



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Transición de micelio a blastospora del entomopatógeno  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* *in vitro*, e *in vivo* en el  
modelo de langosta, y su implicación en la virulencia del hongo

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA PATRICIA JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MEXICO, D.F.

MARZO DE 2006



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.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Micología básica ubicado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera.

Durante la realización de esta tesis, la alumna contó con el apoyo económico brindado por el CONACYT derivado del megaproyecto de investigación “Caracterización genotípica y fenotípica de hongos entomopatógenos: Instrumentos para optimizar su selección como insecticidas biológicos contra plagas agrícolas”, Clave G-31451-B.

## *Agradecimientos*

A la Dra. Conchita Toriello por el apoyo, la comprensión pero sobre todo por sus enseñanzas durante estos años.

A los miembros de mi comité tutorial por su tiempo y atinadas sugerencias en este trabajo. Sobre todo por compartir su conocimiento.

Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dra. María Lucia Taylor da Cunha e Mello

Dra. Margarita Hermelinda Villegas Ríos

Al Dr. Armando Pérez por su experiencia y ayuda incondicional en toda la parte de microscopia, pero más aun por su paciencia.

A la M en C Hortensia Navarro Barranco y a la QFB Amelia Pérez Mejía por todo el apoyo, confianza, ayuda, paciencia....., pero sobre todo por darme la fortuna de su amistad.

## *Dedicatorias*

A mi abuelo por estar siempre cerca de mi, por todas sus enseñanzas y por ayudarme a ser lo que soy. Te quiero mucho.

A mi tía Bety por ser mi apoyo incondicional, pero sobre todo por su amor. Gracias.

A mis hermanos Miguel A. Gutiérrez, Guadalupe Rodríguez y Jorge A. Gutiérrez por caminar siempre junto a mi y darme su apoyo y amor incondicional.

A mi Mamá Maga, a mi tía bomba, a mi tía Licha y a mi tía Rosy porque juntas han hecho de mi lo que soy. Muchas gracias las quiero mucho.

A mi tío Manuel por enseñarme tanto y por su amor.

A Erick Daniel Villamil Ramírez por estar junto a mi siempre y llenar mi vida con su amor. Gracias amorso por tu apoyo, confianza, lealtad, alegría, paciencia.....

A mi tía San y mis primos Manolo, Diana y Susa por apoyarme y confiar en mi. A Gerardo por alegrar mi vida.

A la familia Gutiérrez-Medina por estar cerca de mi. En especial a Martha y a Rosy por compartir tantas cosas en tantos años.

## *Dedicatorias*

A Víctor Manuel por dar alegría a mi vida y recordarme que la vida se disfruta minuto a minuto.

A Víctor Manuel Farías G. y a José Graciano Sarazua por haber llegado a mi familia y ahora ser parte de ella.

A Elena Montoya S. por ser ese gran ser humano, pero sobre todo por ser mi mejor amiga.

A David Basilio por todo su apoyo y su gran amistad.

A Susy y a Víctor por su amistad y esos ratos inolvidables.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES DEL DIMORFISMO FÚNGICO EN ENTOMOPATÓGENOS	6
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVO GENERAL	10
6. OBJETIVOS PARTICULARES	10
7. MATERIALES Y MÉTODOS	11
7.1. MATERIAL FÚNGICO	11
7.2. CULTIVO DE CONIDIOS Y BLASTOSPORAS PARA LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y DE TRANSMISIÓN (MET)	12
7.2.1. Obtención de conidios	12
7.2.2. Obtención de blastosporas	12
7.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y DE TRANSMISIÓN (MET)	12
7.4. MONITORIZACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> A 37°C	13
7.4.1. Dispositivos probados para la monitorización de los cambios morfológicos	13
7.4.2. Videograbación de los cambios morfológicos de <i>M. a. var. acridum</i>	14
7.5. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> A 37°C EN AISLADOS DE <i>M. a. var. acridum</i> CON DIFERENTE VIRULENCIA	14
7.5.1. Selección del campo de observación y monitorización de los cambios morfológicos <i>in vitro</i>	14
7.5.2. Sincronización del cultivo	15

7.5.3. Cuantificación de las células fúngicas	16
7.6. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LA LANGOSTA <i>S. piceifrons</i>	16
7.6.1. Inoculación	16
7.6.2. Fijación	18
7.6.3. Tinciones utilizadas en la monitorización de los cambios morfológicos en <i>S. piceifrons</i>	19
7.6.4. Observación y monitorización de los cambios morfológicos del hongo en los insectos infectados ( <i>S. piceifrons</i> )	19
8. RESULTADOS	20
8.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) DE CONIDIOS OBTENIDOS A 28°C	20
8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) DE BLASTOSPORAS OBTENIDAS A 37°C	21
8.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE LA FASE MICELIAL (CONIDIOS, MICELIO)	23
8.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) Y FOTÓNICA DE BLASTOSPORAS OBTENIDAS A 37°C	26
8.5. MONITORIZACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> A 37°C	29
8.5.1. Dispositivo para la monitorización de los cambios morfológicos <i>in vitro</i> a 37°C	29
8.5.2. Cinética de los cambios morfológicos en aislados de <i>M. a. var. acridum</i> con diferente virulencia a 37°C	30
8.5.2.1. Aislado EH-502/8 de mayor virulencia	31
8.5.2.2. Aislado EH-488/7 de menor virulencia	31
8.6. SINCRONIZACIÓN DEL CULTIVO	35
8.7. CUANTIFICACIÓN DE PROPÁGULOS FÚNGICOS	35
8.7.1. Aislado de mayor virulencia EH-502/8	36
8.7.2. Aislado de menor virulencia EH-488/7	36

8.8. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE <i>S. piceifrons</i>	37
8.8.1. Monitorización de los cambios morfológicos en la langosta <i>S. piceifrons</i> con microscopía fotónica	38
8.8.2. Monitorización de los cambios morfológicos en la langosta <i>S. piceifrons</i> con MEB	39
9. DISCUSIÓN	43
10. CONCLUSIONES	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51
12. ÍNDICE DE TABLAS	57
13. ÍNDICE DE FIGURAS	58

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de plaguicidas químicos provoca efectos negativos en el ambiente y en la salud humana. Además, contribuye al aumento de plagas porque crea resistencia en éstas, y destruye a sus enemigos naturales. Para reducir estos efectos se han implementado sistemas agrícolas sustentables, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos presentes en el campo. Una alternativa al uso de plaguicidas químicos es el control biológico, en el que se emplean hongos entomopatógenos como agentes microbianos contra insectos plaga (Monzón, 2001). Los más usados son: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *M. flavoviride* Gams & Rosypal, *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams, y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, entre otros (Bateman, 1997; Milner, 1997; Bidochka *et al.*, 1987).

Dentro del control biológico el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (*M. a.* var. *acridum*) (= *M. flavoviride*) es de los más eficientes como agente microbiano para el control de insectos acrídidos, como chapulines y langostas (Orthoptera: Acrididae) (Prior *et al.*, 1992; Hernández-Velázquez *et al.*, 1997). Arthurs *et al.* (2003) han mostrado que este hongo acaba en poco tiempo con estos insectos, disminuye su reproducción, su movilidad, el consumo de alimento y, en el campo, es reutilizado. Actualmente se emplea *M. a.* var. *acridum* como micoinsecticidas registrados, la cepa IMI-330189 “Green Muscle”®, en África, y la cepa FI-985 “Green Guard”®, en Australia (Butt *et al.*, 2001).

En México se ha trabajado en los últimos diez años en la búsqueda de entomopatógenos potencialmente útiles para el control biológico de acrídidos (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997; Hernández-Velázquez & Berlanga, 1998; Barrientos & Milner, 2001). La colección de entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) cuenta con 35 aislados de *Metarhizium* spp. que han mostrado alta virulencia hacia langosta y saltamontes (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997; Hernández-Velázquez, 2001).

*Metarhizium a.* var. *acridum* es un hongo mitospórico (no se le conoce forma sexual), con conidios elipsoidales de 7-9 X 4.5–5.5 µm, enteroblásticos y

producidos en sucesión basípeta, dispuestos en columnas que se forman por la agrupación de conidióforos en forma de candelabro (Fig. 1). En medio de cultivo sólido presenta colonias de color amarillo o verde olivo (Samson *et al.*, 1988), pulverulentas, con micelio aterciopelado formando conidios a partir de células especializadas llamadas fiálides, mientras que en cultivo sumergido forma micelio agrupado en pelotillas (“pellets”), que consisten en una colonia esférica desarrollada en un cultivo líquido, particularmente en un cultivo con agitación (Ulloa y Hanlin, 2000), y/o células aisladas (Fargues *et al.*, 2001).

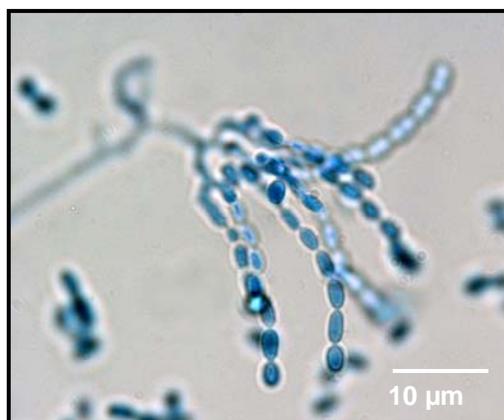


Fig. 1. Conidióforo de *M. a. var. acridum* en forma de candelabro con conidios organizados en cadenas.

Los hongos entomopatógenos varían considerablemente en su modo de acción, virulencia y especificidad hacia el hospedero (Clarkson & Charnley, 1996; Askary *et al.*, 1999). Los eventos que generalmente constituyen el proceso de infección por estos hongos son: a) adhesión del conidio a la cutícula del insecto; b) germinación del conidio y la producción de tubos germinales y ramificaciones hifales que colonizan la superficie de la cutícula; c) formación del apresorio, un hinchamiento aplanado que se origina del tubo de germinación del conidio, que le permite adherirse a la superficie cuticular del hospedero antes de penetrarlo con la clavija de infección; d) penetración de tubos germinales que involucra presión mecánica y producción de enzimas que degradan la cutícula la epicutícula, después las estructuras infectivas se expanden lateralmente en las capas externas de la procutícula y forman placas de penetración que se distribuyen vertical o

lateralmente; e) invasión masiva de la hemolinfa y otros tejidos internos, asimilación de nutrientes y acumulación de lípidos; el micelio se ramifica en el hemocele y forma propágulos fúngicos, como cuerpos hifales, hifas y/o blastosporas; f) salida del hongo del hospedero con producción de conidióforos (Fig. 2). El período de infección descrito es aproximadamente de 6-7 días (Charnley & St. Leger, 1989; Askary *et al.*, 1999).

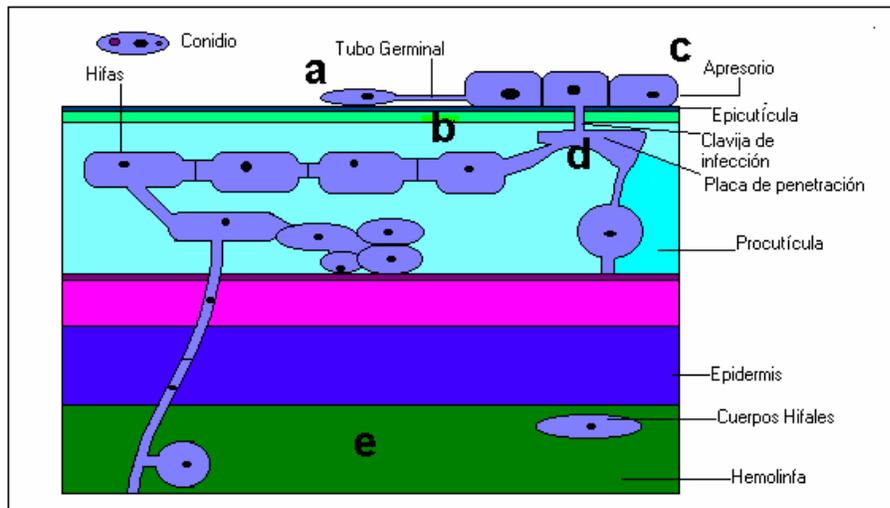


Fig. 2. Proceso infeccioso por hongos entomopatógenos (modificado de Charnley & St. Leger, 1989).

Las diferentes morfologías que ocurren en el proceso de infección son elementos importantes en la elaboración de un micoplaguicida ya que los conidios con su ingrediente activo, y las blastosporas se han reportado como una buena opción también, porque se producen en mayor número y en menor tiempo que los conidios aéreos (Bidochka *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 2003).

Entre los investigadores de hongos entomopatógenos, el término blastospora se aplica comúnmente a cuerpos hifales, producidos en el hemocele del insecto, o en cultivo sumergido, por un proceso de gemación hifal, excluyendo la formación de fialoconidios. En taxonomía fúngica el término blastospora describe todo tipo de propágulo generado de un desarrollo blástico, el cual no excluye las fialosporas enteroblásticas (Ulloa y Hanlin, 2000; Fargues *et al.*, 2001).

Esta multiplicidad de formas encontradas en los hongos es una de sus características plásticas que puede estar asociada a su patogenicidad (Borges-Walmsley *et al.*, 2000). En hongos patógenos se pueden encontrar formas miceliales en la naturaleza, formas levaduriformes y mezclas de formas en el hospedero y viceversa (Szanislo, 1985). A los hongos que presentan esta diferenciación morfológica se les denomina dimórficos. En algunos hongos esta habilidad para cambiar de forma se considera necesaria para la virulencia (Borges-Walmsley *et al.*, 2000). Por ejemplo en el hongo entomopatógeno, *Nomuraea rileyi*, la baja virulencia se ha correlacionado con la ausencia de la fase levaduriforme (Alves *et al.*, 2002).

Existen hongos que presentan fase micelial en su forma saprobia, y de levadura o blastospora en su forma parasítica o viceversa, como el caso de algunos patógenos del hombre, como *Histoplasma capsulatum* que exhibe crecimiento por gemación dentro del tejido infectado y presenta micelio en el ambiente externo (Keath *et al.*, 1989). El fenómeno de dimorfismo, según Madani & Fink *et al.* (1998), es la capacidad de algunos hongos de presentar diferentes morfologías dependiendo de las condiciones ambientales. Se ha observado en diferentes hongos, como algunos patógenos del hombre (*Candida albicans*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides brasiliensis*), patógenos de plantas (*Ustilago maydis*, *Magnaporthe grisea* y *Cryphonectria parasitica*), patógenos de insectos (*B. bassiana*), y en algunos hongos filamentosos (*Aspergillus nidulans*, *Mucor rouxii* y *Neurospora crassa*) (Vanden Bossche *et al.*, 1993; Lengeler *et al.*, 2000).

El significado de la diferenciación morfológica varía considerablemente en las distintas enfermedades fúngicas. La variedad de morfologías en los hongos les confieren ventajas en diferentes estados y sitios de la infección. Sin embargo, esta variedad de formas es solamente una parte del mecanismo de patogenicidad de los hongos patógenos. Para conocer la implicación de la morfología en la patogenicidad es necesario evaluarla como un todo y en cada una de las etapas de la infección (Gow *et al.*, 2002).

Estudios actuales están mostrando una red compleja de regulación para el control de esta transición morfológica. Diferentes vías de señales y factores de transcripción parecen converger hacia la regulación de esta transición. Varios de los genes conocidos, algunos específicos de fase, tanto micelial como levaduriforme, están implicados en la virulencia fúngica. Por ejemplo, la levadura de *H. capsulatum* que es la forma virulenta del hongo, expresa diversos genes asociados a la virulencia (Keath *et al.*, 1989). En patógenos de plantas también se ha observado que el dimorfismo es una transición generalmente necesaria para llevar a cabo la invasión del hospedero (Borges- Walmsley *et al.*, 2000; Lengeler *et al.*, 2000). Esto sugiere que las vías de señales que regulan el dimorfismo son relevantes en la patogénesis del hongo (Liu, 2001).

Las diferentes morfologías fúngicas dependen de las condiciones en que se encuentran los hongos, y son altamente variables (Madhani *et al.*, 1998; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002). Entre las más importantes se encuentran el pH, la temperatura y la presencia de componentes específicos –fuentes de nitrógeno y carbono- en el medio de cultivo (Szaniszlo, 1985) o en el propio hospedero. El conocimiento de dichas condiciones de cultivo hace posible la regulación de la morfología fúngica, que en hongos filamentosos puede mejorar las propiedades de crecimiento e incrementar los niveles de biomasa para la producción industrial (Lübbehüsen *et al.*, 2004).

