



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Termotolerancia y producción de conidios en sustrato sólido de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
DAVID HUMBERTO BASILIO HERNÁNDEZ



DIRECTORA DE TESIS
DRA. CONCEPCION ORIELLO NÁJERA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Termotolerancia y producción de conidios en sustrato sólido de aislamientos de Metarhizium anisopliae var. anisopliae de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México".

realizado por David Humberto Basilio Hernández

con número de cuenta 9121601-2 , quien 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 Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor

Propietario Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro

Suplente Biól. Elva Bazán Mora

Suplente Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

A mis padres, Manuel Basilio y María del Carmen Hernández , no solo por darme la vida, también por entregar la suya a mis hermanos y a mi, por sacarnos adelante y por enseñarnos a ser felices con pocos bienes materiales pero mucho amor.

Gracias, nunca podré pagar lo que han hecho por mi, los quiero mucho. Y por ser el principal soporte de la Fundación BSL-HDZ, la cual patrocino este y muchos otros logros

A mis abuelos, principalmente a Facundo Hernández, por enseñarme muchas cosas en los 15 años que conviví con él, que no me habrían enseñado en ninguna escuela. Ojala pudieras ver este logro para mi, pero se que donde estés, lo disfrutaras tanto como yo.

A mis hermanos, Luis Manuel (Guicho), Elisa (Gordis), Marco Antonio (Pikuy) y Susana Inés (Gusana), por compartir conmigo la aventura de la vida, por ser los mejores hermanos que cualquiera puede tener, aun cuando se empeñaban en parecer los peores, por estar cuando no los necesitaba y por dejarme solo cuando los requería, por no respetar mi privacidad, pero no enojarse cuando yo no respetaba la suya, por interesarse en lo que no me interesa y mostrar nulo interés en lo que me fascina, que mas da, por eso somos HERMANOS. Principalmente por que se que si hiciera falta, darían la vida por mi, así como yo lo haría por ustedes. No pude haber tenido mejores hermanos que ustedes, gracias por todo, por ser una verdadera FAMILIA. A Edith Flores Morales (changuita), por que en sus cortos e inocentes 6 años, ha hecho grandes cambios en mi vida, la llenó de dulzura, ternura y mucha alegría. Por las lagrimas derramadas en aquello de que la familia ni te olvida ni te abandona (OHANA, creo).

A mi patria, aun creo en ti y lo haré toda mi vida. A mi *alma mater*, la UNAM, por permitir que mis sueños se hagan realidad.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología Básica ubicado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada a través del Megaproyecto G31451B.

Agradezco a la Dra. Conchita Toriello por permitirme formar parte de su inmejorable grupo de trabajo, por sus enseñanzas, sus consejos, la paciencia que ha tenido hacia mi persona, pero sobre todo por su profesionalismo y la gran influencia que ha tenido en mi vida.

A las Dras. Maria del Carmen Calderón Ezquerro, María del Carmen González Villaseñor, Margarita Villegas Ríos, y a la Biól. Elba Bazan Mora, por permitirme robarles su valioso tiempo en la revisión de esta tesis, por sus atinadas observaciones y las molestias causadas.

Al personal del Laboratorio de Micología Básica: Biol. Hortensia Navarro, Q.F.B. Amelia de los Ángeles Pérez, M. en C. Claudia Cano, M. en C. Gina Cavallazzi, Q.F.B. Guadalupe Olivares, Q.F.B. Fabiola Vega y Biol. Águeda Vásquez, a las señoras Chalis, Carmelita, Bertita y Angélica. A todas ellas por su ayuda, su comprensión, apoyo y los agradables momentos que me hacen pasar, gracias por enseñarme que una familia no solo se compone de lazos sanguíneos, familia es quien te ayuda a hacer más agradable tu estancia en cualquier lugar, familia es con quien quieres estar, y con todas ellas me fascina estar.

AGRADECIMIENTOS

A todos los profesores que he tenido en mi formación escolar, algunos nombres se pudieron haber perdido, pero su legado y enseñanzas permanecerán para siempre.

A Abel Reyes, Rafael López, Leticia Ramírez, Juan Luis Guadiana, José Mendieta y José Martínez. Por que estuvieron conmigo en los difíciles momentos de la adolescencia, crecimos juntos y de cierta manera nos comimos el mundo de un bocado, por ser las primeras personas a las cuales considere verdaderos AMIGOS. Especialmente a Gilda E. Sánchez Montes, por lo que significa en mi vida.

A Rosa Calvillo, Cirenía López y Ruth Alvarado, por los buenos momentos que me permitieron compartir a su lado, y los recuerdos que conservo de su inapreciable compañía.

A Carmen Armijo, Cristina Salazar y Elizabeth Pérez, por lo que me permitieron compartir y aprender. Por decir si en el momento adecuado, y no en el mejor momento.

A la Lic. Miriam Flores Castelán, lo que hizo por mi me dejó marcado para toda la vida, ojala algún día puedas ver lo que ha sido de mi, promesa cumplida. Sin arrepentimientos ni rencores. Sabes que eres parte importante de mi vida, y eso, nunca lo olvidare. Gracias por estar cuando más lo necesitaba, ahora solo falta concluir como se debe, con la libertad total. Te agradezco el primer impulso de este logro y te dedico "dos imanes".

A María Ramos Ordoñez, Gerardo Figueroa Tapia, Susano Morales Rosas y Cristina Santoyo Santoyo, por los agradables momentos que pasamos juntos en la carrera, por las practicas de campo, las fabulosas platicas, los ratos de bohemia y la complicidad que la biología otorga, por ayudarme en la carrera, GRACIAS AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

A Patricia Jiménez (Patosa) por ayudarme, escucharme, regañarme y apoyarme, cuando lo necesito, eres una excepcional persona y espero algún día poder corresponder a tus atenciones conmigo, así como a tu interminable legión de tías. Elena Montoya (Pelois), por ser una gran apoyo durante la realización de este y futuros trabajos, un sincero agradecimiento de mi parte, espero poder retribuirte lo que me has ayudado. Dos de mis mejores AMIGAS.

Si pudiera elegir una segunda madre, mi primera opción sería Maty Sansón

A Daniel Villamil Le Chat por ayudarme a entrar a un submundo medio desconocido para mi, a Víctor López y Susana Grimaldo por divertirme como solo ellos lo saben hacer, a Patricia Flores, Alfonso García, Mike Mejía, Benjamín, Jesús Juárez, Jorge Limón, por dejarme aprender aunque sea un poco de ellos. A los gemelos fantásticos (Sponge Bob & Colombian Curious) por compartir hasta su locura conmigo, ojala algún día la distancia geográfica se acorte y la aplicación de un abrazo de refri sea posible. Rafafafa García por ser una de mis últimas adquisiciones en el campo de los amigos. A Luisa Escobar (mi cuñada) por ser como es, a Carmen por dormir lo que le corresponde y lo que ME corresponde. A Miguel Ayala por los consejos, la ayuda y por ser un cromosoma "Y" mas en este proyecto (somos tan pocos), Judith Castellanos por que si hubiera un premio a la ÑÑ's, ella lo ganaría sin duda.

A las Dras. Lucia Taylor y Rocío Reyes, a Espe y Gaby, por la ayuda que recibí de ellas, y a la Dra. Francisca Hernández por caerme tan bien.

A quien no esta en estas paginas, pero que de antemano sabe que ocupa un lugar importante en mi vida. A todos mis clones sobre todo al mas dulce, por que me ayudo a preocuparme mas por mi.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Material Fúngico	14
Preparación de la suspensión conidial	14
Termotolerancia	14
Análisis estadístico	15
Determinación de la temperatura óptima de crecimiento	15
Obtención de conidios en sustrato sólido	17
Análisis estadístico	20
RESULTADOS	21
Material Fúngico	21
Preparación de la suspensión conidial	21
Termotolerancia	21
Análisis estadístico	21
Determinación de la temperatura óptima de crecimiento	
Obtención de conidios en sustrato sólido	30
Análisis estadístico	35
DISCUSIÓN	37

CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	50

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la termotolerancia de 18 cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* aislados en México y 7 cepas de referencia de otros países. Se midió el crecimiento diario de los aislamientos a 5 distintas temperaturas: 10, 25, 30, 35, y 40 °C. También se estandarizaron las condiciones del sustrato sólido de un modelo difásico para la producción masiva de hongos entomopatógenos, probando 4 tratamientos del arroz para determinar el que permitiera la máxima esporulación y se determinó el aislamiento con la mayor producción de conidios/g de arroz de 5 cultivos monospóricos previamente seleccionados. Los resultados mostraron que a 10 y 40 °C no hubo crecimiento en ninguno de los aislamientos; el máximo crecimiento se presentó a 25 y 30 °C, mientras que a 35 °C el crecimiento disminuyó considerablemente. A 25 °C los aislamientos que presentaron mayor crecimiento fueron EH-467/6, EH-468/1 y EH-477/5, con una tasa de crecimiento de 4.64 mm/día. El análisis estadístico (ANOVA) ($\alpha = 0.01$) no presentó diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los aislamientos. A 30 °C los aislamientos que más crecimiento mostraron fueron EH-465/8, EH-481/1, EH-482/8, con una tasa de crecimiento de 4.64 mm/día en el primero y 4.52 mm/día en los otros. El análisis estadístico tampoco reveló diferencias entre aislamientos. A 35 °C, EH-468/1 mostró el mayor crecimiento con una tasa de crecimiento de 2.35 mm/día. Al realizar la comparación múltiple de medias (Tukey) los 25 aislamientos se integraron en 9 grupos. El más tolerante a esta temperatura fue el aislamiento EH-468/1. El tratamiento de arroz seleccionado por presentar el hongo con la mayor esporulación tuvo una humedad final entre 35-40 %. El aislamiento EH-479/2 fue el que más conidios/g de arroz produjo, con un promedio de 5.99×10^9 conidios/g, los aislamientos EH-469/6 y EH-470/6 en segundo lugar con una producción de 3.81 y 4.24×10^9 conidios/g, y en el tercer lugar, quedaron los aislamientos EH-466/2 y EH-474/6 con una producción promedio de 0.91 y 1.14×10^9 conidios/g, con diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre ellos, por lo tanto el aislamiento EH-479/2 se perfila como el candidato ideal para su utilización como ingrediente activo de un micoinsecticida en el control de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en México.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas de origen químico en el campo agrícola ha llegado a ocasionar problemas severos de contaminación, los cuales afectan la salud humana directa o indirectamente, así como daños considerables al ambiente.

A principios de la década de los 90's se estimó que el gasto para el combate de plagas en el campo agrícola ascendió a 6 billones de dólares aproximadamente a nivel mundial. Una pequeña fracción de esta cantidad correspondió a productos de origen biológico, alrededor del 10 % (Moore y Prior, 1993). En la actualidad ha aumentado el interés por el uso de productos de origen biológico para el combate a las plagas agrícolas.

Ante la necesidad de proteger la calidad del ambiente, el reto consiste en desarrollar estrategias de control que tengan bajo impacto ambiental, bajo costo y una efectividad mayor o igual a los métodos existentes actualmente.

El control biológico ofrece una alternativa para frenar el daño causado por el abuso de insecticidas químicos, utilizando entre otros, hongos entomopatógenos como agentes microbianos, los cuales han demostrado ser en los últimos años una opción ecológicamente aceptable.

Existen productos registrados cuyo ingrediente activo son esporas de hongos entomopatógenos, ya sea conidios aéreos o propágulos obtenidos de cultivos sumergidos (Wraight *et al.*, 2001).

La industria de la agricultura se encuentra en la búsqueda de nuevos productos de origen biológico, para desarrollar y producir un agente microbiano a gran escala. La identificación de aislados y cepas con actividad insecticida, así como su estudio y mejoramiento es un primer paso de gran importancia en el desarrollo de un micoinsecticida (Deshpande, 1999).

Entre las especies de hongos mas estudiadas como agentes microbianos se encuentran las especies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas (Clarkson y Charnley, 1996).

El género *Metarhizium* está ampliamente distribuido en el mundo. Anteriormente, su clasificación se basaba en caracteres morfológicos, y en la actualidad se ha propuesto una clasificación donde se incluyen características fenotípicas, tales como la termotolerancia y métodos de biología molecular (RAPD-PCR, secuenciación de DNAr, etc.) donde se reconocen 10 clados taxonómicos (Tabla 1) (Driver *et al.*, 2000).

**Tabla 1. Taxones reconocidos molecularmente
Diez grupos (clados)***

Especie	Clado
<i>M. album</i>	(1)
<i>M. flavoviride</i> Tipo E	(2)
<i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i>	(3)
<i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>	(4)
<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i>	(5)
<i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	(6)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	(7)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i>	(8)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	(9)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	(10)

*Driver *et al.*, 2000

Metarhizium anisopliae es un hongo causante de la enfermedad conocida como “muscardina verde” en diversos grupos de insectos y patógeno de cerca de 200 especies (Figura 1), incluyendo muchas plagas de interés agrícola. Ofrece una opción ambientalmente segura al uso de plaguicidas químicos (Bidochka *et al.*, 2001).



Figura 1. Aspecto de un insecto infectado con *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Fotografía: acervo del Laboratorio de Micología Básica.

Este organismo es un hongo con distribución cosmopolita del cual sólo se conoce la fase asexual. Las colonias tienen diferentes tonalidades de verde oscuro, algunas veces sepia o isabelino (Figura 2c). Presenta fialoconidios compactados y columnas regulares de conidios (Figura 2a y 2d). Los conidios son cilíndricos a elipsoidales de 7 X 4 µm aproximadamente (Figura 2b), uninucleados, catenulados y basípetos (Figura 2d). (Domsch *et al.*, 1980; Samson *et al.*, 1988),.

