



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

“PROPÁGULOS FÚNGICOS DE *Metarhizium  
anisopliae* DE MOSCA PINTA (HOMOPTERA:  
CERCOPIDAE) AISLADOS EN MÉXICO, EN  
DIFERENTES MEDIOS Y CONDICIONES DE  
CULTIVO”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
ELENA ITZEL MONTOYA SANSÓN



FACULTAD DE CIENCIAS

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA



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: Elena Itzel Montoya Sansón  
FECHA: 20/01/04  
FIRMA: Elena Montoya

**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 mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) aislados en México, en diferentes medios y condiciones de cultivo"**

realizado por **Elena Itzel Montoya Sansón** con número de cuenta **09653267-6**

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. Miguel Armando Ulloa Sosa

Propietario

Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Suplente

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

Suplente

M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

**Consejo Departamental de Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



**Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Micología Básica de la  
Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Conchita  
Toriello Nájera.**

**En la redacción de este trabajo se contó con el apoyo económico de  
CONACYT derivado del proyecto de investigación G31451B.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Conchita Toriello Nájera por la confianza, el apoyo y las enseñanzas brindadas en todo momento y por permitirme integrar a su grupo de trabajo.

Al Dr. Armando Ulloa Sosa, a la Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello, a la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona y al M. en C. José Luis Villarruel Ordaz por sus sugerencias y atinadas observaciones en la revisión de esta tesis.

A las integrantes del laboratorio de Micología Básica, Biól. Hortensia Navarro, Q.F.B. Amelia Pérez, M. en C. Gina Cavallazzi, M. en C. Claudia Cano, Q.F.B. Fabiola Vega y Q.F.B. Guadalupe Olivares por sus enseñanzas, consejos y apoyo técnico para la realización de este trabajo, pero sobre todo por el cariño, la amistad y la atención brindadas. Muchas Gracias.

## **DEDICATORIAS**

A mi padre, Juan Montoya Monterrubio, por el apoyo brindado. A mi madre, Luz M. Sansón Pimentel, por todo su amor, confianza y apoyo incondicional, pero sobre todo por ser la persona tan maravillosa que me alienta e inspira siempre y por ser un gran ser humano.

A mi hermano Iván por su amistad y cariño.

A mi abuela Elena Pimentel García por su cariño y fe en mí.

A toda mi familia, a mis tíos Guadalupe Sansón y Rubén Hernández por su apoyo, confianza y cariño; a mis primos, Adriana Sansón, Ernesto Paz, Irina y Carlos Hernández por la alegría y momentos de diversión compartidas, los quiero mucho. A los dos nuevos miembros de la familia Atl David y Bernardo.

A Ivonne Arciniega, por todos estos años de amistad y los que nos faltan, por su apoyo incondicional y por ser la otra mitad de mi cerebro ("ya comprate el tuyo"), te quiero mucho. A la familia Arciniega Martínez por abrirme las puertas de su hogar.

A Patricia Jiménez, por ser tan espontánea, ocurrente, sincera, por su enorme paciencia, pero sobre todo por sus consejos, regaños (muy merecidos) y por todo su cariño y amistad incondicional. A la familia Jiménez por permitirme entrar en su hogar.

A Daniel Villamil, Víctor López, David Basilio, Roberto Suárez y Jorge Sahaza por su gran amistad, ayuda, apoyo y paciencia.



**ÍNDICE GENERAL**

## RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	9
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVO GENERAL	13
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	13
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	14
Aislamientos fúngicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	14
Suspensiones conidiales	15
Selección del medio de cultivo	15
Ensayos preliminares	16
Siembra y muestreo para la selección del medio de cultivo	17
Elaboración del medio de cultivo seleccionado	17
Producción de propágulos fúngicos	18
Tamaño de propágulos fúngicos	18
Análisis estadístico	18
VII. RESULTADOS	19
Ensayos preliminares	20
Medio de cultivo y condiciones seleccionadas	25
Formación de propágulos fúngicos	25
Producción de propágulos fúngicos en medio IP	26
Tamaño de propágulos fúngicos	33
VII. DISCUSIÓN	34
IX. CONCLUSIONES	41
X. BIBLIOGRAFÍA	42
XI. ANEXOS	49
XII. ÍNDICE DE TABLAS	58
XIII. ÍNDICE DE FIGURAS	59
XIV. ÍNDICE DE ANEXOS	61

## RESUMEN

El daño causado por los insecticidas químicos aplicados para combatir plagas agrícolas plantea la necesidad de buscar alternativas de control biológico más seguras desde el punto de vista ambiental. Una alternativa favorable de control biológico es la utilización de agentes microbianos producidos a gran escala, como el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para el control de la mosca pinta o salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae). En este estudio, se probaron 10 medios de cultivo líquido y diferentes condiciones de cultivo, como agitación, temperatura y pH, para la fase de producción de propágulos fúngicos. La composición de los medios determinó el tipo de propágulos producidos. De estos medios, el mayor productor de propágulos fúngicos fue el de infusión de papa (IP) y las condiciones óptimas fueron agitación (110 rpm) y temperatura a 28 °C, mientras que el pH no fue relevante. Este medio se ensayó en 19 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* obtenidos de la mosca pinta en México. Entre los aislamientos hubo diferencias significativas ( $P < 0.01$ ). El EH-469/6 fue el mayor productor de conidios sumergidos ( $107 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 24 h, mientras que el EH-474/6 fue el mayor productor de blastosporas ( $38.4 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 96 h de incubación. De acuerdo con lo reportado en la bibliografía se contaron como blastosporas los propágulos fúngicos producidos por gemación y de origen endógeno. El tamaño de los conidios sumergidos de los aislamientos con mayor (EH-469/6), media (EH-479/2) y menor (EH-471/3) concentración fue de  $7.1 \pm 0.79$ ,  $7.5 \pm 0.19$  y  $7.49 \pm 0.18 \mu\text{m}$ , respectivamente, y se mantuvo dentro del rango encontrado para los conidios aéreos. El tamaño de las blastosporas de los aislamientos de mayor (EH-474/6), media (EH-471/3) y menor (EH-172) producción fue de  $8.8 \pm 1$ ,  $9.24 \pm$  y  $9.7 \pm 0.49 \mu\text{m}$ , respectivamente.

## I. INTRODUCCIÓN

El impacto ambiental negativo causado por el uso de insecticidas químicos en todo el mundo deja un saldo anual de casi un millón de personas afectadas por los residuos tóxicos. Éstos afectan las actividades de la microflora del suelo, lo que obliga a cuestionar sobre el uso seguro de los plaguicidas químicos en el control de plagas agrícolas (Desphande, 1999).

El uso frecuente y excesivo de estas sustancias ha dado como resultado, en ciertas especies de insectos, el desarrollo de resistencia a una amplia gama (Ibrahim *et al.*, 2002). El daño causado por los plaguicidas organoclorados al ambiente ha desembocado en la restricción de su uso. En Asia, el chapulín pardo *Nilaparvata lugens*, una plaga seria del arroz, incrementó su resistencia a estos químicos. El resurgimiento de esta plaga debido al uso indiscriminado de insecticidas de amplio espectro provocó un decreto presidencial prohibiendo el uso de 57 productos (Humphreys *et al.*, 1989). Productos como el dieldrín fueron reemplazados por otros más "seguros", entre los que se encuentran organofosfatados como el fenitrotión y el malatión, que tienen poca persistencia ambiental y por lo tanto se deben aplicar en tratamientos repetidos sobre áreas grandes; irónicamente, esto ha causado más daño ambiental que los tratamientos con organoclorados (Lomer *et al.*, 2001). En México, a finales de los años 60's, el gusano del algodón, *Heliothis armigera*, se hizo resistente a los insecticidas organofosfatados, y aún cuando a finales de los años 70's, un nuevo producto piretroide ganó fuerte apoyo entre los productores de algodón, en un periodo corto de tiempo el gusano desarrolló resistencia, aumentando así en 40% el costo global del control de insectos (Desphande, 1999).

Se ha demostrado que los plaguicidas químicos merman poblaciones de especies que pueden ser depredadores naturales de la plaga. En 1994, Murphy *et al.* revisaron la toxicidad de los utilizados con más frecuencia en langosta y encontraron que entre 45 y 55% de los registros, los químicos mostraron tasas de mortalidad de más del 90% en especies no blanco.

Actualmente, la investigación hacia métodos alternativos de estrategias benignas para el control de plagas se ha incrementado significativamente (Butt *et*

al., 2001). En los últimos años ha surgido el manejo integrado de plagas (MIP), un sistema de apoyo para la decisión en la selección y uso de tácticas de control de plagas, individuales o coordinadas, dentro de una estrategia de manejo basada en un análisis de costo-beneficio, tomando en cuenta el interés e impacto en los productores, en la sociedad y en el ambiente (Eilenberg *et al.*, 2001). El MIP involucra opciones de control menos agresivas ambientalmente, combinando técnicas como métodos culturales, enfermedades específicas del insecto, variedades resistentes, insectos estériles, atrayentes, control biológico y aplicaciones de plaguicidas químicos selectivos que puedan contribuir al control de la plaga (García & Byerly, 1995).

Dentro de estas opciones, el control biológico es una de las alternativas con más posibilidades de aplicación, ya que contribuye a la sustentabilidad de los agroecosistemas y puede ser utilizado junto con otras estrategias de control (Quimby *et al.*, 2002). En este tipo de control se utilizan virus, bacterias, semioquímicos y hongos, principalmente. Los virus presentan ciertas desventajas, como: desactivación rápida en el ambiente, la necesidad de un hospedero vivo para su reproducción, además de que son efectivos sólo cuando se ingieren, y la duración de la ingestión de una dosis letal hasta su muerte bajo condiciones de campo es de 3 a 15 días. Los agentes bacterianos que son efectivos después de su ingestión, tienen una amplia gama de hospederos y deben ser utilizados cuidadosamente para que no tengan impacto en poblaciones no blanco. Los semioquímicos (sustancias químicas utilizadas en la comunicación entre los organismos vivos) son utilizados en el manejo de plagas para ayudar en el control biológico (Tadeu, 2001).

Los agentes fúngicos son los más prometedores porque presentan diferente modo de acción: actúan por contacto y no necesitan ser ingeridos, además pueden ser producidos en masa fácilmente y son relativamente específicos. Una amplia gama de hongos de al menos 90 géneros y más de 700 especies han sido identificados como entomopatógenos; géneros como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Nomuraea*, *Entomophthora*, *Neozygites*, *Pythium*, e *Hirsutella* entre otros, se encuentran comúnmente en la naturaleza (Desphande,

1999). El alto grado de especialización que presentan los hongos entomopatógenos hacia un hospedero debió haber evolucionado de forma independiente varias veces debido a la enorme diversidad de insectos (St. Leger, 1997).

El mecanismo de infección del hongo comienza con la adhesión del conidio a la cutícula del insecto y su posterior germinación, desarrollando un apresorio que se une a la cutícula y que forma clavos de penetración que entran en ésta (Fig. 1), la invasión involucra actividades físicas y enzimáticas (Clarkson & Charnley, 1996). El siguiente paso es la colonización del hospedero, inicialmente a través de blastosporas o cuerpos hifales que se multiplican por gemación en el hemocele (Goettel & Inglis, 1997). Se ha reportado que los cuerpos hifales de varios entomopatógenos no son ingeridos por los hemocitos fagocíticos del hospedero debido a que carecen de los epítopes de superficie requeridos para su reconocimiento (Hayek & St. Leger, 1994), y que los cuerpos hifales que llegan a ser ingeridos en una etapa temprana del proceso de infección no son destruidos, por lo que crecen y se multiplican dentro de la célula (Vilcinskis *et al.*, 1997). La muerte del insecto se presenta a los pocos días. El ciclo del hongo se completa con la emergencia del hongo del insecto y la posterior producción de conidios para su liberación (Roberts & Humber, 1981).

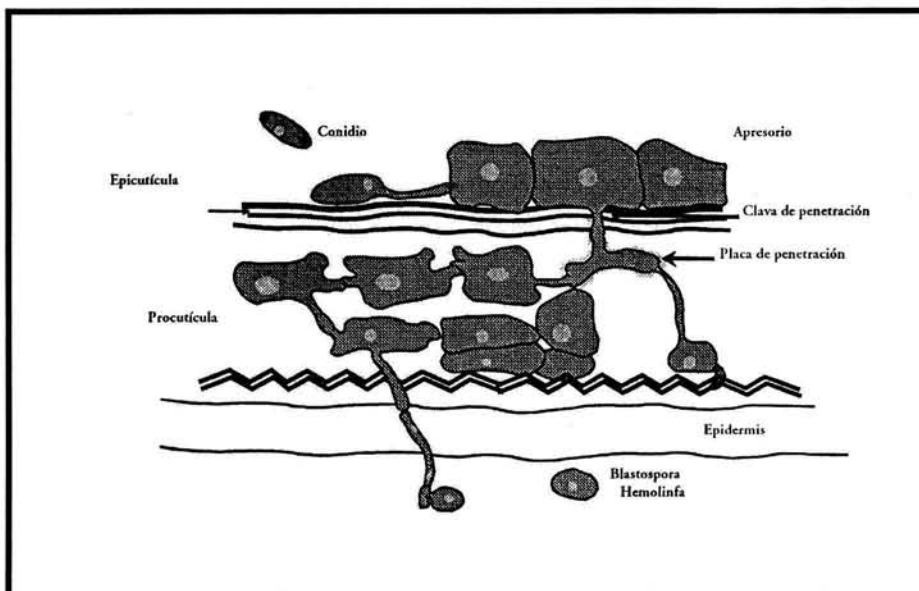


Figura 1. Penetración cuticular de los hongos entomopatógenos. Modificado de Charnley & St. Leger, 1991.

Una de las plagas que afecta cultivos de importancia económica en México (Fig. 2) y en otros países del mundo es la mosca pinta o salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae). Es conocida también como cigarrinha en Brasil y candelilla en Venezuela (Coronado, 1978). Esta plaga está conformada por un grupo diverso que incluye docenas de especies de al menos 11 géneros (Peck *et al.*, 2001) que se alimentan del xilema de las plantas, afectando cultivos como caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), diferentes especies de pastos forrajeros (Tabla 1), arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) (Martín *et al.*, 1985).



Figura 2. Estados cañeros y ganaderos de la República Mexicana con presencia de mosca pinta (Homoptera: Cercopidae).

**Tabla 1.** Pastos forrajeros afectados por la mosca pinta (Coronado, 1978).

Nombre común	Nombre científico
Zacate pangola	<i>Digitaria decumbens</i>
Zacate alemán	<i>Echinochloa polystachia</i>
Zacate pará	<i>Panicum barbinabe</i>
Zacate guineo	<i>P. maximum</i>
Zacate cortador	<i>Paspalum virgatum</i>
Zacate jaragua	<i>Hyperrhenia rufa</i>
Zacate elefante	<i>Pennicetum purpureum</i>
Zacate gramma	<i>Bouteloua eripoda</i> <i>Paspalum orbiculatum</i>

En Trinidad y otras regiones caribeñas, el salivazo, específicamente la especie *Aeneolamia varia saccharina*, devastó la industria de la caña de azúcar a finales del siglo XIX. En Venezuela esta plaga causó grandes pérdidas en esta industria por lo que su control se implementó en 1986. En la actualidad, en este país la mayoría de los productores de caña de azúcar utilizan el control biológico para combatir la plaga; además existe un programa de MIP llamado Programa Inter-Institucional de Combate de la Candelilla y el Taladrador (PICANTA) desde 1984, que establece un plan de trabajo incluyendo el monitoreo, la liberación de parasitoides y la aplicación de entomopatógenos para cada área azucarera (Ferrer, 2001). En Brasil, las plantaciones de caña de azúcar presentan un diverso complejo de otras especies cercopideas (Magalhães *et al.*, 1987; Price *et al.*, 1995; Pires *et al.*, 2000), y en Ecuador y Centroamérica esta plaga se ha incrementado en la última década. Actualmente, el sureste de Estados Unidos sufre daños causados por *Prosapia bicincta* a pastos forrajeros y ornamentales, principalmente. En Colombia, en 1999 se registró por primera vez en pastizales la presencia de *Prosapia simulans*. En el primer registro, en junio de 1999, se encontró una sola hembra junto con individuos de la especie local de salivazo, *Zulia carbonaria*, y un mes después se reportó una abundancia de 46.9 ninfas/m<sup>2</sup>. Posterior a la observación de esta gran cantidad de insectos, se detectaron cuatro poblaciones adicionales que persistieron hasta varios meses después. Aunque la presencia de *P. simulans* en Colombia y Venezuela puede ser atribuida a poblaciones endémicas con pocos individuos, se cree que no es así, ya que esta especie presenta una coloración característica y se encontró en una zona de actividad agrícola importante en la región, por lo que debió haber sido registrada con anterioridad. Alternativamente, *P. simulans* pudo haber llegado por dispersión natural o humana (Peck *et al.*, 2001).

En México, esta plaga incluye diversos géneros (Tabla 2) y el más importante es *Prosapia*, que se encuentra comúnmente en los pastos ganaderos, y la principal especie causante de daño es *P. bicincta*. El otro género, *Aeneolamia*, se encuentra comúnmente en caña de azúcar, representado principalmente por *A. contigua* (Flores, 1994). Ambos géneros presentan tres estadios durante su ciclo

de vida: huevecillo, ninfa (que comprende cuatro estadios) y adulto (Fig. 3). El ciclo comienza con el apareamiento de los adultos a finales de octubre o principios de noviembre, y su posterior oviposición. Estos huevecillos son llamados invernantes o de estivación porque permanecen enterrados aproximadamente 6 meses. Después de dos semanas del establecimiento de las lluvias los huevecillos eclosionan; una vez que han alcanzado el estadio adulto, pueden copular desde el segundo día de su emergencia y poco después se inicia la segunda generación de la plaga. Si las condiciones son favorables, para septiembre o mediados de octubre tiene lugar la tercera generación (Riess & Flores, 1976).