En hongos entomopatógenos la transición dimórfica ha sido muy poco estudiada. Como consecuencia, actualmente se cuenta con pocos datos sobre el tema. En trabajos como el de Vidal *et al.* (1998), se menciona que los hongos entomopatógenos crecidos en cultivo sumergido forman células por separación esquizolítica en los septos, por fragmentación mecánica de las hifas o por gemación hifal. Además, *M. a. var. flavoviride* (ahora *acridum*), produce propágulos oblongos levaduriformes y otros parecidos a conidios aéreos (Fargues *et al.*, 2001). En medio de cultivo líquido *P. fumosoroseus* muestra una alta producción de blastosporas (Jackson *et al.*, 1997), originadas de la parte apical o de las ramificaciones de las hifas (Vidal *et al.*, 1998). En lo que respecta al medio de cultivo sólido, Kleespies & Zimmermann (1992) mencionan que los hongos

## RESUMEN

Los insecticidas químicos aplicados para combatir plagas agrícolas, como la langosta (*Schistocerca piceifrons ssp. piceifrons*), causan daño al hombre y al ecosistema. Por ello, en México se plantea la necesidad de buscar alternativas más seguras, como el control biológico. Dentro de estas alternativas se encuentra el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (*M. a.* var. *acridum*), como agente microbiano contra la langosta. El proceso de infección por este hongo en el insecto ha sido poco estudiado, a pesar de que es parte fundamental en la virulencia que manifiesta el organismo hacia el insecto-plaga. De ahí la relevancia de los estudios biológicos básicos sobre este tema. El objetivo de este estudio fue la caracterización de los propágulos que presenta este microorganismo, tanto *in vitro* como *in vivo*, y su implicación en la virulencia. Para llevar a cabo el seguimiento de la transición de *M. a.* var. *acridum*, se monitorizaron tres aislados seleccionados de acuerdo a su alta, media y baja virulencia. La morfología *in vitro* se estudió en los propágulos obtenidos en agar de papa y dextrosa (APD), adicionado con glicerol al 14%, incubados a 28 y 37 °C, e *in vivo*, infectando langostas. La monitorización se llevó a cabo con microscopía fotónica, en un microscopio Olympus BX 50 12 ,y, hasta completar 120 h de incubación, cada 24 h se cuantificaron los diferentes propágulos encontrados. También se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET); para esto, la fijación se hizo con glutaraldehído al 3% y paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.2), la posfijación con tetróxido de osmio al 1%, y las observaciones con un microscopio DSM 950 y EM10, respectivamente. En el caso de la MET, la inclusión fue en araldita convencional y de manera gradual, los cortes semifinos (1 µm) con cuchilla de vidrio y los finos (100 nm) con cuchilla de diamante. Para una mayor comprensión del fenómeno, se utilizaron técnicas de tinción como las de hematoxilina-eosina (HE) y PAS. Los resultados revelaron estructuras similares, tanto *in vitro* como *in vivo*: conidios, conidios hinchados, conidios con un tubo germinal corto, conidios con tubos germinales bipolares, conidios con tubos germinales largos, blastosporas que surgen lateralmente en el septo de la hifa, seudohifas, conidios sumergidos que surgen en la parte apical de las hifas ,y, pasadas 85 h de incubación o de infección, conidióforos. Por primera vez se describen las seudohifas en la infección de langosta ,e, *in vitro*, los apresorios en la infección de la langosta. Estas estructuras se describen a 37 °C. Con las distintas técnicas de microscopía siempre se observó que el aislado EH-502/8 (de mayor virulencia) fue el de mayor rapidez en la transición de conidio a blastospora, al compararlo con el aislado EH-488/7 (de menor virulencia). El aislado más virulento produjo el mayor número de blastosporas, mientras que el de menor virulencia presentó el mayor número de conidios y cuerpos hifales.

## 2. ANTECEDENTES DEL DIMORFISMO FÚNGICO EN ENTOMOPATÓGENOS

La transición dimórfica en algunos hongos patógenos del hombre ha sido ampliamente estudiada. Como un ejemplo, *C. albicans* exhibe varias formas de crecimiento, que van de levaduras unicelulares gemantes a verdaderas hifas. Entre estos extremos el hongo puede desplegar una variedad de morfologías incluyendo pseudohifas (Sudbery *et al.*, 2004). Esta diferenciación celular puede ocurrir con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, pH, temperatura y luz, entre otros. En *C. albicans* el pH del medio de cultivo induce levaduras en un ambiente ácido, e hifas cuando el pH tiende a ser neutro (Calderone *et al.*; 1994, Szabo & Stofaníková, 2002).

Poco se conoce acerca de los factores morfogenéticos que regulan el dimorfismo de los hongos entomopatógenos, especialmente en relación con la fase levaduriforme (“yeast-like”) en *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *L. lecanii* (Pendland *et al.*, 1995). Hasta la fecha, no se conocen con exactitud las diferentes morfologías que presentan estos hongos en diversas condiciones ambientales y parámetros biológicos.

La producción de células levaduriformes o “yeast-like cells” se ha estudiado en *B. bassiana* (Samsinanaková *et al.*, 1981; Humphreys *et al.*, 1989), *P. farinosus* (Holm Gray) Brown & Smith (Inch & Trinci, 1987), *P. fumosoroseus* (Inch *et al.*, 1986), *Hirsutella thompsonii* Fisher, *L. lecanii* (Zimmerm) Zare & W. Gams (Hall, 1981) y *M. anisopliae* (Kleespies & Zimmermann, 1992). *B. bassiana* produce conidios de forma elipsoidal en medio líquido, conidios en sustratos sólidos, y levaduras que varían en tamaño y forma, en cultivo artificial y en insectos (Lima & Tigano, 1989). Según Bidochka *et al.* (1987), este hongo requiere de una fuente de carbono para iniciar su germinación, y de nitrógeno para el crecimiento exitoso del micelio.

Algunos entomopatógenos producen blastosporas por gemación de las hifas, y pueden ser levaduriformes o formar estructuras elongadas. Este es el caso de *P. fumosoroseus* y *P. farinosus*, que producen altas concentraciones de blastosporas en cultivo líquido sumergido (Inch *et al.*, 1986; Inch & Trinci, 1987;

Jackson *et al.*, 2003). En cultivo líquido adicionado de glucosa, *P. fumosoroseus* tiene una mayor producción de blastosporas. Cuando la temperatura es menor a 30°C, produce blastosporas y cuerpos hifales, generalmente por un proceso de gemación hifal, o alternativamente las hifas se ensanchan para formar cadenas de células semejantes a levaduras (Jackson & Cliquet, 1995; Jackson *et al.*, 1997). En el hemocele del insecto, también produce cuerpos hifales o blastosporas (Inch *et al.*, 1986; Altre & Vandenberg, 2001).

Según Kumar *et al.* (1997), en los insectos *Bombyx mori* y *Anticarsia gemmatalis* la multiplicación de cuerpos hifales del hongo *N. rileyi* ocurre por un proceso de gemación y formación de septos.

En *P. fumosoroseus*, aún cuando las blastosporas son usualmente el único tipo de propágulo producido en cultivo sumergido, varios estudios han reportado la formación de conidios a partir de fiálides (Vidal *et al.*, 1998). Tal es el caso de *M. a.* var. *acridum* (antes *M. flavoviride*) crecido en cultivo sumergido; produce blastosporas por gemación hifal, no pigmentadas y de talla irregular (Jenkins & Prior, 1993). Este hongo también produce estructuras ovoides parecidas a conidios aéreos en medio líquido, aunque de menor tamaño; dichos propágulos fueron altamente infecciosos contra la langosta *Schistocerca gregaria* (Fargues *et al.*, 2001).

Todos los anteriores trabajos mencionan indistintamente “blastospora”, “cuerpo hifal”, “yeast-like” o “propágulo fúngico”, lo que propicia una confusión con respecto a la estructura que mencionan. Es hasta el trabajo de Fargues *et al.* (2001) donde por primera vez se pueden observar fotografías de las estructuras denominadas blastosporas, en hongos entomopatógenos. El término blastospora ha sido ampliamente usado en la literatura, para referirse a células resultantes de la gemación hifal; otros autores consideran que el término es idéntico a célula hifal corta, llamada “cuerpo hifal” por su manera de formación (Fargues *et al.*, 2001).

En estudios en nuestro laboratorio se determinaron las condiciones óptimas de producción de blastosporas en 16 aislados de la langosta (*Schistocerca piceifrons* ssp *piceifrons*). Se encontró que su producción es diferente, en cuanto a la forma, el número y el tiempo en que se producen (Jiménez-Gutiérrez, 2003). El

aislado que mostró la mayor producción presentó también la mayor virulencia hacia la langosta, previamente determinada, por el tiempo letal medio TLM de 5.5 días (Cano-Ramírez *et al.*, 2002). En estos trabajos, además se advirtió que dichas estructuras de *M. a. var. acridum* también se inducían a una temperatura de 37°C. El pH no fue un factor significativo en esta transición dimórfica (Jiménez-Gutiérrez, 2003). En este trabajo en medios de cultivo líquido o sólido a 28°C, la transición se llevó a cabo, comenzando por el conidio que germinó y de los septos y de la parte apical de las hifas, emergieron blastosporas; al final de ensayo se observaron conidios pigmentados de menor tamaño que las blastosporas. En medio líquido a 37°C los cambios morfológicos fueron los mismos pero siempre con una producción menor de micelio.

Los estados de desarrollo del hongo durante la infección permiten el seguimiento de este proceso. Conocer detalladamente la transición dimórfica de los hongos entomopatógenos y sus mecanismos de patogenicidad es de gran relevancia, no sólo en el estudio biológico básico del hongo, sino además de su probable implicación en la producción en masa, para el desarrollo de un micoinsecticida más eficiente en el control de la langosta (Gillespie *et al.*, 2000).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La eficacia del control de plagas mediante hongos entomopatógenos depende, entre muchos factores, del resultado del contacto entre la plaga y el hongo. Por ello los estudios en los mecanismos de patogénesis fúngica pueden sugerir tácticas para el desarrollo de un micoplaguicida más eficiente contra la plaga. Para lograr un mejor entendimiento de estas interacciones, es necesario conocer la transición dimórfica de estos microorganismos en el insecto-plaga. Conociendo la relevancia de este fenómeno en hongos patógenos del hombre y de plantas, se plantea el estudio de la transición morfológica del hongo entomopatógeno *M. a. var. acridum in vitro* y en el insecto-plaga.

#### 4. HIPÓTESIS

El aislado más virulento de *M. a. var. acridum* contra la langosta *S. piceifrons* mostrará una mayor rapidez en su transición morfológica.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Investigar si los cambios morfológicos en *M. a. var. acridum* son un factor determinante en la virulencia del hongo hacia la langosta.

#### 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Realizar microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET) de conidios y blastosporas de los aislados de *M. a. var. acridum* con diferente virulencia.
- ❖ Desarrollar la cinética de los cambios morfológicos de *M. a. var. acridum in vitro* en medio sólido a 37 °C, durante 120 h, monitorizada con una cámara fotográfica digital Olympus DP11.
- ❖ Realizar la cinética de los cambios morfológicos de *M. a. var. acridum* en la infección de la langosta (*S. piceifrons*), monitorizada por MEB y MET durante 7 días.
- ❖ Comparar la rapidez en la transición morfológica de *M. a. var. acridum, in vitro* y en la infección experimental, con el grado de virulencia (TLM) de los aislados seleccionados.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. MATERIAL FÚNGICO

Los aislados de *M. a. var. acridum* utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), de Tecomán, Colima. Dichos aislados fueron seleccionados de acuerdo con el grado de virulencia en la langosta (Cano *et al.*, 2001) *Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons* (= *S. piceifrons*), previamente determinado por el tiempo letal medio (TLM) (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados de *M. a. var. acridum* con datos de origen y TLM en la langosta

Clave UNAM *	Clave CNRCB	Cultivo	Origen	TLM (días) en langosta* *
EH-502/8	MaPL40	-----	Isla Socorro	5.57
	MaPL31	Pastos	Colima	8.14
EH-488/7	MaPL15	Pastos	Colima	12.18

\*Cultivo monospórico seleccionado de aislados de *S. piceifrons*.

\*\*Tiempo letal medio calculado en adultos de langosta (Cano-Ramírez *et al.*, 2003).

\*\*\*Aislado que únicamente se utilizó en los ensayos preliminares.

Todos los experimentos se hicieron con cultivos monospóricos (Cano *et al.*, 2001) derivados de los aislados seleccionados. Éstos son conservados en agua destilada y aceite mineral a 4°C, y en nitrógeno líquido a -196°C en presencia de glicerina al 10%, en la Colección de Cultivos del Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Para llevar a cabo los experimentos, los aislados se mantuvieron en agar papa dextrosa (APD; agar 1.5%, papa 30%, dextrosa 2%).

## **7.2. CULTIVO DE CONIDIOS Y BLASTOSPORAS PARA LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y DE TRANSMISIÓN (MET)**

### **7.2.1. Obtención de conidios**

Para las técnicas de microscopía de MEB y de MET; los conidios de *M. a. var. acridum* se obtuvieron a partir de cultivos de APD a 28°C; de 9 días, agregando al medio de cultivo glicerol al 14%, para una mejor conservación de la pared celular (Montoya-Sansón, 2003). Con la finalidad de obtener los conidios en menor tiempo, se realizó la siembra en cajas de Petri, asperjando con un aerógrafo (Badger, USA) una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml. Transcurridos 6 días, los conidios se removieron de las cajas de agar agregando 2 ml de Tween 80 estéril al 0.5%, raspando con un asa micológica hasta obtener una suspensión. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min y se obtuvo el paquete de conidios para la MEB y MET.

### **7.2.2. Obtención de blastosporas**

Las blastosporas producidas por gemación de *M. a. var. acridum* se obtuvieron de cajas de APD adicionadas con glicerol al 14%, después de 96 h de incubación a 37°C. Las blastosporas se removieron de las cajas de agar agregando 2 ml de Tween 80 estéril al 0.5%, raspando con un asa micológica hasta obtener una suspensión. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min y se obtuvo el paquete de blastosporas para la MEB y MET.

## **7.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y DE TRANSMISIÓN (MET)**

La metodología que se describe a continuación, se modificó de Kassa *et al.*, (2004).

**Fijación:** Se utilizó glutaraldehído al 3%, paraformaldehído al 2%, tritón X-100 al 1.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.2), durante 48 h a 4 °C.

Posteriormente, se utilizó glutaraldehído al 3% en el mismo amortiguador, durante 3 h a 4°C.

**Posfijación:** Se realizó con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.2), durante 3 o 4 días a 4°C. Entre fijación y posfijación se hicieron lavados con el mismo amortiguador, 3 lavados de 5 min cada uno. Posteriormente, los propágulos fúngicos se deshidrataron con diferentes concentraciones de etanol. Más tarde se llevó a cabo la desecación por punto crítico en cámara de CO<sub>2</sub>. En el caso de la MEB, las muestras fueron montadas en cilindros de aluminio con pasta de plata y cubiertas con carbón y oro ionizados.

**Inclusión para MET:** Se llevó a cabo en araldita convencional. Los cortes semifinos (1 µm) se realizaron con cuchilla de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina acuosa al 1%. Los cortes finos (100 nm) se hicieron con cuchilla de diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato acuoso de manera habitual.

Debido a ensayos previos, donde las estructuras fúngicas no alcanzaron la dureza necesaria para ser procesadas, fue necesario prolongar el tiempo de inclusión. Además, la inclusión debió realizarse de manera gradual, iniciando con 20% de resina y 80% de solvente, hasta llegar a una mezcla de resina y solvente (40/60), respectivamente, durante 5 días.

Para las observaciones con MEB se utilizó un microscopio DSM 950 y para la MET un microscopio EM|10.

Para un mejor entendimiento del fenómeno de transición se utilizaron las técnicas que a continuación se describen:

## **7.4. MONITORIZACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS *IN VITRO* A 37°C**

### **7.4.1. Dispositivos probados para la monitorización de los cambios morfológicos**

En los cambios morfológicos a 37°C de los aislados seleccionados, se probaron laminillas con agarosa al 1.5%, portaobjetos excavados con medio de cultivo APD y, finalmente, cajas de Petri con medio APD. En todos los casos la suspensión de conidios que se utilizó fue de 1 X 10<sup>5</sup> conidios/ml y se seleccionó un

solo conidio para su seguimiento. El dispositivo con un solo conidio (laminilla, portaobjetos excavado, caja de Petri) se colocó sobre una platina de calentamiento (Linkam MC60, Inglaterra) a 37°C en el microscopio compuesto Olympus BX 50. Para evitar que el medio de cultivo se secase, a lo largo de las 72 h continuas del ensayo, fue necesario colocar torundas de algodón con agua y glicerol al 14% en cajas de Petri. Después de varios ensayos se encontró que las torundas húmedas y glicerinadas disminuyen la desecación del medio de cultivo, aunque provocó una gran condensación de vapor que propició el empañamiento del objetivo del microscopio, lo que resultó en el continuo desenfoque de las estructuras observadas (aproximadamente cada 7 min.); por esta razón se eliminaron las torundas en los ensayos subsiguientes.

#### **7.4.2. Videograbación de los cambios morfológicos de *M. a. var.***

##### ***acridum***

Debido a que la videograbadora digital utilizada para la monitorización de los cambios morfológicos carece de la función de autoenfoco, se utilizó una cámara fotográfica digital DP11 (Olympus); de esta manera el seguimiento de la transición morfológica de los aislados se realizó tomando fotografías. En el primer ensayo, las fotografías se tomaron cada 3 h hasta completar 72 h de incubación. En el segundo ensayo, cada 5 h hasta completar 85 h de incubación, y finalmente cada 12 h hasta completar 120 h de incubación.