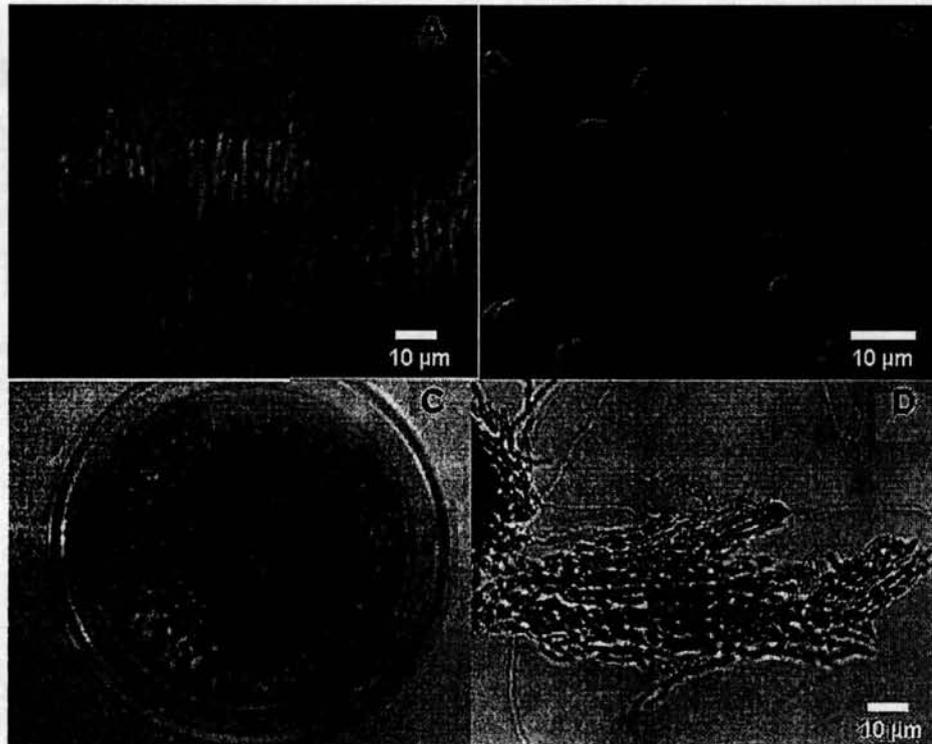


Figura 2. *Metarthizium anisopliae* var. *anisopliae*. a) conidióforos en empalizada; b) conidios cilíndricos; c) aspecto de una colonia de color verde olivo oscuro; d) conidios catenulados. Fotografías: acervo del Laboratorio de Micología Básica

M. anisopliae ha sido aplicado en diversos países, entre ellos, México, Brasil y Guatemala, para el control de cercopídeos, principalmente en cultivos de caña de azúcar y pastos de interés ganadero (Magãlhaes *et al.*, 1987; Toriello *et al.*, 1999). Se han obtenido resultados alentadores que permiten sugerir su uso como un efectivo agente de control microbiano contra plagas (Magãlhaes y Rodríguez de Faria, 2001).

La mosca pinta o salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) (Figura 3), es una plaga que ataca cultivos de caña de azúcar, pastos forrajeros para

ganado, arroz y otras gramíneas. En México, la plaga se encuentra ampliamente distribuida, aunque los problemas más severos se detectan principalmente en estados como Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Nayarit y Sinaloa. Los géneros de mayor importancia son *Prosapia* (figura 3a), y *Aeneolamia* (SARH, 1976; Coronado, 1978).

Las ninfas o "salivazos" (Figura 3b) se encuentran en la base de las plantas a las que ataca, succiona los jugos y secreta sustancias que aceleran el marchitamiento de las plantas. Los adultos se alimentan de las hojas y cuando las poblaciones del insecto son elevadas, se combina la acción de las ninfas con la de los adultos provocando pérdidas considerables en los cultivos. Los métodos de control del insecto más usados son la quema controlada, el sobrepastoreo intensivo, el uso de trampas de luz las cuales atraen al insecto, y el uso de insecticidas químicos. Sin embargo, algunos de estos métodos no son tan efectivos o pueden resultar peligrosos (Martín *et al.*, 1985).

En Brasil, se ha utilizado *Metarhizium anisopliae* para el control del cercopideo conocido como cigarinha (*Mahanarva posticata*) y se han establecido programas de control en 150,000 ha de cultivo de caña de azúcar (Magãlhaes y Rodríguez de Faria, 2001). También en Guatemala se ha utilizado el hongo entomopatógeno para el control de esta plaga en pastizales de ganado con excelentes resultados (Toriello, 1999).

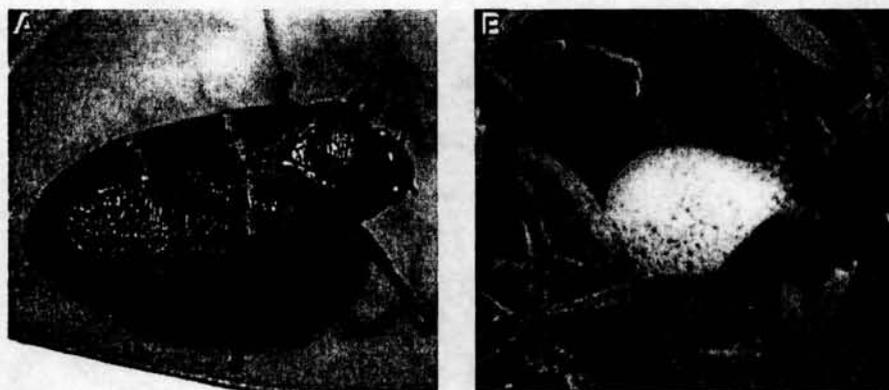


Figura 3. Mosca pinta o salivazo de los pastos. a) adulto de *Prosapia bicincta*; b) ninfa de mosca pinta, en la cual la ninfa del insecto está envuelta en una secreción blanquecina por la que recibe el nombre de "salivazo". Fotografías: acervo del Laboratorio de Micología Básica.

El mecanismo de infección de *M. anisopliae* es similar al de otros entomopatógenos, el cual consiste en la adhesión, penetración, proliferación y salida del hongo del insecto. Una vez que el conidio se adhiere a la superficie cuticular del insecto, este germina y forma estructuras denominadas apresorios, las cuales permiten la penetración por medio de acciones combinadas de enzimas y presión mecánica. Cuando el hongo llega al hemocele del insecto, produce propágulos fúngicos denominados blastosporas. El insecto muere por resultado de diferentes factores, entre ellos, la producción de las toxinas fúngicas conocidas como destruxinas. El desarrollo del hongo obstruye la circulación de la hemolinfa, ocasiona pérdida de nutrientes e invasión de diferentes órganos. Después de la muerte del insecto, las hifas pueden salir del cadáver del insecto y producir conidios y si las condiciones ambientales son óptimas, estos pueden repetir el ciclo infeccioso en otros insectos (Charnley y St. Leger, 1991; Clarkson y Charnley, 1996; Inglis *et al.*, 1997) (Figura 4).

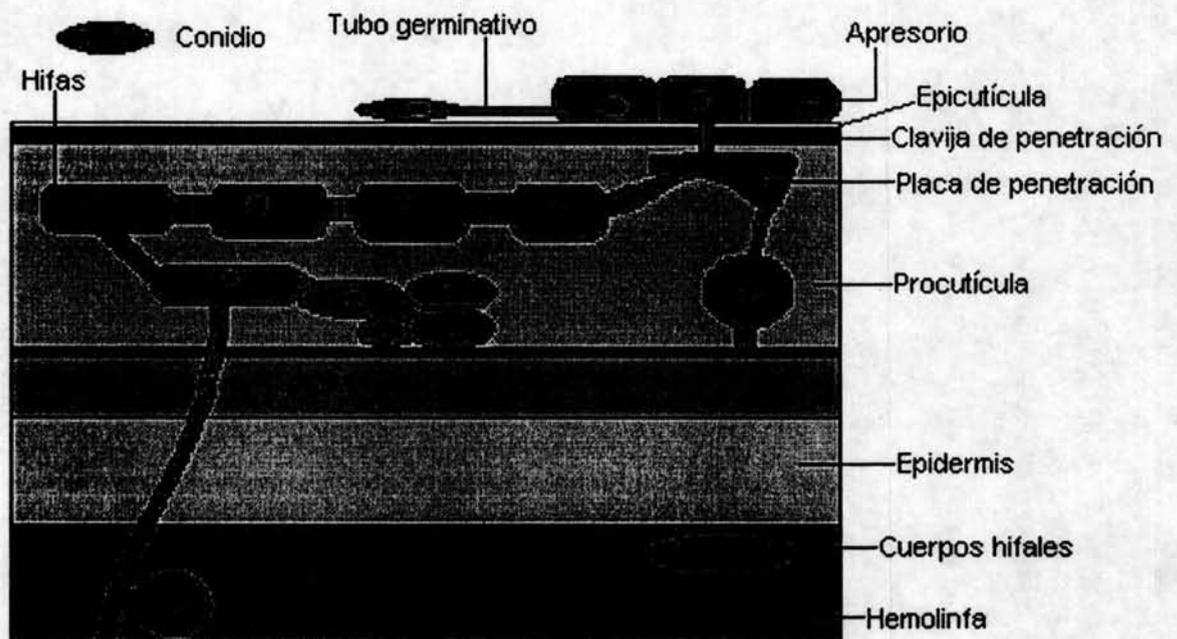


Figura 4. Mecanismo de infección de entomopatógenos, modificado de Clarkson y Charnley (1996).

Hasta la fecha existen varios productos registrados de este hongo para el control biológico de la mosca pinta, como por ejemplo, Metaquino® de Brasil, Cobican® de Venezuela (Butt *et al.*, 2001), y Saligreen-Ma® de México (Rodríguez-Colorado, 1999).

Para aumentar la utilización de estos agentes microbianos en el control biológico de plagas, son necesarios estudios básicos del hongo y de su producción en masa.

Se reconocen tres requerimientos relevantes para la producción a gran escala y uso exitoso de hongos como agentes microbianos contra plagas: primero, el hongo seleccionado debe ser de rápido crecimiento a las temperaturas del ambiente donde va a ser aplicado, abundante esporulación y alta virulencia sobre la plaga. En segundo lugar, los costos de producción deben ser lo más bajo posible. Y el tercer punto, es que el producto debe ser convenientemente formulado para su almacenamiento por tiempo adecuado, sin pérdidas significativas de su eficiencia como biocontrolador. *Metarhizium anisopliae* es factible de ser producido masivamente en sustratos de bajo costo, ya sea en medios sintéticos o en granos de cereales. Por ejemplo, el arroz esterilizado ha mostrado ser un sustrato efectivo para la producción de este y otros entomopatógenos (Hernández Velázquez, 2001).

En cualquier programa de control microbiano, la producción de cantidades suficientes de inóculo es esencial para que tenga éxito. Actualmente, el programa de "Lucha Biológica contra Langostas y Saltamontes" (LUBILOSA) sobre la utilización de *M. anisopliae* var. *acridum* contra la langosta en África, ha desarrollado un sistema difásico para la producción masiva de hongos entomopatógenos, el cual consiste en una producción de biomasa en un medio líquido y una posterior conidiación en un sustrato sólido. Este modelo reduce considerablemente el tiempo y los costos de producción, requisitos indispensables en un programa de control microbiano (Jenkins *et al.*, 1998).

Además de la producción masiva, se deben hacer otro tipo de estudios para validar la efectividad de un agente de control microbiano, tales estudios permiten conocer los rangos en los que el biocontrolador realiza su función de manera

exitosa. Estos estudios comprenden una serie de experimentos tales como determinación de temperatura óptima de desarrollo (Ouedraogo *et al.*, 1997; Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2002), virulencia del patógeno (Ekesi, 1999), efectos de humedad y radiación solar ambiental (Milner *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 2001), actividad enzimática (Bidochka y Khachatourians, 1994) y producción de propágulos fúngicos en medios de cultivo líquido (Jenkins y Prior, 1993), entre otros.

ANTECEDENTES

Metarhizium anisopliae ha sido estudiado en diversos países y por distintos grupos de investigación y los resultados obtenidos sugieren que el uso de este hongo es seguro para el ambiente y efectivo para el combate de diversas plagas.

Se ha observado que *M. anisopliae* crece de manera adecuada en un intervalo de temperatura de 20-30 °C, sin embargo, existen aislados o cepas adaptados a condiciones de temperatura fuera de dicho intervalo. También se ha observado que la temperatura es un factor importante que puede intervenir en la compleja interacción de parásito/hospedero, ya que a temperaturas bajas (5°C) la virulencia disminuye considerablemente (Rath *et al.*, 1995). Existen cepas de este hongo que llegan a desarrollarse a altas temperaturas, por ejemplo, se tienen referencias de que *M. anisopliae* var. *acridum* llega a soportar temperaturas superiores a 35 °C. (Hernández-Velázquez, 2001; Inglis *et al.*, 1997).

La humedad es otro factor relevante para el desarrollo de los hongos. En *M. anisopliae*, se ha observado que crece adecuadamente en atmósferas saturadas de humedad, las cuales permiten un mayor crecimiento del hongo en condiciones ambientales naturales y controladas en el laboratorio (Hallsworth y Magan, 1999). Cuando la humedad relativa se reduce, el desarrollo del hongo se ve afectado (Milner *et al.*, 1997).

