I. & Gillesme, A. T.** 1989. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-bach culture. *Mycol Res* **92**: 257-264.
- **Inch, J. M. M. & Trinci, A. P.** 1987. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J Ger Microbiol* **133**: 247-252.
- **Inch, J. M. M., Humphreys, A. & Trinci, A. P.** 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans Br Mycol Soc* **87**: 215-222.
- **Jackson, M. A. & Cliquet, S.** 1995. Effect of the relative humidity of air-drying on survival of liquid culture produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. Proceedings of 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Ithaca, N Y, p. 30.
- **Jackson, M. A., Mcguire, M. R., Lacey, L. & Wraight, S. P.** 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res* **101**: 35-43.
- **Jenkins, N. E. & Prior, C.** 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol Res* **97**:1489-1494.
- **Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J. & Lomer, C. J.** 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia of mitosporic fungi for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform* **19**: 21N-31N.
- **Jenkins, N. E., Bateman, R. & Thomas, M. B.** 2001. The Lubilosa programme: Development of a mycoinsecticide for locust and grasshopper control, p. 24. *In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Mer., Octubre 2-5.

- **Kleespies, R.G. & Zimmermann, G.** 1992. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. *Biocont Sci Technol* **2**: 127-135.
- **Lascaris, D. & Deacon, J. W.** 1994. *In vitro* growth and microcycle conidiation of *Idriella bolleyi*, a biocontrol agent of cereal pathogens. *Mycol Res* **98**: 1200-1206.
- **Lomer, C. J., Bateman, R. P., Dent, D., Douro-Kpindou, O. K., Kooyman, C., Langewald, J., Ouambama, Z., Peveling, R. & Thomas, M.** 1999. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agric Forest Entomol* **1**: 71-88.
- **Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. & Thomas, M.** 2001. Biological Control of Locusts and Grasshoppers. *Annu Rev Entomol* **46**: 667-702.
- **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- **Magalhães, B. & Faria, M.** 2001. The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil, p. 37. In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Magalhães, B., Faria, M. & Tigano, M.** 2002. The use of entomopathogenic fungi to control insect pests in Brazil, p. 160. In: Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología. Guzmán, G., & G. Mata (eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México.
- **Maresca, B. & Kobayashi, G.** 1989. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Rev Microbiol* **53**: 186-206.
- **Milner, R. J.** 1997. *Metarhizium flavoviride* (F1985) as a promising mycoinsecticide for Australian acridids. *Mem Entomol Soc Can* **171**: 287-300.

- **Milner, R. J.** 2002 a. Fungal biopesticides based on *Metarhizium*—promise and fulfilment, p. 161. *In: Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología.* Guzmán, G., & G. Mata (eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, México.
- **Milner, R. J.** 2002 b. Green Guard. *Biopesticides* 20-24 p.
- **Moore, D. & Prior, C.** 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News Inform* 145:31N-40N.
- **Ouedraogo, R. M., Kamp, A., Goettel, M. S., Brodeur, J. & Bidochka, M. J.** 2002. Attenuation of fungal infection in thermoregulating *Locusta migratoria* is accompanied by changes in hemolymph proteins. *J Invertebr Pathol* 81:19-24.
- **Overseas Development Natural Resources Institute.** 1988. Locust Handbook. 2nd edition, published by ODNRI, London, U.K.
- **Pereyra, C. E.** 2001. Métodos de combate de *Schistocerca piceifrons* Walker, p. 6. *In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Prior, D., Lomer, C. J., Herren, H., Paraiso, A., Kooyman, C. & Smith, J. J.** 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.
- **Ramírez, S. C., Sánchez, H. M. & Rodríguez, Q. M.** 2001. Campaña contra la langosta en México, p. 9. *In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5.
- **Rombach, M. C., Humber, R. A. & Roberts, D. W.** 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., Humber, R. A. & Evans, H. C.** 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers. *Trans Br Mycol Soc* 88: 451-459.
- **SAGAR.** 2000. Manejo integrado de langosta y chapulín. Sagar, México D.F.