#### **7.5. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS *IN VITRO* A 37°C EN AISLADOS DE *M. a. var. acridum* CON DIFERENTE VIRULENCIA**

##### **7.5.1. Selección del campo de observación y monitorización de los cambios morfológicos *in vitro***

En una caja de APD se dispersó una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidios/ml de los aislados EH-502/8 (alta virulencia) y EH-488/7 (baja virulencia). Al centro de dicha caja se colocó un cubreobjetos marcado con un círculo para delimitar el

campo de observación (Fig. 3 ). La caja se incubó a 37°C y después de 12 h de incubación, con la ayuda de un microscopio Olympus BX50, se eligió un solo conidio dentro del campo visual delimitado por el círculo. Cada 12 h y hasta completar 120 h, el conidio seleccionado fue monitorizado con una cámara fotográfica digital. Las observaciones se hicieron con el objetivo de 40 X. El aislado EH-498/8 (virulencia media) únicamente se utilizó en los ensayos para la selección del campo de observación y monitorización de los cambios morfológicos *in vitro*.

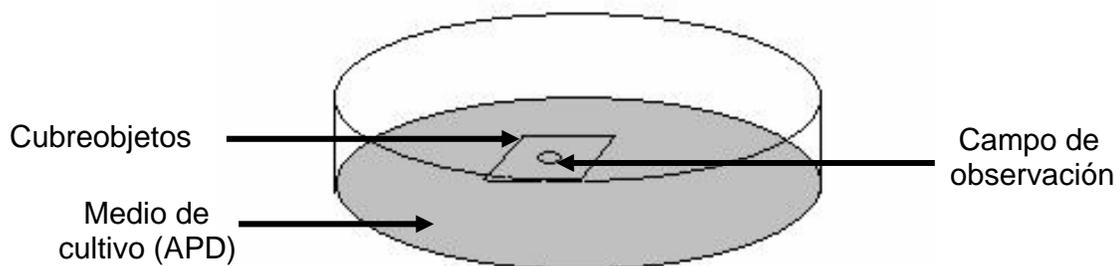


Fig. 3. Caja de Petri con medio de cultivo (APD), que muestra el campo de observación donde se monitorizó el conidio de *M. a. var. acridum*.

### 7.5.2. Sincronización del cultivo

A partir de cultivos de *M. a. var. acridum* incubados por 7 días a 28°C en APD se hizo una suspensión de conidios con Tween 80 estéril al 0.5%. La suspensión se ajustó a  $1 \times 10^8$  conidios/ml. Se sembró 1 ml de esta suspensión en un matraz con 75 ml del medio infusión de papa (IP) y se incubó a 37°C, sin agitación. Transcurridas 120 h de incubación, se tomaron 5 ml del matraz y se sembraron en otro matraz con 75 ml de medio IP, incubando a 37°C sin agitación durante otras 120 h. Este método se siguió hasta completar 360 h, con registros sistemáticos cada 48 h por la observación microscópica de las estructuras pertinentes y toma de fotografías de cada tiempo.

### **7.5.3. Cuantificación de las células fúngicas**

Para cuantificar las células fúngicas de los aislados seleccionados, se dispersó una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/ml en seis cajas de APD y se incubaron a 37°C. Transcurridas 24 h, a una de las cajas se le agregaron 2 ml de Tween 80 estéril al 1 %, para remover las células y cuantificarlas. De la misma forma, se removieron las células de otra caja cada 24 h y hasta completar 120 h de incubación. Para disgregar las células se agregaron perlas de vidrio (de 1 mm de diámetro) y se homogeneizaron en un vórtex (Fisher Scientific, Nueva York, USA). Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Optik Labor-Bright Line, Alemania), clasificándolas de acuerdo con los criterios establecidos para *B. bassiana* por Bidochka *et al.* (1987). Se contaron 300 células para cada aislado en cada tiempo del experimento, y se fotografiaron las estructuras pertinentes. La metodología anterior se realizó por triplicado para cada uno de los aislados. Se registraron los porcentajes de las células de la fase micelial (conidios, conidios germinados, conidios hinchados y cuerpos hifales) y de la fase levaduriforme (blastosporas).

### **7.6. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS *IN VIVO* EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LA LANGOSTA *S. piceifrons***

Las langostas en estado ninfal fueron colectadas del ejido Damian Carmona, en Valles, San Luis Potosí, y llevadas al CNRCB en Tecomán, Colima, donde se mantuvieron en jaulas a temperatura ambiente y se alimentaron con hojas de yuca (*Manihot esculenta*) hasta que llegaron a la fase adulta.

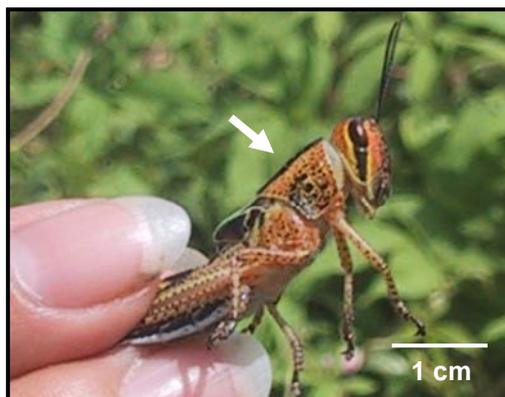


Fig. 4. La flecha muestra el sitio de inoculación (pronoto) de la langosta *S. piceifrons*

Posteriormente, las langostas adultas se inocularon en el pronoto (Fig. 4) con 2  $\mu$ l de una suspensión de  $2.5 \times 10^7$  conidios/ml de citrolina, con los aislados EH-502/8 (de mayor virulencia) y EH-488/7 (de menor virulencia) por separado. Los insectos testigo sin infectar fueron inoculados solamente con citrolina. El número de insectos y el tiempo de muestreo en que se fijaron se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Número de langostas infectadas con aislados de *M. a. var. acridum* y tiempo de muestreo

Tiempo de muestreo (días)	Aislados de <i>M. a. var. acridum</i>		
	EH-502/8 (de mayor virulencia)	EH-488/7 (de menor virulencia)	Testigos
1	2	2	2
2	2	2	
3	2	2	
4	2	2	
5	2	2	
6	2	2	
7	2	2	2

### 7.6.2. Fijación

Para los ensayos de la MEB y MET, las langostas se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al 2%, y tritón X-100 al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.2).

Después de varias observaciones se detectaron las estructuras fúngicas de interés concentradas en el hemocele del insecto, en la zona del pronoto. Por tal motivo, en los ensayos posteriores, se procedió a fijar únicamente el pronoto y el par de patas que corresponde a éste (Fig. 5). La fijación se realizó en frascos de cristal con una solución de glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 preparada al momento de usarse, durante 48 h a 4°C. Transcurridas 48 h, se decantó el fijador y se lavó cada muestra con 5 ml del amortiguador y se dejó a 4°C. La posfijación e inclusión para MET se realizó como se describió en el apartado de MEB y MET.



Fig. 5. Fragmentos de langosta fijados en una solución de glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

Sin embargo, fue necesario reblandecer la quitina para obtener resultados óptimos, en los que fuera posible observar, además de las estructuras fúngicas, los órganos de las langostas. Para ello, del segmento del pronoto fijado se

obtuvieron fragmentos de menos de 0.5 cm de grosor. Estos se lavaron con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.2, durante 24 h; seis veces. Finalmente los fragmentos se pusieron en una solución alcohólica de fenol al 4% en etanol.

### **7.6.3. Tinciones utilizadas en la monitorización de los cambios morfológicos en *S. piceifrons***

Se utilizaron las tinciones de Hematoxilina-eosina de Mayer (HE) y ácido periódico de Schiff (PAS).

### **7.6.4. Observación y monitorización de los cambios morfológicos del hongo en los insectos infectados (*S. piceifrons*)**

La observación de los cambios morfológicos de *M. a. var. acridum* en las langostas se realizó con un microscopio DSM 950 para la MEB y un microscopio EM|10 para la MET.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) DE CONIDIOS OBTENIDOS A 28°C

En las primeras imágenes con MEB de *M. a. var. acridum* los conidios se observaron colapsados (Fig. 6). Para resolver el problema de la deshidratación de los conidios, el medio de cultivo se adicionó con glicerol al 14%, un crioprotector, que fue utilizado con buenos resultados en estudios previos de preservación de conidios para *M. a. var. anisopliae* (Montoya, 2004).

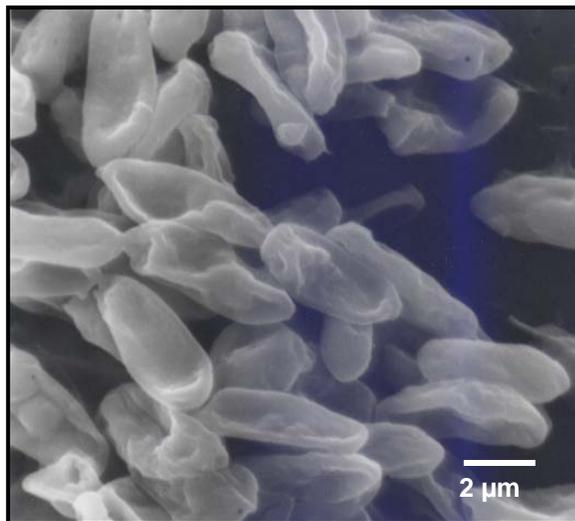


Fig.6. Conidios colapsados de *M. a. var. acridum*.

La MEB de los conidios obtenidos después de 96 h, con las modificaciones mencionadas anteriormente, mostró conidios de forma elipsoidal (forma típica reportada para *M. a. var. acridum*) (Figs. 7 y 8), donde se observa el desarrollo enteroblástico de los conidios (Fig. 9).

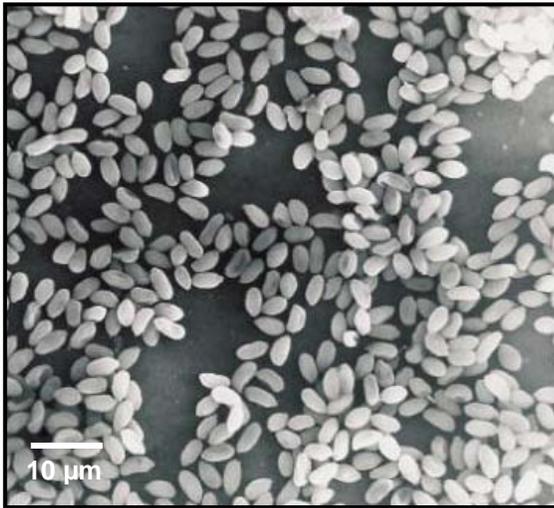


Fig. 8. Conidios de *M. a. var. acridum*. obtenidos a 28°C.

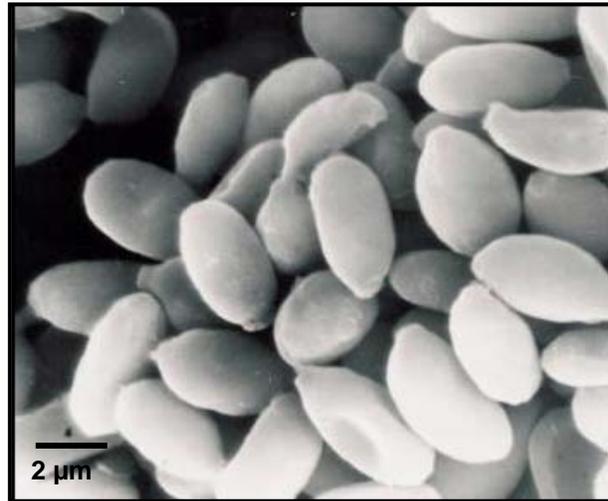


Fig. 9. Detalle de conidios de *M. a. var. acridum*.

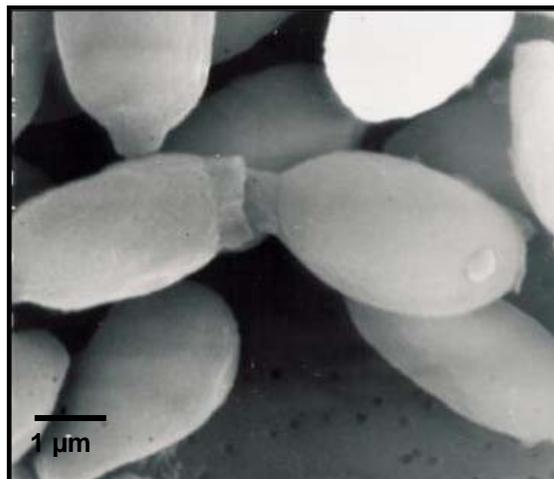


Fig.7. Desarrollo enteroblástico de conidios de *M. a. var. acridum*.

## 8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) DE BLASTOSPORAS OBTENIDAS A 37°C

En las blastosporas también se encontraron estructuras colapsadas (Fig. 10). Este problema se corrigió de igual manera agregando glicerol al 14% al medio de cultivo.

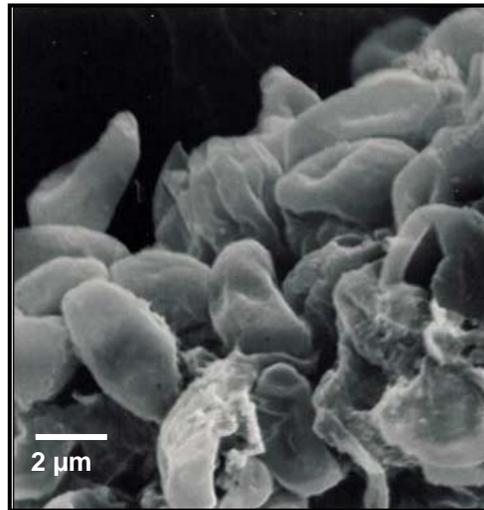


Fig. 10. Blastosporas colapsadas de *M. a. var. acridum* obtenidas a 37°C colapsados.

La MEB de las blastosporas después de 96 h a 37°C reveló estructuras globosas levaduriformes, de mayor tamaño que los conidios (Fig. 11-A); ocasionalmente se observaron algunas blastosporas en proceso de gemación (Fig. 11-B) y cuerpos hifales (Fig.11-C).

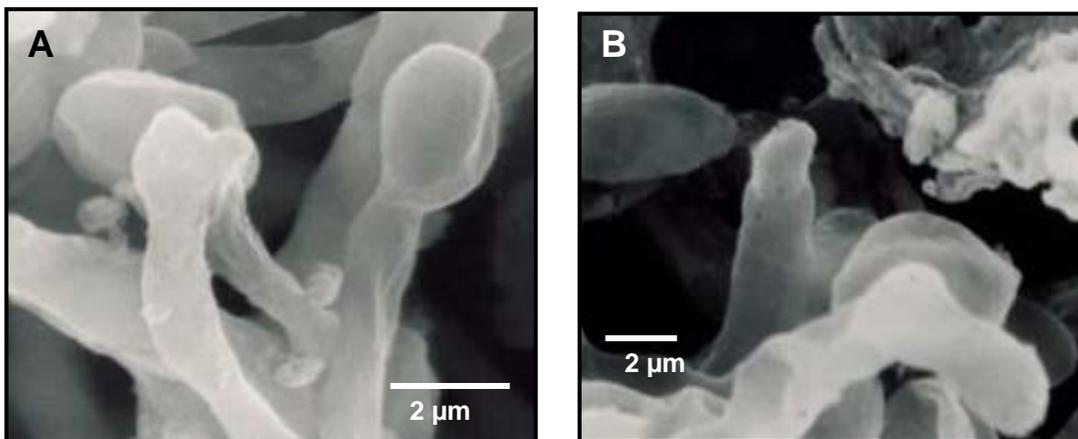


Fig. 11. Blastosporas de *M. a. var. acridum* obtenidos a 37°C: A) estructuras globosas levaduriformes, B) blastospora en proceso de gemación.

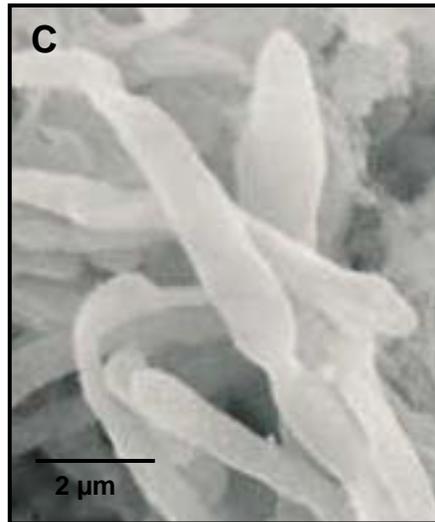


Fig. 11. Continuación. C) cuerpos hifales.

### 8.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE LA FASE MICELIAL (CONIDIOS, MICELIO) A 28°C

En las primeras etapas de la MET se obtuvieron cortes semifinos deficientes, sin poder observar los conidios (Fig. 12). En los cortes finos se observaron espacios dejados por los conidios (Fig. 13-A y 13-B). Por lo tanto, las muestras tuvieron que infiltrarse con resina de manera gradual y en tres ocasiones diferentes para poder corregir el defecto.