**Tabla 2.** Lista actualizada de las especies y subespecies de mosca pinta existentes en México (Flores, 1994).

<i>Aeneolamia</i>	<i>Prosapia</i>
<i>A. contigua</i> Walker	<i>P. bicincta</i> Say
<i>A. contigua campechana</i> Fennah	<i>P. bicincta angustata</i> Walker
<i>A. contigua santa-rosae</i> Fennah	<i>P. tepeana</i> Fennah
<i>A. albofasciata</i> Lallemand	<i>P. simulans</i> Walker
<i>A. vilior</i> Fowler	

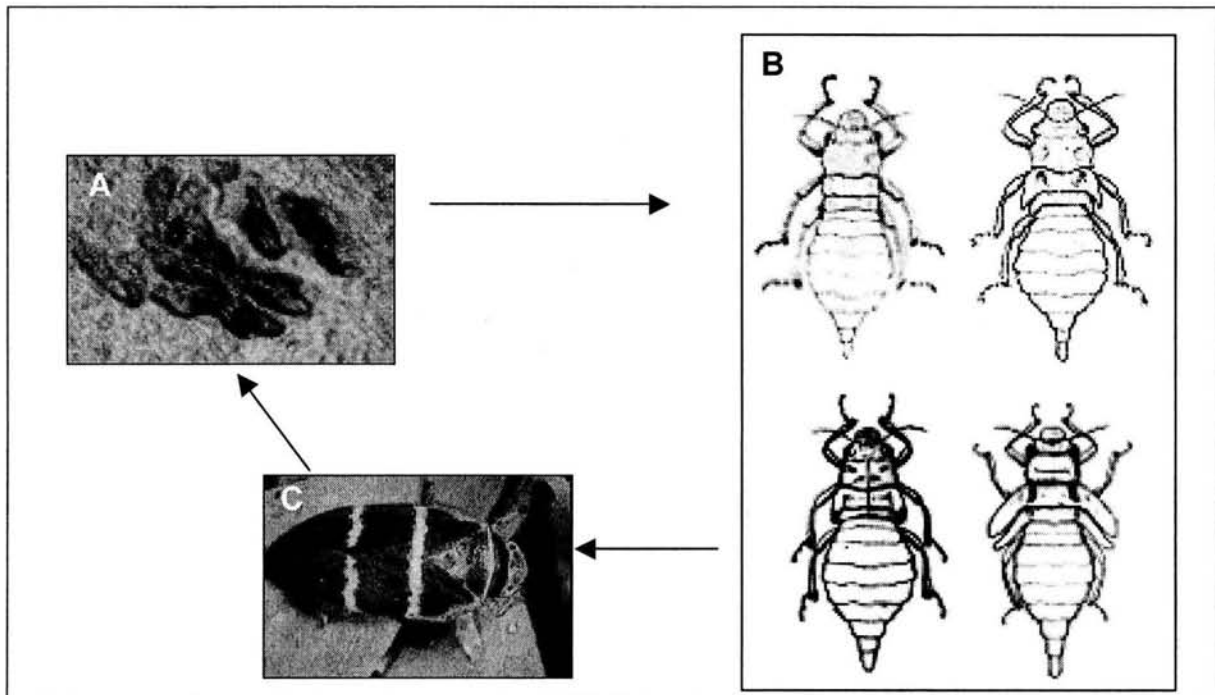


Figura 3. Ciclo de vida de la mosca pinta. A: huevecillos; B: ninfa con cuatro estadios, y C: adulto.



Las ninfas de la mosca pinta no causan daños importantes a la planta porque viven entre el tronco y el suelo, chupando las raicillas superficiales, a menos que el grado de infestación sea alto. Su aspecto es de un salivazo y de ahí su nombre común, salivazo de los pastos (Fig. 4). Una vez que pasan al estadio adulto suben al follaje donde causan el mayor daño. Las plantas infestadas presentan un color café oscuro y necrótico; en ciertas especies y variedades de pastos se ha observado un acentuado enanismo de las plantas afectadas (Coronado, 1978). Se ha visto que una densidad mayor de 10 insectos por planta puede causar una merma de 3 a 6 t/ha de caña (Flores, 1985).

La mosca pinta comenzó a extenderse en 1951 por diversos ingenios azucareros de la vertiente del Golfo de México y en muchas áreas de pastos forrajeros. Para 1955 se reportaron infestaciones alarmantes en la región de las huastecas. El 10 de julio de 1961 se declaró de utilidad pública su prevención y combate. Actualmente causa daños a 100,000 ha de caña de azúcar y 2,000,000 ha de pastos, y no existe un programa permanente de prevención. El control químico de la plaga en México se basa en plaguicidas como Servín, Malatión (Flores, 1994), Furadán o Nuvacrón (Sánchez, 1997). En el caso de los pastos, la práctica cultural de mayor eficacia es una combinación de plaguicidas químicos, fertilizante y chapeado. Este último consiste en no permitir que el crecimiento de los pastos rebase cierta altura y generalmente se realiza con un sistema de pastoreo intensivo (Coronado, 1978).

El control biológico de esta plaga se enfoca principalmente en la utilización del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, un hongo mitosporico con distribución cosmopolita del cual sólo se conoce la fase asexual. Presenta fialoconidios compactados y columnas regulares de conidios debido a la agregación de los conidios cilíndricos (Fig. 5). Las colonias tienen diferentes tonalidades de verde oscuro, algunas veces de color sepia o isabelino (Domsch *et al.*, 1980). Este hongo ha sido considerado también como un agente de control biológico con potencial contra otros insectos, en especial áfidos (Inyang *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2002), garrapatas (Guedes *et al.*, 2000; da Costa *et al.*, 2001; Benjamin *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2001) y termitas (Wraight *et al.*, 2001).

También ha sido utilizado en programas de control de plagas agrícolas en varios países (Braga *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado el uso potencial de una cepa de *M. anisopliae*, desarrollada en el Centro Internacional de Fisiología y Ecología de Insectos en Kenya, como agente de control de trips (Trips), en donde su aplicación semanal provee un control comparable al obtenido con insecticidas químicos (Maniana *et al.*, 2001).



Figura 4. Aspecto del salivazo de los pastos.

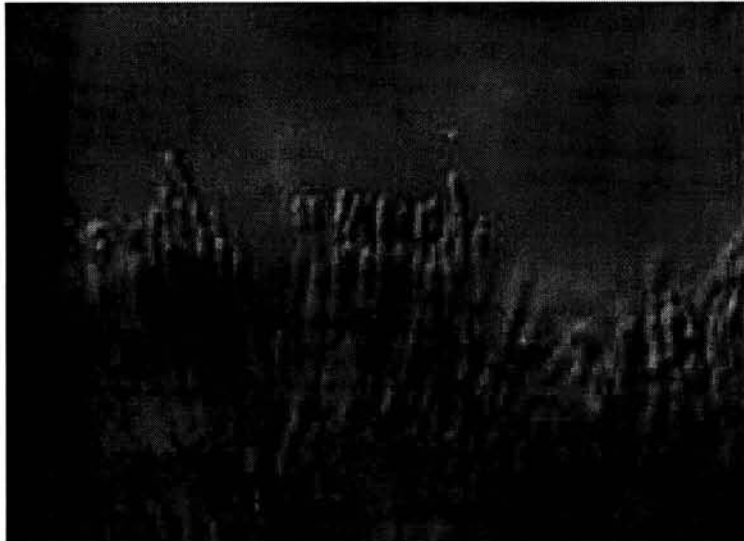


Figura 5. Conidióforos en empalizada con conidios catenulados, basípetos y cilíndricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, vistos en contraste diferencial de Nomarski.

## II. ANTECEDENTES

La utilización de hongos entomopatógenos en el control de plagas está reportada desde hace ya muchos años. Debido a que en una amplia variedad de insectos plaga ya se habían observado epizootias de enfermedades fúngicas en el campo, se intentó iniciarlas artificialmente. Los primeros de estos intentos fueron hechos por Metchnikoff en 1879 y Krassilstchik en 1888, utilizando la producción de conidios en masa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* contra la larva del abejorro del trigo, *Anisoplia austriaca*, y el gorgojo de la caña de azúcar, *Cleovius punctiventris*, respectivamente. Casi al mismo tiempo, en 1880, se inició un proyecto en Estados Unidos para controlar una plaga que afectaba a cereales, utilizando al entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Desafortunadamente este proyecto no estaba apoyado por un trabajo experimental y no alcanzó el nivel esperado de control de la plaga (Roberts & Humber, 1981). Es sólo en los últimos años que los agentes microbianos han recuperado importancia en los proyectos de control de insectos plaga.

Como parte del manejo integrado de plagas, *Metarhizium anisopliae* se utilizó con gran éxito en 1968 en las Islas Tongatapu del Sur del Pacífico y Oeste de Samoa contra el escarabajo rinoceronte (Coleoptera: Scarabaeidae), que llegó a estas islas en 1930 y atacó a los cocoteros recién plantados, masticando las raíces jóvenes (Kendrick, 1992).

En México, de los diversos hongos que se han encontrado parasitando a la mosca pinta, se han realizado pruebas de infectividad y toxicidad en tres: *Erynia neoaphidis*, *Conidiobolus major* (Toriello & Mier, 1985) y *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Toriello *et al.*, 1999). Estas pruebas demostraron la inocuidad de los tres hongos frente a las especies de animales estudiados, pero ha sido *M. anisopliae* var. *anisopliae* con el que se ha continuado la investigación para su aplicación como agente microbiano, por presentar la mayor facilidad en su mantenimiento y producción (Navarro-Barranco *et al.*, 2002).

Las primeras acciones para la implementación del control microbiano de mosca pinta con *M. anisopliae* var. *anisopliae* en México, fueron reportadas en 1992 por

Morales y Alatorre en Berlanga-Padilla & Hernández-Velazquez (1999) en Cd. Mante, Tamaulipas. En 1993, el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) efectuó trabajos de validación de las técnicas de producción masiva y evaluación en el campo. En ese mismo año, se inició la búsqueda de especímenes del hongo en diferentes regiones cañeras, con la finalidad de contar con el mayor número de genotipos del hongo y seleccionar el que combinara las mejores características para controlar al insecto bajo condiciones de campo.

Actualmente, países como Alemania, Australia, Brasil, Costa Rica, Estados Unidos, Suiza, Trinidad y Tobago, Venezuela y México, utilizan a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para el control del salivazo de los pastos. Algunos de estos países con productos ya registrados o con bajo desarrollo comercial, como se observa en la Tabla 3 (Wraight *et al.*, 2001).

La eficiencia de un agente de control biológico está estrechamente relacionada con el potencial para producir el inóculo, ya sea en medio líquido o sólido (Magan, 2001). En el caso de los hongos entomopatógenos, uno de los sistemas para la producción de conidios se realiza en un sistema bifásico, primero con la producción de micelio en medio líquido y posteriormente una conidiación aérea en un sustrato sólido. Las ventajas en la utilización de un inóculo producido en cultivo líquido son: 1) el aumento de la competitividad del hongo, reduciendo el riesgo de colonización del sustrato por microorganismos contaminantes; 2) la colonización y la conidiación son más rápidas, por lo tanto se reduce el tiempo de incubación y se economiza espacio; 3) la etapa de cultivo líquido puede actuar como un filtro de contaminantes que pudieran estar presentes en el cultivo original; 4) se asegura una completa extensión de las partículas del sustrato sólido, resultando en un crecimiento homogéneo (Jenkins *et al.*, 1998).

En la producción en masa de hongos entomopatógenos, la utilización de un sistema bifásico brinda la posibilidad de tener una mayor producción de propágulos sumergidos (Jenkins *et al.*, 1998). En medios de cultivo líquido, utilizados en la primera etapa, se ha reportado en general que los entomopatógenos crecen rápidamente como micelio o como blastosporas (Vega *et al.*, 1997). Una característica del crecimiento fúngico en estos medios es que

algunos aislamientos tienden a desarrollarse particularmente como pelotillas de micelio (pellets) formadas por una colonia esferoidal (Ulloa & Hanlin, 2000). La morfología puede variar dependiendo de la cepa o del aislamiento, por la composición del medio de cultivo o por las condiciones ambientales (Inch *et al.*, 1986; Kleespies & Zimmermann, 1992; Jenkins & Prior, 1993). Por lo tanto, es de fundamental relevancia el estudio de los medios de cultivo líquidos donde se puedan producir mejor los propágulos fúngicos de aislamientos de este hongo de la región donde van a ser utilizados. En este caso, serían los aislamientos de México de diferentes estados de la República.

**Tabla 3.** Agentes microbianos entomopatógenos basados en *Metarhizium anisopliae*, registrados o con bajo desarrollo comercial para el control de plagas.

Marca Registrada	Compañía o País	Ingrediente activo	Formulación	Principales plagas blanco
Bio-Blast	EcoScience, E.U.	Conidios	PH	Termitas
BioGreen	Bio-Care Technology, Australia	Conidios	G	Abejorro pelirrojo
Bio-Path	EcoScience, E.U.	Conidios	TC	Cucarachas
BIO 1020	Bayer AG, Alemania	Micelio	G	Gorgojo negro de la vid
Cobican	Probioagro, Venezuela	Conidios	PH	Salivazo de la caña de azúcar
Metabiol	Plan Terra-Produtos Biotecnológicos, Brasil	Conidios	PH	Salivazo de los pastos
Metarhizium Schweizer	Eric Schweizer Seeds, Suiza	Conidios	G/TC	Gusano blanco
Metarril	Plan Terra, Brasil	Conidios	PH	Salivazo de la caña de azúcar
Meta-Sin	Agrobionsa, México	Conidios	PH	Picudo del algodón y chile, barrenador de la caña, salivazo

G= granular; PH= Polvo humectable; TC= todo el cultivo.  
Adaptada de: Wraight *et al.*, 2001.

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido al gran daño causado a la salud humana y a los ecosistemas por los insecticidas químicos, es necesaria la búsqueda de opciones menos dañinas y con menor impacto ecológico. Dentro de estas opciones se encuentra el control biológico mediante la producción a gran escala de hongos entomopatógenos para su aplicación en el campo agrícola. El potencial comercial de los entomopatógenos se encuentra limitado a aquellas especies que son reproducibles en masa en medios relativamente baratos. La producción a gran escala de conidios de hongos para su uso como agentes microbianos se realiza en general mediante un sistema bifásico, primero en medio de cultivo líquido y posteriormente en un sustrato sólido. En términos industriales, la producción inicial del hongo en medio de cultivo líquido tiene el potencial de una producción a un costo y tiempo mucho menores. Este trabajo pretende la optimización de un medio líquido que promueva el crecimiento rápido de propágulos fúngicos de diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de México, ya que éste es uno de los pasos primordiales en el desarrollo de un procedimiento de producción en masa.

#### IV. HIPÓTESIS

El medio de cultivo líquido ideal y las condiciones óptimas de crecimiento presentarán la mayor producción de propágulos fúngicos en aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de México.

#### V. OBJETIVO GENERAL

Obtener el medio de cultivo líquido ideal y las condiciones óptimas de crecimiento para la selección de los aislamientos con mayor producción de propágulos fúngicos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de aislamientos de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) de México.

#### VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Ensayar medios de cultivo líquido con material industrial para la obtención de propágulos fúngicos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo y las condiciones óptimas con mayor producción de propágulos fúngicos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.
- Realizar curvas de producción con número de propágulos fúngicos para cada aislamiento del hongo.
- Comparar y seleccionar los aislamientos del hongo que presenten la mayor facilidad y el menor tiempo en la producción de propágulos fúngicos.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Los 19 aislamientos fúngicos evaluados se obtuvieron de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Tecomán, Colima, y de la colección del Laboratorio de Micología básica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las características de los aislamientos se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Datos de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae).

Aislados fúngicos				
CNRCB*	UNAM	Insecto hospedero	Plaga de cultivo	Origen
	EH-172*	<i>Aeneolamia</i> sp.	Caña de azúcar	Tuxtepec, Oaxaca, MX
	EH-346*	<i>Trialeurodes</i> sp.	Berenjena	Guatemala
	EH-347*	<i>Trialeurodes</i> sp.	Berenjena	Guatemala
MaZC1A	EH-465/8**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaZC2N	EH-466/2**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaGB2A	EH-468/1**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaGB3A	EH-469/6**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaGB4	EH-470/6**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaNL18	EH-471/3**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaNP1	EH-472/6**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaNL1	EH-473/4**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaNL2	EH-474/6**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaNM1	EH-475/2**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaNM2	EH-476/3**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	S.L. Potosí, MX
MaOPS1	EH-477/5**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Oaxaca, MX
MaOPS2	EH-478/1**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Oaxaca, MX
MaMV	EH-479/2**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaBA	EH-481/1**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Veracruz, MX
MaPA1	EH-482/8**	<i>Aeneolamia</i> sp.	C. azúcar	Tuxtepec, Oaxaca, MX

\*Cultivos polispóricos; \*\* cultivos monospóricos derivados del original respectivo.



### Suspensiones conidiales

En este estudio se utilizaron conidios provenientes de cultivos monospóricos mantenidos en conservación en agua destilada, aceite mineral y nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Navarro-Barranco *et al.*, 2001). Para los diferentes ensayos, los conidios se sembraron en tubos de cultivo con medio APD (infusión de papa blanca 30%, dextrosa 2%, agar 1.5%) y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Para la realización de las suspensiones conidiales, a cada tubo se agregaron 3 ml de Tween 80 estéril al 1%, y se separaron los conidios utilizando un asa micológica evitando transferir el micelio. La suspensión obtenida se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml para su siembra posterior en el medio de cultivo específico.

### Selección del medio de cultivo

La selección del medio de cultivo líquido se realizó ensayando 10 medios diferentes reportados en la literatura, mostrados en la Tabla 5 con los componentes respectivos:

- Medio Adamek, originalmente descrito para la producción de esporas sumergidas de *Metarhizium anisopliae* (Stephan & Zimmermann, 1998).
- DEL, reportado para producción de conidios sumergidos (Jenkins & Prior, 1993).
- Infusión de papa (IP), utilizado como prueba al observar propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* en APD (Toriello, com. pers.).
- IP con asparagina; esta última es una fuente de nitrógeno que enriquece el medio y se utiliza para mayor producción de células de levaduras en hongos patógenos del hombre.
- IP modificado, adicionado con glucosa para reducir la actividad del agua y favorecer la formación de propágulos fúngicos (Kleespies *et al.*, 1992).
- Medio Jackson, para producir blastosporas tolerantes a la desecación en *Paecilomyces fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997).