- **SAGARPA.** 2001. *In*: Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. 2-5 Octubre, Mérida, Yuc., México.
- **Samsinakova, A., Kalalova, S., Vlcek, V. & Kybal, J.** 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J Invertebr Pathol* **38**:169-174.
- **Samson, R. A., Evans, H. C. & Latgé, J. P.** 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, The Netherlands.
- **Scanlan, J. C., Grant, W. E., Hunter, D. M. & Milner, R. J.** 2001. Habitat and environmental factors influencing the control of migratory locusts (*Locusta migratoria*) with an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*). *Ecol Modelling* **136**: 223-236.
- **Stephan, D. & Zimmermann, G.** 1998. Development of a Spray-drying technique for submerged spores of entopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Technol* **8**: 3-11.
- **St Leger, R. J.** 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can J Bot* **73** (Suppl. 1): S1119-S1125.
- **St Leger, R. J., Cooper, R. M. & Charnley, A. K.** 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation *in vitro* from entomopathogens. *J Invertebr Pathol* **47**: 167-177.
- **St Leger, R. J., Charnley, A. K. & Cooper, R. M.** 1987. Characterisation of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* **253**: 221-232.
- **Tulloch, M.** 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans Br Mycol Soc* **66**: 407-411.
- **Trujillo, G. P.** 1975. El problema de la langosta *Schistocerca paranensis*. *Sociedad de Geografía y Estadística de Baja California*. Tijuana, B. C.
- **Ulloa, M. & Hanlin, T. R.** 2000. Illustrated Dictionary of Mycology. APS Press, St. Paul, Minnesota. P. 283.
- **Vega, F. E., Dowd, P. F., McGuire, M. R., Jackson, M. A. & Nelsen, T. C.** 1997. *In Vitro* effects of secondary plant compounds on germination of

blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Invertebr Pathol* **70**: 209-213.

- **Vimala, D.** 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. *J Invertebr Pathol* **63**: 145-150.

XII. ANEXOS

Anexo I. Tiempo (h) y número de blastosporas ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) de 15 muestras de los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* durante 120 h de incubación.

EH-483	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	0	4	41	2
	2	1	2	6	12	2
	3	0	2	6	12	0
	4	0	0	4	12	0
	5	0	2	12	12	2
	6	0	2	6	12	4
	7	0	3	12	12	2
	8	0	3	4	12	0
	9	1	3	10	8	0
	10	0	3	10	12	2
	11	1	3	8	12	0
	12	0	2	8	6	2
	13	0	2	8	12	2
	14	0	3	8	8	0
	15	3	4	10	7	3

EH-484	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	2	4	8	10
	2	1	0	4	4	14
	3	0	2	6	8	12
	4	1	0	4	10	8
	5	1	4	4	8	12
	6	1	4	2	8	10
	7	1	4	0	6	10
	8	1	2	0	8	20
	9	1	2	9	8	22
	10	0	6	4	6	4
	11	0	4	2	10	2
	12	0	10	6	10	16
	13	1	2	2	6	10
	14	0	6	4	6	12
	15	0	2	4	8	10

EH-486	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	0	4	2	8
	2	0	0	8	6	4
	3	0	0	8	8	8
	4	0	0	4	0	2
	5	0	0	4	0	4
	6	0	0	4	4	4
	7	0	1	2	4	8
	8	0	0	4	6	6
	9	0	0	4	6	10
	10	0	0	2	8	6
	11	1	2	4	4	6
	12	0	1	0	4	4
	13	0	1	4	6	6
	14	0	3	2	4	8
	15	0	1	0	4	6

EH-487	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	2	14	28	4
	2	0	0	20	25	10
	3	0	0	14	16	2
	4	0	0	0	9	4
	5	0	2	16	19	8
	6	0	0	20	25	6
	7	0	2	6	15	4
	8	0	0	14	10	4
	9	0	0	8	10	10
	10	0	0	6	20	10
	11	0	0	16	18	8
	12	0	2	6	15	10
	13	0	4	14	18	10
	14	0	0	6	12	10
	15	1	0	8	19	10