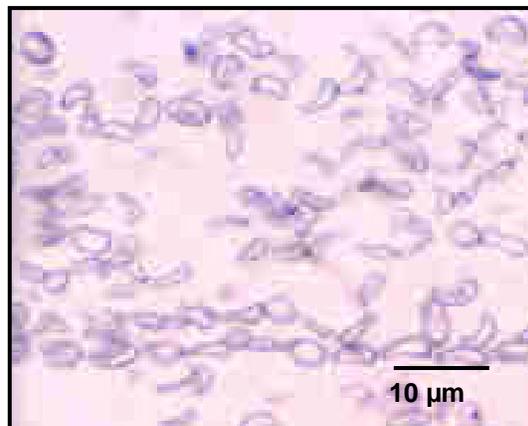


Fig. 12. Corte semifino que muestra los espacios dejados por los conidios de *M. a. var. acridum*.

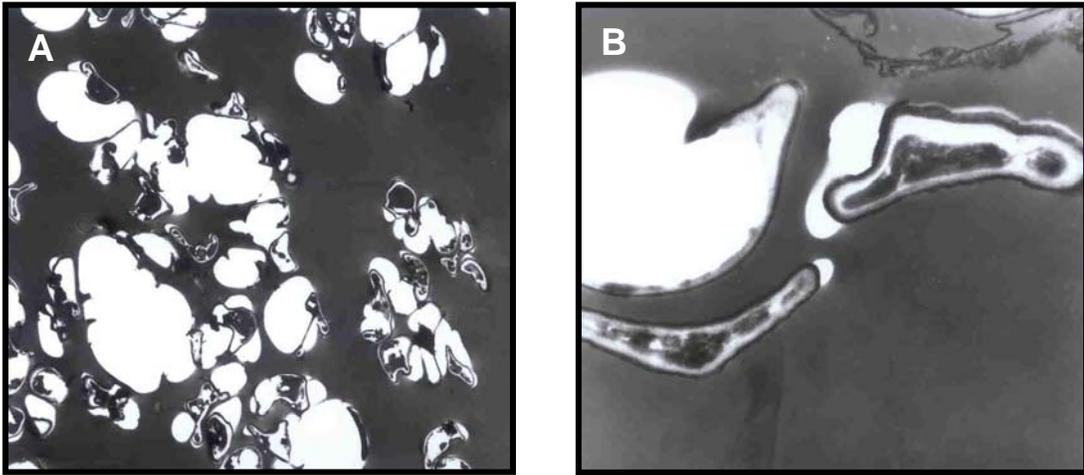


Fig. 13. Cortes finos de conidios de *M. a. var. acridum*:  
A) Espacios dejados por los conidios, 25 000 X y B) Conidios deformados, 20 000 X.

La MET permitió observar la típica citología de las células y distinguir sus principales organelos. En la Fig. 14 se muestra un conidio con un solo núcleo, nucleolo y membrana nuclear, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas, y la pared celular con una capa interna electrotranslúcida y otra externa electrodensa.

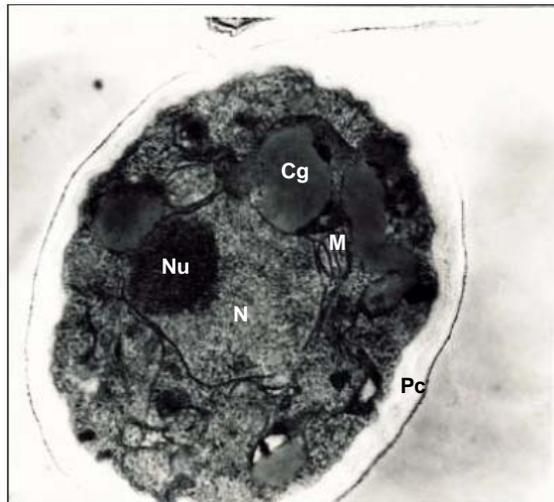


Fig. 14. Conidio de *M. a. var. acridum*: N =núcleo; Nu = nucleolo;  
M =mitocondria; Pc =pared celular y Cg = cuerpos grasos, 31 500 X.

En la Fig. 15 se aprecia una hifa ramificada, con doble pared y cuerpos grasos. La fig. 16 muestra una hifa con un conidio al lado.

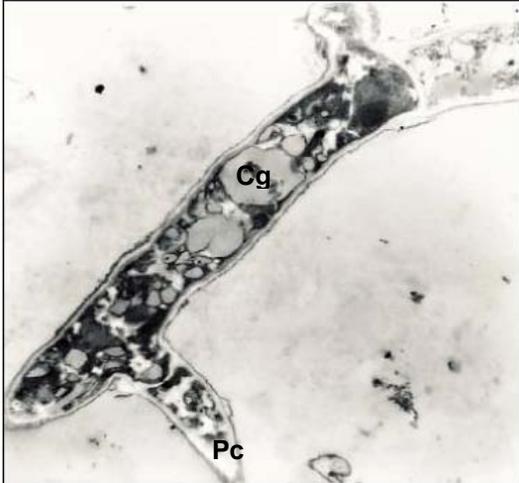


Fig. 15. Hifa ramificada de *M. a. var. acridum*:  
Pc = pared celular y Cg = cuerpos grasos,  
8 000 X.

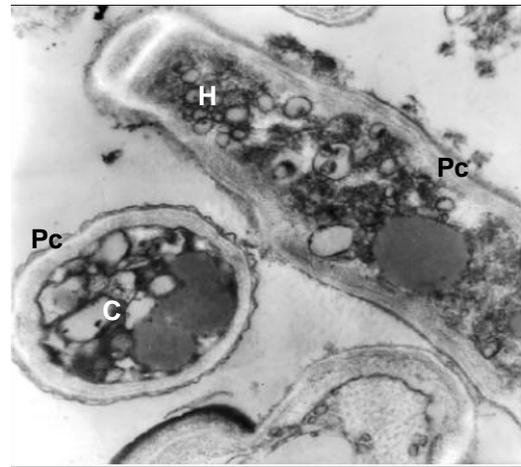


Fig. 16. Hifa (H) y conidio (C) de *M. a. var. acridum* donde se nota la pared celular (Pc),  
25 000 X.

Se observaron conidios germinando, en los que se nota el paso de material citoplasmático del conidio al tubo germinal (Fig. 17). En la punta del tubo germinal se observó material mucilaginoso (Fig. 17).



Fig. 17. Conidio de *M. a. var. acridum*. Mc = material citoplasmático  
y Mmc = material mucilaginoso, 25 000 X.

#### 8.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) Y FOTÓNICA DE BLASTOSPORAS OBTENIDAS A 37°C

La MET de las blastosporas obtenidas a 37°C mostró daño celular; se observaron células casi vacías (Fig. 18-A) y no fue posible identificar algún organelo (Fig. 18-B). Al utilizar el método recomendado para el procesamiento de hongos citado en Vestergaard *et al.*(1998) & Wraight (2000), las células no alcanzaron la dureza necesaria, por lo que se prolongó el tiempo de inclusión de las muestras. Además, la inclusión se realizó de forma gradual, iniciando con 20% de resina y 80% de solvente, hasta llegar a una mezcla de 40 y 60%, respectivamente.

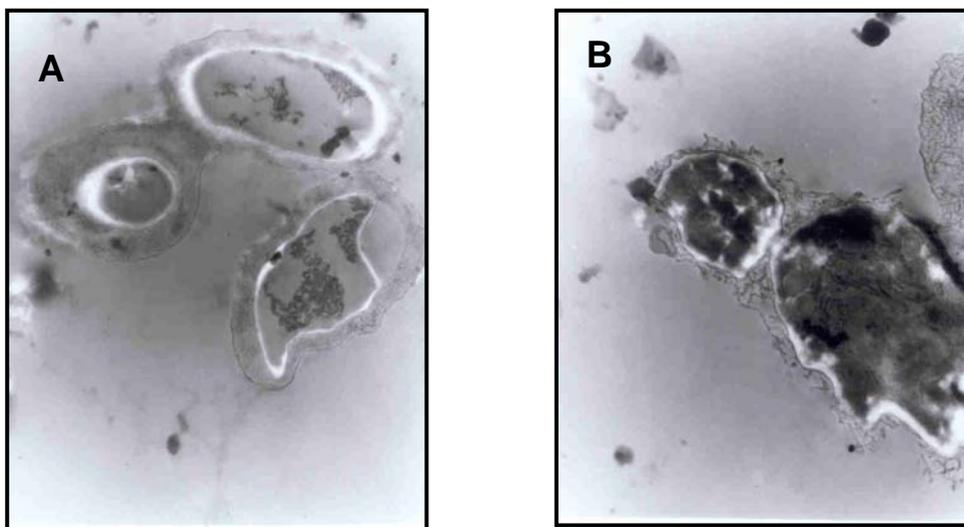


Fig. 18. Blastosporas de *M. a. var. acridum* obtenidas a 37°C.  
A) Células vacías, 12 500 X y B) Células con organelos sin identificar, 17 000 X.

Se observaron diferentes formas de reproducción celular, entre ellas, la gemación, en la que puede distinguirse con claridad la célula madre de la célula hija (Figs. 19 y 20); este tipo celular también se observó con microscopía fotónica (Figs. 19-B y 20-B).

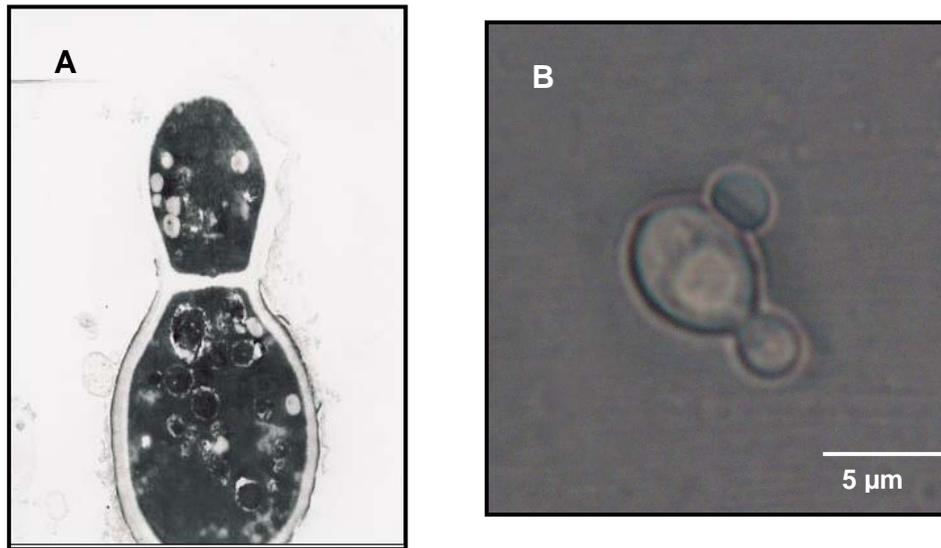


Fig. 19. Blastospora de *M. a.* var. *acridum* en gemación: A) Vista con MET, 20 000 X, y B) Vista con microscopía fotónica.

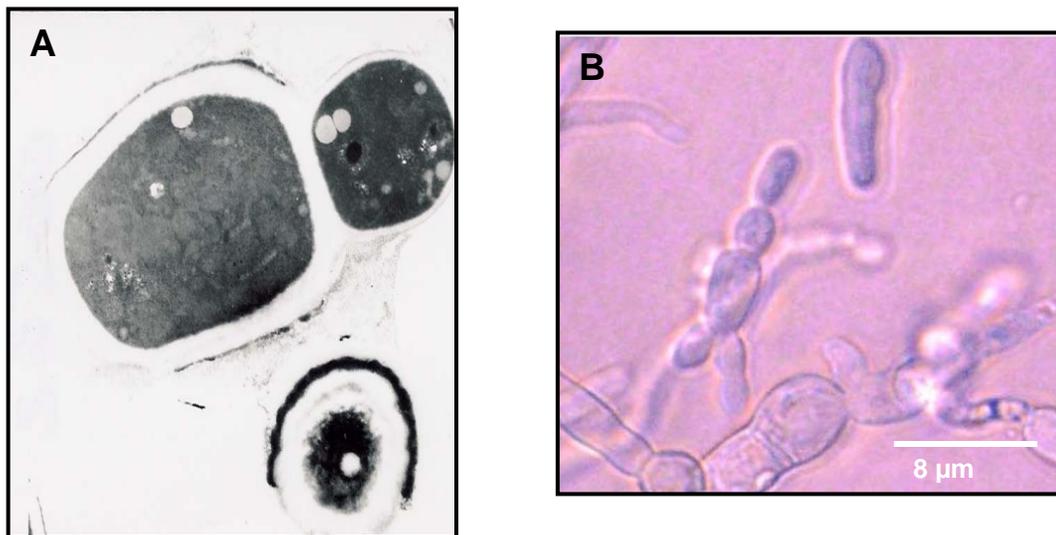


Fig. 20. Blastospora de *M. a.* var. *acridum* en gemación: A) Vista con MET, 20 000 X, y B) Vista con microscopía fotónica.

También se identificaron por MET estructuras con un septo central de separación, en las que se distinguen por cada compartimento dos núcleos y varios nucléolos (Fig. 21-A); la misma morfología se identificó en la microscopía fotónica, con la que no fue posible observar el par de núcleos (Fig. 21-B). En la mayoría de

las estructuras pueden apreciarse las capas electrodensa y electrotranslúcida de la pared celular, además del septo central.

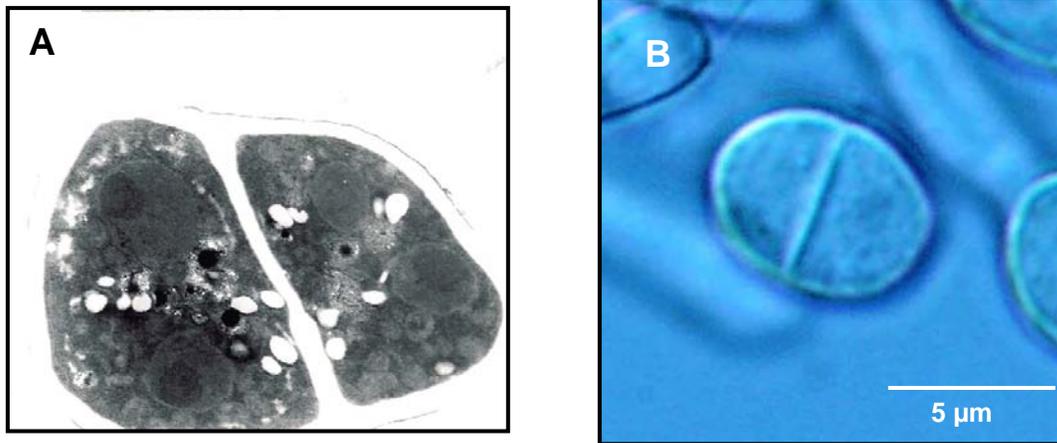


Fig. 21. Estructuras con un septo central de *M. a. var. acridum*: A) Se observan dos núcleos y nucleolos en cada compartimiento (MET), 25 000 X y B) Estructura que muestra el septo central (microscopía fotónica).

Algunas estructuras sugieren pseudohifas de acuerdo a la denominación de esta estructura en *C. albicans* (Sudbery *et al.*, 2004). La Fig. 22-A muestra un corte longitudinal con apariencia parece una pseudohifa; también se observó con microscopía fotónica (Fig. 22-B).

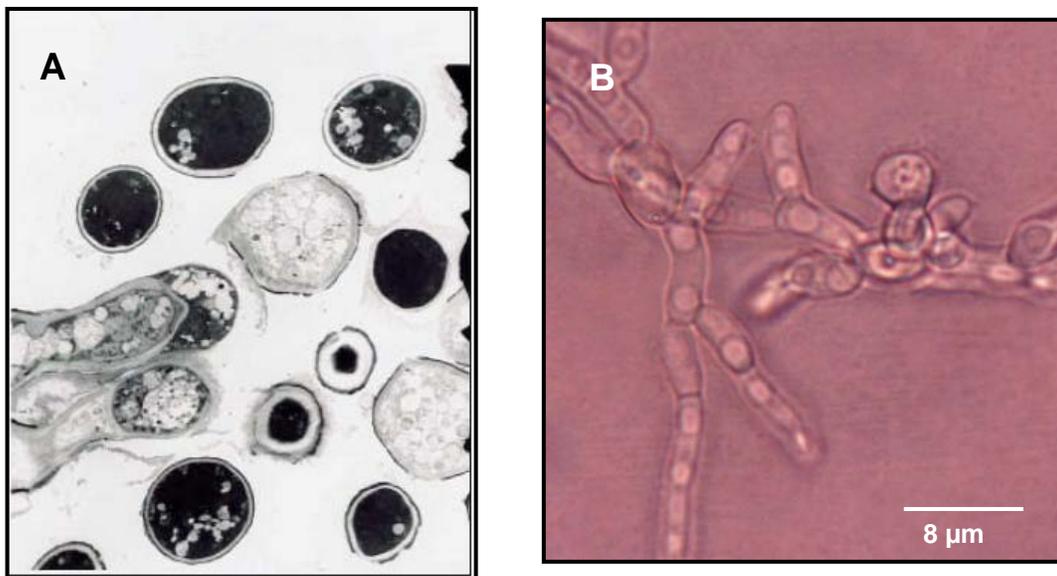


Fig. 22. Pseudohifas de *M. a. var. acridum*: A) Corte longitudinal de una hifa vista con MET, 20 000 X y B) Pseudohifas vistas con microscopía fotónica.