Actualmente, *M. anisopliae* esta siendo probado como agente de control contra diversas plagas tales como: *Otiorhynchus sulcatus* (Moorhouse *et al.*, 1993), *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) (Zurek *et al.*, 2002), *Frankiniella occidentales* (Thysanoptera: Thripidae) (Vestergaard *et al.*, 1999; Maniania *et al.*, 2001), *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) (Sun *et al.*, 2002), *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) (Quintinela *et al.*, 1998), *Heteronychus licas* (Scarabaedae: Dynastinae) (Mazodze y Zvoutete, 1999). Jaccoud *et al.* (1999) proponen a *M. anisopliae* como un agente efectivo para la regulación de poblaciones de hormigas *Atta sexdens*, las cuales llegan a causar graves problemas cuando las poblaciones son elevadas. Asimismo, se ha investigado el potencial de este hongo para

controlar a la mosca tsetse *Glossina* spp. (Kaaya y Munyinyi, 1995) y al parásito de abejas productoras de miel *Varroa destructor* (Kanga *et al.*, 2002).

Para elegir el método adecuado en la producción masiva de un agente de control biológico, se deben tomar en cuenta varios aspectos, tales como el ciclo de vida del organismo, la resistencia a la desecación o a ambientes con un contenido de humedad alto, el tiempo de producción de propágulos fúngicos, entre otros factores a considerar (Frey y Magan, 2001).

Para *Metarhizium anisopliae*, el sistema difásico, que consiste en la producción de propágulos fúngicos en un medio líquido para después pasar a la producción de conidios en un sustrato sólido (arroz), ha mostrado excelentes resultados (Jenkins *et al.*, 1998; Hernández Velázquez, 2001). El sustrato para la segunda fase de fermentación, el arroz esterilizado, ha sido determinado como excelente para la producción de conidios del hongo, ya que el arroz tiene una alta capacidad de retención de agua, además de funcionar como una buena fuente de carbono (Dorta y Arcas, 1998). La fermentación en sustrato sólido ofrece la ventaja de permitir un mejor intercambio gaseoso, es de menor costo, es fácil de llevar a cabo, y la más importante, los propágulos fúngicos producidos tienen una mayor adaptación a la desecación (Deshpande, 1999).

La producción puede ser llevada a cabo en menor escala, en los países con menor desarrollo tecnológico, siguiendo el modelo difásico, y obteniendo suficiente material para cubrir una hectárea a un costo de 8-12 dólares americanos (Grimm, 2001).

En México, se han comparado otros sustratos para la etapa de fermentación en sustrato sólido como arroz, trigo y maíz, encontrando que el trigo esterilizado ofrece buenos resultados para la obtención de una gran cantidad de conidios (Rivera-Durán *et al.*, 2002). Estos autores mencionan que la ventaja del medio difásico es que al inocular micelio obtenido de la fase de fermentación en sustrato líquido, el tiempo de obtención de conidios se reduce en un 37 %.

También se han obtenido aislamientos de *Metarhizium anisopliae* de la mosca pinta y conservados en la colección del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) ubicado en Tecomán, Colima, México (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2002). En un proyecto de colaboración entre la UNAM, UAM Xochimilco y CNRCB se comenzaron a caracterizar estos

aislados. Se comenzó por obtener cultivos monospóricos de los hongos provenientes directamente del insecto y seleccionados de acuerdo a sus características fenotípicas (Navarro-Barranco *et al.*, 2001). Estos están siendo caracterizados genotípicamente usando el método de RAPD-PCR, para así contar con aislados de México bien caracterizados. Así mismo se han realizado estudios sobre el medio de cultivo líquido óptimo para estos aislados, correspondiente a la primera fase del método difásico (Montoya-Sansón, 2004).

Debido a la fundamental relevancia de la temperatura de crecimiento del hongo para su exitosa aplicación en el campo, así como para la infección en el insecto (Rath *et al.*, 1995), se llevó a cabo el presente trabajo con cultivos monospóricos, para conocer el intervalo de temperatura óptimo para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* aislado de la mosca pinta en México y algunas cepas de referencia de otros países. Además, se seleccionaron cinco cultivos monospóricos estudiados por Montoya-Sansón, como los mejores en la producción de propágulos en medio líquido, para investigar su producción de conidios en sustrato sólido, característica altamente relevante para la producción difásica de hongos entomopatógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la relevancia del intervalo óptimo de temperatura para el crecimiento fúngico en climas tropicales y a la producción elevada de conidios que se requieren como ingrediente activo de un agente microbiano, se plantea el presente trabajo para conocer el intervalo de temperatura óptimo en el crecimiento y el número de conidios por gramo de sustrato sólido de distintos aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, provenientes de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) de México. Se espera encontrar un aislamiento que sea un candidato idóneo para producirlo masivamente y probar su eficiencia contra la plaga.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Determinar el intervalo de temperatura óptima para el crecimiento de diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta en México y cepas de referencia de otros países.
- Determinar la producción de conidios en sustrato sólido de distintos aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en México.
- Comparar los resultados de producción de conidios entre los aislamientos para determinar al mayor productor de conidios/g de sustrato sólido.

Objetivos particulares

1. Comparar el crecimiento de aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* a 10, 25, 30, 35 y 40 °C.
2. Determinar la(s) temperatura(s) óptima(s) de crecimiento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de México.
3. Comparar distintas condiciones del sustrato sólido para producir masivamente conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de México, en condiciones de laboratorio.
4. Determinar las condiciones óptimas del sustrato sólido para la producción masiva de este entomopatógeno bajo condiciones de laboratorio.
5. Comparar la producción de conidios por gramo de sustrato entre 5 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.
6. Analizar estadísticamente los resultados para observar diferencias significativas entre los aislamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material fúngico

Se utilizaron 18 aislamientos de las colecciones de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) ubicado en Tecomán, Colima y 7 cepas de referencia de la "American Type Culture Collection" (ATCC) de Estados Unidos (Tabla 2). Los ensayos fueron realizados con cultivos monospóricos (Navarro-Barranco *et al.*, 2001) de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* pertenecientes a la colección del CNRCB, y con las cepas EH-172, EH-345 (38249, ATCC), EH-346, EH-347, EH-350 (60335, ATCC), EH-351 (60366, ATCC) y EH-352 (56096, ATCC) como cepas de referencia. Los hongos están conservados en la colección del Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Preparación de la suspensión conidial

El hongo se cultivó en tubos de ensaye con agar papa dextrosa, y se incubó a 28 °C durante 15 días. Los conidios se desprendieron de la superficie del agar con ayuda de un asa micológica adicionando Tween 80 al 0.5 %. Se determinó el número de conidios de la suspensión por conteos en cámara de Neubauer, se ajustó la suspensión a 1×10^8 conidios/ml, para cada aislamiento a probar.

Termotolerancia

Los aislamientos fueron sometidos a 5 distintas temperaturas (10, 25, 30, 35 y 40 °C). El estudio fue desarrollado según el método propuesto por Driver *et al.* (2000), con algunas modificaciones.

Se esterilizaron círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro, los cuales fueron depositados en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio sólido estéril de agar de Sabouraud con dextrosa y extracto de levadura (SDEL): dextrosa 40 g/L, peptona de soya 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, agar 15 g/L.

Las cajas con medio sólido fueron marcadas perpendicularmente con tinta indeleble, y en la intersección se colocaron los círculos de papel filtro. Las

cajas fueron colocadas a 37 °C durante 48 h para eliminar el exceso de agua y verificar la esterilidad de las mismas.

Una vez concluido el tiempo de esterilidad, los círculos de papel filtro fueron impregnados con 2 µl de la suspensión conidial (2×10^5 conidios) y las cajas fueron incubadas en las temperaturas seleccionadas durante 17 días. Durante el periodo de incubación se midió el diámetro colonial sobre las líneas perpendiculares diariamente y se promediaron.

Con los datos de crecimiento obtenidos, se determinó la tasa de crecimiento, expresada en mm/día con la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Diámetro final} - \text{diámetro inicial}}{\text{Días totales que duró el ensayo}}$$

Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados, graficados y sometidos a un análisis de varianza ($\alpha = 0.01$ y 0.05) para detectar diferencias significativas. En los resultados donde se detectaron diferencias significativas, los datos fueron sometidos a un análisis de Tukey con ayuda del programa SPSS™ for Windows™ ver. 9.0. En este ensayo se trabajaron cinco repeticiones.

Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de *M. anisopliae* var. *anisoplae*

Con los resultados del análisis estadístico, se determinó cual fue la temperatura en que los aislamientos en estudio exhibieron el mayor crecimiento.

Tabla 2. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislamiento	Clave origen	Hospedero	Origen geográfico
UNAM*			
EH-172		<i>Aeneolamia</i> sp.	Oaxaca, MX
EH-346		<i>Trialeurodes</i> sp.	Guatemala
EH-347		<i>Trialeurodes</i> sp.	Guatemala
Aislamiento/ Monospórico seleccionado	CNRCB**		
EH-465/8	MaZC1A	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-466/2	MaZC2N	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-467/6	MaZC3A	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-468/1	MaGB2A	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-469/6	MaGB3A	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-470/6	MaGB4	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-471/3	MaNL18	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-472/6	MaNP1	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-473/4	MaNL1	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-474/6	MaNL2	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-475/2	MaNM1	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-476/3	MaNM2	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-477/5	MaOPS1	<i>Aeneolamia</i> sp.	Oaxaca, MX
EH-478/1	MaOPS2	<i>Aeneolamia</i> sp.	Oaxaca, MX
EH-479/2	MaMV	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-480/8	MaZP	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-481/1	MaBA	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-482/8	MaPA1	<i>Aeneolamia</i> sp.	Oaxaca, MX
	ATCC***		
EH-345	38249	<i>Hylobius pales</i>	Guatemala
EH-350	60335	<i>Deois flavopicta</i>	Brasil
EH-351	60366	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil
EH-352	56096	<i>Aeneolamia albofasciata</i>	México

*Universidad Nacional Autónoma de México.

**Centro Nacional de Referencia en Control Biológico, México.

***American Type Culture Collection.

Obtención de conidios en sustrato sólido

Determinación de las condiciones óptimas del sustrato sólido (pruebas preliminares).

Para determinar las condiciones óptimas del sustrato sólido se utilizaron granos de arroz enteros de primera calidad (Covadonga, México), como ha sido descrito en otros trabajos (Jenkins, 1998; Hernández-Velazquez, 2000; Alves, 2000).

Para obtener la condición de humedad óptima para la máxima esporulación de los aislamientos en estudio, se probaron distintos tratamientos del arroz (Tabla 3). Debido a que la humedad es un factor determinante para la producción de conidios de este hongo, se determinó el porcentaje de humedad con un analizador de humedad modelo MA30 (Sartorius, Alemania), en cada paso al que fue sometido el arroz.

Los tratamientos del arroz difirieron en cuanto al tiempo del enjuague y escurrido, así como en la temperatura del agua y adición de hipoclorito como desinfectante para la disminución de contaminantes. El criterio para la determinación de los tratamientos óptimos en el arroz, se basó en resultados cualitativos de producción de conidios y la ausencia de contaminantes. Para comparar la producción de conidios en el arroz con los 4 tratamientos mencionados, se probó el cultivo monospórico EH-479/2.

Tabla 3. Tratamientos en la preparación del arroz como sustrato de *M. anisopliae* var. *anisopliae*

Tratamiento 1

Proceso	Tiempo (min)
Enjuague con agua corriente	30
Enjuague con agua corriente a 80 ± 5 °C	20
Escurreido	15
Esterilizado 120°C	15

Tratamiento 2

Proceso	Tiempo (min)
Enjuague con agua corriente	20
Enjuague con agua corriente a 80 ± 5 °C	15
Escurreido	15
Esterilizado 120 °C	15

Tabla 3. Continuación.

Tratamiento 3

Proceso	Tiempo (min)
Enjuague con agua corriente	20
Enjuague con agua corriente a 80 ± 5 °C	20
Escurrido	20
Esterilizado 120 °C	20

Tratamiento 4

Proceso	Tiempo (min)
Enjuague con agua corriente	10
Enjuague con hipoclorito al 10 %	10
Enjuague con agua corriente hirviendo	1
Enjuague con hipoclorito al 1 %	10
Escurrido	15
Esterilizado 120 °C	20

Entre las etapas de escurrido y esterilizado, el arroz se depositó en bolsas de polipapel de 26 x 35 cm, acondicionadas con tapones de algodón en vasos pequeños de plástico (Figura 6), y cubiertos con papel aluminio y papel estraza. Al término de la esterilización, las bolsas con el arroz procesado se enfriaron a temperatura ambiente durante 24 h.