EH-488	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	0	6	4	4
	2	0	2	12	2	14
	3	0	6	6	0	12
	4	0	0	6	4	14
	5	0	8	14	8	12
	6	0	2	12	0	8
	7	0	6	10	2	4
	8	0	0	6	2	0
	9	0	4	10	8	10
	10	0	2	10	4	0
	11	0	2	6	4	18
	12	0	4	4	4	8
	13	0	6	10	8	4
	14	0	2	6	8	10
	15	0	1	10	8	10

EH-489	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	2	4	14	6
	2	0	8	4	14	8
	3	0	8	6	10	4
	4	0	4	8	20	8
	5	3	4	4	20	8
	6	0	10	4	4	6
	7	0	0	4	16	4
	8	0	4	6	10	4
	9	0	2	4	14	8
	10	0	6	2	16	8
	11	0	4	6	20	8
	12	0	4	6	14	6
	13	0	6	4	10	6
	14	0	2	2	14	8
	15	0	4	4	16	7

EH-490	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	1	1	16	12	12
	2	0	1	10	12	10
	3	0	3	8	16	12
	4	1	3	8	14	16
	5	1	2	8	12	16
	6	1	1	8	12	12
	7	0	2	12	10	12
	8	1	3	6	12	10
	9	0	2	10	16	14
	10	0	3	14	8	14
	11	0	2	10	8	10
	12	0	2	10	12	16
	13	2	4	8	14	12
	14	1	2	6	8	15
	15	1	1	6	8	11

EH-491	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	0	6	18	4
	2	0	4	12	12	2
	3	0	2	4	14	2
	4	0	0	6	8	6
	5	1	2	4	12	2
	6	1	2	6	10	4
	7	0	6	6	8	2
	8	0	2	4	10	2
	9	0	2	2	16	2
	10	1	4	2	20	0
	11	1	6	2	6	2
	12	0	2	0	10	0
	13	0	2	0	6	0
	14	1	0	2	12	0
	15	0	2	2	16	2

EH-493	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	0	4	3	2
	2	0	0	4	4	10
	3	0	1	6	3	4
	4	0	0	8	4	4
	5	0	0	6	4	4
	6	0	0	6	2	2
	7	0	0	6	5	2
	8	0	5	4	5	2
	9	0	0	8	2	4
	10	0	0	2	5	4
	11	0	0	2	5	2
	12	0	0	2	3	2
	13	0	0	2	4	4
	14	0	0	2	3	4
	15	0	0	6	4	4

EH-494	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	6	8	8	6
	2	1	0	4	12	10
	3	1	2	0	10	8
	4	1	4	0	12	6
	5	0	4	4	12	14
	6	1	2	4	10	0
	7	1	2	6	8	2
	8	1	2	2	6	18
	9	0	6	4	14	6
	10	0	0	4	14	12
	11	1	2	6	14	4
	12	1	0	4	6	8
	13	0	4	6	10	10
	14	0	4	2	8	14
	15	0	0	6	16	8

EH-497	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	2	4	14	10
	2	0	2	4	16	12
	3	0	3	6	24	11
	4	0	2	2	12	14
	5	0	7	3	18	16
	6	1	2	6	16	10
	7	0	2	4	10	11
	8	1	2	6	16	13
	9	3	1	6	22	14
	10	1	3	4	16	12
	11	2	4	6	16	13
	12	1	3	2	30	15
	13	0	3	4	10	12
	14	1	2	4	24	10
	15	1	2	4	16	8

EH-498	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	2	10	22	18	8
	2	2	2	8	23	10
	3	2	8	14	20	16
	4	0	10	16	21	16
	5	2	4	16	18	4
	6	2	4	10	14	8
	7	0	4	6	16	6
	8	0	2	8	13	14
	9	2	2	12	22	12
	10	0	6	12	21	10
	11	0	0	8	23	12
	12	2	6	10	20	16
	13	2	8	10	15	16
	14	2	6	8	15	14
	15	2	6	18	13	10