Se observó material mucilaginoso alrededor de las células levaduriformes (Figs. 23 y 24). Cercano a los septos se observaron algunos cuerpos de Woronin (Fig. 24).

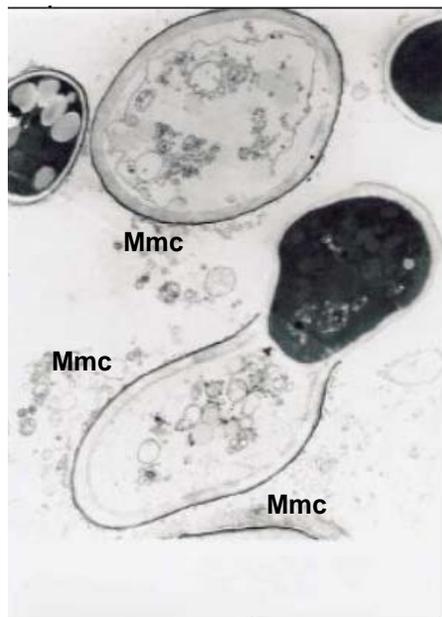


Fig. 23. Blastosporas de *M. a. var. acridum*, con mucilago (Mmc) alrededor, 25 000 X.

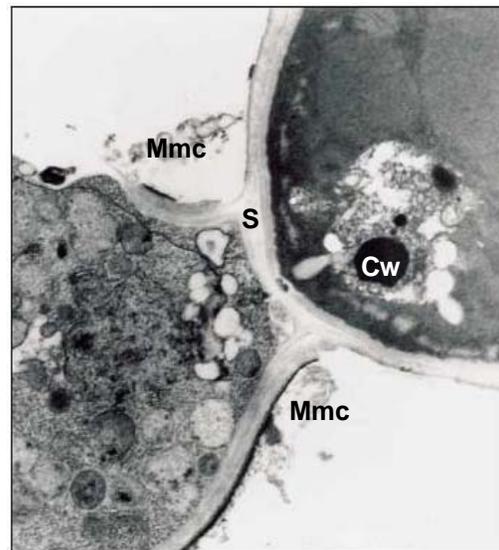


Fig. 24. Blastospora de *M. a. var. acridum* con cuerpos de Woronin (Cw) cerca del septo (S) y material mucilaginoso (Mmc), 35 000 X.

## 8.5. MONITORIZACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS *IN VITRO* A 37°C

### 8.5.1. Dispositivo para la monitorización de los cambios morfológicos *in vitro* a 37°C

El método adoptado para poder observar la cinética de los cambios morfológicos de los aislados seleccionados fue el registro con una cámara fotográfica digital DP11 cada 12 h, hasta completar 220 h de incubación.

### 8.5.2. Cinética de los cambios morfológicos en aislados de *M. a. var. acridum* con diferente virulencia a 37°C

La tabla 3 muestra el esquema de clasificación de estados morfológicos en *B. bassiana*, modificado de Bidochka *et al.* (1987), utilizado en este trabajo para clasificar las diferentes morfologías de *M. a. var. acridum* encontradas.

Tabla 3. Listado de clases y descripción de células de *M. a. var. acridum* encontradas

clase	Descripción
I	Conidios pequeños, compactos, de 2-3 $\mu\text{m}$ de diámetro.
II	Conidios hinchados, esféricos, de 3-5 $\mu\text{m}$ de diámetro.
III	Conidios con un primordio de tubo germinal.
IV	Conidios con un tubo germinal elongado, del triple de la longitud del conidio.
V	Tubo germinal elongado, más del triple de la longitud del conidio. Emergencia uni o bipolar.
VI	Blastosporas que aparecen lateral o terminalmente.
VII	Blastosporas no unidas al micelio, aproximadamente de 6.5 $\mu\text{m}$ de longitud y de 2.5 $\mu\text{m}$ de anchura.
VIII	Seudohifas (Sudbery <i>et al.</i> , 2004)
IX	Cuerpos hifales.
X	Conidióforos característicos de <i>M. a. var. acridum</i> .
XI	Células con gránulos y en desintegración.

Modificado de Bidochka *et al.*, 1987.

#### **8.5.2.1. Aislado EH-502/8 de mayor virulencia**

Los conidios de *M. a. var. acridum* (Fig. 25-A) se hincharon pasadas 5 h de incubación (Fig. 25-B); el aumento de tamaño en estos propágulos continuó hasta las 30 h. Los primordios de tubos germinales se advirtieron a las 12 h (Fig. 25-C); los tubos germinales duplicaron la longitud de los conidios antes de las 24 h. Transcurridas 30 h de incubación se observaron tubos germinales bipolares y grandes hifas ramificadas (Fig. 25-D). Las hifas se engrosaron a partir de las 30 h de incubación. Se identificaron estructuras dividiéndose por gemación (Fig. 25-E) o fisión binaria (Fig. 25-F) a partir de las 34 h; transcurridas 36 h, en el micelio empezaron a formarse constricciones (Fig. G), se observaron pequeños brotes de blastosporas (Fig. 25-H) y las primeras pseudohifas (Fig. 25-I); pasadas las 55 h de incubación se observó que las células levaduriformes germinan (Fig. 25-J); después de las 60 h de incubación se observaron conidios únicos en los ápices de las hifas (Fig. 25-K). Los cuerpos hifales se formaron en distintos puntos de las hifas a partir de las 50 y hasta las 110 h de incubación. El micelio vacuolizado se advirtió a las 100 h (Fig. 25-L). Después de 98 h de incubación se identificaron estructuras granulosas, posiblemente en proceso de desintegración.

#### **8.5.2.2. Aislado EH-488/7 de menor virulencia**

En este aislado se observaron los mismos propágulos que con el aislado de mayor virulencia, solamente que los cambios morfológicos se observaron en tiempos más prolongados, es decir, la transición fue más lenta. Este aislado mostró hifas en espiral (Fig. 26) y más conidióforos (Fig. 27) que en el aislado EH-502/8 de mayor virulencia.

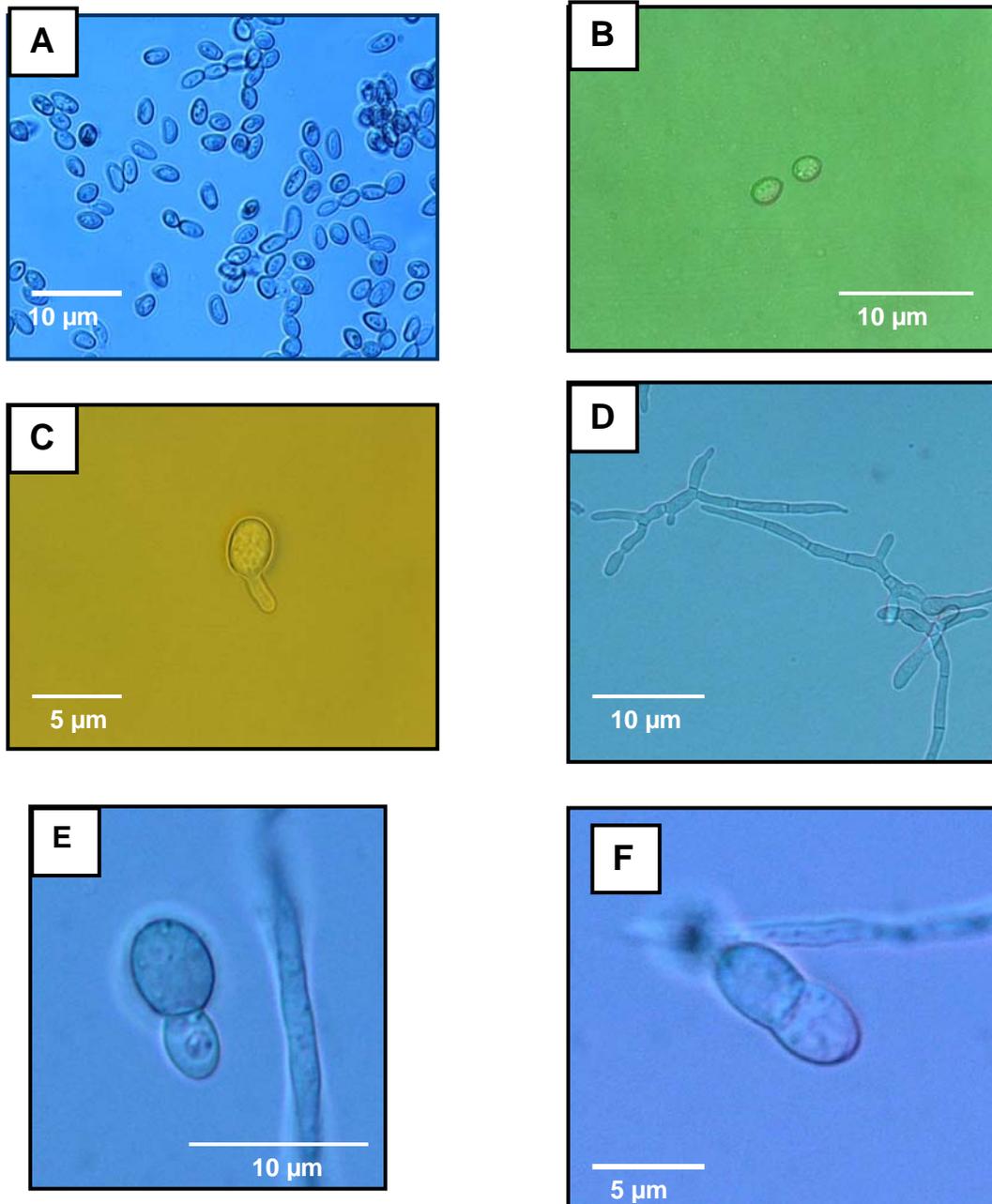


Fig. 25. Cambios morfológicos del aislado de *M. a. var. acridum* de mayor virulencia (EH-502/8) vistos con microscopía fotónica, *in vitro* a 37°C: A) Conidios 0 h; B) Conidios hinchados; C) Conidios con primordios germinales; D) Hifas y tubos germinales bipolares; E) Blastospora dividiéndose por gemación; F) Blastospora dividiéndose por fisión.

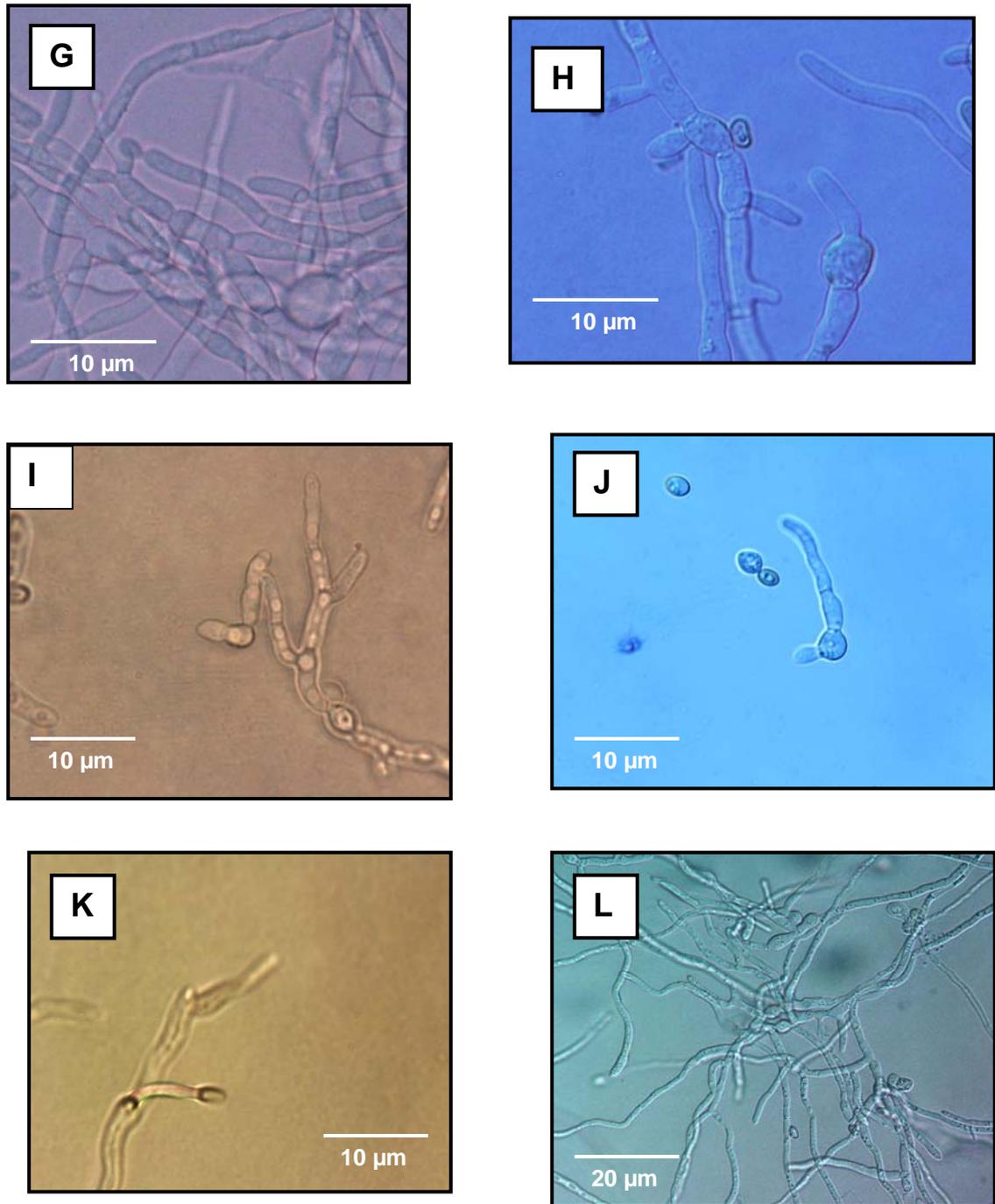


Fig. 25. Continuación. G) Micelio con constricciones; H) Formación de blastosporas;  
I) Seudohifas; J) Blastospora germinando; K) Conidio en el ápice de una hifa;  
L) Micelio vacuolizado



Fig. 26. Hifa en espiral de *M. a. var. acridum*.

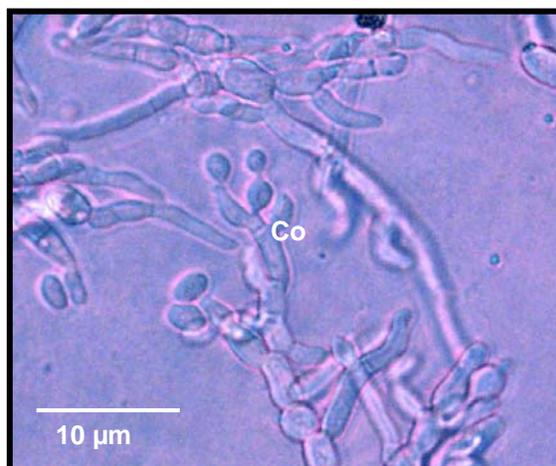


Fig. 27. Conidióforo (Co) de *M. a. var. acridum*

Las diferencias observadas en los cambios morfológicos de ambos aislados se muestran en la tabla 4, en una comparación entre el aislado de mayor y de menor virulencia, con respecto a los diferentes estados de desarrollo que se presentaron a lo largo del experimento.

Tabla 4. Comparación de los estados de desarrollo en los aislados de mayor y de menor virulencia de *M. a. var. acridum*

Tiempo de incubación (h)	Aislado más virulento EH-502/8 (Clases)*	Aislado menos virulento EH-488/7 (Clases)*
0	I	I
5	I, II	I
12	II, III	I, II
20	II, III	I, II, III
30	II, III, IV, V	II, III
40	II, III, IV, VI	II, III, IV, V
48	II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX	III, IV, VII, IX
60	IV, V, VI, VII, VIII, IX	III, IV, V, VI, VII, IX
66	IV, V, VI, VII, VIII, IX	IV, V, VI, VII, VIII, IX
100	IV, V, VI, VII, VIII, IX	IV, V, VI, VII, VIII, IX, X
110	IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI	IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI
120	V, VIII, IX, X, XI	VII, VIII, IX, XI

\* De acuerdo al listado de la tabla 3.

## 8.6. SINCRONIZACIÓN DEL CULTIVO

Se intentó sincronizar el cultivo para comprobar que cuando el medio carece de nutrientes, los propágulos encontrados previamente son capaces de mantener la misma morfología. Esta sincronización no fue posible, porque al sembrar las blastosporas obtenidas a 37°C, éstas germinan y mostraron nuevamente los cambios morfológicos, es decir, el ciclo se repitió. Los cambios más característicos fueron la germinación de los conidios, la multiplicación y el crecimiento del micelio, la producción de pseudohifas y blastosporas, formación de conidios y de cuerpos hifales. Es importante mencionar que dichos cambios morfológicos se observaron a lo largo de las 360 h de incubación.

## 8.7. CUANTIFICACIÓN DE PROPÁGULOS FÚNGICOS

Al cuantificar los propágulos fúngicos de ambos aislados de *M. a. var. acridum*, se observaron cúmulos de éstos (Fig. 28-A) que impidieron el recuento, por lo tanto fue necesario disgregarlos con perlas de vidrio (Fig. 28-B).