- Paris, medio sintético probado con *Beauveria brongniartii*, en el que se reporta la obtención de blastosporas (Vidal *et al.*, 1998).
- Vogel, probado para *Metarhizium anisopliae* (Humphreys *et al.*, 1989).
- Vogel modificado, utilizado para la obtención de blastosporas de *B. bassiana* (Humphreys *et al.*, 1989).
- YG, utilizado para la producción en masa de blastosporas de *B. bassiana* (Humphreys *et al.*, 1989).

**Tabla 5.** Componentes (g/L) de los medios ensayados para la producción de propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Ingredientes	Adamek	DEL	IP	IP con asparagina	IP modificado	Jackson	Paris	Vogel	Vogel modificado	YG
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	2	0.36	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	0.3	0.60	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	1.42	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	0.016	-	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	0.037	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	0.70	-	-	-
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	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	-	-	700	700	700	-	-	-	-	-
Mezcla de vitaminas	-	-	-	-	-	3.15	-	-	-	-
Tween 80	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG 200	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-

### Ensayos preliminares

Para las pruebas preliminares con los distintos medios se utilizó el aislamiento EH-473/4. Las condiciones de cultivo ensayadas para la selección del medio fueron: temperatura a 28 y 37°C; agitación a 110 rpm y sin agitación; pH inicial ajustado a 7 y sin ajustar.

No fue necesario probar todas las condiciones para todos los medios ya que estas se fueron descartando conforme a las observaciones en ciertos medios.

### **Siembra y muestreo para la selección del medio de cultivo**

A matraces erlenmeyer con 75 ml de medio de cultivo estéril se adicionó 1 ml de una suspensión conidial en Tween 80 estéril al 1 %, obteniendo una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, y se incubaron bajo las condiciones anteriormente descritas. La observación cualitativa de la morfología de los propágulos se realizó tomando una muestra cada 24 h. Cada tratamiento consistió de un matraz del medio específico con tres repeticiones y tuvo una duración de 96 h.

El resultado de las pruebas preliminares mostró que el medio ideal para la producción de propágulos fúngicos de este hongo fue Infusión de Papa (*Solanum tuberosum*) en condiciones de agitación a 28°C. Con este medio y condiciones de cultivo se procedió a realizar los ensayos con todos los aislamientos.

### **Elaboración del medio de cultivo seleccionado**

El medio de cultivo seleccionado, IP, se elaboró de la siguiente forma: para un litro de medio, se pesaron 300 g de papa blanca, pelada y cortada en trozos. La papa cortada se hirvió en 1 L de agua destilada hasta su cocción. La infusión obtenida de este procedimiento fue filtrada varias veces en capas dobles de gasa para eliminar los residuos de papa. A la infusión resultante se agregaron 20 g/L de glucosa (Droguería Cosmopolita, México) y se aforó a 1 L. Al medio estéril se le determinaron carbohidratos por el método de Dubois (Dubois *et al.*, 1951) y proteínas totales por la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### **Siembra, condiciones y procedimientos de muestreo del medio seleccionado**

Para cada uno de los 19 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, se adicionó 1 ml de una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml a matraces con 100 ml del medio IP, obteniendo una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios/ml. Los matraces se incubaron en agitación orbital a 110 rpm (Boekel Grant ORS 200, Boekel Scientific, USA) a 28°C. La concentración y morfología de los propágulos fúngicos se determinó tomando 20 ml de muestra cada 24 h. La duración del experimento

se aumentó 24 h más (120 h), ya que aún después de las 96 h se observó producción de propágulos.

### **Producción de propágulos fúngicos**

Debido a la presencia de pelotillas de micelio (pellets), fue necesario hacer una dilución 1:1 y sonicar las muestras a 130 watts durante 7 min (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonics Corporation, USA) para poder determinar la concentración de propágulos fúngicos. De cada muestra se tomaron cinco alícuotas y se observaron a una magnificación de 400 x en un microscopio CH-2 (Olympus Optical, Japón). Los propágulos se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer (Optik Labor, Alemania), obteniendo un total de 15 registros para cada aislado a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes y se determinaron los aislamientos con mayor, media y menor producción de propágulos fúngicos. Al mismo tiempo, los diferentes tipos de propágulos se fotografiaron utilizando una cámara digital DP11 (Olympus) en un microscopio BX50 F-3 (Olympus).

### **Tamaño de propágulos fúngicos**

La longitud y anchura de los propágulos de los aislamientos con mayor, media y menor producción se midió utilizando un micrómetro ocular calibrado a una magnificación de 400 x, en un total de 15 propágulos para cada uno de los aislamientos y en cada uno de los tiempos registrados (24, 48, 72, 96 y 120 h).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos de la producción y el tamaño de los propágulos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha = 0.01$ ).

## VIII. RESULTADOS

## Ensayos preliminares

La comparación cualitativa entre el crecimiento y la producción de propágulos del aislamiento EH-473/4 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con pH ajustado a 7, y el pH original de algunos de los medios probados, no mostró diferencias importantes (Tabla 6). La selección del medio de cultivo y de las condiciones óptimas para la producción de propágulos fúngicos en este aislamiento se realizaron simultáneamente mediante una escala cualitativa de cruces (Tabla 7).

**Tabla 6.** Crecimiento del aislamiento EH-473/4 en cuatro de los medios líquidos probados, con pH ajustado a 7 y pH original del medio.

		28° C a 110 rpm					
Medio	Horas	pH 7			pH original*		
		P	C	B	P	C	B
Adamek	24	++	++	-	++	++	-
	48	++	++	+	+++	++	+
	72	+++	+	+	+++	+	++
	96	+++	-	+	+++	-	+
DEL	24	+++	++	-	+++	+++	-
	48	+++	++	-	+++	++	-
	72	+++	+	-	+++	++	-
	96	+++	+	+	+++	+	+
IP	24	++	-	-	+++	-	-
	48	+++	+	+	+++	+	++
	72	+++	+	+++	++	+	+++
	96	+++	-	++	+++	-	++
Jackson	24	-	++	-	-	++	-
	48	+	+	-	+	++	-
	72	+	+	+	+	+	+
	96	++	-	+	++	-	+

+ = cantidad baja de propágulos fúngicos; ++ = cantidad media de propágulos fúngicos; +++ = cantidad alta de propágulos fúngicos; - = sin propágulos fúngicos.

\* Medio Adamek pH = 5; medio DEL pH = 5.1; medio IP pH = 5.7; medio Jackson pH = 4.7.

P = pelotillas de micelio; C = conidios; B = blastosporas.

**Tabla 7.** Crecimiento de propágulos fúngicos del aislamiento EH-473/4 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en los 10 medios de cultivo líquidos probados.

Medio de cultivo	Horas	Agitación (110 rpm)						Sin agitación					
		28° C			37° C			28° C			37° C		
		P	C	B	P	C	B	P	C	B	P	C	B
Adamek	24	++	++	-	-	++	-	NR	NR	NR	-	++	-
	48	+++	++	+	-	++	-	NR	NR	NR	-	++	-
	72	+++	+	++	+	+	-	NR	NR	NR	-	++	-
	96	+++	-	+	+	+	-	NR	NR	NR	-	++	-
DEL	24	+++	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-
	48	+++	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-
	72	+++	++	-	+	++	-	+	+	-	-	++	-
	96	+++	+	+	++	+	-	+	+	-	-	++	-
IP	24	++	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-
	48	+++	+	++	-	++	-	-	++	-	-	++	-
	72	+++	+	+++	+	+	-	+	+	-	-	++	-
	96	+++	-	++	+	+	-	+	+	-	-	++	-
IP con asparagina	24	+++	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-
	48	+++	-	+	+	++	-	-	++	-	-	++	-
	72	+++	-	+	+	++	-	+	+	-	-	++	-
	96	+++	-	++	++	+	-	++	+	-	-	++	-
IP modificado	24	++	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	48	++	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	72	++	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	96	+++	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Jackson	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
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
Vogel	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
Vogel 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
YG	24	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	48	+	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	72	+	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	96	++	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

+ = cantidad baja de propágulos fúngicos; ++ = cantidad media de propágulos fúngicos; +++ = cantidad alta de propágulos fúngicos; - = sin propágulos fúngicos y NR = no realizado.

P = Pelotillas de micelio; C = Conidios; B = Blastosporas.

El medio de cultivo Adamek presentó una gran cantidad de pelletillas de micelio (pellets) muy compactas y de gran tamaño a partir de las 24 y hasta las 96 h en agitación a 28°C (Fig. 6); los propágulos fúngicos (conidios, blastosporas y cuerpos hifales) sólo lograron observarse en la periferia de éstas. Por el contrario, a 37°C con agitación los conidios sembrados difícilmente germinaron y las pelletillas reportadas presentaron una gran cantidad de conidios sin germinar. A 37°C sin agitación los conidios no germinaron en ningún momento (Fig. 7). Por lo tanto, en las cruces que aparecen en la Tabla 7 con y sin agitación a 37°C, los conidios observados fueron conidios que no germinaron. En cambio, en agitación a 28°C los conidios observados desde las 24 h fueron conidios sumergidos (nuevos).

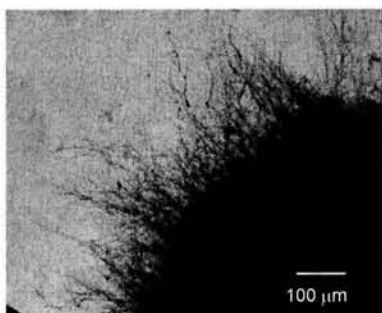


Figura 6. Pelotilla de micelio en medio Adamek con agitación a 28°C, 48 h.

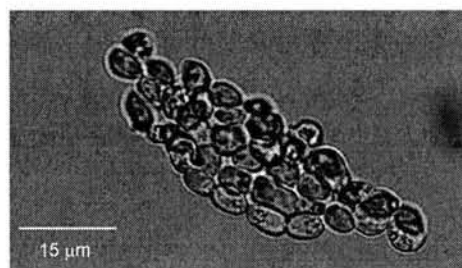


Figura 7. Conidios sin germinar en medio Adamek sin agitación a 37°C, 96 h.

El medio DEL mostró pelletillas muy compactas en agitación a 28°C durante todo el experimento (Fig. 8), y al igual que en el medio Adamek sólo fue posible observar propágulos en la periferia; a esta misma temperatura pero sin agitación los conidios tardaron más tiempo en germinar, se observaron pocas pelletillas y muy laxas (Fig. 9). En agitación a 37°C muy pocos conidios germinaron y las pelletillas encontradas presentaron poco micelio (Fig. 10); a esta misma temperatura sin agitación no hubo germinación de conidios. Las cruces que aparecen en la Tabla 7 con y sin agitación a 37°C y sin agitación a 28°C, corresponden a conidios no germinados. A partir de las 24 h, los conidios en agitación a 28°C fueron conidios sumergidos.

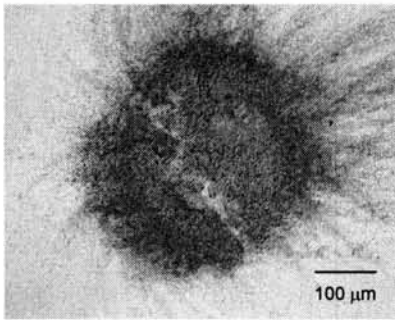


Figura 8. Pelotilla en medio DEL con agitación a 28°C, 72 h.

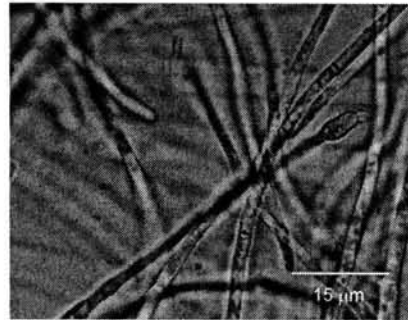


Figura 9. Interior de una pelotilla laxa en medio DEL sin agitación a 28C, 72 h.

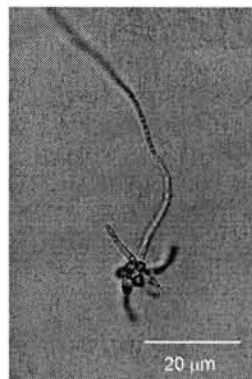


Figura 10. Conidios sin germinar y algunos germinando en medio DEL con agitación a 37°C, 48 h.

Al igual que en los medios anteriores, el medio IP presentó gran cantidad de pelotillas en agitación a 28°C, pero a diferencia de éstos, en IP se pudieron observar gran cantidad de propágulos fúngicos en el interior (Fig. 11); a esta misma temperatura y sin agitación, los conidios germinaron muy tarde y no formaron pelotillas sino hasta las últimas horas del experimento (Fig. 12). A 37°C con agitación, el poco micelio formado dio origen a estructuras de resistencia (Fig. 13), sin agitación los conidios no germinaron (Fig 14). Las cruces reportadas con y sin agitación a 37°C y sin agitación a 28°C corresponden a conidios que no germinaron. Los conidios registrados a partir de las 24 h corresponden a conidios sumergidos.



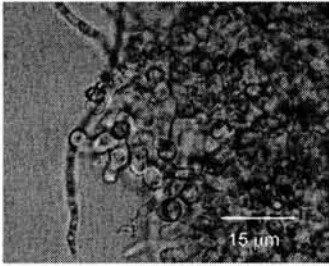


Figura 11. Propágulos en el interior de una pelotilla formada en medio IP con agitación a 28°C, 72 h.

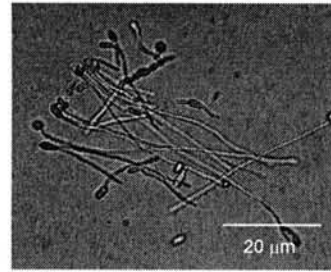


Figura 12. Conidios germinados en medio IP sin agitación a 28°C, 48 h.

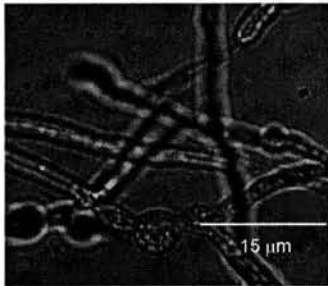


Figura 13. Estructura de resistencia (clamidospora) en medio IP con agitación a 37°C, 60 h.

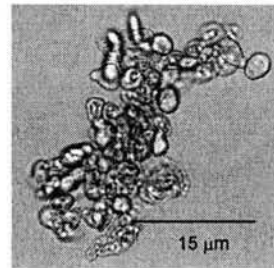


Figura 14. Conidios sin germinar en medio IP sin agitación a 37°C, 72 h.

En el caso del medio IP con asparagina en agitación a 28°C se observó menor cantidad de propágulos en el interior de los pellets que en el medio IP. A esta misma temperatura y sin agitación, al igual que a 37°C con y sin agitación los resultados obtenidos fueron iguales que en el medio IP. Las cruces reportadas con y sin agitación a 37°C y sin agitación a 28°C pertenecen a conidios que no germinaron. En el caso de los conidios con agitación a 28°C las cruces pertenecen a conidios sumergidos.

De acuerdo con los resultados hasta ahora mencionados, se observó que las condiciones con y sin agitación a 37°C y sin agitación a 28°C no presentaron formación de propágulos fúngicos, y por esta razón se fueron eliminando en algunos medios (NR en la Tabla 7).

El medio IP modificado, enriquecido con glucosa (80 g/L), fue utilizado para disminuir la actividad del agua con la finalidad de evitar la formación de pellets y aumentar la de propágulos (Kleespies & Zimmermann 1992). Lo que se observó fue una disminución en la formación de pellets, pero al mismo tiempo la producción de los dos tipos de propágulos (conidios y blastosporas) fue nula. Las

cruces que aparecen en la Tabla 7 corresponden a conidios que no habían germinado hasta las 48 h.

El medio Jackson a 28°C en agitación mostró una disminución en la formación de propágulos y pelotillas (Fig 15). A 37°C en agitación pocos conidios germinaron y la formación de pelotillas fue casi nula. Las cruces reportadas a los 37°C con y sin agitación corresponden a conidios sin germinar. A 28°C con agitación, los conidios observados son también conidios sin germinar ya que este medio retrasó la formación de pelotillas y por lo tanto la germinación y el crecimiento fueron más lentos.

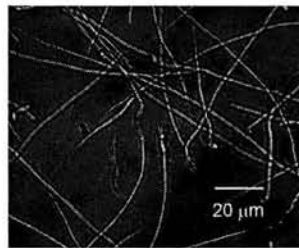


Figura 15. Micelio disperso producido en medio Jackson en agitación a 28°C, 48 h.

Las pruebas realizadas con el medio Paris mostraron gran cantidad de pelotillas y baja de propágulos. Sin agitación y a 28°C no se observó la formación de propágulos nuevos.

Los medios Vogel y Vogel modificado presentaron el mismo comportamiento, tanto en la formación de abundantes pelotillas como en la producción de propágulos fúngicos a 28 y 37°C en agitación. Las cruces que se observan en agitación a 37°C corresponden a conidios que no germinaron. A 28°C con agitación los conidios observados fueron sumergidos.

En el medio YG, utilizado también para aumentar la producción de propágulos fúngicos y disminuir la actividad del agua, la formación de pelotillas compactas fue menor, pero al mismo tiempo favoreció la producción de micelio y disminuyó la cantidad de propágulos fúngicos (Fig. 16).

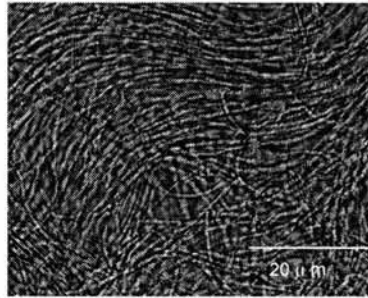


Figura 16. Pelotilla laxa en medio YG en agitación a 28°C, 48 h.

### **Medio de cultivo y condiciones seleccionadas**

Con base en los resultados obtenidos, el medio seleccionado para probarse en los 19 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* fue el medio IP por presentar la mayor cantidad de propágulos fúngicos. Las condiciones óptimas fueron agitación a 110 rpm y temperatura a 28°C.