EH-499	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	3	0	4	12
	2	0	0	0	6	8
	3	0	3	2	10	8
	4	0	2	2	10	9
	5	1	0	3	4	6
	6	0	0	2	8	8
	7	0	2	0	16	9
	8	2	1	2	4	6
	9	1	3	1	10	7
	10	0	2	1	8	12
	11	0	1	2	6	8
	12	0	0	1	4	9
	13	1	0	1	4	6
	14	5	17	2	10	8
	15	1	3	2	4	6

EH-500	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	3	8	10	8
	2	1	0	4	2	10
	3	0	4	8	10	8
	4	0	4	8	6	8
	5	0	0	8	6	8
	6	1	0	8	2	8
	7	0	8	4	8	8
	8	0	4	4	6	8
	9	2	0	0	2	8
	10	2	4	4	6	4
	11	0	4	8	4	6
	12	1	4	4	6	8
	13	1	0	4	4	6
	14	0	0	4	6	6
	15	1	4	8	4	8

EH-502	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	4	16	10	16	32
	2	8	8	18	12	22
	3	8	12	12	20	26
	4	8	16	10	20	18
	5	8	12	10	22	20
	6	2	6	14	22	22
	7	6	6	12	14	18
	8	4	10	18	20	22
	9	6	16	10	18	32
	10	10	8	12	18	26
	11	13	12	12	24	20
	12	10	10	14	18	24
	13	12	10	12	18	20
	14	10	8	10	22	18
	15	12	14	10	16	20

EH-531	Muestra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	0	6	10	4	4
	2	1	4	8	4	8
	3	0	2	4	6	4
	4	0	42	4	0	8
	5	0	2	10	4	4
	6	1	2	6	8	8
	7	1	0	6	6	6
	8	0	0	10	10	6
	9	1	4	4	4	8
	10	1	2	6	6	6
	11	1	4	10	12	2
	12	1	42	10	8	6
	13	1	4	12	10	6
	14	1	4	8	8	6
	15	1	2	4	10	4

Anexo 2. Tiempo (h) y número de conidios ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) de 15 muestras de los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*, a partir de 48 h y durante 120 h de incubación.

EH-483	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	58	18	44	14
	2	67	16	46	26
	3	66	20	38	42
	4	56	14	58	28
	5	63	24	58	38
	6	43	24	68	30
	7	60	24	38	18
	8	77	30	32	26
	9	47	22	34	34
	10	24	20	58	37
	11	35	28	42	30
	12	41	48	28	29
	13	37	38	48	39
	14	51	50	38	44
	15	48	54	39	45

EH-484	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	44	18	26	34
	2	56	32	10	32
	3	32	42	30	40
	4	30	26	40	22
	5	44	18	34	32
	6	50	34	30	32
	7	42	32	20	30
	8	54	16	34	48
	9	42	26	28	40
	10	30	30	34	26
	11	40	70	26	14
	12	36	32	28	30
	13	38	34	24	30
	14	40	28	36	32
	15	42	36	40	32

EH-486	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	35	16	60	26
	2	31	14	82	34
	3	88	30	54	40
	4	36	10	18	30
	5	67	22	20	39
	6	30	6	48	44
	7	37	20	48	44
	8	37	16	66	22
	9	39	32	92	40
	10	25	20	56	24
	11	25	32	64	26
	12	25	18	74	30
	13	25	60	74	24
	14	27	28	74	30
	15	25	32	44	40

EH-487	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	114	66	150	74
	2	94	70	170	68
	3	86	18	98	82
	4	86	26	90	66
	5	96	56	130	64
	6	120	74	175	62
	7	124	100	115	48
	8	126	56	150	32
	9	76	106	120	114
	10	64	92	145	68
	11	72	124	120	66
	12	82	106	140	34
	13	106	144	128	68
	14	100	126	100	66
	15	86	108	148	68

EH-488	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	24	19	128	12
	2	30	28	96	208
	3	22	26	128	120
	4	22	10	136	112
	5	18	32	68	128
	6	16	30	118	120
	7	24	48	120	70
	8	6	24	111	40
	9	38	38	116	84
	10	35	14	120	100
	11	36	6	108	128
	12	38	22	70	128
	13	36	28	110	116
	14	30	10	84	156
	15	26	12	118	118