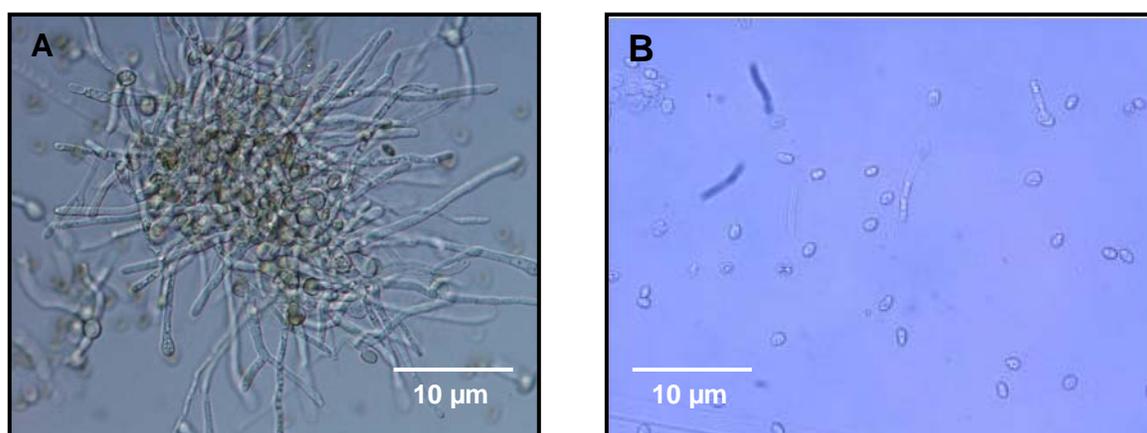


Fig. 28. Propágulos de *M. a. var. acridum*: A) Cúmulo de propágulos y B) Propágulos disgregados con perlas de vidrio.

### **8.7.1. Aislado de mayor virulencia EH-502/8**

A lo largo de 120 h de incubación el aislado EH-502/8 (de mayor virulencia), mostró la mayor cantidad de conidios a las 72 h de incubación. Los conidios hinchados aumentaron desde las 24 h, hasta las 48 h. El máximo número de conidios germinados se encontró a las 24 h, posteriormente disminuyó. Las levaduras aumentaron desde las 24 h, hasta las 120 h de incubación, algunas se dividieron por gemación y otras por fisión binaria. A partir de las 48 h los cuerpos hifales se mantuvieron sin cambios drásticos. El recuento de las estructuras de la fase micelial (conidios, conidios hinchados, conidios germinados, cuerpos hifales) y de la fase levaduriforme (blastosporas) se muestran en la tabla 5.

### **8.7.2. Aislado de menor virulencia EH-488/7**

A lo largo de 120 h de incubación este aislado mostró la mayor cantidad de conidios a las 120 h de incubación o sea 48 h más tarde que el aislado de mayor virulencia. Los conidios hinchados aumentaron a partir de 48 h o sea 24 h más tarde que el aislado EH-502/8, posteriormente disminuyeron. Los conidios germinados tuvieron los valores máximos entre las 30 h y 48 h, y disminuyeron a partir de las 72 h. Transcurridas 48 h de incubación las blastosporas tuvieron un ligero aumento. Los cuerpos hifales mostraron un comportamiento irregular, y sus valores máximos a las 48 h y 120 h de monitorización. El recuento de la fase micelial y levaduriforme se muestra en la tabla 5.

Al comparar el aislado EH-502/8 (de mayor virulencia) con el aislado EH-488/7 (de menor virulencia) se observó que el aislado EH-488/7 tuvo un mayor número de conidios, aunque hasta las 120 h, mientras que el aislado EH-502/8 mostró el valor máximo a las 72 h de incubación. Los conidios hinchados se observaron primero en el aislado EH-502/8 (5 h). En ambos aislados un menor número de conidios siguieron germinando hasta las 110 h de incubación. El aislado EH-502/8 se mostró como el mejor productor de blastosporas, mientras que el EH-488/7 como el mejor productor de cuerpos hifales y conidios durante las 120

h registradas, a pesar de que fue en el aislado EH-502/8 el primero en el que se observaron los conidios sumergidos.

La Tabla 5 muestra el porcentaje de la fase micelial y de la fase levaduriforme en el aislado más virulento (EH-502/8) y en el menos virulento (EH-488/7) de *M. a. var. acridum*, a lo largo de 120 h de incubación a 37 °C. El mayor número de estructuras levaduriformes se encontró en el aislado EH-502/8, aunque la fase micelial fue similar en ambos aislados. El aislado EH-488/7 mostró un considerable aumento de la fase micelial a las 72 h y el aislado EH-502/8 hasta pasadas las 120 h de incubación.

Tabla 5. Comparación entre la fase micelial y la fase levaduriforme del aislado de mayor virulencia (EH-502/8) y menor virulencia (EH-488/7) de *M. a. var. acridum*.

Tiempo (h)	Fase micelial (%)		Fase levaduriforme (%)	
	EH-502/8	EH-488/7	EH-502/8	EH-488/7
0	100	100	0	0
24	95	98	5	2
48	91	95	9	5
72	88	93	12	7
96	85	91	15	9
120	76	89	24	11

\* Se cuantificaron 200 propágulos para cada tiempo y por triplicado.

## 8.8. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS *IN VIVO* EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE *S. piceifrons*

Las langostas se infectaron con conidios del hongo en el pronoto, porque en la literatura esta zona se ha referido como la óptima para iniciar la infección (Gillespie *et al.*, 1999; Ouedraogo *et al.*, 2002).

Los ensayos revelaron que las estructuras fúngicas de interés a observarse en la langosta se concentraron en la hemolinfa del pronoto y el primer par de

patas; por lo tanto, debido al alto costo de la técnica únicamente se fijaron estos fragmentos del insecto.

### 8.8.1. Monitorización de los cambios morfológicos en la langosta *S. piceifrons* con microscopía fotónica

En las primeras observaciones con las técnicas HE y PAS, en el hemocele de las langostas infectadas con el aislado más virulento (EH-502/8) se observaron propágulos semejantes a los observados *in vitro*, entre ellas, blastosporas, micelio, micelio ramificado, pseudohifas, cuerpos hifales y blastosporas en gemación (Fig. 29).

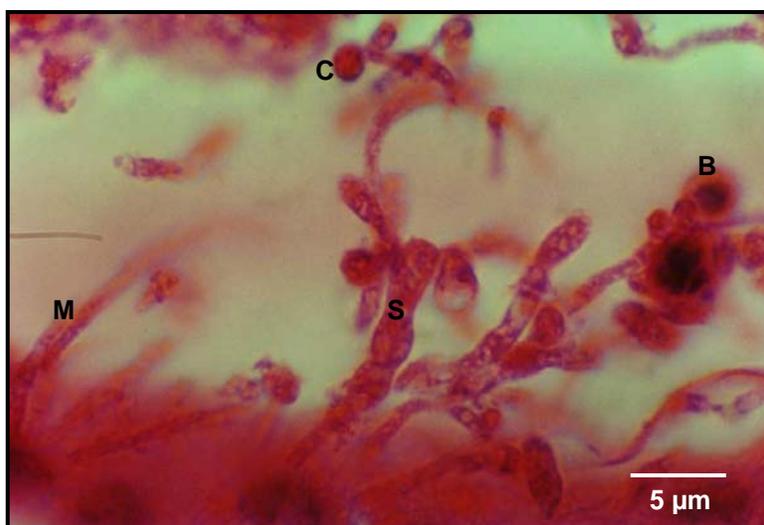


Fig. 29. Propágulos de *M. a. var. acridum* (EH-502/8), en el hemocele de *S. piceifrons* con HE: A) Seudohifas (S), micelio (M), conidios(C) y blastosporas (B).

Al comparar el hemocele infectado con ambos aislados, se observaron los mismos propágulos, pero el aislado (EH-488/7) de menor virulencia siempre mostró un menor número de propágulos que el aislado (EH-502/8) de mayor virulencia (Fig. 30-A y B).

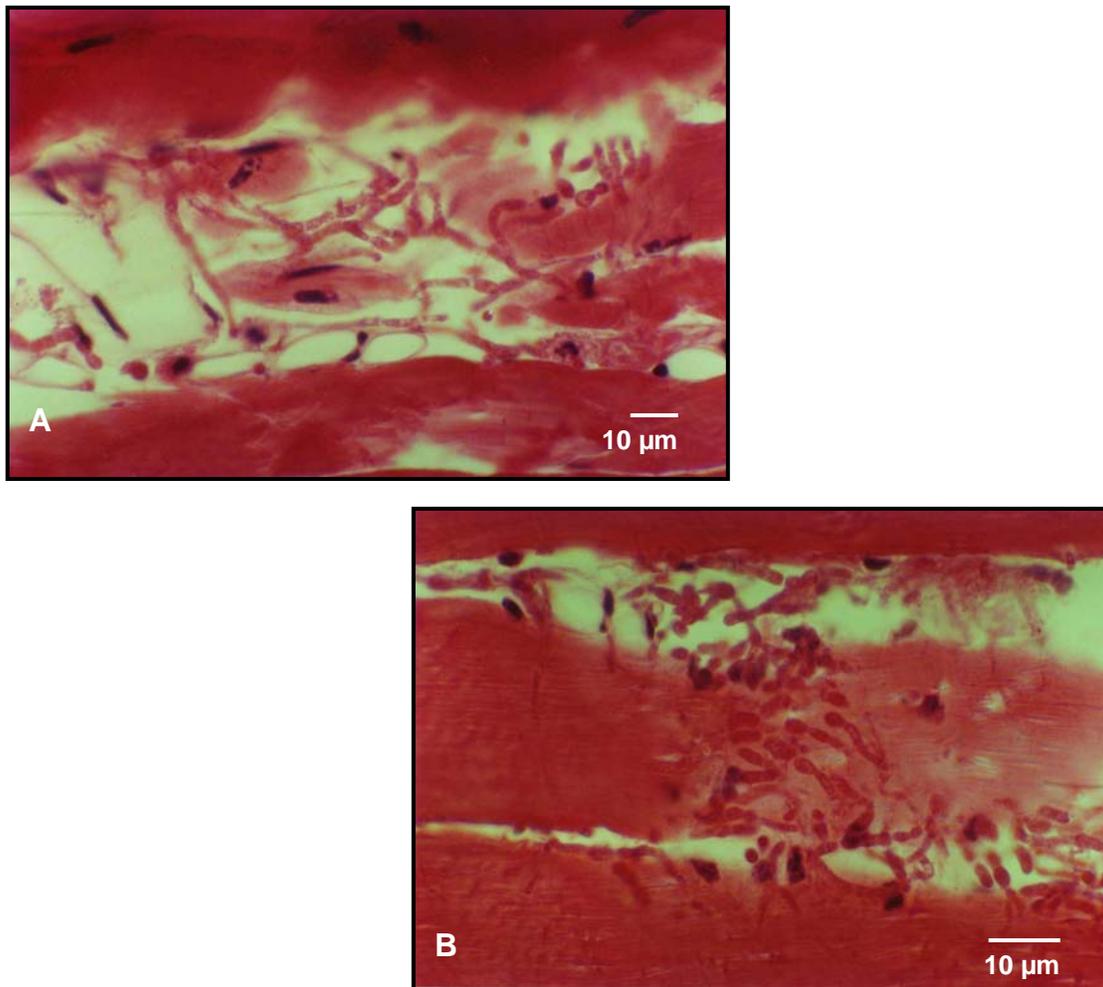


Fig. 30. Propágulos de *M. a. var. acridum*, en el hemocele de la langosta con HE: A) Menor número de propágulos en el aislado (EH-488/7) de menor virulencia y B) Mayor número de propágulos en el aislado (EH-502/8) de mayor virulencia

### 8.8.2. Monitorización de los cambios morfológicos en la langosta *S. piceifrons* con MEB

La infección de *M. anisopliae* var. *acridum* en langosta (*S. piceifrons*) se inició con la adhesión de los conidios a la cutícula externa de la langosta (Fig. 31 A y B); se observaron conidios con uno o dos tubos germinales, extendiéndose sobre la cutícula, hasta su penetración (Fig. 32).

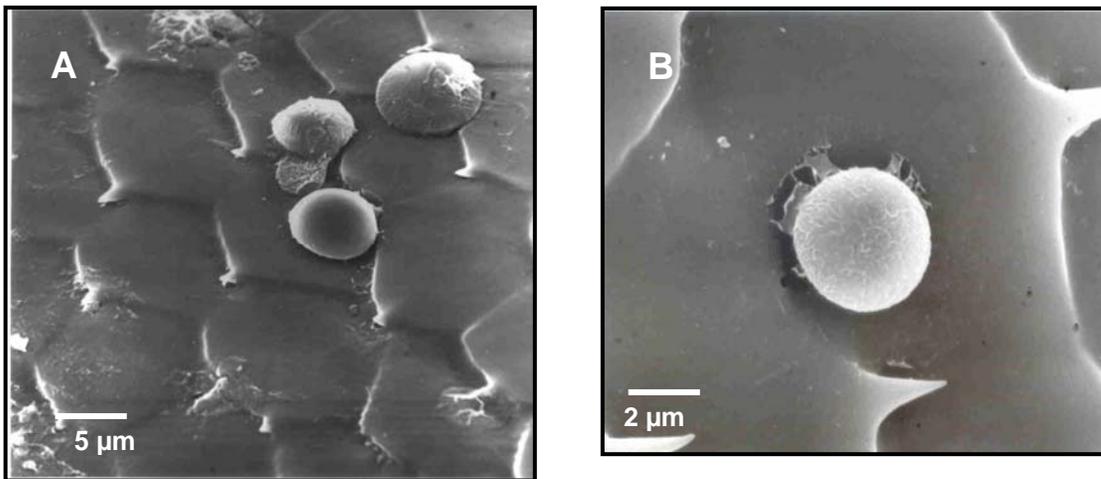


Fig. 31. Conidios de *M. a. var. acridum*, en la cutícula de la langosta: A) Algunos conidios sobre la cutícula y B) Conidio en el que se observa material de adhesión sobre la cutícula de la langosta.

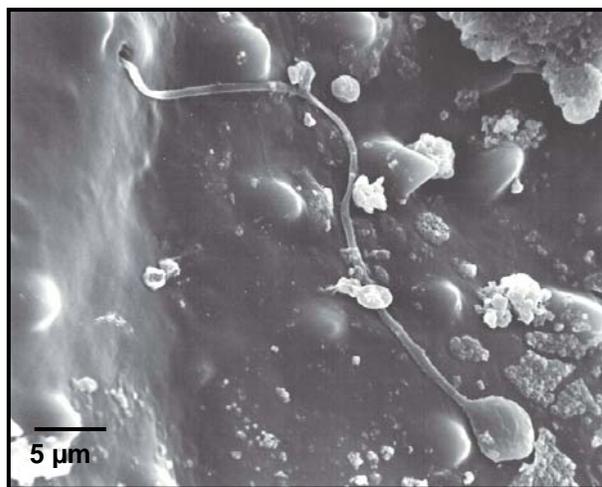


Fig. 32. Tubo germinal de *M. a. var. acridum*, penetrando la cutícula del insecto.

También se encontraron tubos germinales con apresorio, los cuales se observaron sobre la superficie de la langosta (Fig. 33).

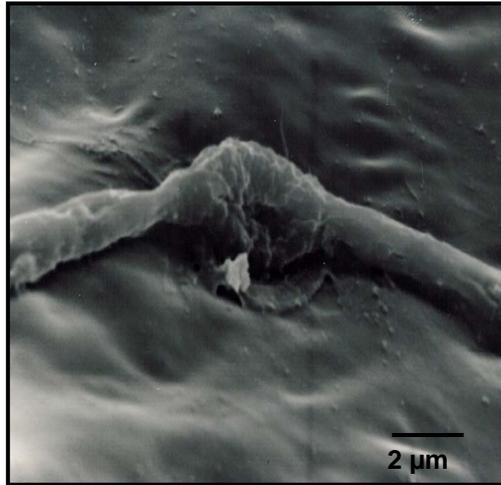


Fig. 33. Apresorio de *M. a. var. acridum* en la cutícula de la langosta.

En el hemocele del insecto se observó el desarrollo del micelio con constricciones en los septos hifales, como las pseudohifas observadas *in vitro* (Fig. 34).

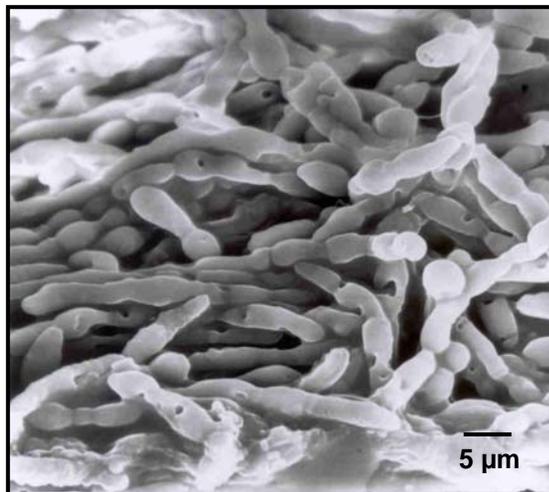


Fig. 34. Pseudohifas de *M. a. var. acridum* en el hemocele de la langosta.