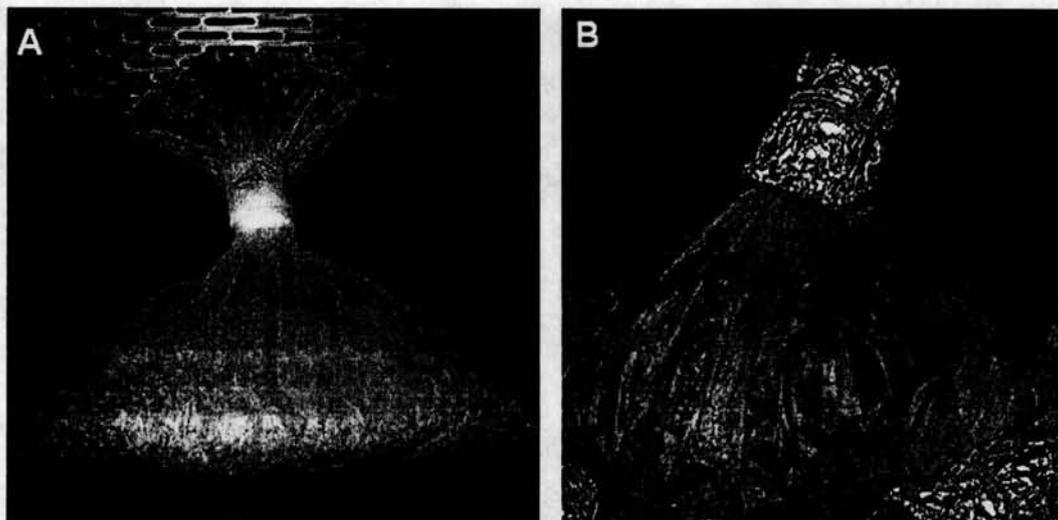


Figura 6. a) Aspecto de las bolsas con arroz y el tapón de algodón cubierto usado en el ensayo; b) bolsa con tapon de algodón cubierto con papel aluminio y papel estraza. Fotografías: Acervo del Laboratorio de

Micología Básica

Fase de cultivo en sustrato líquido.

Se obtuvieron conidios de cultivos de APD de 15 días a 28 °C del aislamiento seleccionado. Se prepararon suspensiones de 1×10^7 conidios/ml en Tween 80 al 0.5 %. Se colocaron 150 ml de medio de infusión de papa (IP, 30 % infusión de papa blanca, 20 % de dextrosa) en matraces Erlenmeyer y se sembraron con 1.5 ml de la suspensión conidial. Se incubaron a 28 °C, en agitación orbital a 100 rpm, durante 48 h. A cada paso se realizaron observaciones directas para evaluar la presencia de contaminantes.

Fase de cultivo en sustrato sólido.

A cada una de las bolsas con arroz esterilizado y enfriado, se le añadieron 15 ml del medio IP con propágulos fúngicos mediante una jeringa estéril de 20 ml con una aguja de 32 mm de largo y calibre 20. El pequeño orificio fue cubierto con masking tape, y las bolsas fueron colocadas en incubación a 28 °C, con un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad, durante 16 días.

Una vez obtenido el tratamiento óptimo en el arroz para la mayor producción de conidios, se realizó la comparación de los aislamientos seleccionados para esta prueba.

Producción masiva de conidios en sistema bifásico

Fase de cultivo en sustrato líquido.

Para este ensayo se emplearon 5 aislamientos de México con base a resultados previos de producción de propágulos fúngicos en medio de cultivo líquido (EH-466/2, EH-469/6, EH-470/6, EH-474/6 y EH-479/2) (Montoya-Sansón, 2004). La fase de cultivo líquido fue realizada como se describió anteriormente

Fase de cultivo en sustrato sólido.

A cada una de las bolsas con arroz esterilizado y enfriado del tratamiento seleccionado, se repitió la metodología descrita previamente.

Este ensayo se llevó a cabo con 10 bolsas por aislamiento, de las cuales se tomaron 10 muestras y se repitió tres veces en días diferentes (n = 300).

Obtención y conteo de conidios.

Al término del tiempo de incubación, se agregó 1 L de Tween 80 al 1% estéril a cada bolsa de arroz con conidios y se agitó vigorosamente. La suspensión se filtró con dos capas de gasa estéril. Se determinó el número de conidios con cámara de Neubauer.

Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados y sometidos a un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para determinar la presencia de diferencias significativas entre los aislamientos utilizados.

RESULTADOS

Material Fúngico

Todos los aislamientos y las cepas de referencia utilizados en este trabajo, están depositados en la colección del Laboratorio de Micología Básica, conservados en nitrógeno líquido en tanque criogénico.

Preparación de la suspensión conidial

Todas las suspensiones obtenidas presentaron distintas concentraciones, todas ellas fueron ajustadas a 1×10^8 conidios/ml

Termotolerancia y análisis estadístico

En los ensayos de crecimiento a las temperaturas de 10 y 40 °C, no hubo desarrollo en ninguno de los aislamientos de México, ni en las cepas de referencia. Por lo tanto, los resultados de termotolerancia están descritos solamente para las temperaturas de 25, 30 y 35 °C.

Al aplicar la fórmula para obtener la tasa de crecimiento, se anotó el resultado obtenido al día 17, como diámetro final, y un diámetro inicial de 6 mm, ya que este es el diámetro del papel filtro usado donde se depositó la suspensión inicial como fue descrito en material y métodos.

En la tabla 4 se puede observar el crecimiento de los aislamientos en estudio a 25 °C. Los aislamientos que mostraron el mayor crecimiento a esta temperatura fueron EH-467/6, EH-468/1 y EH-477/5, de los estados de Veracruz (los dos primeros) y de Oaxaca, que presentan una tasa de crecimiento de 4.64 mm/día. Los aislamientos que menos crecimiento mostraron fueron EH-472/6 y EH-473/4 del estado de San Luis Potosí, con una tasa de crecimiento de 2.88 y 3.43 mm/día respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el crecimiento de los aislamientos a esta temperatura.

En la tabla 5 se puede observar el crecimiento de los aislamientos en estudio a 30 °C. Los aislamientos que mostraron el mayor crecimiento a esta

temperatura fueron EH-481/1 de Veracruz, EH-482/8 de Oaxaca y EH-465/8 de Veracruz, con una tasa de crecimiento de 4.52, 4.52 y 4.64 mm/día, respectivamente. Los aislamientos con menor crecimiento fueron EH-473/4 de San Luis Potosí y EH-172 de Oaxaca, con una tasa de crecimiento de 3.66 y 3.76 mm/día, respectivamente.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el crecimiento de los aislamientos a esta temperatura.

Tabla 4. Diámetro colonial y tasa de crecimiento a 25 °C de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislamiento	Crecimiento al día 17 (mm ± DS)	Tasa de crecimiento (mm/día)
EH-172	75.1 ± 0.22*	4.06
EH-345	80.4 ± 0.89	4.37
EH-346	84.0 ± 0	4.58
EH-347	80.0 ± 1.87	4.35
EH-350	80.2 ± 2.77	4.36
EH-351	79.6 ± 0.89	4.32
EH-352	72.2 ± 0.44	3.89
EH-465/8*	84.4 ± 0.54	4.61
EH-466/2*	74.8 ± 0.44	4.04
EH-467/6*	85.0 ± 0	4.64
EH-468/1*	85.0 ± 0	4.64
EH-469/6*	74.6 ± 0.54	4.03
EH-470/6*	74.1 ± 0.82	4.00
EH-471/3*	74.0 ± 1	4.00
EH-472/6*	55.1 ± 3.17	2.88
EH-473/4*	64.4 ± 1.34	3.43
EH-474/6*	75.6 ± 0.54	4.09
EH-475/2*	81.6 ± 1.51	4.44
EH-476/3*	75.4 ± 1.67	4.08
EH-477/5*	85.0 ± 0	4.64
EH-478/1*	81.9 ± 1.14	4.46
EH-479/2*	78.0 ± 0	4.23
EH-480/8*	74.4 ± 0.89	4.02
EH-481/1*	78.6 ± 0.89	4.27
EH-482/8*	84.2 ± 0.44	4.60

* Monospórico seleccionado

Tabla 5. Diámetro colonial y tasa de crecimiento a 30 °C de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislamiento	Crecimiento al día 17 (mm \pm DS)	Tasa de crecimiento (mm/día)
EH-172	70.0 \pm 0	3.76
EH-345	64.2 \pm 0.44	3.42
EH-346	77.6 \pm 1.94	4.21
EH-347	78.9 \pm 0.22	4.28
EH-350	74.0 \pm 0	4.00
EH-351	75.0 \pm 0	4.05
EH-352	74.0 \pm 0	4.00
EH-465/8*	85.0 \pm 0	4.64
EH-466/2*	77.0 \pm 0	4.17
EH-467/6*	81.0 \pm 0	4.41
EH-468/1*	80.0 \pm 0	4.35
EH-469/6*	80.0 \pm 0	4.35
EH-470/6*	81.0 \pm 3.37	4.41
EH-471/3*	78.0 \pm 0	4.23
EH-472/6*	74.2 \pm 1.3	4.01
EH-473/4*	68.3 \pm 2.77	3.66
EH-474/6*	79.0 \pm 0	4.29
EH-475/2*	79.0 \pm 2.23	4.29
EH-476/3*	75.0 \pm 0	4.05
EH-477/5*	79.6 \pm 0.54	4.32
EH-478/1*	80.0 \pm 0	4.35
EH-479/2*	79.5 \pm 0.7	4.32
EH-480/8*	78.4 \pm 0.54	4.25
EH-481/1*	83.0 \pm 0	4.52
EH-482/8*	83.0 \pm 0	4.52

*Monospórico seleccionado

Tabla 6. Diámetro colonial y tasa de crecimiento a 35 °C de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislamiento	Crecimiento al día 17 (mm \pm DS)	Tasa de crecimiento (mm/día)
EH-172	7.0 \pm 0	0.05
EH-345	7.5 \pm 1.32	0.08
EH-346	17.6 \pm 2.38	0.68
EH-347	18.3 \pm 0.87	0.72
EH-350	30.1 \pm 2.92	1.41
EH-351	6.6 \pm 0.54	0.03
EH-352	21.1 \pm 1.98	0.88
EH-465/8	39.0 \pm 2.64	1.94
EH-466/2	22.0 \pm 4.52	0.94
EH-467/6	22.5 \pm 1.83	0.97
EH-468/1	46.1 \pm 0.96	2.35
EH-469/6	33.6 \pm 1.47	1.62
EH-470/6	30.0 \pm 2.42	1.41
EH-471/3	35.5 \pm 3.0	1.73
EH-472/6	32.7 \pm 1.2	1.57
EH-473/4	37.5 \pm 2.12	1.82
EH-474/6	39.0 \pm 1.87	1.94
EH-475/2	43.0 \pm 3.55	2.17
EH-476/3	28.4 \pm 1.25	1.31
EH-477/5	9.0 \pm 1.17	0.17
EH-478/1	22.6 \pm 1.65	0.97
EH-479/2	40.3 \pm 0.83	2.01
EH-480/8	23.9 \pm 1.14	1.05
EH-481/1	21.3 \pm 1.48	0.90
EH-482/8	34.4 \pm 1.63	1.67

En la tabla 6 se puede observar el crecimiento de los aislamientos en estudio a 35 °C. Los aislamientos que mostraron el mayor crecimiento a esta temperatura fueron EH-468/1 y EH-475/2 de Veracruz y San Luis Potosí, con una tasa de crecimiento de 2.35 y 2.17 mm/día respectivamente. Los aislamientos con menor crecimiento fueron EH-172 y EH-477/5, ambos del estado de Oaxaca, con una tasa de crecimiento de 0.05 y 0.17 mm/día, respectivamente.

El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) en la tasa de crecimiento entre los aislamientos a esta temperatura. La comparación múltiple de medias (Tukey) mostró 9 grupos de tolerancia al crecimiento a 35 °C ($F = 58.618$; $gl = 24$; $P < 0.001$), donde destaca el aislamiento EH-468/1 como el más tolerante a esta temperatura (Tabla 7).

Al comparar los datos de crecimiento entre 25 y 30 °C, no hubo diferencias significativas, sin embargo al comparar los datos de 25 y 35 °C, y 30 con 35 °C, si se detectaron diferencias significativas ($P < 0.01$) (Anexo 1), entre el crecimiento de los aislamientos a estas temperaturas (Tabla 8).