### **Determinación de carbohidratos y proteínas totales**

La cantidad de carbohidratos del medio IP estéril, realizado por el método de Dubois (Dubois *et al.*, 1951), fue de 250 g/L, mientras que la de proteínas totales realizada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) fue de 1.95 g/L.

### **Formación de propágulos fúngicos**

Los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* utilizados en este experimento presentaron tres tipos de propágulos: conidios sumergidos, blastosporas y cuerpos hifales. Los conidios sumergidos se produjeron de forma diferente a la conidiogénesis aérea, es decir, no formaron cadenas de fialoconidios emergiendo de manera terminal en fiálides elongadas, como se observa en medios de cultivo sólidos; en vez de esto, se formó sólo un conidio en la parte terminal de la hifa (Fig. 17-A) o en la parte lateral de la hifa en un septo (Fig. 17-B). Es importante mencionar que de acuerdo con lo reportado en la literatura (Inch *et al.*, 1986; Kleespies & Zimmermann, 1992; Jackson *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1998; Deshpande 1999; Fargues *et al.*, 2001), se contaron y midieron como blastosporas los propágulos producidos de forma endógena, por gemación (Fig. 17-C) o por fisión binaria (Fig. 17-D). Los cuerpos hifales se encontraron en menor concentración que los conidios y las blastosporas; estas estructuras fueron muy

alargadas, de longitud variable y se formaron por desprendimiento en los septos de las hifas (Fig. 17-E y F).

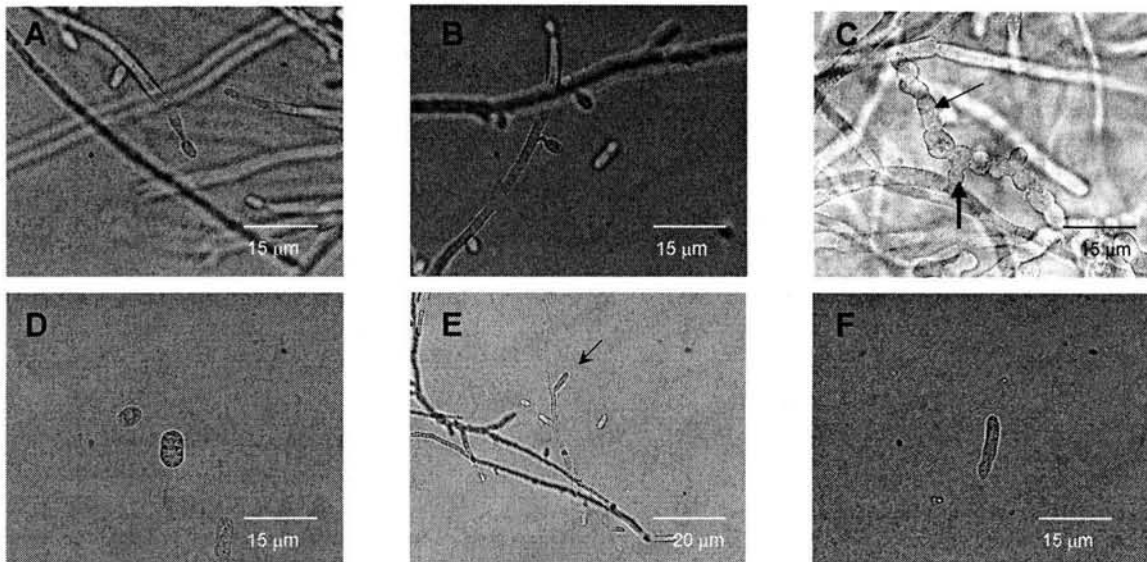


Figura 17. Propágulos fúngicos del aislamiento EH-469/6. (A) Conidio sumergido creciendo en la parte terminal de una hifa. (B) Conidio sumergido en la parte lateral de una hifa. (C) Blastosporas de origen endógeno (flecha delgada) y por gemación (flecha gruesa) y (D) Propágulo con división. (E) Formación de cuerpo hifal (flecha) y (F) cuerpo hifal separado de la hifa.

### Producción de propágulos fúngicos en medio IP

Los datos de producción para los 19 aislamientos se muestran por tipo de propágulos fúngicos. En la Tabla 8 se muestra la producción de conidios sumergidos. Entre los aislamientos se encontró una gran variación en la producción; el aislamiento EH-469/6 presentó la mayor producción de conidios sumergidos, registrando una concentración de  $107 \times 10^5/\text{ml}$  a las 24 h de transcurrido el experimento, es decir, 10 veces mayor que la concentración inicial, y fue la mayor de este aislamiento a lo largo del experimento permaneciendo con la mayor producción sobre los demás hasta las 72 h. El seguimiento de la transición en este aislamiento desde los conidios sembrados al inicio (0 h) y su observación microscópica cada 24 h hasta 120 h se presenta en la Fig. 18. A las 24 h después de haber sido sembrados, los conidios ya habían germinado, presentando gran cantidad de micelio y pelotillas no muy compactas. La formación de gran cantidad de conidios sumergidos se observó a partir de las puntas hifales, a lo largo del micelio y en algunos casos a partir de cuerpos hifales. La presencia de blastosporas y una gran disminución de conidios sumergidos se observó a las

48 h de registro; al mismo tiempo aumentó la cantidad de pelotillas debido a la germinación de los conidios. La menor producción de conidios se encontró a las 96 h. Simultáneamente, la producción de blastosporas se mantuvo constante y mayor que la de conidios a partir de las 72 h y hasta las 120 h; en esta última hora la producción de conidios se incrementó y se observó el micelio vacuolizado. La producción media de conidios se presentó en el aislamiento EH-479/2, cuya mayor concentración ( $7.2 \times 10^5/\text{ml}$ ) se registró también a las 24 h. La producción disminuyó a las 48 h mientras que la de blastosporas comenzó; en el registro de las 72 y 96 h la concentración de conidios se mantuvo constante y disminuyó a las 120 h. La menor producción se encontró en el aislamiento EH-471/3, que sólo presentó conidios ( $0.06 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 48 h. En la Fig. 19 se muestra la producción de conidios de los aislamientos con mayor, media y menor producción, y en el anexo 1 se puede observar la producción de todos los aislamientos. Los conidios que aparecen al tiempo cero corresponden a los sembrados al comienzo del experimento.

La mayoría de los aislamientos mostraron la mayor concentración de conidios sumergidos entre las 24 y 48 h, posteriormente su producción disminuyó y en algunos aislamientos se incrementó nuevamente después de las 72 h. Los aislamientos EH-465/8 y 476/3 presentaron la mayor concentración hasta las 120 h. Hubo diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) en cuanto a la producción de conidios sumergidos entre todos los aislamientos probados.

**Tabla 8.** Producción de conidios sumergidos ( $N^{\circ} \times 10^5/\text{ml}$ )\* de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio IP.

Aislamiento	Tiempo (horas)				
	24	48	72	96	120
EH-172	0	0	0	0.9	0.2
EH-346	3.2	1.6	1.8	1	0.8
EH-347	17.6	7.6	4.0	2.8	4
EH-465/8	8.5	2.7	2.9	1.7	25.8
EH-466/2	2.4	1.7	0.4	0.6	0.6
EH-468/1	2.7	2.6	0.6	1.4	0.7
EH-469/6*	107	25	6.8	1.6	6.3
EH-470/6	0	4.5	1.2	1.3	0.46
EH-471/3***	0	0.06	0	0	0
EH-472/6	2.2	1.5	1.2	1.5	1.3
EH-473/4	0	3.4	3.8	0.1	0.3
EH-474/6	0	0.7	0.5	0.2	0.7
EH-475/2	7.5	5.4	2	4.6	1
EH-476/3	0	0.8	0.7	1.8	2.2
EH-477/5	0	0.6	0.1	0.1	0
EH-478/1	0	6.6	8.6	15.8	7.9
EH-479/2**	7.2	6	3.1	3.2	1.2
EH-481/1	5	4	2.6	2.4	1.3
EH-482/8	0	1.2	2.4	1.6	1.7

\*Todos los resultados se expresaron con el mismo exponente para una mejor comprensión y comparación entre ellos, y están anotados los promedios de 15 conteos. Los cultivos se incubaron con agitación (110 rpm) a 28 °C. \* Mayor productor de conidios; \*\* productor medio de conidios; \*\*\* Menor productor de conidios.

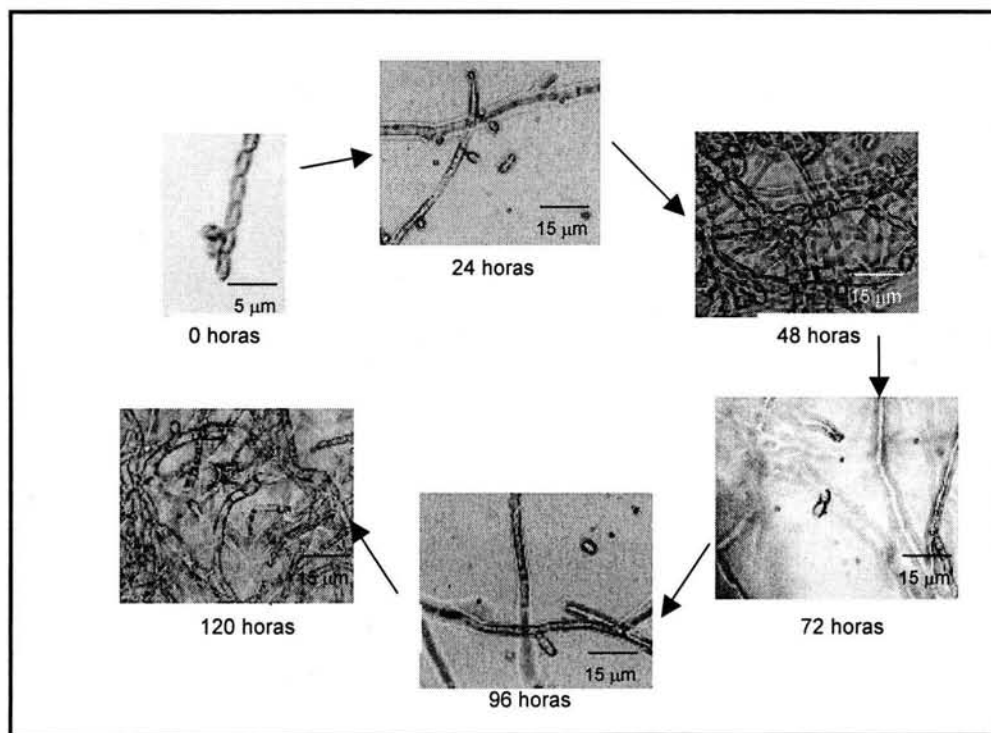


Figura 18. Producción de conidios sumergidos y blastosporas en el aislamiento EH-469/6 en medio IP, con agitación a 28 °C, durante 120 h de incubación.

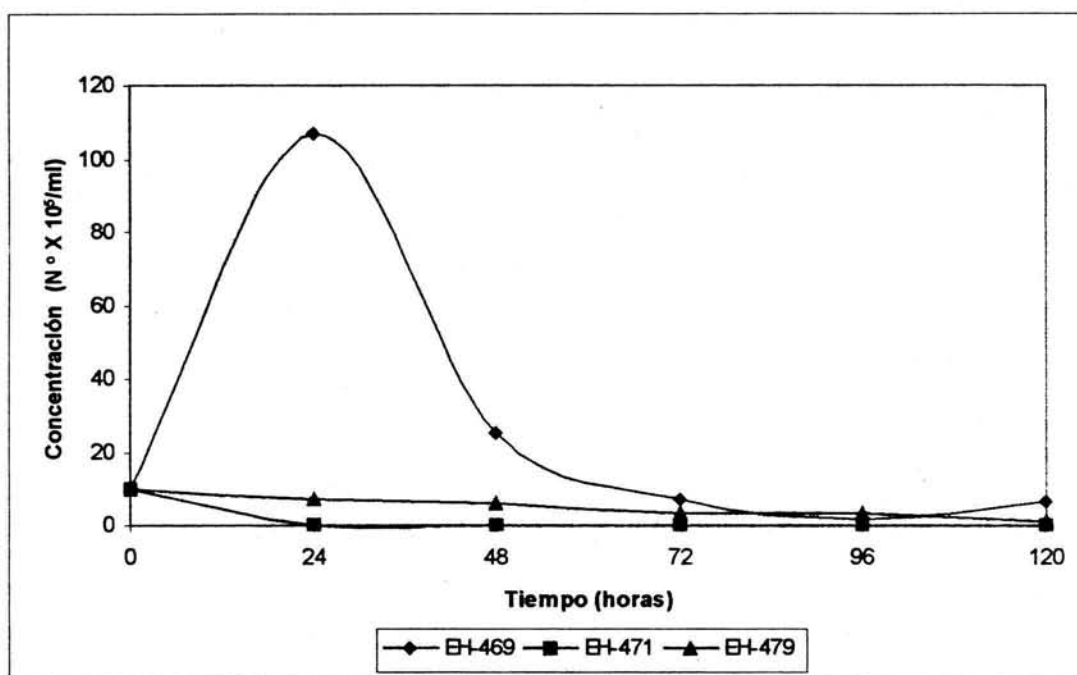


Figura 19. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con mayor, media y menor producción de conidios sumergidos en medio IP, en agitación a 110 rpm a 28 °C. La concentración de conidios al tiempo cero corresponde a los sembrados al inicio del experimento.

En la producción de blastosporas los resultados obtenidos (Tabla 9) muestran al aislamiento EH-474/6 como el mayor productor, presentando su más alta concentración a las 96 h ( $38.4 \times 10^5/\text{ml}$ ); este aislamiento presentó también la mayor concentración a las 48, 72 y 120 h sobre los demás. La transición de este aislamiento observada por microscopía, desde los conidios inoculados hasta la formación de blastosporas (0 a 120 h), se muestra en la Fig. 20. A las 24 h, los conidios germinados presentaron tubos germinativos muy largos y gruesos formando pellets muy pequeños. En el registro realizado a las 48 h, se observó el engrosamiento del micelio indicando el comienzo de la formación de blastosporas endógenas; este evento fue mayor a las 72 h, ya que el número y tamaño de pellets aumentó. A las 96 h se presentó la mayor producción de blastosporas, y también se registró la menor de conidios sumergidos. Sin embargo, en el último registro (120 h) la cantidad de conidios aumentó y la de blastosporas disminuyó. A este tiempo se observó también la vacuolización del micelio. La producción media se obtuvo en el aislamiento EH-471/3, y su mayor concentración ( $4.8 \times 10^5/\text{ml}$ ) se registró a las 96 h, mientras que la menor se registró en el EH-172 que sólo presentó blastosporas ( $0.13 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 120 h. La Fig. 21 muestra la

producción de estos tres aislamientos, y en el anexo 2 se puede observar la producción de todos los aislamientos. La mayoría de los aislamientos presentaron la mayor concentración de blastosporas entre las 48 y 72 horas. Al realizar el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre todos los aislamientos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 9.** Producción de blastosporas ( $N^{\circ} \times 10^5/ml$ )\* de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio IP.

Aislamiento	Tiempo (horas)				
	24	48	72	96	120
EH-172***	0	0	0	0	0.1
EH-346	0	1.2	2	0.3	0.06
EH-347	0.5	2	3	0.4	0.5
EH-465/8	0.2	2.4	0.6	0.1	0.6
EH-466/2	0.2	1.1	0.1	0.2	0.1
EH-468/1	0.6	0.4	0.7	0.2	0.1
EH-469/6	3	5.4	12.3	12.2	12.6
EH-470/6	0	10	3.2	3.9	3
EH-471/3**	0	1.8	4.2	4.8	3.3
EH-472/6	0.1	1.66	1.4	0.1	0.1
EH-473/4	0	0.46	1.8	2.3	2.9
EH-474/6*	0	14.7	23.9	38.4	28.6
EH-475/2	2.2	6.2	15.2	12.9	6.8
EH-476/3	0	0.3	0.2	3.5	4.9
EH-477/5	0	2.1	2	2.4	2.4
EH-478/1	0	0.5	2.3	0.6	0.2
EH-479/2	0	1	15	11.4	6.2
EH-481/1	0.2	0.2	0.5	0.2	0.6
EH-482/8	0	2.3	0.9	0.8	0.4

\*Todos los resultados se expresaron con el mismo exponente para una mejor comprensión y comparación entre ellos, y están anotados los promedios de 15 conteos. Los cultivos se incubaron con agitación (110 rpm) a 28 °C. \* Mayor productor de blastosporas; \*\* productor medio de blastosporas; \*\*\* Menor productor de blastosporas.



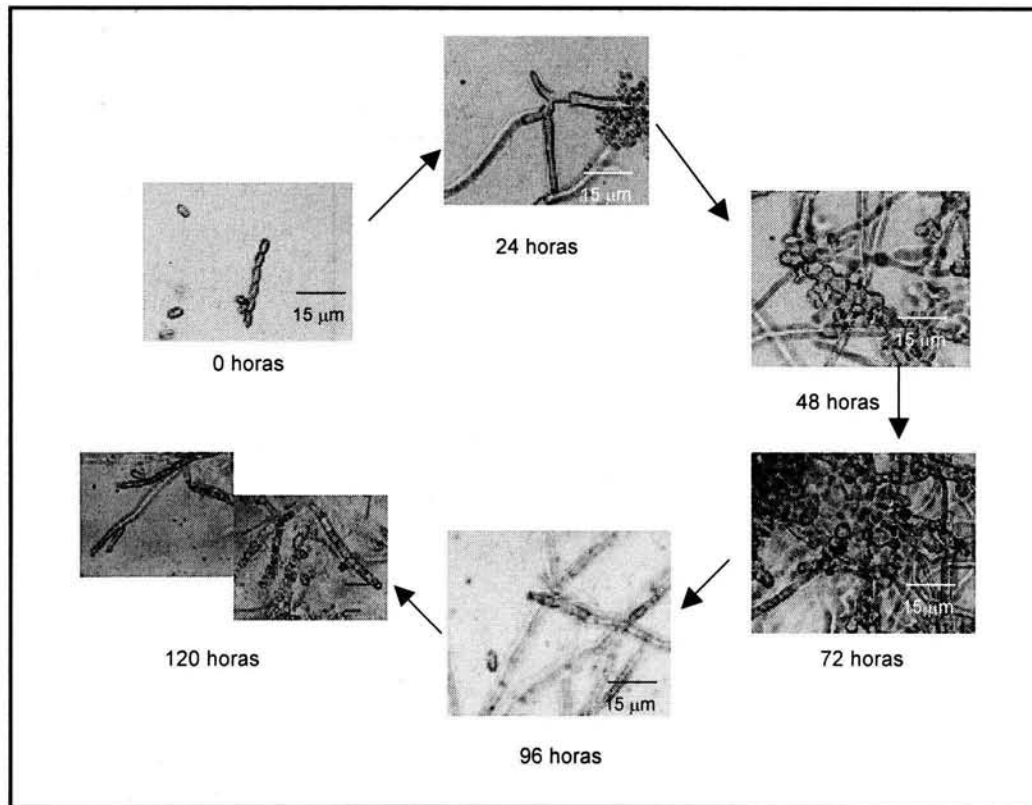


Figura 20. Producción de blastosporas y conidios sumergidos del aislamiento EH-474/6 en medio IP con agitación a 28 °C, durante 120 h.