Al final del experimento se observó en la superficie del insecto la esporulación del hongo, caracterizada por conidióforos (Fig. 35) con conidios en sucesión basípeta dispuestos en cadenas (Figs. 36 A y B).

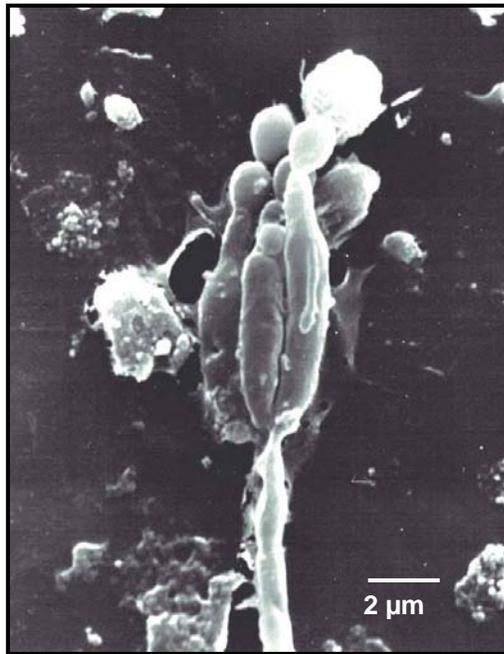


Fig. 35. Conidióforo de *M. a. var. acridum* en la superficie de la langosta.

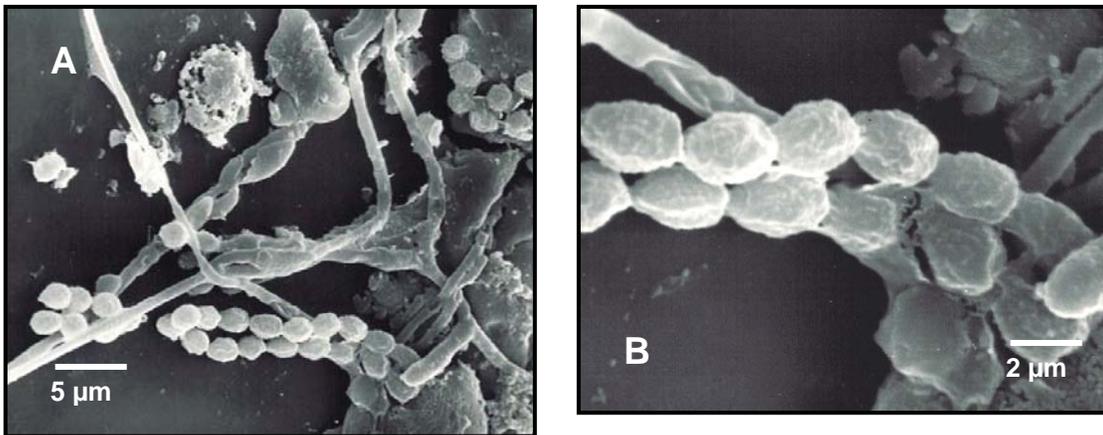


Fig. 36. Conidios catenulados de *M. a. var. acridum*:  
A) Cadenas de conidios sobre la cutícula de la langosta  
y B) Detalle de conidios en cadena.

Como característica constante al comparar ambos aislados, fue el aislado de mayor virulencia (EH-502/8) siempre presentó más propágulos fúngicos.

## 9. DISCUSIÓN

En México, la aplicación indiscriminada de insecticidas químicos para el control de plagas de importancia económica ha generado la necesidad de desarrollar agentes microbianos autóctonos (Lomer *et al.*, 2001). El hongo *M. a. var. acridum* se presenta como un fuerte candidato para ser el ingrediente activo de un micoinsectida, por su característica de ser patógeno de acrídidos. Dentro del proceso de selección de las cepas adecuadas para el control biológico cobra gran relevancia la biología básica del hongo. Por esto, este trabajo se enfocó a estudiar las diferentes formas de crecimiento del hongo, tanto *in vitro* como en la infección en la langosta.

El control biológico de plagas es un área multidisciplinaria que involucra la participación de entomólogos, biólogos, ingenieros agrícolas, genetistas, taxónomos, etc. Debido a esta variedad de investigadores, actualmente existe una fuerte problemática con respecto a la terminología empleada para nombrar las distintas estructuras fúngicas implicadas en el proceso de infección del insecto-plaga. Por citar un ejemplo, Bidochka *et al.* (1987) mencionan que el término blastospora inicialmente se aplicó a los conidios de forma elipsoidal de *B. bassiana*, observados en cultivo líquido. Este término ha sido descrito por varios autores; según Vidal *et al.* (1998), las blastosporas son estructuras producidas por separación esquizolítica de los septos, por fragmentación mecánica de las hifas o por gemación hifal, mientras que los propágulos formados en cultivo sumergido, microscópicamente iguales a los conidios aéreos, han sido llamados conidiosporiformes (conidiospore-like) (Vidal *et al.*, 1998). Por otro lado el término blastospora ha sido comúnmente aplicado por los entomólogos a los cuerpos hifales producidos en la hemolinfa del insecto o en cultivo sumergido, por un proceso de gemación hifal, que excluye la formación de fialoconidios (Fargues *et al.*, 2001). No obstante, el término blastoconidio describe todos los tipos de propágulos obtenidos por desarrollo blástico, y éste no excluye las fialosporas enteroblásticas (Cole, 1981; Fargues *et al.*, 2001). Es importante tratar de uniformar la terminología empleada para la denominación de los propágulos,

estableciendo parámetros inequívocos, debido a las diferentes morfologías que ocurren durante el desarrollo fúngico. Por esto, nosotros consideramos que el término blastospora debe ser denominado como descrito en Ulloa & Hanlin (2006) como una espora de reproducción asexual, que se origina por gemación, como la de las levaduras y algunos hongos filamentosos.

Las diferentes morfologías que exhibe un hongo le confieren propiedades y ventajas en los distintos estados de infección (Gow et al., 2002). La gran variedad de formas de crecimiento observadas con microscopía fotónica y electrónica durante este trabajo, ya se han reportado para *M. anisopliae*. Entre ellas, se observaron blastosporas que surgen de la punta de la hifa o por gemación del septo de la hifa (Bidochka et al., 1987; Kleespies & Zimmermann, 1992; Vidal et al., 1998; Fargues et al., 2001; Lomer et al., 2001). Probablemente, la producción de esta fase de levadura se deba a que el hongo fue crecido en cultivo líquido artificial, y dicho cultivo imita los componentes de la hemolinfa (Alves et al., 2002). En este trabajo se observaron cuerpos hifales, tanto en medio de cultivo líquido como en el hemocele del insecto, lo cual ya ha sido reportado por Látge & Moletta (1988) y por Jenkins & Prior (1993) en diferentes hongos. Vestergaard et al. (1999) los describen con apariencia de varilla tubular con pared delgada, que se multiplican por fisión; esto último también fue reportado por otros autores (Vidal et al., 1998; Fargues et al., 2001). Aun cuando las blastosporas son el único tipo de propágulos reportados en cultivo líquido, varios estudios mencionan la formación de conidios sumergidos (Vidal et al., 1998), como es el caso de este experimento. Por otro lado, las células de levadura se consideran estructuras de diseminación en la hemolinfa de los insectos (Sudbery et al., 2004).

La microscopía electrónica y la fotónica permitieron examinar la interacción a nivel ultraestructural entre el hongo y la langosta. Ambas son una herramienta eficiente para el estudio del proceso de infección, ya que con ellas se observaron conidios que caracterizan a este entomopatógeno, y blastosporas de una sola célula, elipsoidales, hialinas, lisas y con pared delgada, tal y como lo describen Bidochka et al. (1987) para *B. bassiana*. De igual forma que en las observaciones hechas por Jenkins & Prior (1993), los conidios en cultivo líquido, observados con

microscopía fotónica, presentaron un pigmento verde que no se observó en las blastosporas.

En las imágenes de MET se observó una cubierta mucilaginoso en la superficie de algunos tubos germinales, como fue reportado en el caso de *L. lecanii* (Askary *et al.*, 1999), que además también se notó en los sitios de infección. En *M. a. var. acridum* (antes *M. flavoviride*) se ha observado una sustancia pegajosa en la pared celular alrededor de la constricción formada durante la división de los conidios (Jenkins & Prior, 1993). Probablemente, dicho mucílago contribuye a la difusión de las enzimas que degradan la cutícula del insecto (Askary *et al.*, 1999), y a la adhesión de los conidios en hongos patógenos de plantas (Cole, 1991; Schreiter *et al.*, 1994; Vestergaard *et al.*, 1999), además de estar involucrado en la hidrofobicidad de los conidios (Cole, 1991; Nicholson *et al.*, 1993).

Con microscopía fotónica y electrónica, durante los experimentos *in vitro* y en la infección de la langosta, de manera constante se observaron estructuras que parecen pseudohifas, de acuerdo a algunos parámetros establecidos por Sudbery *et al.* (2004) para este tipo de propágulos. Las pseudohifas son estructuras modificadas por crecimiento polarizado que no se han separado totalmente de la hifa después de haber completado el ciclo celular. Los brotes hijos se mantienen unidos a la célula madre y, como consecuencia, en los septos se forman constricciones. La teoría de Sudbery *et al.* (2004) se refiere a que las pseudohifas de *C. albicans* no son estructuras intermedias entre la levadura y el micelio verdadero, sino que son estructuras definidas por diversas características. La longitud y anchura de una pseudohifa puede variar ampliamente; son más anchas que el micelio, más amplias en el centro que en los extremos y no tienen paredes paralelas, por lo que en un extremo puede parecer hifa y en el otro pseudohifa. Finalmente, tienen un patrón de crecimiento discontinuo, cambiando entre polarizado e isotrópico, con mayores periodos de crecimiento polarizado. De acuerdo a estos criterios, las estructuras que se observaron de manera mayoritaria y constante en el hemocele de la langosta fueron las pseudohifas; interesantemente, el aislado más virulento (EH-502/8) exhibió una predominancia

de estas estructuras, al compararlo con el aislado menos virulento (EH-488/7), que mostró pseudohifas muy escasas.

Existen otras características que deben tomarse en cuenta para la clasificación de las pseudohifas, las cuales no se utilizaron en este trabajo porque no fueron el objetivo del mismo. Entre ellas, la formación de un anillo de septina en el sitio del brote en la célula madre, antes de que surja la célula hija; la primera mitosis que ocurre en el anillo de septina y, finalmente, la formación del septo primario, compuesto de quitina, en la división de este anillo (Sudbery *et al.*, 2004). Sería aconsejable determinar estos parámetros puntuales en *M. a. var. acridum*, para afirmar que las estructuras observadas corresponden inequívocamente a pseudohifas.

Esta capacidad para cambiar de forma entre levadura e hifa es considerada necesaria para la virulencia, como en el caso de *B. bassiana* y *N. rileyi*, cuya forma levaduriforme se ha relacionado con la virulencia (Alves *et al.*, 2002), así como en el caso de hongos patógenos de humanos y de plantas (Borges- Walmsley *et al.*, 2000; Lengeler *et al.*, 2000). Probablemente, también éste sea el caso de *M. a. var. acridum*, ya que en este trabajo el aislado más virulento (EH-502/8), cuya TLM fue de 5.57 días (Cano-Ramírez *et al.*, 2003), siempre mostró la mayor concentración de blastosporas. Mientras que el aislado menos virulento (EH-488/7, TLM de 12.18 días) siempre se caracterizó por una mayor concentración de conidios sumergidos.

En nuestro trabajo, la infección de las langostas se realizó de manera tópica (como ocurre durante la infección natural), y posiblemente a eso se deba que en las observaciones hechas con microscopía electrónica, durante el proceso de infección de *M. a. var. acridum* en la langosta, se identificó la secuencia de eventos consistentes con lo que se ha descrito para *M. anisopliae* en otros insectos (Vestergaard *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2000). Por el contrario, en otros estudios, se ha mencionado que cuando la infección de las langostas es mediante la inyección de conidios puede no revelar el alcance de su respuesta inmune, y que los pasos de la ruta natural de infección pueden ser distintos, ya que

posiblemente involucren formas del hongo que normalmente no están presentes (Gillespie *et al.*, 2000).

Entre estos eventos del proceso de infección se observó la adherencia de conidios a la cutícula del insecto, donde quizá el número de conidios adheridos a ésta se relacione con la virulencia fúngica o con la susceptibilidad del hospedero (Vestergaard *et al.*, 1999). La germinación de los conidios en la superficie de la langosta ocurrió entre las 20-24 h posteriores a la inoculación, como está reportado en *P. fumosoroseus* (20 h), *N. rileyi* (20-24 h) (Kumar *et al.*, 1997) y *L. lecanii* (Askary *et al.*, 1999).

En estudios con *N. rileyi*, infectando diferentes hospederos, se encontró que las diferentes texturas de la cutícula de éstos probablemente afecten la germinación del conidio y el desarrollo de las hifas, porque proveen varios estímulos para la formación del tubo germinal. Esta variedad de estímulos da como resultado un amplio lapso en el tiempo de germinación de la espora (Kumar *et al.*, 1997). Otros factores involucrados en la germinación de los conidios son el tipo de nutrientes de los que dispone el hongo, en la cutícula del insecto (Charnley, 1989; Askary, 1999). Por ejemplo, en *B. bassiana* cuando el sustrato es rico en carbono propicia una rápida germinación, mientras que cuando es rico en nitrógeno favorece el crecimiento del micelio (Bidochka *et al.*, 1987). En diversos insectos, la penetración por *Pandora neoaphidis* en el áfido del tabaco ocurrió 12 h después de la inoculación (Dara & Semtner, 1998), la de *L. lecanii* en el áfido de la papa, y *M. anisopliae* en *Frankliniella occidentalis*, a las 30 h de inoculación (Altre & Vandenberg, 2001). En nuestro trabajo, la penetración de la cutícula del insecto ocurrió principalmente en la base de las cerdas que están cubiertas por una cutícula delgada, en los orificios de la cutícula y en las membranas intersegmentales, posiblemente porque estas zonas constituyen sitios más fácilmente penetrables (Cole, 1981; Vestergaard *et al.*, 1999).

En varios entomopatógenos se ha descrito que la hifa desarrolla una estructura especializada llamada apresorio, que se adhiere a la cutícula del insecto y forma un clavija, que con ayuda de presión mecánica penetra la cutícula. Tal es el caso de *P. fumosoroseus* en la mosca blanca (Altre & Vandenberg *et al.*,

2001) y en *Pandora neoaphidis* en el áfido del tabaco (Dara & Semtner, 1998). Nuestro trabajo muestra, por primera vez, la formación del apresorio en *M. anisopliae* var. *acridum* en la infección de langosta. Entre otros, algunos requerimientos para la formación del apresorio son bajos niveles de compuestos nitrogenados complejos (Charnley & St. Leger, 1989), altos niveles de glucosa, superficies altamente hidrofóbicas (Dara & Semtner, 1998) y tubos germinales cortos (Nicholson *et al.*, 1993). También se ha reportado en otros hongos, como en *L. lecanii* infectando áfidos, que la penetración de la cutícula ocurre en ausencia del apresorio (Altre & Vandenberg *et al.*, 2001).

Las señales químicas que se dan durante la penetración del hongo en la cutícula de la langosta juegan un papel significativo en la respuesta inmune. Dentro de ésta, es importante la oxidación y polimerización de compuestos fenólicos, que proporcionan una medida de resistencia al hongo, caracterizada por la producción de un pigmento melanínico de color café o negro (Gillespie *et al.*, 1997; Vestergaard *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2000 ). En la infección de la langosta por *M. a.* var. *acridum* observamos una pigmentación de color rosa a rojo que siempre se presentó en los insectos infectados.

Los cuerpos hifales de *M. a.* var. *acridum* fueron observados rutinariamente en la hemolinfa de la langosta, entre los 3-4 días después de la inoculación. En el caso de *N. rileyi* se observaron después del tercer día de inoculación en *Bombyx mori* (Kumar *et al.*, 1997).

En este trabajo también se observaron conidióforos en la superficie de los insectos, ya avanzada la infección (6 días), en un tiempo menor del que se ha reportado para otras especies. En otros hongos, como *N. rileyi*, existen reportes de que 8 días después de la infección a *B. mori*, se observó un gran número de hifas ramificadas formando conidióforos (Kumar *et al.*, 1997). En la infección de *F. occidentalis* por *M. anisopliae* se observaron hifas saliendo del insecto, diferenciadas en fiálides con numerosas cadenas de conidios verdes (Vestergaard *et al.*, 1999). Estos autores sugieren que los conidióforos se forman debido a la falta de agua y nutrientes en los tejidos del insecto.

El tiempo en la rapidez de la muerte de la langosta puede ser variable y depende en gran medida de las temperaturas ambientales y la del hospedero (Arthurs *et al.*, 2003).