Tabla 7. Prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) entre el crecimiento a 35 °C de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislamiento	Grupo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EH-351	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-
EH-172	7	-	-	-	-	-	-	-	-
EH-345	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-
EH-477/5	9	9	-	-	-	-	-	-	-
EH-346	-	17.6	17.6	-	-	-	-	-	-
EH-347	-	-	18.3	-	-	-	-	-	-
EH-352	-	-	21.1	-	-	-	-	-	-
EH-481/1	-	-	21.3	-	-	-	-	-	-
EH-466/2	-	-	22	-	-	-	-	-	-
EH-467/6	-	-	22.5	22.5	-	-	-	-	-
EH-4781	-	-	22.6	22.6	22.6	-	-	-	-
EH-480/8	-	-	23.9	23.9	23.9	-	-	-	-
EH-476/3	-	-	-	28.4	28.4	28.4	-	-	-

Tabla 7. Continuación

EH-470/6	-	-	-	30	30	30	-	-	-
EH-350	-	-	-	-	30.1	30.1	-	-	-
EH-472/6	-	-	-	-	-	32.7	32.7	-	-
EH-469/6	-	-	-	-	-	33.6	33.6	33.6	-
EH-482/8	-	-	-	-	-	34.4	34.4	34.4	-
EH-471/3	-	-	-	-	-	35.5	35.5	35.5	-
EH-473/4	-	-	-	-	-	37.5	37.5	37.5	-
EH-465/8	-	-	-	-	-	-	39	39	39
EH-474/6	-	-	-	-	-	-	39	39	39
EH-479/2	-	-	-	-	-	-	40.3	40.3	40.3
EH-475/2	-	-	-	-	-	-	-	43	43
EH-468/1	-	-	-	-	-	-	-	-	46.1

Tabla 8. Promedio del diámetro colonial al día 17 de incubación de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Aislamiento	25 °C	30°C	35 °C
EH-172	75.1 ± 0.22*	70.0 ± 0	7.0 ± 0
EH-345	80.4 ± 0.89	64.2 ± 0.44	7.5 ± 1.32
EH-346	84.0 ± 0	77.6 ± 1.94	17.6 ± 2.38
EH-347	80.0 ± 1.87	78.9 ± 0.22	18.3 ± 0.87
EH-350	80.2 ± 2.77	74.0 ± 0	30.1 ± 2.92
EH-351	79.6 ± 0.89	75.0 ± 0	6.6 ± 0.54
EH-352	72.2 ± 0.44	74.0 ± 0	21.1 ± 1.98
EH-465/8**	84.4 ± 0.54	85.0 ± 0	39.0 ± 2.64
EH-466/2**	74.8 ± 0.44	77.0 ± 0	22.0 ± 4.52
EH-467/6**	85.0 ± 0	81.0 ± 0	22.5 ± 1.83
EH-468/1**	85.0 ± 0	80.0 ± 0	46.1 ± 0.96
EH-469/6**	74.6 ± 0.54	80.0 ± 0	33.6 ± 1.47
EH-470/6**	74.1 ± 0.82	81.0 ± 3.37	30.0 ± 2.42
EH-471/3**	74.0 ± 1	78.0 ± 0	35.5 ± 3.0
EH-472/6**	55.1 ± 3.17	74.2 ± 1.3	32.7 ± 1.2
EH-473/4**	64.4 ± 1.34	68.3 ± 2.77	37.5 ± 2.12
EH-474/6**	75.6 ± 0.54	79.0 ± 0	39.0 ± 1.87
EH-475/2**	81.6 ± 1.51	79.0 ± 2.23	43.0 ± 3.55
EH-476/3**	75.4 ± 1.67	75.0 ± 0	28.4 ± 1.25
EH-477/5**	85.0 ± 0	79.6 ± 0.54	9.0 ± 1.17
EH-478/1**	81.9 ± 1.14	80.0 ± 0	22.6 ± 1.65
EH-479/2**	78.0 ± 0	79.5 ± 0.7	40.3 ± 0.83
EH-480/8**	74.4 ± 0.89	78.4 ± 0.54	23.9 ± 1.14
EH-481/1**	78.6 ± 0.89	83.0 ± 0	21.3 ± 1.48
EH-482/8**	84.2 ± 0.44	83.0 ± 0	34.4 ± 1.63

*Media ± DS; **Monospórico seleccionado.

En la tabla 8 se muestra una comparación de la media de crecimiento de los aislamientos en estudio, a las diferentes temperaturas ensayadas. Se observó que a las temperaturas de 25 y 30 °C se alcanzó el mayor crecimiento, mientras que a 35 °C el crecimiento disminuyó considerablemente, la comparación se puede observar en los anexos IV, V y VI.

A 25 °C el intervalo de crecimiento va de los 55.1 ± 3.17 a 85 ± 0.0 mm, a los 30 °C el intervalo es de 64.2 ± 0.44 a 85 ± 0 mm, mientras que a los 35 °C, el intervalo va de 6.6 ± 0.54 a 46.1 ± 0.96 mm. Es notable el casi nulo crecimiento a 35 °C de los aislamientos EH-172, EH-345, EH-351 y EH-477/5 con un crecimiento de 7.0 ± 0 , 7.5 ± 1.32 , 6.6 ± 0.54 y 9.0 ± 1.17 , respectivamente.

El mayor crecimiento se observó en las temperaturas de 25 y 30 °C, sin diferencia significativa ($\alpha = 0.01$) por lo que la temperatura óptima de crecimiento de estos aislamientos estudiados se encuentra en este intervalo. A 35 °C el crecimiento disminuyó significativamente ($P < 0.01$), y a 10 y 40 °C no hubo crecimiento alguno.

Determinación de la temperatura óptima del crecimiento

En base a los análisis estadísticos, se determinó que la temperatura óptima de crecimiento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* es a 25 y 30 °C, al no haber diferencias significativas en los resultados de crecimiento a estas temperaturas.

Obtención de conidios en sustrato sólido

Los resultados preliminares de las condiciones óptimas del sustrato sólido se muestran en la tabla 9. En todos los tratamientos, el porcentaje de humedad inicial del arroz utilizado fue del 10 %.

Tabla 9. Condiciones y porcentaje de humedad de los tratamientos al arroz

Proceso	Tiempo (min)	Humedad %
Tratamiento 1		
Enjuague con agua corriente	30	25
Enjuague con agua a 80 ± 5 °C	20	40
Ecurrido	15	50
Esterilizado 120°C	15	70
Tratamiento 2		
Proceso		
Enjuague con agua corriente	20	25
Enjuague con agua a 80 ± 5 °C	15	45
Ecurrido	15	60
Esterilizado 120 °C	15	80
Tratamiento 3		
Enjuague con agua corriente	20	27
Enjuague con agua a 80 ± 5 °C	20	33
Ecurrido	20	57
Esterilizado 120 °C	20	75
Tratamiento 4		
Enjuague con agua corriente	10	27
Enjuague con hipoclorito al 10 %	10	33
Enjuague con agua hirviendo	1	38
Enjuague con hipoclorito al 1 %	10	40
Ecurrido	15	35
Esterilizado 120 °C	20	30

En los tratamientos 1 al 3 el porcentaje de humedad del arroz al final de cada tratamiento fue de 70, 80 y 75 %, respectivamente.

En el tratamiento 4, se incluyó hipoclorito como desinfectante, y un enjuague con agua fría después de la fase de remojo en agua caliente, con la

finalidad de disminuir la temperatura del arroz. De los cuatro tratamientos probados, el cuarto mostró que el proceso utilizado resultaba en el menor porcentaje de humedad del arroz.

La selección del tratamiento adecuado se basó en la siembra del hongo en cada sustrato y luego en observaciones cualitativas, considerando la presencia o ausencia de contaminantes y un mejor desarrollo del hongo. El tratamiento 4 fue el que permitió estas condiciones, donde la bolsa con arroz sometido al tratamiento 4 inoculado con el hongo, muestra un buen desarrollo fúngico que puede observarse por el color verde olivo característico de la esporulación del hongo. Las otras bolsas con el arroz con tratamientos 1, 2 y 3 muestran poco desarrollo del hongo como se aprecia en la figura 7a y 7b , o muestras evidentes de contaminación (figuras 7c y 7d), en comparación con la bolsa del tratamiento 4 donde se observa una abundante esporulación por el color verde olivo homogéneo en toda la bolsa.

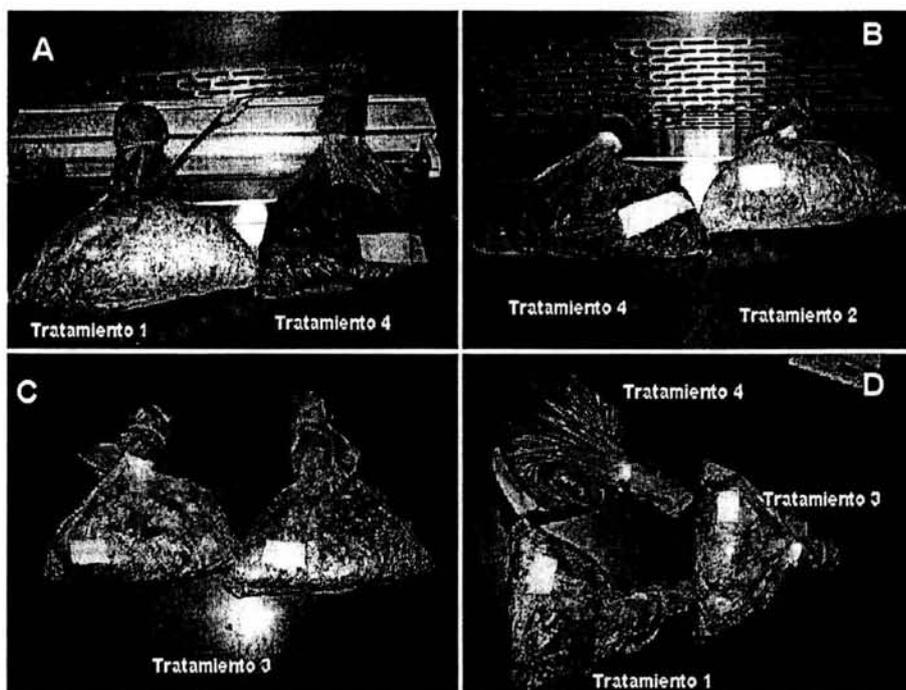


Figura 7. Aspecto de bolsas con arroz con distintas condiciones de humedad y sembradas con el aislamiento EH-479/2 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. A) comparación de bolsas de arroz a las cuales se les aplicó el tratamiento 1 y el tratamiento 4; B) comparación bolsas de arroz a las cuales se les aplicó el tratamiento 2 y el tratamiento 4; C) bolsas de arroz a las cuales se les aplicó el tratamiento 3; D) bolsas de arroz a las cuales se les aplicaron los tratamientos 1,3 y 4. Fotografías: acervo del Laboratorio de Micología Básica.

En la figura 8 se observa una bolsa con arroz que recibió el tratamiento 4, donde se aprecia una abundante esporulación por el color verde olivo pulverulento y nulas evidencias de contaminantes. Este ensayo cualitativo permitió seleccionar el cuarto tratamiento, ya que el aislamiento utilizado presentó la mejor esporulación. Se utilizó el tratamiento 4 para el arroz con el fin de realizar el estudio de producción masiva de conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae* apegado a un modelo difásico.



Figura 8. Bolsa con arroz y conidios del aislamiento EH-479/2. Fotografía: acervo del Laboratorio de Micología Básica.

Producción masiva de conidios en sistema bifásico

Las bolsas con arroz del tratamiento 4, fueron sembradas con precultivos líquidos del hongo, como se describió en material y métodos, de los 5 aislamientos previamente caracterizados por su virulencia y producción de propágulos fúngicos en medio líquido.

Las bolsas se incubaron 17 días a 28 °C, en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h del sustrato sólido, como fue descrito en material y métodos. La comparación en la producción de conidios/g de sustrato de los cinco aislamientos probados se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Comparación de cinco aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en la producción de conidios/g de sustrato.

(Conidios x 10⁹)

	EH-466/2	EH-469/6	EH-470/6	EH-474/6	EH-479/2
	$\bar{x} \pm DS$				
Bolsa 1	0.41 ± 0.12	5.04 ± 0.80	6.07 ± 0.73	1.33 ± 0.15	5.95 ± 0.78
Bolsa 2	0.44 ± 0.08	4.55 ± 1.13	5.13 ± 0.55	1.33 ± 0.14	7.23 ± 0.62
Bolsa 3	0.91 ± 0.17	4.9 ± 0.66	6.69 ± 1.14	1.40 ± 0.16	7.24 ± 0.74
Bolsa 4	0.62 ± 0.14	4.65 ± 0.58	5.61 ± 1.23	1.47 ± 0.17	7.96 ± 0.80
Bolsa 5	1.12 ± 0.13	5.28 ± 0.71	7.11 ± 1.48	1.53 ± 0.19	9.11 ± 0.78
Bolsa 6	0.86 ± 0.10	3.85 ± 0.45	4.68 ± 0.35	1.60 ± 0.10	9.41 ± 0.82
Bolsa 7	1.12 ± 0.10	5.02 ± 1.01	7.54 ± 1.05	1.47 ± 0.16	6.02 ± 0.52
Bolsa 8	1.38 ± 0.10	4.65 ± 0.63	6.44 ± 0.69	1.40 ± 0.12	5.94 ± 0.63
Bolsa 9	1.16 ± 0.14	4.35 ± 0.45	4.55 ± 0.43	1.40 ± 0.10	5.97 ± 0.72
Bolsa 10	1.09 ± 0.28	2.80 ± 0.48	6.28 ± 0.80	1.53 ± 0.12	6.53 ± 0.50
Bolsa 1	0.80 ± 0.18	2.84 ± 0.45	2.50 ± 0.37	1.60 ± 0.08	3.50 ± 0.32
Bolsa 2	0.64 ± 0.17	2.70 ± 0.25	3.23 ± 0.29	1.67 ± 0.09	4.91 ± 0.78
Bolsa 3	0.87 ± 0.22	2.81 ± 0.37	3.19 ± 0.32	1.73 ± 0.08	3.25 ± 0.48
Bolsa 4	1.15 ± 0.25	3.37 ± 0.65	4.16 ± 0.51	1.40 ± 0.10	4.20 ± 0.23
Bolsa 5	0.53 ± 0.18	3.75 ± 0.43	2.81 ± 0.32	1.47 ± 0.08	4.69 ± 0.48

Tabla 10. Continuación

Bolsa 6	1.12 ± 0.20	3.17 ± 0.59	3.02 ± 0.67	1.40 ± 0.10	3.59 ± 0.34
Bolsa 7	0.81 ± 0.33	2.75 ± 0.44	2.59 ± 0.32	1.47 ± 0.10	4.44 ± 0.53
Bolsa 8	1.13 ± 0.23	3.28 ± 0.50	2.32 ± 0.23	1.53 ± 0.08	4.22 ± 0.44
Bolsa 9	0.80 ± 0.19	3.05 ± 0.42	2.64 ± 1.28	1.47 ± 0.16	4.40 ± 0.71
Bolsa 10	0.79 ± 0.28	3.86 ± 0.76	2.67 ± 0.55	1.40 ± 0.11	4.56 ± 0.29
Bolsa 1	0.75 ± 0.14	3.41 ± 0.62	2.97 ± 0.38	1.47 ± 0.10	5.92 ± 0.60
Bolsa 2	0.96 ± 0.23	3.56 ± 0.70	3.50 ± 0.48	1.33 ± 0.13	6.29 ± 0.68
Bolsa 3	0.93 ± 0.30	3.89 ± 0.92	2.94 ± 0.46	1.27 ± 0.15	6.71 ± 0.79
Bolsa 4	0.92 ± 0.17	4.62 ± 0.89	3.78 ± 0.63	1.67 ± 0.12	6.37 ± 0.31
Bolsa 5	1.00 ± 0.08	3.73 ± 0.12	3.93 ± 0.72	1.60 ± 0.13	7.00 ± 1.18
Bolsa 6	1.01 ± 0.08	3.73 ± 0.12	4.12 ± 0.53	1.53 ± 0.13	7.32 ± 1.43
Bolsa 7	1.04 ± 0.08	3.78 ± 0.12	4.16 ± 0.51	1.47 ± 0.08	6.72 ± 0.58
Bolsa 8	1.02 ± 0.08	3.71 ± 0.16	4.31 ± 0.53	1.40 ± 0.07	6.83 ± 0.49
Bolsa 9	1.00 ± 0.08	3.70 ± 0.15	4.20 ± 0.45	1.47 ± 0.07	6.81 ± 0.58
Bolsa 10	1.03 ± 0.08	3.73 ± 0.14	4.26 ± 0.47	1.67 ± 0.08	6.87 ± 0.70
Promedio	0.91	3.81	4.24	1.14	5.99

Los ensayos se repitieron tres veces a diferentes tiempos. Cada uno se realizó 10 veces de 10 bolsas diferentes (n = 300).