EH-489	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	106	70	82	38
	2	116	64	50	38
	3	186	40	76	38
	4	58	62	94	65
	5	124	74	80	28
	6	96	46	100	40
	7	62	60	80	40
	8	56	58	86	50
	9	108	64	70	40
	10	86	58	80	40
	11	106	104	80	48
	12	70	26	54	78
	13	48	70	89	90
	14	96	42	84	48
	15	88	38	78	43

EH-490	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	64	50	60	94
	2	54	38	66	60
	3	69	58	54	66
	4	75	26	50	60
	5	62	100	48	68
	6	44	50	64	60
	7	51	48	46	82
	8	66	36	86	98
	9	58	44	92	82
	10	75	60	60	48
	11	64	56	64	86
	12	71	66	98	74
	13	73	54	114	62
	14	63	55	60	67
	15	66	50	65	80

EH-491	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	112	90	60	116
	2	114	94	70	126
	3	102	96	82	124
	4	120	90	70	88
	5	94	74	84	108
	6	80	88	70	86
	7	126	90	70	94
	8	124	96	84	92
	9	78	98	84	116
	10	106	120	60	90
	11	100	80	76	128
	12	110	90	48	124
	13	94	90	54	214
	14	102	96	56	120
	15	84	88	68	124

EH-493	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	25	24	62	22
	2	45	20	59	40
	3	32	28	45	34
	4	46	26	47	46
	5	33	38	66	54
	6	44	40	65	34
	7	36	38	56	34
	8	60	22	51	50
	9	50	46	40	40
	10	70	42	51	38
	11	66	42	70	54
	12	66	42	58	39
	13	55	50	60	28
	14	58	36	57	28
	15	79	36	61	28

EH-494	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	32	60	54	26
	2	50	54	66	28
	3	42	56	66	24
	4	60	68	64	28
	5	42	60	90	30
	6	46	48	64	40
	7	40	74	64	22
	8	52	74	54	38
	9	70	30	54	48
	10	62	60	76	40
	11	34	42	70	34
	12	56	44	54	46
	13	58	80	76	52
	14	60	58	64	36
	15	40	44	92	42

EH-497	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	56	39	84	74
	2	55	42	68	58
	3	62	58	68	68
	4	80	58	70	60
	5	60	44	64	54
	6	72	56	46	42
	7	48	44	64	51
	8	48	54	74	63
	9	38	26	70	56
	10	69	68	94	52
	11	83	53	90	67
	12	30	65	108	64
	13	38	54	90	58
	14	97	68	96	58
	15	33	54	64	55

EH-498	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	54	48	200	36
	2	44	30	115	42
	3	28	26	180	60
	4	40	40	225	44
	5	24	58	180	26
	6	36	38	130	22
	7	60	38	130	16
	8	50	40	110	48
	9	50	50	99	30
	10	50	22	140	48
	11	38	30	128	40
	12	46	38	150	28
	13	36	32	148	48
	14	24	32	139	46
	15	52	46	144	40