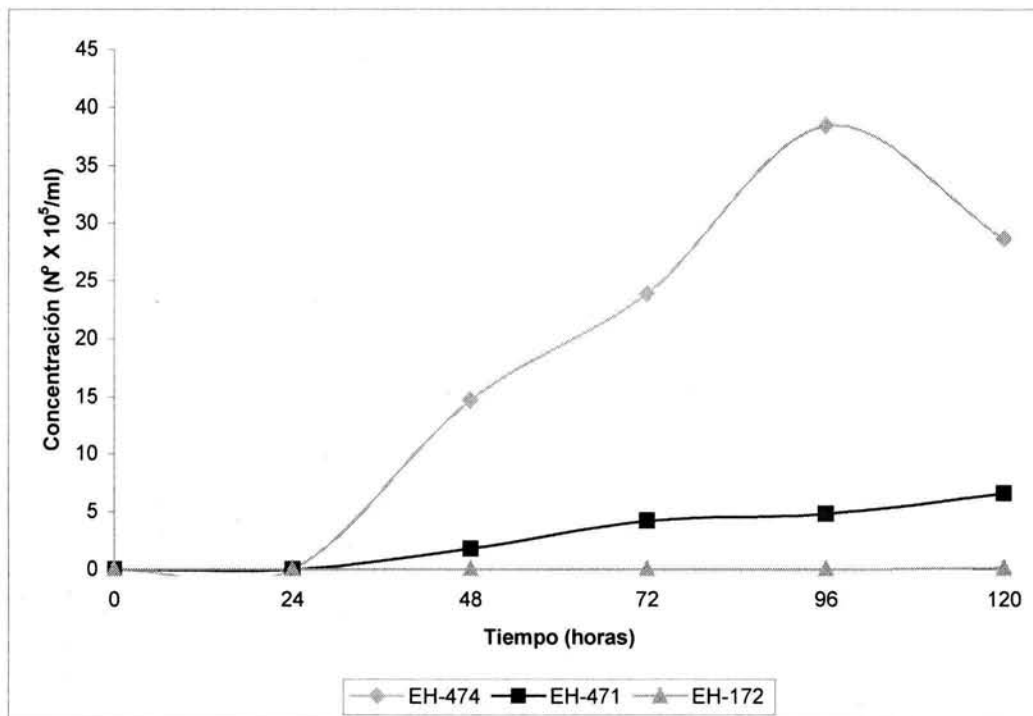


Figura 21. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con mayor, media y menor producción de blastosporas en medio IP con agitación a 110 rpm a 28 °C.

La producción de cuerpos hifales se mantuvo por debajo de la de conidios y blastosporas (Tabla 9), y no se observó en los aislamientos EH-172 y 474/6. El aislamiento con la mayor producción fue el EH-468/1, presentando la mayor concentración ( $5.3 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 48 h, mientras que la producción media se registró en el EH-347 con su máxima concentración ( $1.2 \times 10^5/\text{ml}$ ) a las 48 h. Dos aislamientos, el EH-471/3 y 472/6, presentaron la menor concentración de propágulos ( $0.06 \times 10^5/\text{ml}$ ), y sólo se observaron a las 72 y 24 h respectivamente. La Fig. 22 muestra la producción de estos cuatro aislamientos; en el anexo 3 se puede observar la producción de todos los aislamientos. Con excepción de cinco (EH-465/8, 471/3, 472/6, 475/2 y 481/1), todos los aislamientos presentaron la mayor concentración de cuerpos hifales a las 48 h. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los aislamientos ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 10.** Producción de cuerpos hifales ( $\text{N}^\circ \times 10^5/\text{ml}$ ) de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio IP.

Aislamiento	Tiempo (horas)				
	24	48	72	96	120
EH-172	0	0	0	0	0
EH-346	0.13	0.2	0	0	0
EH-347**	0.8	1.2	0.06	0.1	0.1
EH-465/8	0.2	0.06	0.06	0.4	0
EH-466/2	0	0.6	0.2	0.1	0.2
EH-468/1*	2.2	5.3	0.6	0.4	0.5
EH-469/6	1.2	1.5	0.5	0	0
EH-470/6	0	0.4	0.2	0.06	0.06
EH-471/3***	0	0	0.06	0	0
EH-472/6***	0.06	0	0	0	0
EH-473/4	0	1	0.06	0.5	0.2
EH-474/6	0	0	0	0	0
EH-475/2	0.7	0	0	0	0
EH-476/3	0	0.5	0.2	0.2	0
EH-477/5	0	0.6	0.2	0	0
EH-478/1	0	4.6	1.4	0	0.9
EH-479/2	0	0.8	0.5	0	0
EH-481/1	1.8	0.0	0.3	0.1	0.4
EH-482/8	0	1.4	0.2	0	0

\*Todos los resultados se expresaron con el mismo exponente para una mejor comprensión y comparación entre ellos, y están anotados los promedios de 15 conteos. Los cultivos se incubaron con agitación (110 rpm) a 28 °C. \* Mayor productor de cuerpos hifales; \*\* productor medio de cuerpos hifales; \*\*\* Menor productor de cuerpos hifales.

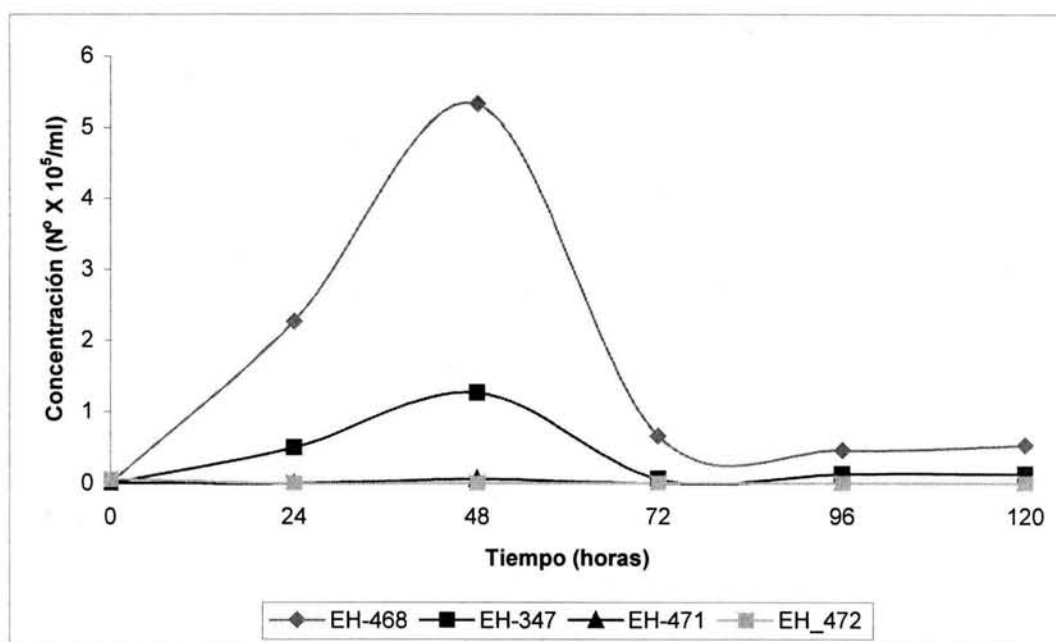


Figura 22. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con mayor, media y menor producción de cuerpos hifales en medio IP con agitación a 110 rpm a 28 °C.

### Tamaño de propágulos fúngicos

El tamaño de conidios y blastosporas de los aislamientos con mayor, media y menor concentración se muestra en la Tablas 11 y 12, respectivamente. En el caso de los conidios sumergidos, se muestran también las medidas de las blastosporas, y lo mismo ocurre para los conidios. Los cuerpos hifales no fueron medidos por presentar una longitud y una anchura muy variables.

**Tabla 11.** Medidas de conidios (longitud X anchura) de los aislamientos con mayor, media y menor producción.

Aislamiento	longitud(μm)	anchura (μm)
EH-469/6	7.11 ± 0.79	2.56 ± 0
EH-471/3	7.49 ± 0.18	2.56 ± 0
EH-172	7.69 ± 0.00	2.56 ± 0
EH-479/2	7.52 ± 0.19	2.56 ± 0
EH-474/6	6.79 ± 0.37	2.56 ± 0

Las medidas de conidios de los aislamientos EH-474/6, 471/3 y 172 pertenecen a los aislamientos que presentaron también la mayor, media y menor producción de blastosporas. El dato anotado es el resultado de 15 mediciones ± desviación estándar.

**Tabla 12.** Medidas de blastosporas (longitud X anchura) de los aislamientos con mayor, media y menor producción.

Aislamiento	longitud ( $\mu\text{m}$ )	anchura ( $\mu\text{m}$ )
EH-469/6	$9.70 \pm 0.49$	$5.17 \pm 0.08$
EH-471/3	$9.24 \pm 0.21$	$5.42 \pm 0.21$
EH-172	$9.70 \pm 0.49$	$5.17 \pm 0.08$
EH-479/2	$9.01 \pm 0.56$	$5.42 \pm 0.21$
EH-474/6	$8.84 \pm 1.00$	$6.49 \pm 0.42$

Las medidas de blastosporas de los aislamientos EH 469/6, 479/2 y 471/3 pertenecen a los aislamientos que también presentaron la mayor, media y menor producción de conidios. El dato anotado es el resultado de 15 mediciones  $\pm$  desviación estándar.

## VIII. DISCUSIÓN

La pérdida de eficiencia de los insecticidas químicos debido al desarrollo de resistencia en las poblaciones de plagas y el alto costo de los insecticidas de menor toxicidad, han dado como resultado la búsqueda de otras opciones menos dañinas al ambiente, entre las cuales se encuentra el control biológico. Además, recientemente el regreso de los llamados productos de granjas orgánicas han creado gran interés en los métodos alternativos para el control de plagas ya que carnes, frutas y vegetales alcanzan altos precios en el mercado si se mantienen libres de químicos (Hogsette, 1999).

La utilización de hongos entomopatógenos y el desarrollo de nuevas tecnologías de producción y aplicación en el control biológico tienen como finalidad ofrecer una alternativa eficaz en el combate de plagas que afectan cultivos agrícolas de importancia económica. Hasta ahora, la mayoría de los sistemas de producción fúngica emplean dos etapas, una en donde el inóculo del micelio o los cuerpos hifales son producidos en cultivo líquido, y otra en donde son transferidos a un substrato sólido para la producción de conidios, lo que disminuye sustancialmente el tiempo y por lo tanto el costo de la producción (Jenkins *et al.*, 1998). De aquí, la relevancia de estudios básicos sobre los aislamientos fúngicos del país para encontrar la composición y las condiciones de medios de cultivo ideales que propicien una mayor rapidez de producción y por ende menor costo de producción.

*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, al igual que la mayoría de los hongos entomopatógenos, produce conidios que se forman en fiálides, generalmente aéreos en cultivos sólidos o semisólidos, y blastosporas que se forman en cultivos líquidos. En este último cultivo, los hongos pueden crecer como micelio filamentoso disperso, como densos agregados miceliales llamadas pelotillas de micelio, o como una mezcla de ambos (Humphreys *et al.*, 1989). Se ha reportado también la presencia de conidios sumergidos en medios líquidos; en el caso de *Beauveria bassiana*, se requiere de cuidadosas manipulaciones de los nutrientes y condiciones ambientales (Bosch & Yantorno, 1999), mientras que en *Metarhizium*, se presentan en medios de cultivo simples (Jenkins & Prior, 1993).

Las condiciones y la composición de los diez medios de cultivo probados en este estudio afectaron la formación y producción de propágulos fúngicos de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* estudiados. Dos condiciones de cultivo fueron determinantes para la producción de propágulos: la temperatura y la agitación. La temperatura a 28°C resultó ser la óptima para la producción de propágulos, aunque en el caso de este género, está reportada como óptima entre los 25 y 30°C, por diversos autores (Jackson *et al.*, 1997; Stephan & Zimmermann, 1998; Fargues *et al.*, 2001). A 37°C, el crecimiento del hongo y la producción de propágulos fueron desfavorables en todos los medios probados. Esto se observó, además, por la presencia de estructuras de resistencia (clamidosporas) en medios que presentaron crecimiento a esta temperatura. En la condición de cultivo sin agitación se presentó muy poco crecimiento micelial y no se observó la presencia de propágulos en ninguno de los medios probados. La agitación a 110 rpm fue la óptima encontrada para los aislamientos de México, ya que las reportadas como óptimas, de 150 a 200 rpm (Kleespies & Zimmermann, 1992; Fargues *et al.*, 2001), sólo aumentaron la cantidad de pelotillas.

Todos los medios de cultivo probados en los resultados preliminares, con excepción de YG y Jackson, presentaron una gran cantidad de pellets compactos, a pesar de la adición de compuestos como PEG 200 o Tween 80, reportados para disminuir la cantidad de pellets y aumentar la de blastosporas (Inch *et al.*, 1986; Stephan & Zimmermann, 1998). En los medios YG y Jackson, en donde la cantidad de glucosa fue mayor que en el resto, la morfología fue más filamentosa, exponiendo más biomasa al medio. Sin embargo, contrario a lo esperado, la disminución de pellets no resultó en una mayor producción de blastosporas.

Los resultados del presente estudio coinciden con los de Fargues *et al.* (2001) en la presencia de propágulos fúngicos en los medios Adamek, DEL y Jackson, que fueron obtenidos con otra especie: *M. anisopliae* var. *acridum* (antes *M. flavoviride*).

Básicamente, las fuentes de nitrógeno y carbono se reportan como las principales que afectan directamente la producción de propágulos (Lane *et al.*, 1991). Debido a la complejidad de los medios de cultivo utilizados por diferentes

autores, los resultados reportados son muchas veces contradictorios. Por ejemplo, la influencia de los componentes del medio en la producción de propágulos puede variar dependiendo de la especie del entomopatógeno que se trate, inclusive entre los aislamientos de una misma especie. En compuestos que proporcionan la fuente de nitrógeno, se ha reportado que en algunos casos es desfavorable para la producción de blastosporas y favorable para la de conidios (Jeanne *et al.*, 1986). En cambio, en otros, la situación sucede a la inversa, e inclusive, en el caso del extracto de levadura, hasta la marca de la compañía que la produce puede afectar la presencia y el tipo de propágulos (Fargues *et al.*, 2001; Toriello, com. pers.). En el presente trabajo, los medios con alguna fuente de nitrógeno produjeron conidios sumergidos en las primeras horas, antes de comenzar con la producción de blastosporas.

En el caso de la glucosa, ésta se ha reportado como la mejor fuente de carbono probada en la mayoría de los estudios, permitiendo el mejor crecimiento y esporulación mejores (Toriello *et al.*, 1983; Kleespies & Zimmermann, 1992; Jackson *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1998). Además, ha sido propuesta como la fuente de carbono ideal para la producción a gran escala de blastosporas (Inch *et al.*, 1986). No sólo la cantidad, sino también la naturaleza de la fuente de carbono, puede afectar la producción de propágulos (Humphreys *et al.*, 1989; Desphande, 1999; Jackson *et al.*, 1997). Todos los medios ensayados en este estudio tuvieron como principal fuente de carbono la glucosa; el aumento en su concentración (80g/L) propició una mayor cantidad de la fase somática (micelio), demostrando que concentraciones elevadas impiden la producción de conidios, blastosporas y/o cuerpos hifales.

En general, los resultados obtenidos con los medios reportados para la producción de propágulos de hongos entomopatógenos, principalmente de blastosporas en otras investigaciones, no presentaron el mismo comportamiento que en los aislamientos de México probados en este trabajo. La infusión de papa del medio IP, no reportado anteriormente, no contiene gran cantidad de proteína (1.95 g/L) o ingredientes complejos, pero sí un gran aporte de carbohidratos (250

g/L). Sin embargo, fue el medio con mayor producción de propágulos para estos aislamientos.

Otro fenómeno que se observó en los distintos experimentos fue el polimorfismo (diferentes morfologías) exhibido por los 19 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medios de cultivo líquidos. En algunos hongos parásitos del hombre y otros animales de sangre caliente, el dimorfismo se manifiesta por un cambio de la forma, de micelio a levadura, cuando la temperatura aumenta de 25 o 28 °C a 37 °C; y en el caso de los fitopatógenos dimórficos, tienden a producir la fase unicelular cuando están sumergidos (Deacon, 1997). En el caso de los entomopatógenos, la formación de blastosporas se reporta a partir de los conidios, que germinan y dan origen a blastosporas, cuerpos hifales o conidios sumergidos en medios de cultivo adecuados o en el insecto (Alves *et al.*, 2002).

En los 19 aislamientos utilizados en este trabajo, se encontró la presencia de hifas, blastosporas, conidios sumergidos y cuerpos hifales, confirmando el dimorfismo de este grupo de hongos. Actualmente, no existe una definición general, concreta y específica de los propágulos producidos en medios líquidos. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los trabajos realizados con estos medios reportan a las blastosporas como los principales propágulos producidos en éstos, un número menor de reportes mencionan la presencia de conidios sumergidos y, en el caso de los cuerpos hifales, muy pocos autores los mencionan y con frecuencia se refieren a éstos como blastosporas (Inch *et al.*, 1986; Jenkins & Prior, 1993; Vidal *et al.*, 1998).