En la tabla 10 se muestran los resultados de los conteos de conidios por gramo de arroz de cada bolsa, en los tres tiempos distintos en los que se realizó el ensayo. El aislamiento que mostró la mayor producción de conidios por gramo de arroz, fue el EH-479/2, con una producción promedio de 5.99×10^9 conidios por gramo. A continuación los aislamientos EH-470/6, EH-469/6 y EH-474/6 con una producción promedio de 4.24, 3.81 y 1.14×10^9 conidios/g de arroz, respectivamente. El aislamiento con menor producción de conidios por gramo fue el EH-466/2, con una producción promedio de 0.91×10^9 conidios por gramo de sustrato.

En la figura 9, se puede apreciar la comparación de la producción de conidios por gramo de arroz de los cinco aislamientos estudiados.

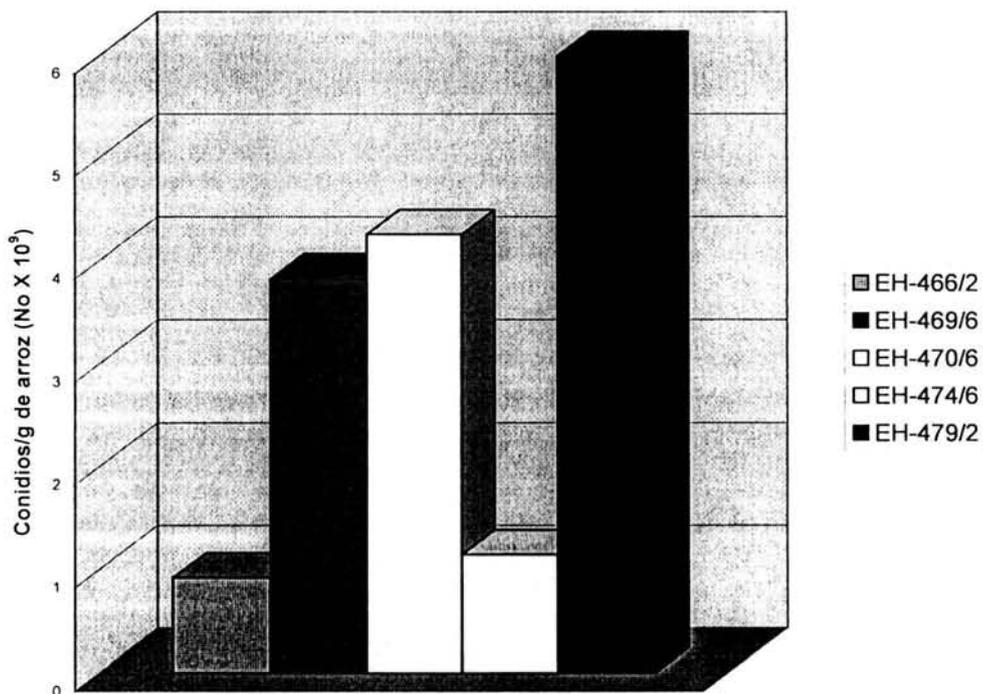


Figura 9. Comparación de la producción de conidios por gramo de sustrato de los aislamientos en estudio.

El análisis estadístico ($\alpha = 0.05$) reveló la presencia de diferencias significativas al comparar la producción de conidios entre los 5 aislamientos ($P < 0.01$). Al realizar la comparación múltiple de medias (Tukey) ($F = 120.920$; $gl = 5$; $P < 0.01$) se formaron 3 grupos, siendo el aislamiento EH-479/2 el que más conidios produjo por gramo de arroz (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) entre los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en la producción de conidios por gramo de sustrato (Conidios X 10⁹).

Aislamiento	Grupo		
	1	2	3
EH-466/2	0.91	-	-
EH-474/6	1.14	-	-
EH-469/6	-	3.81	-
EH-470/6	-	4.24	-
EH-479/2	-	-	5.99

DISCUSIÓN

Debido a la importancia que han adquirido estrategias alternativas al uso de productos químicos en el combate de plagas agrícolas, tales como el uso de microorganismos en control biológico, que tengan bajo impacto ambiental, costos accesibles y una alta eficiencia biológica, aspectos que tienen una gran relevancia en la actualidad. El uso de hongos entomopatógenos para tal fin ha cobrado gran relevancia en los últimos tiempos, debido a que éstos organismos han demostrado eficiencia y seguridad en su uso.

El control biológico está siendo desarrollado y lentamente incorporado a las técnicas para el control de plagas, aun cuando es relativamente mas económico el uso de plaguicidas químicos. El desarrollo de nuevas tecnologías de producción de agentes microbianos permitirá disminuir los costos operativos (Quimby *et al.*, 2002).

Metarhizium anisopliae es un modelo importante en el estudio de agentes de control biológico, se ha estudiado su eficiencia biológica en diversos países alrededor del mundo; se han realizado trabajos sobre su proceso de infección, formulación, aplicación y virulencia (Zimmermann, 1993; St. Leger, 1993; Jenkins *et al.*, 1998; Hernández-Velazquez, 2001; Toriello *et al.*, 1999). En México, hacen falta estudios que permitan conocer el comportamiento de aislamientos nativos de este hongo para poder ser utilizado en el control biológico de plagas de interés agrícola, de ahí la importancia de este trabajo.

Además de estos estudios, se han llevado a cabo experimentos diversos que evalúan la capacidad de *M. anisopliae* para el control biológico de diversas plagas, la mayoría de tales experimentos se han llevado bajo condiciones de laboratorio. Así se han estudiado los efectos de la disponibilidad y ausencia de ciertos nutrientes sobre el desarrollo del hongo, como: la influencia de fuentes de carbono y nitrógeno en el desarrollo óptimo del hongo (Li y Holdom, 1995). La temperatura óptima para el desarrollo del hongo también ha sido estudiada, y se ha determinado que existe una correlación entre aislados de distintos países y la temperatura del lugar en que fueron aislados (Ouedraogo *et al.*, 1997; Hallsworth y Magan, 1999).

Este hongo ha sido aplicado en Guatemala para el control de la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales ganaderos y demostró una alta efectividad (Toriello *et al.*, 1999). En Brasil también se han llevado a cabo aplicaciones de *M. anisopliae* var. *anisopliae* para el control de *Deois flavopicta* y *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae) y ha tenido resultados alentadores que permiten pensar en aplicaciones sobre áreas más extensas (Magãlhaes *et al.*, 2002).

Driver *et al.* (2000), llevaron a cabo un estudio para redefinir la taxonomía del género *Metarhizium* basado en análisis de secuencias de DNA ribosomal, RAPD-PCR y características fenotípicas del hongo, que permitieron establecer 10 clados taxonómicos en este género. En este mismo trabajo se hicieron ensayos de termotolerancia y se determinó que dos cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI-1114 y FI-1115, provenientes de Australia, clado 9), presentaron crecimiento a una temperatura de 10 °C. En los 25 aislamientos de México, Guatemala y Brasil estudiados en el presente trabajo, a esta temperatura no se observó crecimiento alguno. Ouedraogo *et al.* (1997) y Hallsworth y Magan (1999) mencionan la existencia de una correlación entre aislados de distintos países y la temperatura del lugar en que fueron aislados, lo que podría sugerir que los aislamientos de México, Guatemala y Brasil estudiados, posiblemente estén adaptados a condiciones diferentes que las estudiadas por Driver *et al.* (2000).

La importancia del conocimiento del rango de temperatura óptima para el desarrollo del hongo sugiere que la eficiencia del hongo en la infección del insecto se alcanzará en temperaturas similares.

La temperatura óptima de crecimiento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* encontrada en este trabajo fue en el intervalo de 25 a 30 °C, lo cual coincide con estudios realizados en diferentes cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de Camerún, Francia, Madagascar, Brasil, Estados Unidos, México, Egipto, Cuba, Burkina Faso, Tailandia y Etiopía, tienen un mejor desarrollo dentro de este intervalo de temperatura cuando fueron puestos a crecer en medios de agar (Ouedraogo *et al.*, 1997). Estos investigadores obtuvieron las mayores tasas de crecimiento a los 25 °C. Por arriba de 30 °C, el crecimiento del hongo

disminuyó considerablemente, y fue nulo entre 8 y 11 °C y 40 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro presente estudio.

Diversos estudios de virulencia de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y otros entomopatógenos han demostrado que la máxima mortalidad de insectos infectados en condiciones de laboratorio, de diversas cepas y/o, aislamientos se alcanza dentro del rango de 25 a 30 °C. (Inglis *et al.*, 1999; Arthurs y Thomas, 2001; Ekesi *et al.*, 2003).

La temperatura no solo afecta el desarrollo colonial, sino que también tiene influencia sobre la viabilidad de los conidios. En otras especies como *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* var. *acridum*, se observó que la viabilidad de los conidios se mantiene alta (alrededor del 100 %) en un intervalo de temperatura de 24 a 32 °C (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2002).

En otro trabajo, Thomas y Jenkins (1997) mencionan también que la temperatura óptima de crecimiento colonial, así como la mayor producción de conidios de *M. anisopliae* es de alrededor de 25 °C, mientras que la temperatura óptima de germinación conidial es de 30 °C, donde se obtiene una germinación cercana al 100 %. Este intervalo de temperatura concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Entre otros, un producto comercial, Biocane®, basado en conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, para la plaga *Dermolepida albohirtum* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Australia, también describe el mejor crecimiento fúngico a los 25 °C (Milner *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos con los hongos en este estudio presentaron crecimiento en medios de cultivo en rangos de temperatura similares a los observados en la bibliografía. El aislamiento EH-468/1 fue el que mayor crecimiento presentó a los 25 y 35 °C, mientras que el aislamiento EH-465/8 fue el que más creció a 35 °C. Estos aislamientos provienen del estado de Veracruz, México, región que presenta temperatura y humedad relativa elevadas durante la mayor parte del año. Estas condiciones, como se mencionó anteriormente, tienen influencia positiva en el crecimiento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Hallsworth y Magan, 1999).

Una de las cualidades relevantes para que un microorganismo sea seleccionado como agente microbiano de control de plagas es que la

producción masiva del organismo sea rápida, económica y lo menos complicada posible. En la actualidad, la producción de agentes microbianos fúngicos se basa en un modelo bifásico, el cual incluye una fase de producción de propágulos fúngicos en un medio de cultivo líquido y una posterior obtención de conidios de un sustrato sólido (Jenkins *et al.*, 1998; Lomer *et al.*, 2001). En este estudio se estandarizó un método apegado a este modelo difásico, estudiando entre diversos aislamiento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de México, aquel que presentara la mayor producción de conidios. La utilización inicial del medio de infusión de papa (IP), se debió a que en un estudio previo se demostró que es óptimo para la fase de cultivo líquido para la producción de propágulos fúngicos en un lapso de dos días (Montoya-Sansón, 2004). En otros estudios, la fase de cultivo líquido es llevada a cabo utilizando medios de cultivo complejos (Jenkins y Prior, 1993). Montoya-Sansón (2004) determinó que este medio es ideal para la producción de propágulos fúngicos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* de México.

Para la obtención de conidios en un sustrato sólido se seleccionó el arroz que ha mostrado buenos resultados en la producción masiva de entomopatógenos, aun cuando otros cereales también han sido probados (Jenkins *et al.*, 1998).