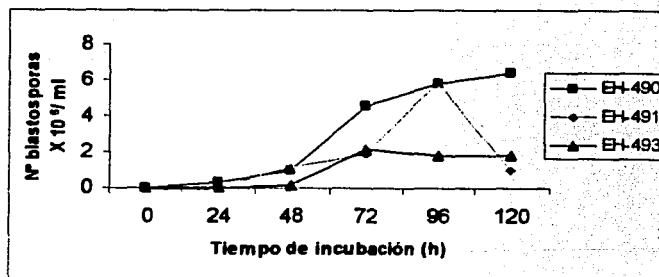
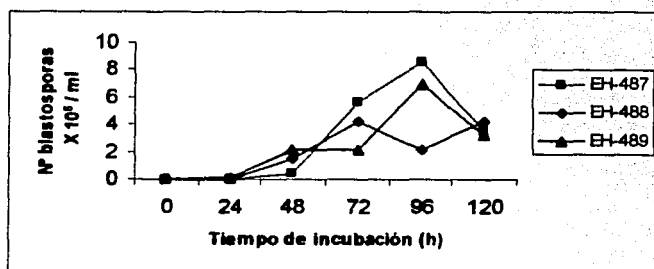
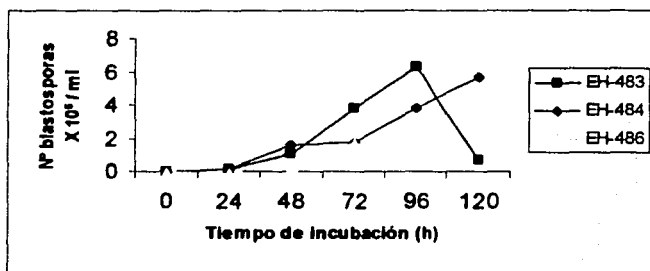
EH-499	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	78	54	70	36
	2	96	56	89	38
	3	105	82	80	36
	4	94	86	98	24
	5	83	61	86	26
	6	98	88	70	38
	7	82	65	128	26
	8	97	68	62	34
	9	77	86	56	26
	10	89	48	110	52
	11	118	64	60	28
	12	69	64	58	29
	13	102	43	60	27
	14	69	47	80	36
	15	82	65	66	31

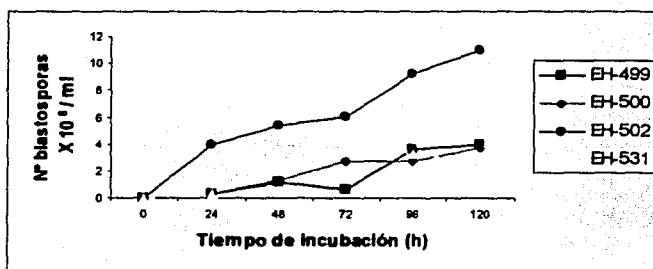
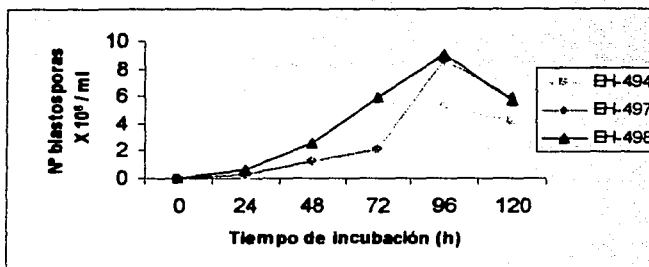
EH-500	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	24	32	30	32
	2	16	12	18	38
	3	16	24	26	62
	4	36	16	32	42
	5	12	36	40	36
	6	12	24	20	48
	7	24	28	32	46
	8	28	24	42	32
	9	24	28	32	52
	10	24	8	42	42
	11	36	24	32	46
	12	20	20	42	94
	13	20	20	26	60
	14	36	28	38	56
	15	36	32	32	32

EH-502	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	114	94	68	54
	2	94	110	58	80
	3	86	152	60	84
	4	84	116	86	124
	5	102	94	102	144
	6	92	106	94	74
	7	94	92	70	98
	8	94	158	100	81
	9	184	74	60	78
	10	108	54	64	76
	11	130	110	104	54
	12	112	102	98	64
	13	110	88	84	60
	14	122	80	82	56
	15	128	120	68	88

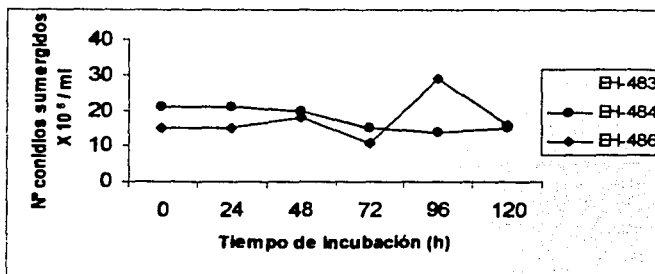
EH-531	Muestra	48 h	72 h	96 h	120 h
	1	76	84	91	112
	2	112	78	81	100
	3	84	63	73	103
	4	78	77	78	92
	5	73	52	32	110
	6	67	73	66	96
	7	81	83	67	74
	8	64	77	65	125
	9	65	85	49	142
	10	75	68	60	121
	11	64	73	67	74
	12	61	66	62	118
	13	68	77	60	136
	14	77	81	67	134
	15	71	80	68	113