En el presente estudio, se observó la producción de blastosporas por gemación y principalmente, por endogénesis, tipo de formación también llamada oidial por Garrison (1985). Otros autores reportan esta producción ya sea por constricción hifal, separación en los septos, o por gemación parecida a la de levaduras a partir de las hifas (Fargues *et al.*, 2001); por separación esquizolítica en los septos o por fragmentación mecánica de hifas (Vidal *et al.*, 1998). En este estudio, la mayor producción de blastosporas se presentó en el aislamiento EH-474/6 y, en su mayoría, se formaron por endogénesis y por gemación.



La formación de conidios sumergidos en medios de cultivo líquidos fue diferente a la de los conidios aéreos, las cuales forman cadenas de conidios enteroblásticos en sucesión basípeta en la punta de las fiálides. En los cultivos sumergidos, la agitación impidió la formación de estas cadenas típicas del género *Metarhizium* (Vidal *et al.*, 1998; Fargues *et al.*, 2001). Jenkins & Prior (1993) reportan que las proteínas que están presentes en los conidios aéreos, y que presumiblemente son las responsables de la adhesión conidial, pueden ser lavadas y eliminadas por la agitación evitando la formación de las cadenas conidiales. Los aislamientos de este estudio que produjeron conidios sumergidos fueron uniformes tanto en tamaño como en forma y no hubo diferencia con las medidas del tamaño de los conidios aéreos. En el aislamiento EH-469/6, que presentó la mayor producción, la formación de conidios sumergidos fue tanto en la punta de las hifas como a lo largo del micelio, e inclusive en algunos se pudo observar la formación de éstos a partir de cuerpos hifales pequeños. En el resto de los aislamientos la presencia de los conidios se observó generalmente en la parte apical de las hifas.

En el caso de los cuerpos hifales, su formación se observó a partir del desprendimiento de pequeñas partes de hifas, y fue el propágulo que se presentó en menor cantidad en los aislamientos probados.

La composición del medio líquido probado determinó el tipo de propágulos producidos por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y la producción tanto de blastosporas, conidios sumergidos y cuerpos hifales. Además, mostró diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) entre todos los aislamientos probados. Los resultados mostraron que un aislamiento puede producir diferentes propágulos dependiendo del medio de cultivo, y, en el mismo medio de cultivo, aislamientos diferentes también pueden producir propágulos diferentes.

Una de las condiciones más importantes para el desarrollo de un agente comercial de control biológico es la determinación del medio de cultivo que proveerá la virulencia óptima. Se ha mostrado que el medio de cultivo puede influir en la germinación, el crecimiento micelial y la virulencia de los hongos empleados como micoinsecticidas (Ibrahim *et al.*, 2002). Como el tipo de propágulos

producidos en medios de cultivo líquido puede ser afectado por las condiciones de cultivo, la cantidad y calidad de los propágulos producidos en un medio líquido requerirán de la misma atención que aquellos producidos en medios de cultivo sólidos, ya que los parámetros de producción son especialmente importantes para el desarrollo de blastosporas (Kleespies y Zimmermann, 1992).

La tecnología de producción en masa es relevante para mejorar los plaguicidas basados en propágulos de hongos entomopatógenos, donde un sistema de producción bifásico es el más prometedor para la realización de una formulación basada en conidios aéreos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

## IIX. CONCLUSIONES

- La composición de los medios de cultivo líquidos utilizados en este estudio determinó la presencia de propágulos fúngicos producidos en los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de México.
- El medio de cultivo líquido de infusión de papa (IP) mostró ser el óptimo para la producción de propágulos fúngicos con los aislamientos de México, además de ser económico y de fácil preparación.
- Los 19 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* presentaron diferente tipo, formación y producción de propágulos en el medio líquido de infusión de papa, mostrando gran variabilidad fenotípica entre ellos.
- El tipo y la producción de propágulos de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de México fue diferente a la reportada para aislamientos de otras partes del mundo, de esta misma especie.
- De acuerdo a la producción de propágulos, el aislamiento EH-469/6 fue el mayor productor de conidios sumergidos, y el EH-474/6 el de blastosporas.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, S. B., L. S. Rossi, R. B. Lopes, M.n A. Tamai & R. M. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **J. Invertebr. Pathol.** **81**: 70-77.
- Benjamin, M. A., E. Zhioua & R. S. Ostfeld. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** **39**: 723-728.
- Berlanga-Padilla, A. M. & V. M. Hernández-Velázquez. 1999. Control microbial de mosca pinta *Aeneolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*. Ficha Técnica CB-8. Dirección General de Sanidad Vegetal, CNRF-CNRCB. México, D.F.
- Bosch, A., & O. Yantorno. 1999. Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Process Biochem.** **34**: 707-716.
- Braga, G. U., S. D. Flint, C. L. Messias, A. J. Anderson & D. W. Roberts. 2001. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.** **105**: 874- 882.
- Butt, T. M., C. Jackson & N. Magan. 2001. **Fungal biological control agents: progress, problems and potential.** En: **Fungi as Biocontrol Agents.** Butt, T. M., C. Jackson y N. Magan (eds.), CAB International, Wallingford, UK.
- Charnley, A. K. & R. J. St. Leger. 1991. **The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects.** En: **The Fungal Spore and Disease.** Initiation in plants and animals. Cole, G. T. & Hoch, H. C. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 267-283.
- Coronado, P. R. 1978. **Memorias de la Campaña Contra la Mosca Pinta.** Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D.F.
- Clarkson, J. M. & A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** **4**: 197-204.
- Da Costa, G. L., M. I. Sarquis, A. M. de Moraes & V. E. Bittencourt. 2001. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia 154**: 207-209.

- Deacon, J. W. 1997. **Modern Mycology**. Blackwell Science, UK.
- Deshpande, M. V. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. **Crit. Rev. Microbiol.** 25: 229-243.
- Domsch, K. H., W. Gams & T. H. Anderson. 1980. **Compendium of Soil Fungi**. Academic Press, New York.
- Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, & F. Smith. 1951. Colorimetric method for the determination of sugars. **Nature 168**: 167.
- Eilenberg, J., A. Hajek & C. Lomer. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biocontrol 46**: 387-400.
- Fargues, J., N. Smiths, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier & P. Quimby. 2001. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. **Mycopathologia 154**: 127-138.
- Ferrer, F. 2001. Biological control of agricultural insect pests in Venezuela; advances, achievements, and future perspectives. **Biocontrol News Inform.** 22: 67N - 74N.
- Flores, C. S. 1985. **Principales plagas de la caña de azúcar en México**. AZÚCAR, S. A. de C.V.-IMPS, México, D.F.
- Flores, C. S. 1994. **Las plagas de la caña de azúcar en México**. México, D.F.
- García, S.C. & K.F. Byerly. 1995. **Manejo integrado de plagas**. En: SAGAR. Desafíos fitosanitarios: Mosquita blanca **Fitófilo 48**: 71-88.
- Garrison, G. R. 1985. **Cytological and ultrastructural aspects of dimorphism**. En: **Fungal Dimorphism, with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans**. Szaniszló, J. P. & L. J. Harris (eds.), Plenum Press, New York, pp. 15-47.
- Goettel, M. S., & S. D. Inglis. 1997. **Fungi: Hyphomycetes**. En: **Manual of Techniques in Insect Pathology**. L. A. Lacey (ed.), Academic Press, London, pp. 213- 248.

- Guedes, A. P., J. I. Da Silva Vaz, A. Masuda, A. Schrank & V. M. Henning. 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** **94**: 117-125.
- Hayek, A. E., & R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Ann. Rev. Entomol.** **39**: 293-322.
- Hogsette, A. J. 1999. Management of ectoparasites with biological control organisms. **Int. J. Parasitol.** **29**: 147-151.
- Humphreys, A. M., P. Matewele, A. P. J. Trinci & A. T. Gillespie. 1989. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycol. Res.** **92**: 257-264.
- Ibrahim, L., T. M. Butt & P. Jenkinson. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycol. Res.** **106**: 705-715.
- Inch, M. M., A. M. Humphreys, A. P. J. Trinci & A. T. Gillespie. 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). **Trans. Br. Mycol. Soc.** **87**: 215-222.
- Inyang, E. N., T. M. Butt, K. J. Doughty, A. D. Todd & S. Archer. 1999. The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection on the mustard beetle. **Mycol. Res.** **103**: 974-980.
- Jackson, M. A., M. R. McGuire, A. L. Lacey & P. S. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycol. Res.** **101**: 35-41.
- Jeanne, M. M., M. Inch & P. J. Trinci. 1987. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. **J. Gen. Microbiol.** **133**: 247-252.
- Jenkins, N. E. & C. Prior. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. **Mycol. Res.** **97**: 1489-1494.

- Jenkins, N. E., G. Heviefó, J. Langewald, A. J. Cherry & C. J. Lomer. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News Inform.** **19**: 21N-31N.
- Kendrick, B. 1992. **The Fifth Kingdom**. Focus Information Group, Ontario, Canada.
- Kleespies, R. G. & G. Zimmermann. 1992. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Sci. Technol.** **2**: 127-135.
- Lane, B. S., A. P. J. Trinci & A. T. Gillespie. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. **Mycol. Res.** **95**: 829-833.
- Lomer, C. J., R. P. Bateman, D. L. Johnson, J. Langewald & M. Thomas. 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.** **93**: 265-275.
- Magalhães, B. P., J. R. P. Postali & A. B. Silva. 1987. Técnica de criação de *Deois incompleta* em *Brachiaria*. **Pesq. Agropec. Bras.** **22**: 137-144.
- Magan, N. 2001. **Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents**. En: **Fungi as Biocontrol Agents**. Butt., T. M., C. Jackson y N. Magan (eds.), CAB International, Wallingford, UK.
- Maniana, N. K., S. Ekesi, B. Löhr & F. Mwangi. 2001. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. **Mycopathologia** **155**: 229-235.
- Martín, R. M., O. Cázares de H. y F. F. Ibarra. 1985. ¿Cómo ataca la mosca pinta al Buffel? **Rancho** **22**: 1-5.
- Murphy, C. F., P. C. Jepson, & B. A. Croft. 1994. Database analysis of the toxicity of antilocus pesticides to non-target, beneficial invertebrates. **Crop Prot.** **13**: 413-20.

- Navarro-Barranco, H., D. Basilio-Hernández, V. Hernández-Velázquez & C. Toriello. 2002. **Termotolerancia de aislados de México y de cepas de referencia del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***. En: **Memorias del XXV Congreso Nacional de Control Biológico**. Báez S. R. & Juvera B. J (eds.), Hermosillo, Son., Noviembre 14 y 15, 2002, pp. 218-222.
- Navarro-Barranco, H., A. Pérez-Mejía, G. Cavallazzi-Vargas, A. Berlanga-Padilla, T. Mier & C. Toriello. 2001. **Cultivos monospóricos de aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de *Aeneolamia* sp (Homoptera: Cercopidae) en México**. En: **Memorias del XXIV Congreso Nacional de Control Biológico**. Nevárez M. G, Sánchez M. G & Muñoz C.L. (eds.), Chihuahua, Chih., Agosto 9 y 10, 2001, pp. 201-204.
- Peck, D., U. Castro, F. López, A. Morales & J. Rodríguez. 2001. First records of the sugar cane and forage grass pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South America. **Florida Entomol.** **84**: 402-409.
- Pires, C. S., P. W. Price & E. G. Fontes. 2000. Preference-performance linkage in the neotropical spittlebug *Deois flavopicta*, and its relation to the phylogenetic constraints hypothesis. **Ecol. Entomol.** **25**: 71-80.
- Price, P., I. Andrade, C. Pires, E. Sujii & E. M. Vieira. 1995. Gradient analysis using plant modular structure: Pattern in plant architecture and insect herbivore utilization. **Environ. Entomol.** **24**: 497-505.
- Quimby, P. C., L. R. King & W. E. Grey. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. **Agricult. Ecosyst. Environ.** **88**: 147-152.
- Riess, H. C. M & C. S. Flores. 1976. **Catálogo de plagas y enfermedades de la caña de azúcar en México**. CNIAA-IMPA, México, D.F.
- Roberts, D. W. & R. A. Humber. 1981. **Entomogenous fungi**. En: **Biology of Conidial Fungi**. Cole, G. T. & B. Kendrick (eds.), Academic Press, London, pp. 201-229
- Rodrigues, A. A., U. F. Lopes & E. L. de Luna Alves. 2001. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** **21**: 12-15.

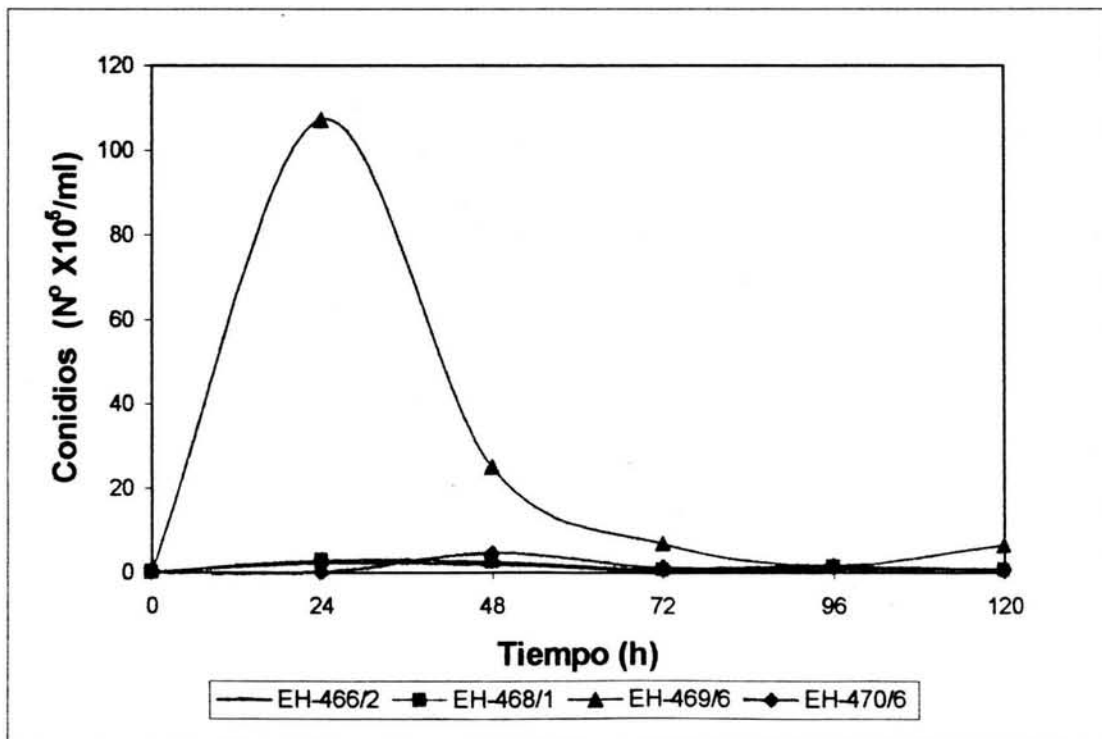
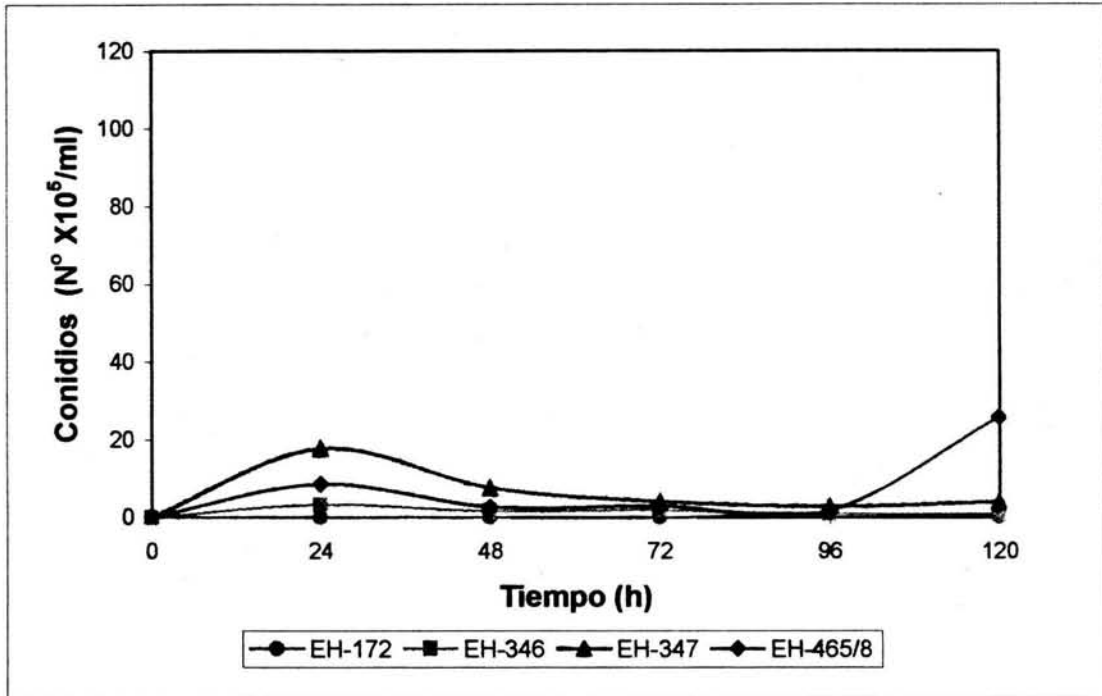