En algunas especies de langosta los individuos parecen cambiar su comportamiento para elevar su temperatura corporal y reducir su mortalidad durante una infección. Cuando las langostas se exponen a la luz natural o artificial, su temperatura corporal puede llegar a elevarse por encima de los 46°C (Arthurs *et al.*, 2003). Estos autores mencionan que los acrididos limitan el crecimiento del hongo al aumentar su temperatura corporal a 37°C. La termorregulación de las langostas es eficiente y puede disminuir la eficacia de *M. anisopliae* (Scalan *et al.*, 2001), probablemente porque su termorregulación induce la formación de ciertas proteínas en la hemolinfa (Ouedraogo *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, por primera vez se observó que *M. a. var. acridum* crece y se desarrolla a 37°C, y en trabajos previos se observó que a esta temperatura este hongo es capaz de desplegar todas las estructuras involucradas en la infección natural de langostas (Jiménez-Gutiérrez, 2003). Además, en otros estudios realizados para determinar a que temperatura el hongo pierde el 100% de viabilidad, se encontró que a 55°C aún fue posible observar algunas unidades formadoras de colonias (UFC) del hongo (Vega- García, 2004). Estos resultados apoyan la virulencia de la cepa EH-502/8, que crece bien a 37°C y por lo tanto sería capaz de desarrollarse en el insecto aun cuando éste aumentara su temperatura corporal.

Este es el primer trabajo que conocemos donde se estudió el desarrollo de *M. a. var. acridum* con microscopía fotónica y electrónica en la infección de la langosta y en condiciones de laboratorio; donde se describen pseudohifas, propágulos nunca antes mencionados en hongos entomopatógenos.

## 10. CONCLUSIONES

- ❖ Por primera vez en el hongo *M. a. var. acridum* se describen las estructuras que exhibe a infectar langostas.
- ❖ Se observó la transición de las estructuras de infección, los conidios, a blastosporas, tanto en medio de cultivo líquido como en el hemocele de la langosta.
- ❖ Por primera vez se describen pseudohifas para *M. a. var. acridum* en la infección de langosta e *in vitro*, y de apresorios en la infección de la langosta.
- ❖ Por primera vez se describen las estructuras en el hongo *in vitro* a 37 °C.
- ❖ El aislado más virulento (EH-502/8) siempre predominaron las blastosporas, mientras que en el aislado menos virulento (EH-488/7) predominaron los conidios sumergidos.
- ❖ El aislado más virulento (EH-502/8) mostró la mayor rapidez en la transición de conidios a blastosporas, principalmente entre las 30 a 40 h después de la infección del insecto.
- ❖ En la infección de la langosta con el aislado más virulento constantemente se observó predominio de pseudohifas, probablemente involucradas en la virulencia de dicho aislado.
- ❖ Futuros estudios considerando como base estas técnicas permitirán conocer si las pseudohifas encontradas en este hongo pudieran tener un rol relevante durante la infección. Por otro lado la obtención de blastosporas como un ingrediente activo de un micopláguica facilitaría la producción industrial del hongo.

**XII. ÍNDICE DE TABLAS**

	Pág.
1. Aislados de <i>M. a. var. acridum</i> con datos de origen y TLM en la langosta	11
<b>2. Número de langostas infectadas con aislados de <i>M. a. var. acridum</i> y tiempo de muestreo</b>	<b>17</b>
3. Listado de clases y descripción de células de <i>M. a. var. acridum</i> encontradas	30
4. Comparación de los estados de desarrollo en los aislados de mayor y de menor virulencia de <i>M. a. var. acridum</i>	34
5. Comparación entre la fase micelial y la fase levaduriforme del aislado de mayor virulencia (EH-502/8) y menor virulencia (EH-488/7) de <i>M. a. var. acridum</i>	37

**XIII. ÍNDICE DE FIGURAS**

	Pág.
1. Conidióforo de <i>M. a. var. acridum</i> en forma de candelabro con conidios organizados en cadenas	2
2. Proceso infectivo por hongos entomopatógenos	3
3. Caja de Petri con medio de cultivo (APD), que muestra el campo de observación donde se monitorizó el conidio de <i>M. a. var. acridum</i>	15
4. Sitio de inoculación (pronoto) de la langosta <i>S. piceifrons</i>	17
5. Fragmentos de langosta fijados en una solución de glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4	18
6. Conidios colapsados de <i>M. a. var. acridum</i>	20
7. Conidios elipsoidales de <i>M. a. var. acridum</i> , obtenidos a 28°C	21
8. Detalle de conidios de <i>M. a. var. acridum</i>	21
9. Desarrollo enteroblástico de <i>M. a. var. acridum</i>	21
10. Blastosporas colapsadas de <i>M. a. var. acridum</i> , obtenidas a 37°C	22
11. Blastosporas de <i>M. a. var. acridum</i> , obtenidas a 37°C	22
11. Blastosporas de <i>M. a. var. acridum</i> , obtenidas a 37°C	23
12. Corte semifino que muestra los espacios dejados por los conidios de <i>M. a. var. acridum</i>	23
13. Cortes finos de conidios dañados de <i>M. a. var. acridum</i>	24
14. Conidio de <i>M. a. var. acridum</i> , donde se observa la típica citología	24
15. Hifa ramificada de <i>M. a. var. acridum</i>	25
16. Hifa y conidio de <i>M. a. var. acridum</i>	25
17. Conidio de <i>M. a. var. acridum</i> , que muestra el paso de material citoplasmático hacia el tubo germinal,	

en cuyo ápice se observa material mucilaginoso	25
<b>18.</b> Blastosporas dañadas de <i>M. a. var. acridum</i> , obtenida a 37°C	26
<b>19.</b> Blastospora de <i>M. a. var. acridum</i> , en gemación	27
<b>20.</b> Blastospora de <i>M. a. var. acridum</i> , en gemación	27
<b>21.</b> Estructuras con un septo central de <i>M. a. var. acridum</i>	28
<b>22.</b> Seudohifas de <i>M. a. var. acridum</i>	28
<b>23.</b> Blastospora de <i>M. a. var. acridum</i> con mucilago alrededor	29
<b>24.</b> Blastospora de <i>M. a. var. acridum</i> con cuerpos de Woronin cerca del septo	29
<b>25.</b> Cambios morfológicos del aislado de <i>M. a. var. acridum</i> de mayor virulencia (EH-502/8) vistos con microscopía fotónica, <i>in vitro</i> a 37°C	32
<b>26.</b> Hifa en espiral de <i>M. a. var. acridum</i>	34
<b>27.</b> Conidióforo del aislado EH-488/7 de <i>M. a. var. acridum</i>	34
<b>28.</b> Propágulos de <i>M. a. var. acridum</i>	35
<b>29.</b> Propágulos de <i>M. a. var. acridum</i> (EH-502/8), en el hemocele de <i>S. piceifrons</i>	38
<b>30.</b> Propágulos de <i>M. a. var. acridum</i> , en el hemocele de la langosta con HE	39
<b>31.</b> Conidios de <i>M. a. var. acridum</i> , en la cutícula de la langosta	40
<b>32.</b> Tubo germinal de <i>M. a. var. acridum</i> , penetrando la cutícula del insecto	40
<b>33.</b> Apresorio de <i>M. a. var. acridum</i> en la cutícula de la langosta	41
<b>34.</b> Seudohifas de <i>M. a. var. acridum</i> en el hemocele de la langosta	41
<b>35.</b> Conidióforo de <i>M. a. var. acridum</i> en la superficie de la langosta	42
<b>36.</b> Conidios catenulados de <i>M. a. var. acridum</i>	42

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Altre, J. A. & Vandenberg J. D.** 2001. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against Lepidopteran larvae. *J Invertebr Pathol* **78**: 81-86.

**Alves, B. S., Savoi, L., Biaggioni, R., Tamai, M. A. & Pereira, R. M.** 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J Invertebr Pathol* **81**: 70-77.

**Arthurs, S., Thomas, B. M. & Langewald, J.** 2003. Field observations of the effects of fenitrothion and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on non-target ground dwelling arthropods in the Sahel. *Biol Control* **26**: 333-340.

**Askary, H., Benhamou, N. & Brodeur, J.** 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* **74**: 1-13.

**Barrientos, L. L. & Milner, R. J.** 2001. Uso actual y potencial de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* para el control biológico de acridoideos en América Latina. *In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5. pp. 43-48.

**Bateman, R.** 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook Agri* **26**(1): 13-18.

**Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A. & Khachatourians, G. G.** 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia* **99**: 77-83.

**Borges-Walmsley, M. I. & Walmsley, A. R.** 2000. cAMP-signaling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**: (3) 133-141.

**Butt, T. M., Jackson, C. W., Magan, N. & Magan, N.** 2001. Fungal biological control agents. *In: Butt, T. M., Jackson, C. & Magan, N.* Eds. Fungi as biocontrol agents. progress, problems and potential. CABI Publishing, U. K. pp.390. pp. 1-8.

**Calderone, R., Diamond, R., Senet, J. M., Warmington, J., Filler, S. & Edwards, J. E.** 1994. Host cell- fungal interactions. *J Med Vet Mycol* **32** (Suppl. 1): 151-168.

**Cano- Ramírez, R. C., García, G. K., Hernández- Velázquez, V. M. Berlanga, A. M. & Toriello, C.** 2002. Diferencia en la virulencia de cultivos monospóricos de aislados de México de *M. anisopliae* var. *acidum* en langosta *Schistocerca*

*piceifrons*, p. 407. In: Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología. Guzmán, G., & G. Mata (eds.), Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México.

**Charnley, A.K. & St. Leger, R. J.** 1989. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole, G. T. & Hoch, H. C. (eds.). The fungal spore and disease. Initiation in plants and animals. Plenum Press, New York, pp. 267-283.

**Clarkson, J. M. & Charnley, A. K.** 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* **4**: 199-203.

**Cole, G. T.** 1981. Conidiogenesis and conidiomatal ontogeny. In: Biology of Conidial Fungi. Academic Press, pp. 271-326.

**Dara, S. K. & Semtner, P. J.** 1998. Influence of Substrate Type and Temperature on the Developmental Morphology of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales), a Pathogen on the Tobacco Aphid (Homoptera: Aphididae). *J Invertebr Pathol* **72**: 112-118.

**Fargues, J., Smits, N., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G. & Quimby, P.** 2001. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* **154**: 127-138.

**Gow, A. R., Brown, A. J. & Odds, F.** 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opin Microbiol* **5**: 366-371.

**Gillespie, J. P., Burnett, C. & Charnley, A. K.** 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *J. Insect Physiol* **46**: 429-437.

**Gillespie, J. P. & Kanost, R. M.** 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann Rev Entomol* **42**: 611-643.

**Gunnarsson, S. G.** 1988. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. *J Invertebr Pathol* **52**: 19-17.

**Hernández-Velázquez, V. M.** 2001. Estrategia de control biológico *Schistocerca piceifrons* Walker. In: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. SAGARPA (eds.), Mérida, Yuc., Octubre 2-5. pp. 16

**Hernández-Velázquez, V. M. & Berlanga, P. A.** 1998. Efecto de dos temperaturas sobre la virulencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en adultos de langosta

*Schistocerca pceifrons piceifrons* Walker. In: Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Entomología. Acapulco, Gro., 24 al 27 Mayo. p. 231-241

**Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga, P. A. & Garza, E. G.** 1997. Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia* **4**(9): 45-46.

**Humphreys, A. M., Matewale, P. A., Trinci, P. I & Gillesme, A. T.** 1989. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* in batch and fed-catch culture. *Mycol Res* **92**: 257-264.

**Inch, J. M. M. & Trinci, A. P.** 1987. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J Gen Microbiol* **133**: 247-252.

**Inch, J. M.M., Humphreys, A. & Trinci, A. P.** 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans Br Mycol Soc* **87**: 215-222.

**Jackson, M. A. & Cliquet, S.** 1995. Effect of the relative humidity of air-drying on survival of liquid culture produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. Proceedings of 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Ithaca, N Y, p. 30.

**Jackson, M. A., Cliquet, S. & Iten, L. B.** 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci Technol* **13**: 23-33.

**Jackson, M. A., McGuire, M. R., Lacey, L. A., Wraight, S. P.** 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res* **101**: 35-41.

**Jenkins, N. E. & Prior, C.** 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol Res* **101**: 35-43.

**Jiménez-Gutiérrez, P.** 2003. Propágulos fúngicos de *M. anisopliae* de langosta (Orthoptera: Acrididae) en México, en diferentes medios y condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.

**Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S. & Zimmerman, G.** 2004. Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia. *Mycol Res* **108**: 93-100.

- Kleespies, R & Zimmermann, G.** 1992. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci Technol* **2**: 127-135.
- Kumar, V., Singh, G. P., Kumar, V., Babu, A. M. & Datta, R. K.** 1997. SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. *Mycopathologia* **138**: 141-144.
- Latgé, J. P. & Moletta, R.** 1998. In Atlas of Entomopathogenic Fungi, (ed. R. A. Samson, H. C. Evans & J. P. Latgé ). Springer- Verlag Berlín. Pp 12-164.
- Lengeler, K, B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Waugh, M. & Heitman, J.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785.
- Li, D. P. & Holdom, D. G.** 1995. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Invertebr Pathol* **65**: 253-260.
- Lima, E. H. D. L. A. & Tigano, M. S.** 1989. Cytology of the yeast- like structures of *Beauveria bassiana* in liquid media and in the hemolymph of *Spodoptera frugiperda*. *Rev Microbiol* **20**: 85-94.
- Liu, H. P.** 2001. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**:728-735.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. & Thomas, M.** 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol.* **46**: 667-702.
- Lübbehüsen, T., González, V., Rossi, S., Nielsen, J., Moreno, S., McIntyre, M. & Arnau, J.** 2004. Protein kinase A is involved in the control of morphology and branching during aerobic growth of *Mucor circinelloides*. *Microbiology* **150**: 143-150.
- Madhani, H. D. & Fink, G. R.** 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**: 348-353.
- Milner, R. J.** 1997. *Metharizium flavoviride* (F1985) as a promising mycoinsecticide for Australian acrididids. *Mem Entomol Soc Can* **171**: 287-300.
- Montoya-Sansón, E. I.** 2003. Propágulos fúngicos de *M. anisopliae* de mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) aislados en México, en diferentes medios y condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.

- Monzón, A.** 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* **63**: 95-103.
- Nicholson, R. L., Kunoh, H., Shiraishi, T. & Yamada, T.** 1993. Initiation of the infection process by *Erysiphe graminis* conversion of the conidial surface from hydrophobicity to hydrophilicity and influence of the conidial exudates on the hydrophobicity of the barley leaf surface. *Physiol Mol Plant Pathol* **43**: 307-318.
- Pendland, J. C., Hung, S. Y. & Boucias, D.** 1995. *In vivo* development of the entomogenous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* larvae. *Mycopathologia* **130**: 151-158.
- Prior, D., Lomer, C. J., Herren, H., Paraíso, A., Kooyman, C. & Smith, J. J.** 1992. The IIBC/ITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locust and grasshoppers. *In*: Lomer, C. J. & Prior, C. (eds.), Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, Wallingford, Inglaterra. pp. 8-18
- Ouedraogo, R. M., Kamp, A., Goettel, M. S., Brodeur, J. & Bidochka, M. J.** 2002. Attenuation of fungal infection in thermoregulating *Locusta migratoria* is accompanied by changes in hemolymph proteins. *J Invertebr Pathol* **81**: 19-24.
- Rombach, M. C., Humber, R. A. & Roberts, D. W.** 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov. A pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. *Mycotaxon* **27**: 87-92.
- Ruiz- Herrera, J. & Sentandreu, R.** 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* **178**: 477-483.
- Samsinakova, A., Kalalova, S., Vicek, V. & Kybal, J.** 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J Invertebr Pathol* **38**: 169-174.
- Samson, R. A., Evans, H. C. & Latgé, J. P.** 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer- Verlag, The Netherlands.
- Sánchez- Martínez, C. & Pérez- Martín, J.** 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*- similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**: 214-221.
- Scalan, J. C., Grant, W. E., Hunter, D.M. & Milner, R. J.** 2001. Habitat and environmental factors influencing the control of migratory locusts (*Locusta migratoria*) with an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*). *Ecol Model* **136**: 223-236.

- Schreiter, G., Butt, T. M., Vestergaard, S. & Moritz, G.** 1994. Invasion and development of *Verticillium lecani* in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Mycol Res.* **98**: 1025-1034.
- Sudbery, P., Gow, N. & Berman, J.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **5**:1-8
- Szabo, R. & Stofaníková, V.** 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 45-50.
- Szanislo, P. J.** 1985. Fungal dimorphism with emphasis of fungi pathogenic for Humans. Plenum Press, New York.
- Ulloa, M. & Hanlin, R. T.** 2000. Illustrated Dictionary of Mycology. APS Press, St. Paul, Minnesota. 283 pp.
- Vega- García, F.** 2004. Toxicidad y patogenicidad aguda oral del hongo de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* EH-502/8. Tesis de Licenciatura de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.
- Vestergaard, S., Butt, T. M., Bresciani, A. T., Eilenberg, 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*. *J Invertebr Pathol* **73**: 25-33.
- Vey, A. & Fargues, J.** 2004. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *J Invertebr Pathol* **30**: 207-215.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. A. & Jackson, A. M.** 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* **143**: 33-46.
- Vanden Bossche, A., Odds, F. C. & Kerridge, D.** 1993. Dimorphic fungi in biology and medicine, Plenum Press, New York.
- Wraight, S. P., Jackson, M.A & Kock, S. L.** 2001. Production stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *In*: But, T. M., Jackson & Magan, N. (eds.) Fungi as biocontrol agents, CAB international, pp. 253-287.