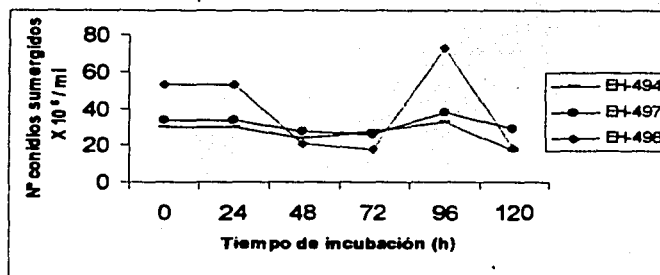
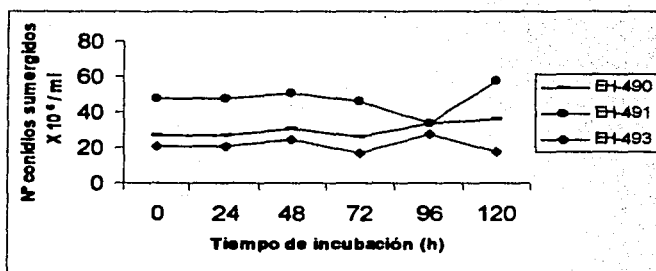
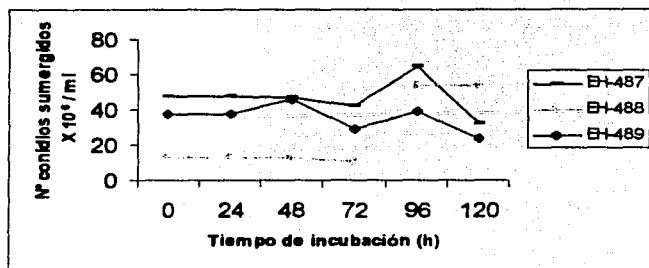
Anexo 3. Figuras de producción de blastosporas ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) en los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* durante 120 h de incubación.

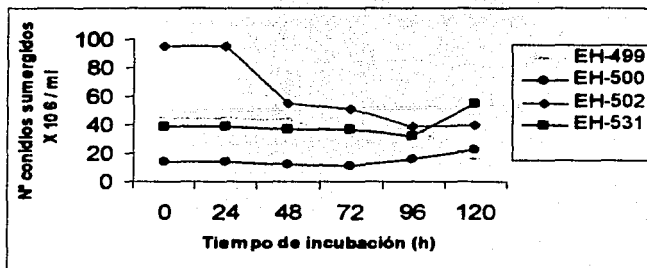




Anexo 4. Figuras de número de conidios (N° X 10⁶/ml) en los 16 aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*, a partir de 48 h y durante 120 h de incubación.







XIII. ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación del género <i>Metarhizium</i> basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular	8
2. Cultivo y origen de los aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> estudiados	19
3. Componentes (g/L) de los medios de cultivo líquidos ensayados para la obtención de propágulos fúngicos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	23
4. Componentes (g/L) de los medios de cultivo sólidos ensayados para la obtención de propágulos fúngicos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	24
5. Crecimiento de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> Eh-502 en medios de cultivo líquidos con pH 7, o el pH original del medio, ensayados para la obtención de propágulos fúngicos	25
6. Crecimiento de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> Eh-502 en los medios de cultivo líquidos probados para la obtención de propágulos fúngicos	27
7. Crecimiento del aislamiento EH-502 de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en los medios de cultivo sólidos probados para la obtención de propágulos fúngicos	31
8. Tiempo de incubación y producción de blastosporas de 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en el medio líquido IP a 37 °C	38
9. Tiempo y concentración de la máxima producción de blastosporas en los 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> estudiados en el medio líquido IP a 37 °C	39
10. Tiempo de incubación y producción de conidios sumergidos de 16 aislados de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en el medio líquido IP a 37 °C	41
11. Concentración y tiempo de máxima producción de conidios sumergidos en 16 aislamientos estudiados de <i>M. anisopliae</i> .	