En la bibliografía rara vez se especifica el tratamiento al que es sometido el arroz para tal fin. Se trató de implementar una técnica utilizada para *M. anisopliae* var. *acridum*, sin embargo, los resultados no fueron los esperados, ya que se presentaron altos niveles de contaminación en los ensayos preliminares, debido a los altos contenidos de humedad presentes en el arroz (superior al 50 %). En estos ensayos preliminares, se observó que humedades altas propiciaron presencia de contaminantes, los cuales competían con *M. anisopliae* var. *anisopliae* por el sustrato. Un porcentaje alto de humedad en el arroz propicia el crecimiento de otros organismos impidiendo el desarrollo del hongo de interés.

Los primeros ensayos realizados con el arroz mostraron que al hervirlo, éste retiene una gran cantidad de humedad. Las pruebas realizadas permitieron encontrar un balance adecuado de humedad en el arroz para que *M. anisopliae* var. *anisopliae* se desarrollara mas rápidamente que cualquier eventual competidor, y por consiguiente se eliminarán las contaminaciones.

Dorta y Arcas (1998) reportan que para la producción de *M. anisopliae* en grandes cantidades, una humedad en el arroz de 47-50 % es lo ideal para la obtención de grandes cantidades de conidios. En el sistema de bolsas probado se encontró que la humedad del arroz más adecuada para la posterior producción de conidios de los aislamientos de México de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, se encontraba entre 35 y 40 %. El enjuague del arroz con hipoclorito ayudó a evitar la presencia de agentes contaminantes.

Procesos como éste de producción de conidios en sustrato sólido en ambiente cerrado, requieren el intercambio gaseoso (Ooijkaas *et al.*, 1998), de ahí el uso de bolsas de polipapel con tapones de algodón, papel estraza y aluminio que lo permiten. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la efectividad de los materiales utilizados al obtener suficiente cantidad de conidios y bajos niveles de contaminaciones.

Pandey (2003) indica que el tamaño de la partícula del sólido es de gran relevancia, ya que a mayor tamaño de partícula el intercambio gaseoso es más eficiente. El uso del arroz permite un mayor intercambio, ya que el tamaño de la partícula es grande, y permite la aireación de todo el contenido de la bolsa, garantizando la disponibilidad de oxígeno en toda la muestra.

Estos resultados sugieren que con un kilo de sustrato sólido (arroz) del aislamiento EH-479/2 que mostró la mayor producción de conidios, permite obtener la cantidad suficiente para asperjar una ha de caña de azúcar con mosca pinta, ya que se necesitan aproximadamente alrededor de 5×10^{12} conidios/ha (Rodríguez-Colorado, 1999).

Aunque este estudio no permitió evaluar el costo real de la producción por gramo de arroz, se estima que una planta a gran escala en países del tercer mundo, produciría suficiente material para cubrir una ha a un costo de entre 8 y 12 dólares americanos (Grimm, 2001).

Los resultados de este trabajo de investigación sugieren que los aislamientos de México estudiados ofrecen una buena alternativa para su utilización como agentes microbianos para el control biológico de la mosca pinta o salivazo de los pastos. Los aislamientos EH-479/2, EH-470/6 y EH-469/6 se proyectan como los más adecuados para este uso, que tendrán que ser analizados junto con los resultados de su virulencia hacia la plaga y eficiencia en el campo agrícola.

CONCLUSIONES

- El intervalo óptimo de temperatura de los aislamientos estudiados fue de 25 a 30 °C.
- La humedad del arroz adecuada para la producción masiva de conidios fue de 35-40 %.
- El aislamiento que presentó la mayor producción de conidios por gramo de sustrato fue EH-479/2, y en orden decreciente le siguen los aislamientos EH-470/6 y EH-469/6.
- El aislamiento EH-479/2 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* muestra características que lo perfilan como el candidato ideal para ser producido masivamente y aplicarlo en el campo agrícola para combatir a la mosca pinta, a un costo relativamente bajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arthurs, S., Thomas, M. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 59-65.
- Berlanga-Padilla, A., Hernández-Velázquez, V.M. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. a.* var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 51-55.
- Bidochka, M., Khachatourians, G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 26-32.
- Bidochka, M., Kamp, A., Lavender, M., Dekoning, J., De Cross, A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1335-1342.
- Braga, G.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, J., Roberts, D.W. 2001. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus. *Photochemistry and Photobiology* 74: 734-739.
- Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. 2001. Introduction - Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-8.
- Charnley, A., St. Leger, R. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole, T.G., Hoch, C.H. (Eds.). *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, NY.
- Clarkson, J. M., Charnley, A. 1996. New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 5: 197-203.
- Coronado, P.R. 1978. Memoria de la campaña contra la mosca pinta. Dirección General de Sanidad Vegetal. SARH, México D. F.

- Deshpande, M. V. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 25: 229-243.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, NY.
- Dorta, B., Arcas, J. 1998. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 501-505.
- Driver, F., Milner, R., Trueman, J. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104: 134-150.
- Ekési, S., Maniania, N.K., Lux, S.A. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 157-167.
- Frey, S., Magan, N. 2001. Production of the biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 372-377.
- Grimm, C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection* 20: 623-630.
- Hallsworth, J., Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 261-266.
- Hernández-Velázquez, V., Berlanga, A. Barrientos, L. 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium flavoviride* to control the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae)). *Journal of Orthoptera Research* 9: 223-227.
- Hernández Velázquez, V. 2001. Formulación y aplicación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Walker) para el control de *Schistocerca piceifrons* en México. En: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* WALKER. 2-5 octubre 2001, Mérida, Yucatán, México. pp. 63-67.

- Inglis, G., Johnson, D., Goettel, M. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycoses (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symphodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology* 26: 400-409.
- Inglis, G., Duke, G., Kawchuk, L., Goettel, M. 1999. Influence of oscillation temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beuaveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biological Control* 14: 111-129.
- Jaccoud, D.B., Hughes, W.O., Jackson, C.W. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nest of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 51-61.
- Jenkins, N.E., Prior, C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid media. *Mycological Research* 97: 1489-1494.
- Jenkins, N.E., Heviefio, G., Langewald, J., Cherry, A.J., Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19: 21N-31N.
- Kaaya, G., Munyinyi, D. 1995. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse flies (*Glossina* ssp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 237-241.
- Kanga, L.H., James, R.R., Boucias, D.G. 2002. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Verroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 175-184.
- Li, D.P., Holdom, D.G. 1995. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 253-260.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46: 667-702.
- Magalhães, B. P., Postali, J.R., Silva, A.B. 1987. Técnica de criação de *Deois incompleta* em *Brachiria*. *Pesquisas Agropecuarias do Brasil* 22: 137-144.

- Magalhães, B. P., Rodríguez de Faria, M. 2001. O uso de fungos entomopatogenicos no Brasil. *Biotecnología Ciencia y Desenvolvimento* 22: 18-21.
- Magalhães, B., Rodríguez de Faria, M., Tigano, M. 2002. The use of entomopathogenic fungi to control insect pests in Brazil. En: *Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología*. Guzmán, G., Mata, G. (Eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México. p. 160.
- Maniania, N.K., Ekesi, S., Löhr, B., Mwangi, F. 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, M.H., Cázares, O., Ibarra, F. 1985. ¿Cómo ataca la mosca pinta al zacate Buffel?. *Boletín Rancho* 22:1-5.
- Mazodze, R., Zvoutete, P. 1999. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against *Heteronychus licas* (Scarabaeidae: Dynatinae) in sugarcane in Zimbabwe. *Crop Protection* 18: 571-575.
- Milner, R., Staples, J., Lutton, G. 1997. The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 64-69.
- Milner, R.J., Samson, P.R., Bullard, G.K. 2002. FI-1045: a profile of a commercially useful isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 43-58.
- Moore, D., Prior, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information* 14: 31N-40N.
- Montoya-Sansón, E. 2003. Propágulos fúngicos de *Metarhizium anisopliae* de mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) aislados de México, en diferentes medios y condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Cavallazzi-Vargas, G., Berlanga-Padilla, A., Mier, T., Toriello, C. 2001. Cultivos monospóricos de aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de *Aeneolamia* sp. (Homoptera:

- Cercopidae) en México. En: Nevárez, G., Sánchez, G., Muñoz, L. (Eds.). Memorias del XXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico, 9-10 Agosto 2001, Chihuahua, México. pp 201-204.
- Ooijkass, L.P., Tramper, J., Buitelaar, R. 1998. Biomass estimation of *Coniothyrium mimitans* in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 480-486.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137: 37-43.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Quimby, P.C., King, L.R., Grey, W.E. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88: 147-152.
- Quintinela, E.D., McCoy, C.W. 1998. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 220-230.
- Rath, A., Anderson, G., Worledge, D., Koen, T. 1995. The effect of low temperature on the virulence of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) to the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 65: 186-192.
- Rivera-Durán, L.S., Cordova-Ramírez, J., Cortés-Penagos, C.J., Cortés-Penagos, C., Mercado-Camargo, R., Yahuaca-Juaréz, B., Ortiz-Alvarado, R. 2002. Estudio comparativo de algunos granos en la producción de conidias del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* utilizado en agricultura como bioinsecticida. En: Baéz, R., Juvera, J. (eds.). Actas del XXV Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico, 14-15 noviembre 2002, Hermosillo, Sonora, México. pp 119-121.

- Rodríguez-Colorado, S.R. 1999. Saligreen-Ma®, una alternativa biológica en el control de mosca pinta (*Aeneolamia posticata* Wik) en caña de azúcar. Investigación en Caña de Azúcar 1: 25-30.
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Londres.
- SARH, 1976. La mosca pinta o salivazo de los pastos. Dirección General de Sanidad Vegetal, México.
- St. Leger, R., 1993. Biology and mechanisms of invasion of deuteromycete fungal pathogens. Parasites Pathogens Insects 2: 211-229.
- Sun, J., Fuxa, J. R., Henderson, G. 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. Journal of Invertebrate Pathology 81: 78-85.
- Thomas, M.B., Jenkins, N.E. 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegates*. Mycological Research 101: 1469-1474.
- Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Almengor, M., Mier, T. 1999. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como bioinsecticida contra la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala. Revista Mexicana de Micología 15: 119-121.
- Vestergaard, S., Butt, T.M., Bresciani, J., Gillespie, A.T., Eilemberg, J. 1999. Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal on Invertebrate Pathology 73: 25-33.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., De Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., (Eds.). Fungi as Biocontrol Agents. CAB International Publishing, Wallingford, UK. pp. 253-287.
- Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pesticide Science 37: 375-379.
- Zurek, L., Wes Watson, D., Schal, C. 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deutermycota: Hyphomycetes) and boric acid against the

German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biological Control* 23: 296-302.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ANEXO I

 Termotolerancia. Análisis de varianza comparación entre crecimiento a 25 y 30 °C, $\alpha = 0.01$

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EH-172	2	7.829411765	3.914705882	0.045
EH-345	2	7.8	3.9	0.454048443
EH-346	2	8.8	4.4	0.070865052
EH-347	2	8.641176471	4.320588235	0.002093426
EH-350	2	8.364705882	4.182352941	0.06650519
EH-351	2	8.388235294	4.194117647	0.036608997
EH-352	2	7.894117647	3.947058824	0.005605536
EH-465	2	9.258823529	4.629411765	0.000622837
EH-466	2	8.223529412	4.111764706	0.008373702
EH-467	2	9.058823529	4.529411765	0.027681661
EH-468	2	9	4.5	0.043252595
EH-469	2	8.388235294	4.194117647	0.050449827
EH-470	2	8.417647059	4.208823529	0.082370242
EH-471	2	8.235294118	4.117647059	0.027681661
EH-472	2	6.9	3.45	0.63115917
EH-473	2	7.1	3.55	0.026314879
EH-474	2	8.388235294	4.194117647	0.02
EH-475	2	8.741176471	4.370588235	0.011695502
EH-476	2	8.141176471	4.070588235	0.000276817
EH-477	2	8.976470588	4.488235294	0.050449827
EH-478	2	8.817647059	4.408823529	0.006245675
EH-479	2	8.558823529	4.279411765	0.003892734
EH-480	2	8.282352941	4.141176471	0.027681661
EH-481	2	8.8	4.4	0.03349481
EH-482	2	9.129411765	4.564705882	0.002491349

25 °C	25	105.1529412	4.206117647	0.163184775
30 °C	25	104.9823529	4.199294118	0.078077624

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	4.056017993	24	0.16900075	2.338733633	0.021173627	2.659078291
Columnas	0.000582007	1	0.000582007	0.00805416	0.929234637	7.82290499
Error	1.734279585	24	0.072261649			
Total	5.790879585	49				

Anexo II

Análisis de varianza comparación entre el crecimiento a 25 y 35 °C. $\alpha = 0.01$

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EH-172	2	4.123529412	2.061764706	8.023546713
EH-345	2	4.464705882	2.232352941	9.194480969
EH-346	2	5.270588235	2.635294118	7.627958478
EH-347	2	5.076470588	2.538235294	6.586314879
EH-350	2	5.782352941	2.891176471	4.342577855
EH-351	2	4.364705882	2.182352941	9.219723183
EH-352	2	4.782352941	2.391176471	4.51766436
EH-465	2	6.552941176	3.276470588	3.566020761
EH-466	2	4.988235294	2.494117647	4.823252595
EH-467	2	5.617647059	2.808823529	6.758217993
EH-468	2	7.005882353	3.502941176	2.618010381
EH-469	2	5.658823529	2.829411765	2.908304498
EH-470	2	5.417647059	2.708823529	3.364723183
EH-471	2	5.735294118	2.867647059	2.564446367
EH-472	2	4.458823529	2.229411765	0.868096886
EH-473	2	5.117647059	2.558823529	1.536401384
EH-474	2	6.164705882	3.082352941	2.04733564
EH-475	2	6.470588235	3.235294118	2.936747405
EH-476	2	5.523529412	2.761764706	3.487906574
EH-477	2	4.864705882	2.432352941	9.809844291
EH-478	2	5.535294118	2.767647059	5.760017301
EH-479	2	6.252941176	3.126470588	2.458979239
EH-480	2	5.076470588	2.538235294	4.412197232
EH-481	2	5.170588235	2.585294118	5.680432526
EH-482	2	6.270588235	3.135294118	4.290726644