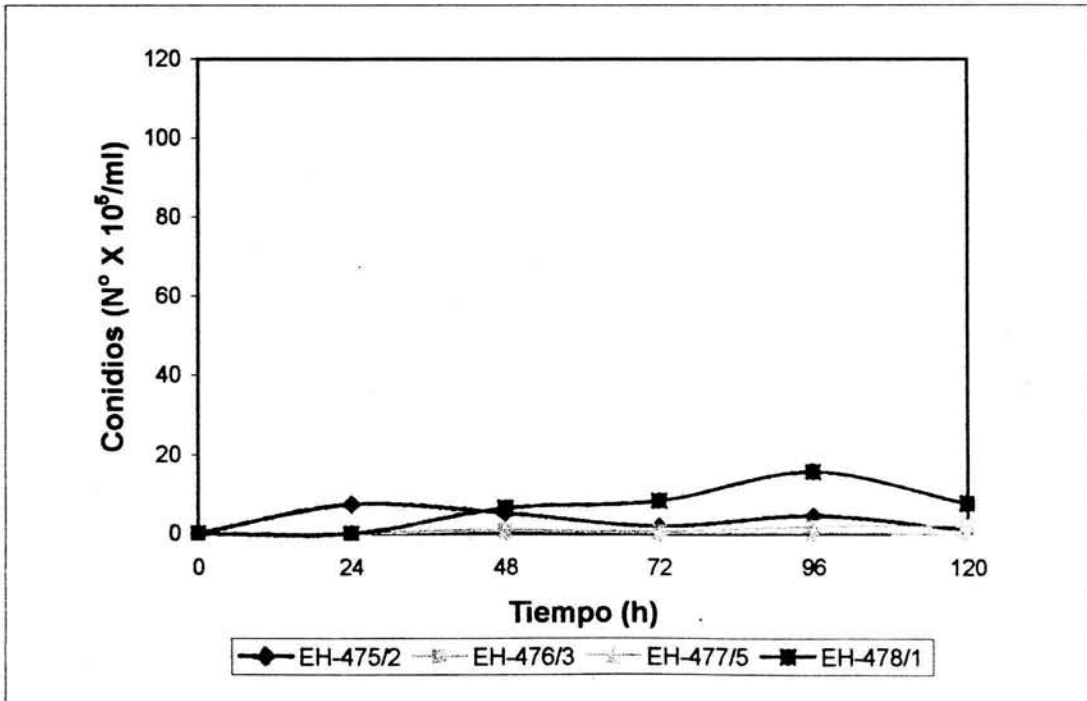
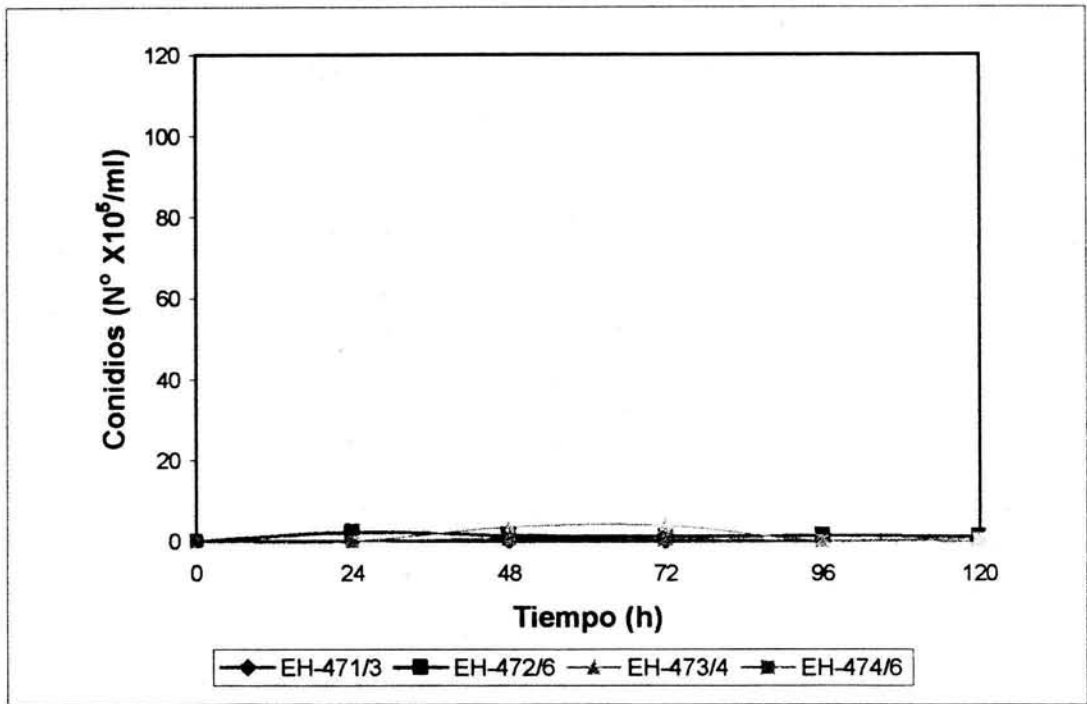
- Sánchez, F. M. 1997. **Desarrollo de la producción de caña y azúcar en la República Mexicana**. Colegio de Postgraduados, Chapingo.
- Stephan, D. & G. Zimmermann. 1998. Development of a spray-drying technique for submerged spores of entomopathogenic fungi. **Biocontrol Sci. Technol.** **8**: 3-11.
- St. Leger, R. J. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology** **143**: 1983-1992.
- Tadeu, F. L. 2001. Os Semioquímicos no Controle de Pragas e Vetores de Doenças. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** **22**: 4-7.
- Toriello, C. & T. Mier. 1985. Panorama general de los hongos entomofthorales en el control biológico de la mosca pinta en México. **Rev. Mex. Mic.** **1**: 37-50.
- Toriello, C., H. Navarro-Barranco, A. Martínez-Jacobo & T. Mier. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. **Rev. Mex. Mic.** **15**: 123-125.
- Toriello C., L. L. González, C. L. Gutiérrez, J. Hernández, L. Sampedro & J. P. Latgé. 1983. Los hongos patógenos de la mosca pinta en México, II. Germinación, crecimiento y esporulación. **Bol. Soc. Mex. Mic.** **18**: 141-152.
- Ulloa, M. & T. R. Hanlin. 2000. **Illustrated Dictionary of Mycology**. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Vega, F. E., P. F. Dowd, M. R. Mc Guire, M. A. Jackson & T. C. Nelsen. 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.
- Vidal, C., J. Fargues, A. L. Lacey & M. A. Jackson. 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycopathologia** **141**: 33-46.

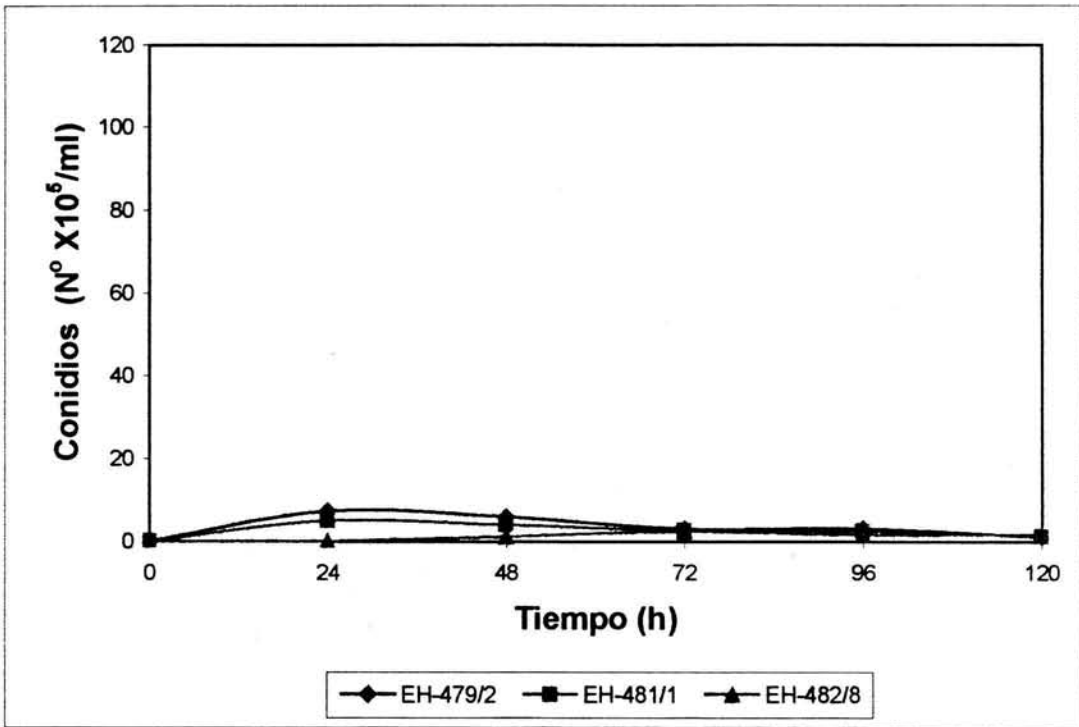
- Wraight, S. P., M. A. Jackson & S. L. de Kock. 2001. **Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents**. En: **Fungi as Biocontrol Agents**. Butt., T. M., C. Jackson y N. Magan (eds.), CAB International, Wallingford, UK.
- Vilcinskas A., V. Matha & P. Götz. 1997. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **J. Insect Physiol.** **43**: 475-483.

## XI. ANEXOS

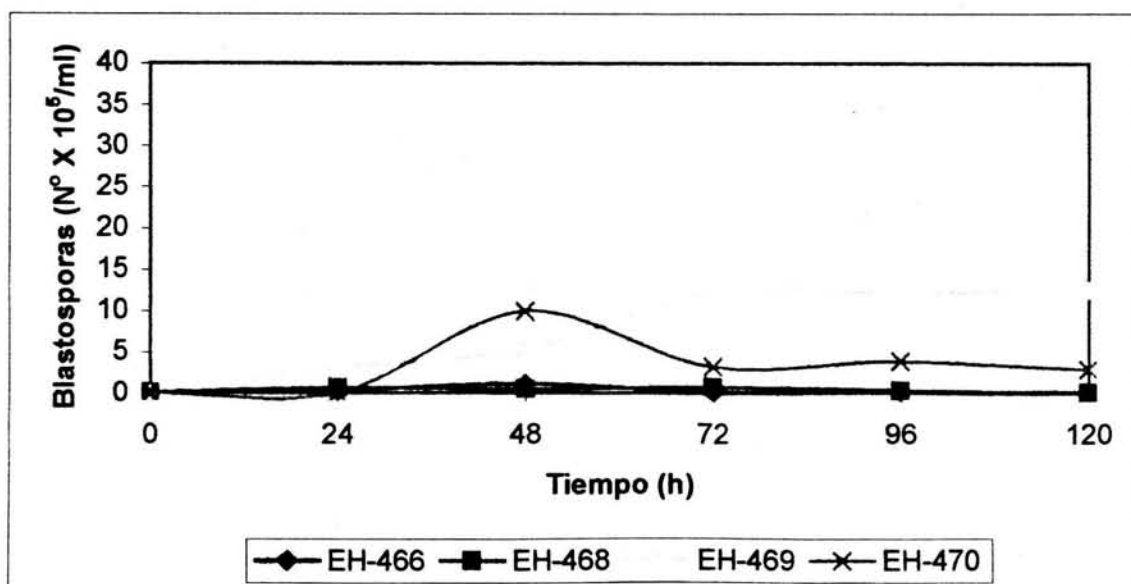
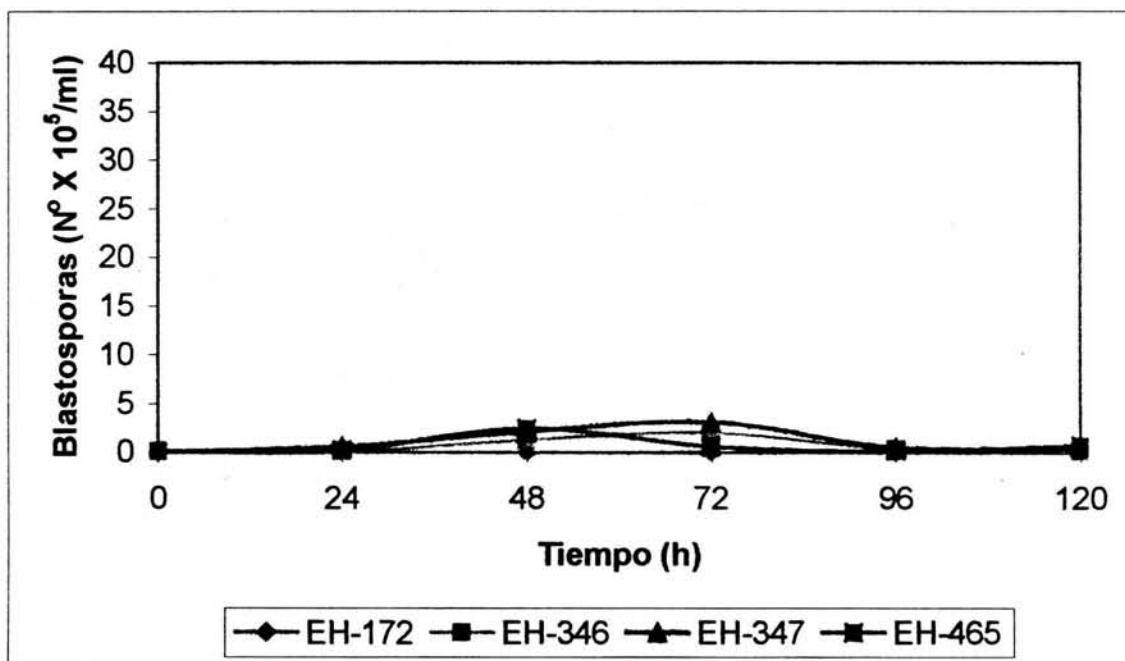
**Anexo 1.** Producción de conidios sumergidos de los 19 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP, de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución.

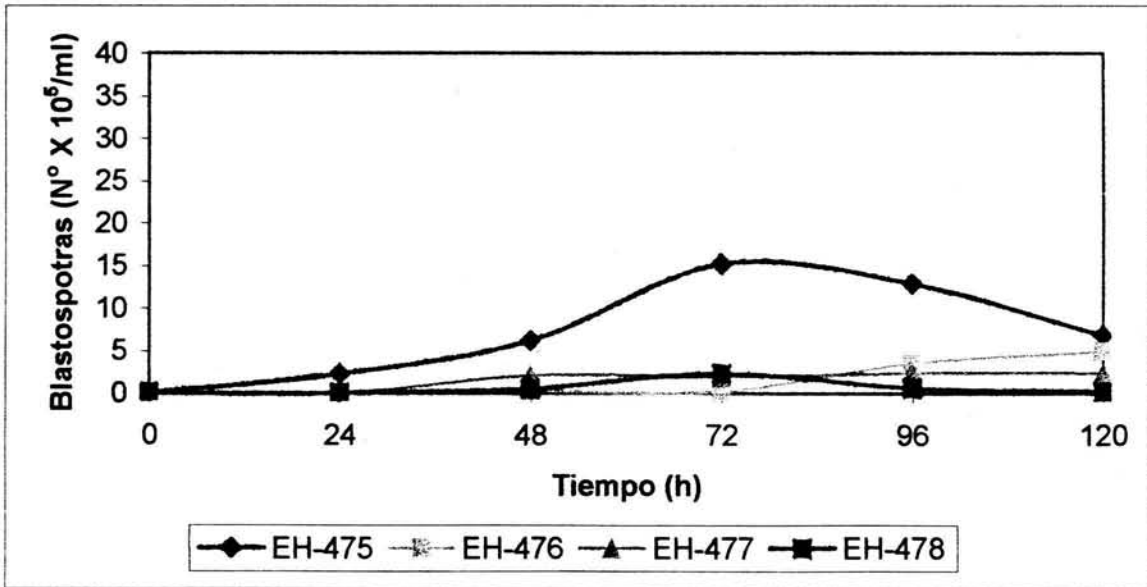
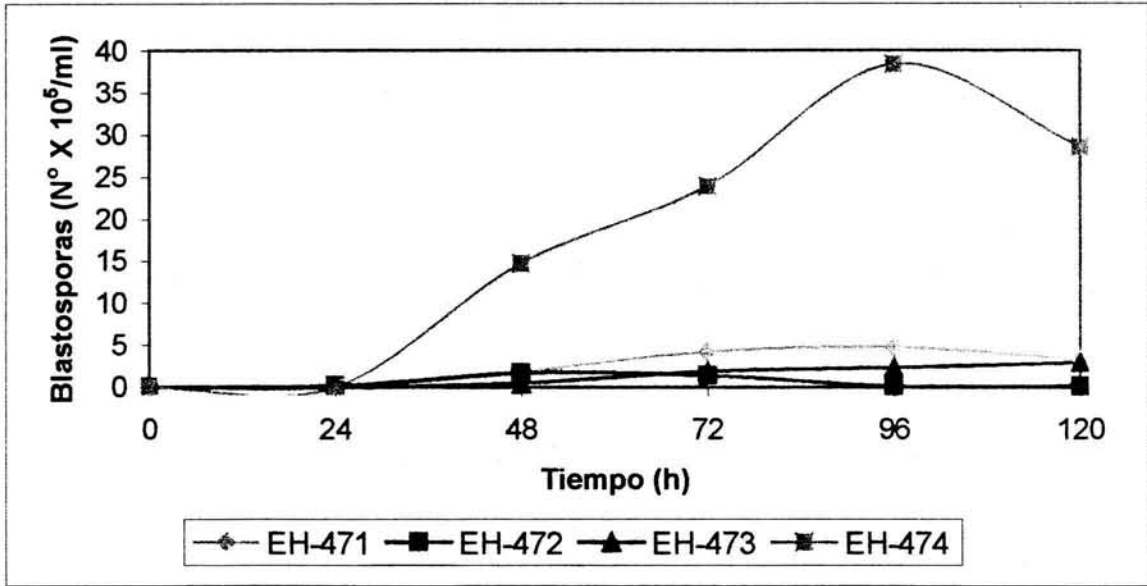


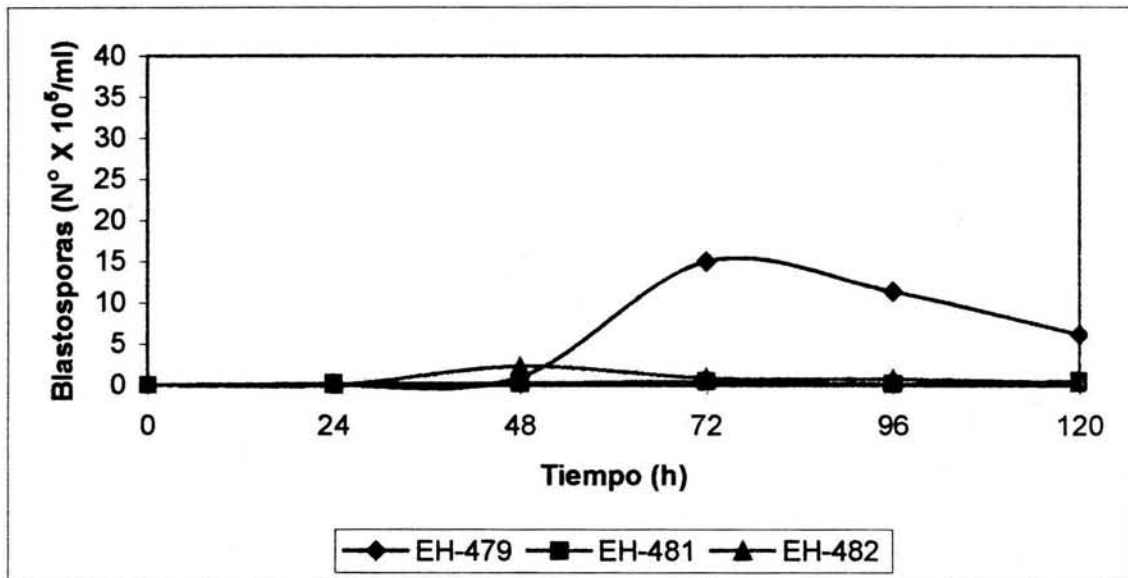




**Anexo 2.** Producción de blastosporas de los 19 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP, de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución.