var. <i>acidum</i> en el medio líquido IP a 37 °C	42
12. Tamaño (µm) de blastosporas y conidios en aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> en medio IP y APD	45

XIV. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Zonas gregarigenas de la langosta <i>Schistocerca piceifrons</i> ssp. <i>piceifrons</i> en México.	4
2. Ciclo de vida de la langosta <i>Schistocerca piceifrons</i> ssp. <i>piceifrons</i>	5
2. Ciclo biológico de <i>Schistocerca piceifrons</i> ssp. <i>piceifrons</i> de acuerdo a los meses y estaciones del año	6
3. Fiálide de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> en forma de candelabro con conidios enteroblásticos en sucesión basípeta	9
5. Proceso infectivo en hongos entomopatógenos	9
6. Diagrama que muestra el método bifásico para la producción masiva de conidios que sirven como ingrediente activo para un agente microbiano	15
7. Estructuras observadas en el aislamiento EH-502 durante 120 h de incubación	26
8. Exterior de un pellet del aislamiento EH-502 a las 72 h, en medio Adamek a 28 °C con agitación	28
9. Blastosporas del aislamiento EH-500 a las 72 h, en medio DEL a 37 °C sin agitación	28
10. Cuerpo hifal del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio DEL a 28 °C con agitación	28
11. Blastosporas del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación	29
12. Micelio y propágulos del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio Jackson a 37 °C sin agitación	30
13. Pellet del aislamiento EH-502 a las 72 h, en medio Vogel a 28 °C con agitación	30
14. Pellet laxo del aislamiento EH-500 a las 72 h, en medio Vogel modificado a 28 °C con agitación	31
15. Estructuras (blastosporas) del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio APD a 37 °C	32

16. Micelio y blastosporas del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio Paris a 37 °C	32
17. Blastospora gemando y conidios del aislamiento EH-502 a las 48 h, en medio Sabouraud, a 37 °C	33
18. Blastosporas del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación	33
19. Propágulos del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 28 °C con agitación	33
20. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio IP a 37 °C con agitación	34
21. Blastosporas del aislamiento EH-502 a las 96 h, en medio IP a 37 °C sin agitación	34
22. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio líquido IP a 37 °C sin agitación	35
23. Cambios morfológicos en el aislamiento EH-502 en medio sólido APD a 37 °C	36
24. Formación de conidios sumergidos en el aislamiento EH- 491 en medio IP, 37 °C y sin agitación	37
25. Aislamientos de <i>M. anisopliae</i> . var. <i>acidum</i> con la máxima, media y mínima producción de blastosporas, durante 120 h de incubación, a 37 °C	40
26. Aislamientos de <i>M. anisopliae</i> . var. <i>acidum</i> con la máxima, media y mínima producción de conidios sumergidos, durante 120 h de incubación, a 37 °C	43
27. Producción de blastosporas y conidios sumergidos en el aislamiento EH-502 de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> durante 120 h de incubación	44
28. Producción de conidios sumergidos y blastosporas en el aislamiento EH-498 de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i> durante 120 h de incubación	44

XV. ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Tiempo (h) y número de blastosporas ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) de 15 muestras de los 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> durante 120 h de incubación	61
ANEXO 2. Tiempo (h) y número de conidios ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) de 15 muestras de los 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , a partir de 48 h y durante 120 h de incubación	67
ANEXO 3. Figuras de producción de blastosporas ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) en los 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> durante 120 h de incubación	73
ANEXO 4. Figuras de número de conidios ($N^{\circ} \times 10^6/\text{ml}$) en los 16 aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , a partir de 48 h y durante 120 h de incubación	74