25 °C	25	105.1529412	4.206117647	0.163184775
35 °C	25	30.59411765	1.223764706	0.45377301

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	6.583422837	24	0.274309285	0.800555918	0.704950644	2.659078291
Columnas	111.1803633	1	111.1803633	324.4735148	1.89704E-15	7.82290499
Error	8.223564014	24	0.342648501			
Total	125.9873502	49				

Anexo III

Análisis de varianza 30 y 35 °C $\alpha = 0.01$

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EH-172	2	3.82352941	1.91176471	6.86678201
EH-345	2	3.51176471	1.75588235	5.56209343
EH-346	2	4.89411765	2.44705882	6.2283737
EH-347	2	5.01176471	2.50588235	6.35356401
EH-350	2	5.41764706	2.70882353	3.33427336
EH-351	2	4.09411765	2.04705882	8.09439446
EH-352	2	4.88823529	2.44411765	4.84153979
EH-465	2	6.58823529	3.29411765	3.66089965
EH-466	2	5.11764706	2.55882353	5.23356401
EH-467	2	5.38235294	2.69117647	5.92084775
EH-468	2	6.71176471	3.35588235	1.9882526
EH-469	2	5.97647059	2.98823529	3.72484429
EH-470	2	5.82352941	2.91176471	4.5
EH-471	2	5.97058824	2.98529412	3.125
EH-472	2	5.58235294	2.79117647	2.97967128
EH-473	2	5.34705882	2.67352941	1.96486159
EH-474	2	6.36470588	3.18235294	2.47204152
EH-475	2	6.31764706	3.15882353	2.57778547
EH-476	2	5.5	2.75	3.42603806
EH-477	2	4.54705882	2.27352941	8.4533045
EH-478	2	5.42352941	2.71176471	5.38692042
EH-479	2	6.34117647	3.17058824	2.65854671
EH-480	2	5.31176471	2.65588235	5.13884083
EH-481	2	5.42941176	2.71470588	6.58631488
EH-482	2	6.2	3.1	4.08643599

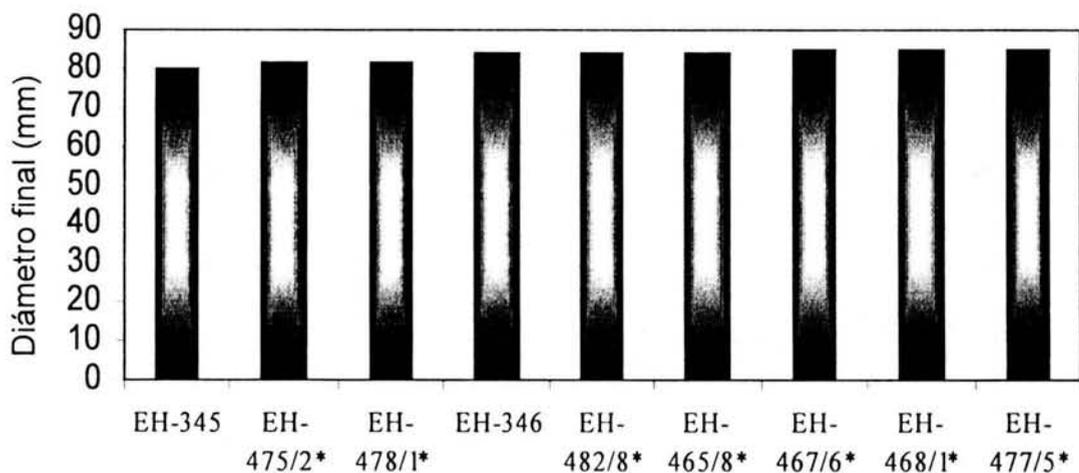
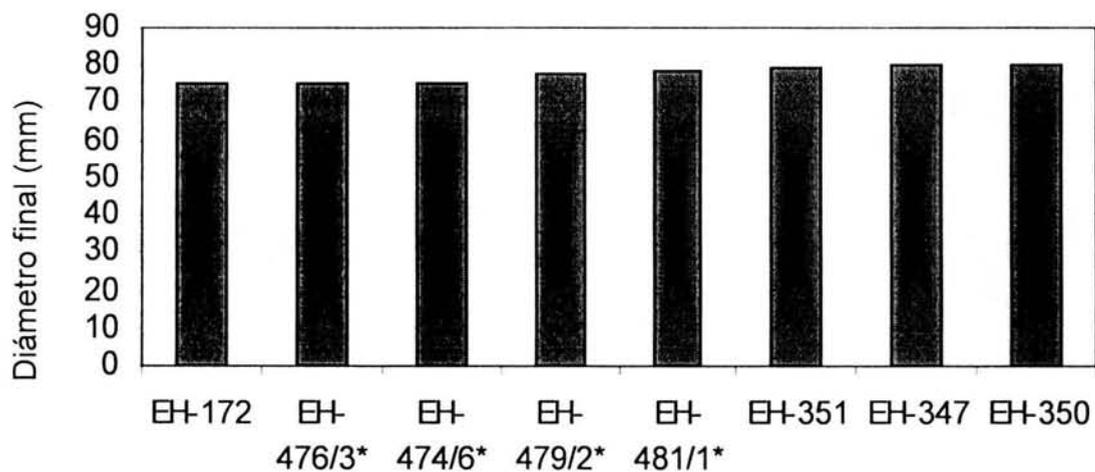
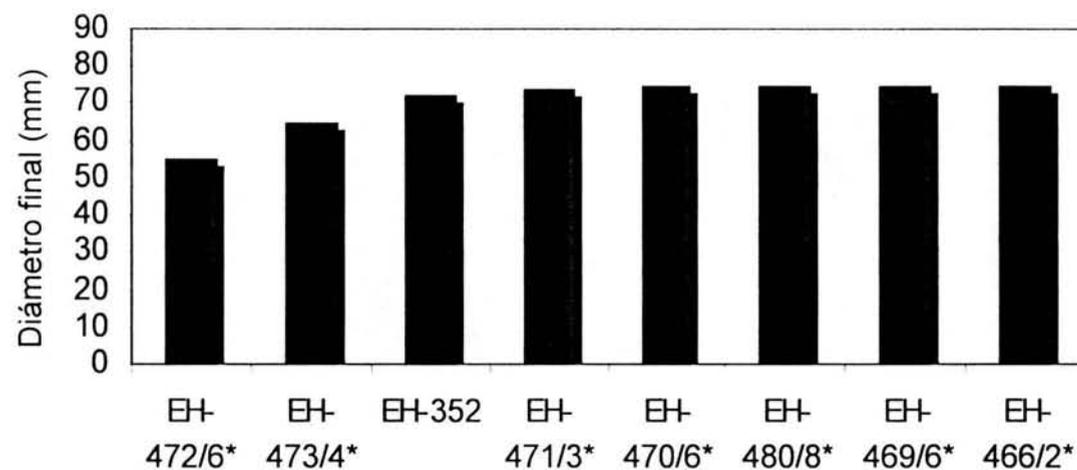
30 °C	25	104.982353	4.19929412	0.07807762
35 °C	25	30.5941176	1.22376471	0.45377301

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	8.27141592	24	0.34464233	1.84095642	0.07101471	2.65907829
Columnas	110.672191	1	110.672191	591.171376	2.0411E-18	7.82290499
Error	4.49299931	24	0.1872083			
Total	123.436606	49				

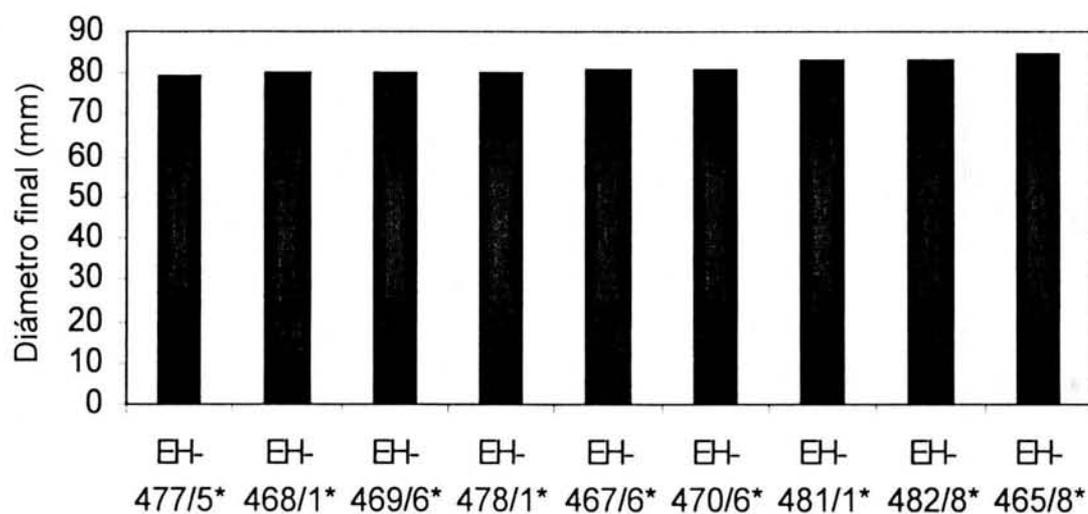
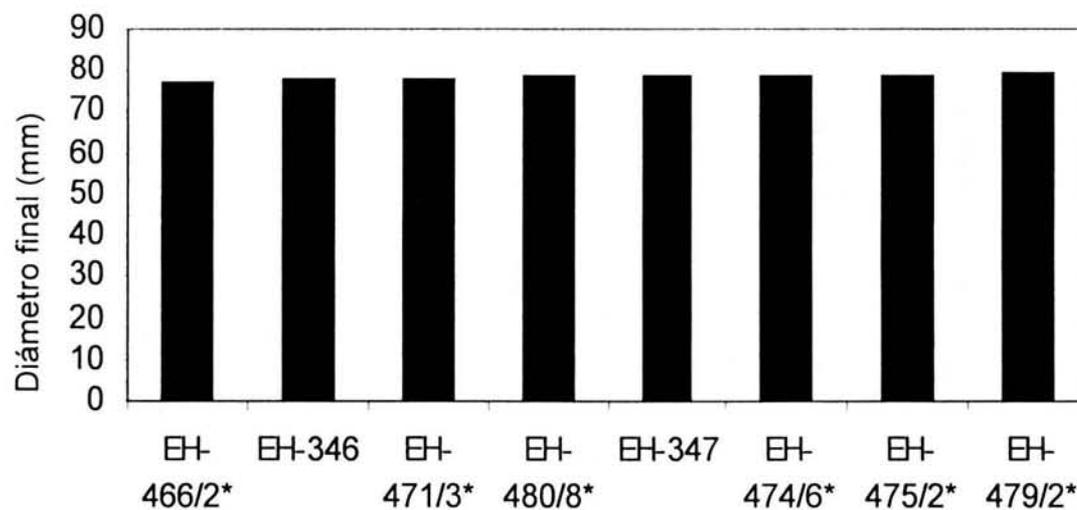
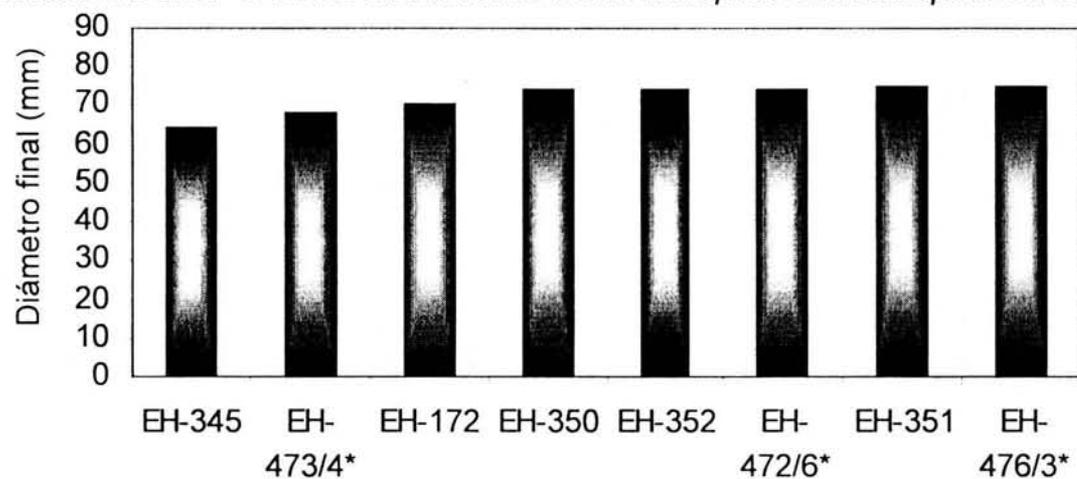
ANEXO IV

Crecimiento a 25 °C de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio



ANEXO V

Crecimiento a 30 °C de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio



ANEXO VI

Crecimiento a 35 °C de los aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio