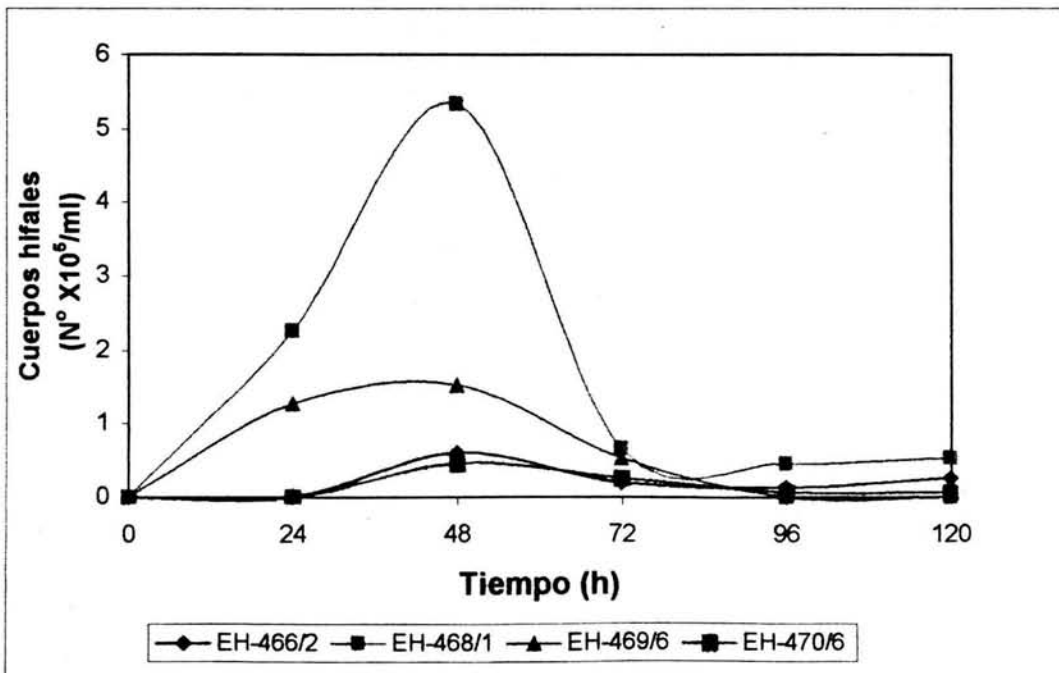
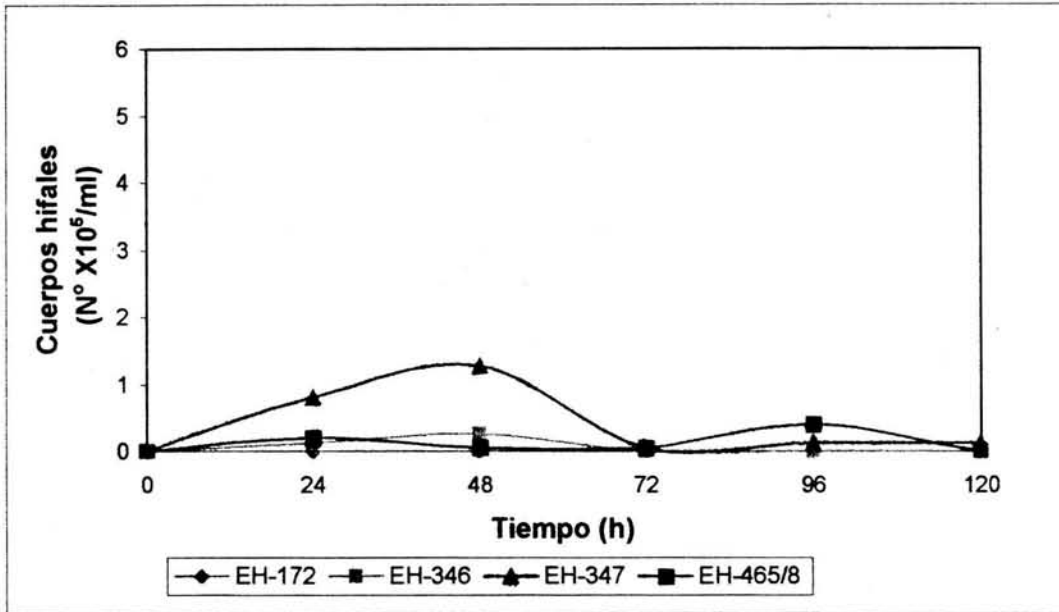


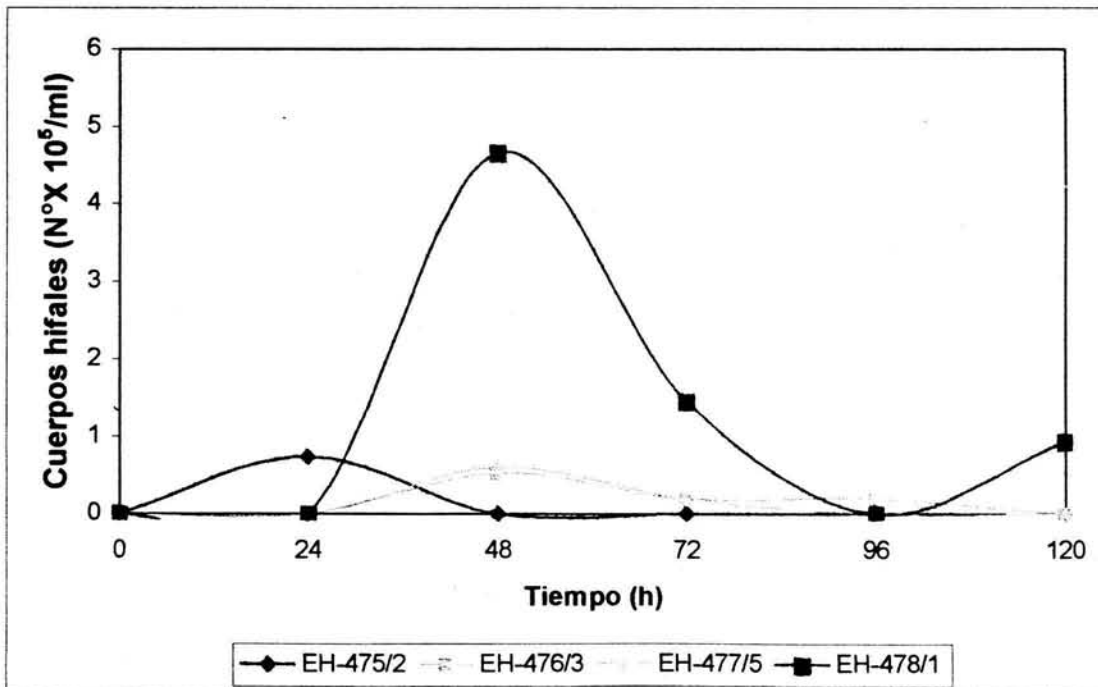
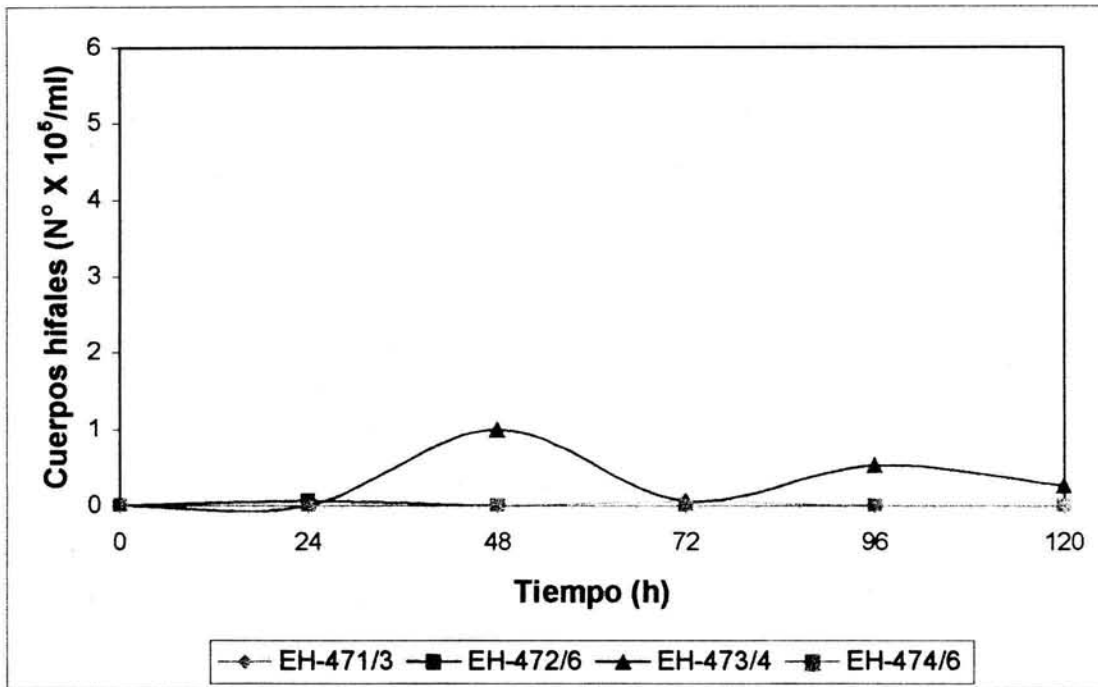


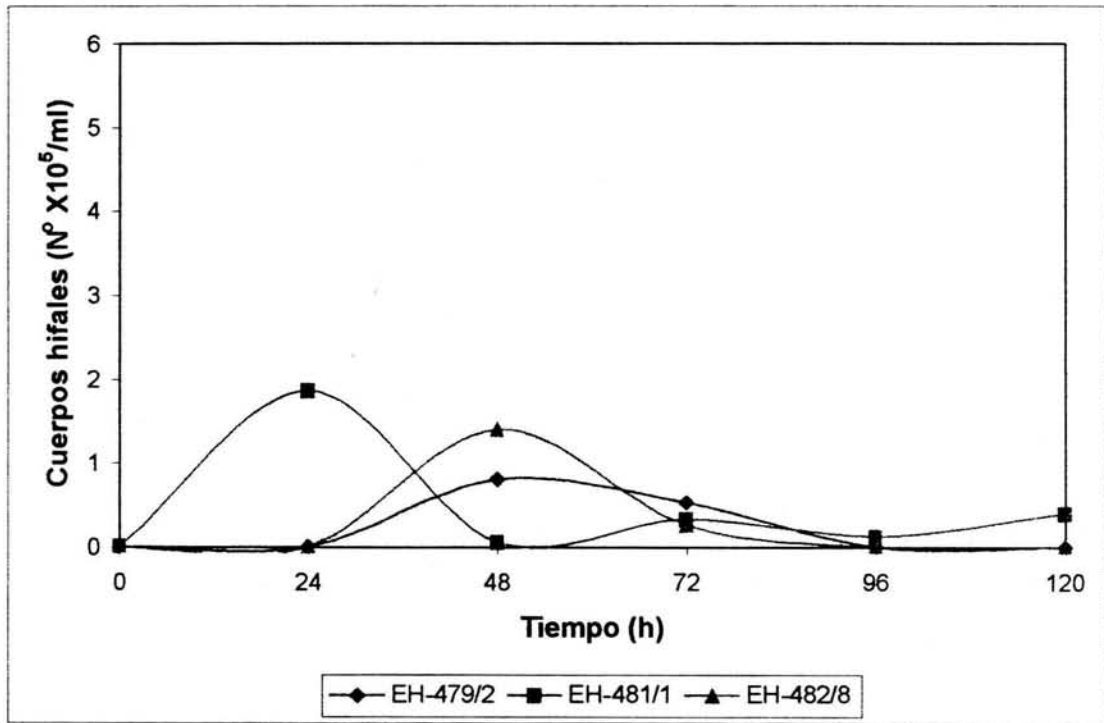




**Anexo 3.** Producción de cuerpos hifales de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP, de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución.







## XII. ÍNDICE DE TABLAS

1. Pastos forrajeros afectados por la mosca pinta	4
2. Lista actualizada de las especies y subespecies de mosca pinta existentes en México (Flores, 1994)	6
3. Agentes microbianos entomopatógenos basados en <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> registrados o con bajo desarrollo comercial para el control de plagas	11
4. Datos de los aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae)	14
5. Componentes (g/L) de los medios ensayados para la producción de propágulos fúngicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	16
6. Crecimiento del aislamiento EH-473/4 en cuatro de los medios líquidos probados, con pH ajustado a 7 y pH original del medio	19
7. Crecimiento en los 10 medios de cultivo líquidos probados para la obtención de propágulos fúngicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> en el aislado EH-473/4	20
8. Producción de conidios sumergidos ( $N^{\circ} \times 10^5/\text{ml}$ ) en aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> en medio IP, con agitación (110 rpm) a 28 °C	28
9. Producción de blastosporas ( $N^{\circ} \times 10^5/\text{ml}$ ) en aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> en medio IP, con agitación (10 rpm) a 28 °C	30
10. Producción de cuerpos hifales ( $N^{\circ} \times 10^5/\text{ml}$ ) en aislamientos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> en medio IP, con agitación (110 rpm) a 28 °C	32
11. Medidas de conidios (longitud X anchura) de los aislamientos con mayor, media y menor producción	33
12. Medidas de blastosporas (longitud X anchura) de los aislamientos con mayor, media y menor producción	34

### XIII. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Penetración cuticular de los hongos entomopatógenos. Modificado de Charnley y St. Leger, 1991	3
2. Estados cañeros y ganaderos de la República Mexicana con presencia de mosca pinta (Homoptera: Cercopidae)	4
3. Ciclo de vida de la mosca pinta A: huevecillos; B: ninfa con cuatro estadios y, C: adulto	6
4. Aspecto del salivazo de los pastos	8
5. Conidióforos en empalizada con conidios catenulados, basípetos y cilíndricos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , vistos en contraste diferencial de Nomarski	8
6. Pelotilla de micelio en medio Adamek con agitación a 28 °C, 48 h	21
7. Conidios sin germinar en medio Adamek sin agitación a 37 °C, 96 h	21
8. Pelotilla en medio DEL con agitación a 28 °C, 72 h	22
9. Interior de una pelotilla laxo en medio DEL sin agitación a 28 °C, 72 h	22
10. Conidios sin germinar y algunos germinando en medio DEL con agitación a 37 °C, 48 h	22
11. Propágulos en el interior de una pelotilla formado en medio IP con agitación 28 °C, 72 h	23
12. Conidios germinados en medio IP sin agitación a 28 °C 48 h	23
13. Estructura de resistencia (clamidospora) en medio IP con agitación a 37 °C, 60 h	23
14. Conidios sin germinar en medio IP sin agitación a 37 °C, 72 h	23
15. Micelio disperso producido en medio Jackson en agitación a 28 °C, 48 h	24
16. Pelotilla laxa en medio YG en agitación a 28 °C, 48 h	25
17. Formación de propágulos fúngicos en el aislamiento EH-469/6. (A) Conidio sumergido creciendo en la parte terminal de una hifa. (B) Conidio sumergido en la parte lateral de una hifa. (C) Formación de blastosporas de origen endógeno (flecha delgada); por gemación (flecha gruesa) y (D) por fisión binaria. (E) Formación de cuerpo hifal (flecha) y (F) cuerpo hifal separado de la hifa	26

18. Producción de conidios sumergidos y blastosporas en el aislamiento EH-469/6 en medio IP con agitación a 28 °C, durante 120 h	28
19. Aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> con mayor, media y menor producción de conidios sumergidos en medio IP, en agitación a 110 rpm a 28 °C. La concentración de conidios al tiempo cero corresponde a los sembrados al inicio del experimento	29
20. Producción de blastosporas y conidios sumergidos en el aislamiento EH-474/6 en medio IP, con agitación a 28 °C durante 120 h	31
21. Aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> con mayor, media y menor producción de blastosporas en medio IP con agitación a 110 rpm a 28 °C	31
22. Aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> con mayor, media y menor producción de cuerpos hifales en medio IP, con agitación a 110 rpm a 28 °C	33

#### XIV. INDICE DE ANEXOS

1. Producción de conidios sumergidos de los 19 aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP, de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución 49
2. Producción de blastosporas de los 19 aislados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución 52
3. Producción de cuerpos hifales de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en medio de cultivo IP de las 0 a las 120 h. Se colocaron 4 aislamientos por gráfica para una mejor resolución 55