



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

“Evaluación de la persistencia y viabilidad del hongo *Metarhizium acridum* en el ambiente de zonas rurales al ser aplicado como agente microbiano para el control biológico de ortópteros”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

César Guerrero Guerra

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Centro de Ciencias de la Atmósfera

COMITÉ TUTOR: Dra. Concepción Toriello Nájera

Facultad de Medicina

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Facultad de Medicina

TUTOR INVITADO: Dr. Daniel Piñero Dalmau

Instituto de Ecología

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2013.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **CÉSAR GUERRERO GUERRA** con número de cuenta **96504640** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA Y VIABILIDAD DEL HONGO *Metarhizium acridum* EN EL AMBIENTE DE ZONAS RURALES AL SER APLICADO COMO AGENTE MICROBIANO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE ORTÓPTEROS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DR. MIGUEL ARMANDO ULLOA SOSA
Secretario: DR. ZENÓN CANO SANTANA
Suplente: DRA. JULIETA RAMOS ELORDUY BLÁSQUEZ
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de abril de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente

AGRADECIMIENTOS

- ◆ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de cursar el Doctorado y también por todo el apoyo brindado para la realización de estos estudios.

- ◆ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por beca otorgada durante la realización de estos estudios. Número de CVU 176135 y número de registro de becario 203979. También se agradece el apoyo económico conjunto brindado por la Royal Society of London y PAPIIT (IN213303 y IN206504) para la realización del proyecto “Detección molecular de esporas del aire de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en cultivos agrícolas controlados biológicamente contra la langosta *Schistocerca piceifrons* spp. *Piceifrons*”

- ◆ Al inestimable apoyo dado por mi comité tutorial: Dra. Concepción Toriello Nájera, a la Dra. María del Rocío Reyes Montes y al Dr. Daniel Piñero Dalmau por sus observaciones, aportaciones, sugerencias y toda la ayuda otorgada para la realización de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

- ◆ A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las herramientas teóricas y técnicas brindadas para mi formación personal.
- ◆ Al Centro de Ciencias de la Atmósfera por permitirme realizar esta tesis en sus instalaciones y por haberse convertido en mi segundo hogar durante el tiempo de realización de este trabajo.
- ◆ A los Sinodales: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dra. Julieta Ramos Elorduy Blásquez, a la Dra. María del Rocío Reyes Montes, al Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa y al Dr. Zenón Cano Santana, por sus oportunas observaciones, aportaciones y sugerencias en la revisión de este trabajo.
- ◆ Al Dr. Victor Hernández Velázquez por su apoyo técnico para la obtención de los aislamientos de *M. acridum* y en las aspersiones en campo.
- ◆ A la Dra. Lucía Mora Palomino por la ayuda brindada para los análisis de suelo.
- ◆ A las Dras. María Frías de León y Esperanza Duarte por su ayuda en los procesos de biología molecular y a la M. en C. Hortensia Navarro Barranco y a la Q.F.B. Amelia Pérez Mejía por su apoyo en las técnicas de cultivo de hongos.
- ◆ Al M. en C. Miguel Meneses por la construcción del minitúnel de viento y a los Ingenieros Wilfrido Gutiérrez Lopez y Manuel León García Espinosa por todo su apoyo técnico en el manejo de los equipos.
- ◆ Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Yucatán y a la Junta Local de Sanidad Vegetal de Tizimín por su ayuda en los experimentos en campo.
- ◆ Al Presidente Auxiliar de San Mateo Coatepec, Paulino Valle, por todo el apoyo brindado para la realización de los experimentos en campo.

Agradecimientos muy especiales

- ◆ A mi directora de tesis, Dra. Maria del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, por haberme dado la oportunidad de hacer este trabajo, por su inestimable guía y apoyo, por darme ánimos cuando las cosas parecían no funcionar, por su gran paciencia durante todo el proceso de publicación del artículo y finalmente por convertirse en una persona muy importante en mi vida.

- ◆ A mis compañeros del Laboratorio de Bioindicadores Moleculares de Contaminación Ambiental por su amabilidad y ayuda: Adriana, Erika, Vicky, Tania, Fernando, Claudia, Fidel, Marisol y Alberto.

- ◆ Finalmente agradezco de todo corazón a los buenos amigos conocidos durante mi paso por el Centro de Ciencias de la Atmósfera: gracias a Antonio, Selene, Emmanuel, Erika, Carolina, Rodrigo, Martha, Roció, Concepción, Isabel, Ana, Sofía, Alex, Alejandro, Leonel, y Hugo. No hay que olvidar a la señora Elena, a la señora Victoria, a la M. en C. Ana Rosa Flores, a la Dra. Josefina Cortes, a la Dra. Maria Elena Calderón, a la Dra. Judith y al Dr. Villalobos. Cuando llegué no esperaba encontrar tan buenas personas, y ya por ese solo hecho todo ha valido la pena.

Dedicado a:

A Dios

Son tantas las bendiciones otorgadas que fueron necesarias para la conclusión de esto, que necesitaría una enciclopedia de muchos tomos para agradecerlo como se debe. Me queda claro que Dios me puso en este camino por una razón y que debo hacer mi mejor esfuerzo en beneficio de los demás. Gracias.

Mi Amada esposa Ivonn Santiago López

Cuando entré al doctorado jamás me pasó por la cabeza que una de las más grandes recompensas sería encontrar al amor de mi vida. Agradezco a Dios que haya hecho que nos conociéramos, y a ti te agradezco todo tu apoyo para poder concluir con este proyecto, pero sobre todo por el amor que me tienes. Te agradezco haber soportado todos los sacrificios derivados de esto y toda la ayuda que me diste, Gracias.

Mi Mamá, Elena Guerra García y mi Papá, Guillermo Guerrero Hernández

Sin ustedes no estaría en este bello mundo y sin su esfuerzo, dedicación, sacrificios, protección y sobre todo amor, no sería la persona que soy ahora. Gracias por todo lo que han hecho por mí. Estoy orgulloso de ustedes y siempre le daré gracias a Dios por habérmelos dado como padres.

Mi abuelita Sara García López

Por haber estado con nosotros durante tantos años cuidándonos, queriéndonos y enseñándonos tantas cosas, la principal, que la familia es una de las cosas más importantes que pueda haber y una de las más grandes bendiciones de Dios. Mil gracias.

A mis hermanos, Diana, David y Guillermo

Gracias a ustedes por compartir conmigo tantos años de su vida. Me han enseñado muchas cosas y la principal es que ni un millar de amigos sustituiría nunca a un hermano, y mucho menos a ustedes 3. Los quiero mucho.

A mis abuelos Luisa Hernández, Guillermo Guerrero y Salvador Guerra

No estamos juntos ahora, pero sé que desde el cielo nos envían sus bendiciones y que están orgullosos de sus hijos y, espero, de sus nietos. Sé que algún día nos reuniremos de nuevo así que hasta luego.

A mi nueva gran familia Santiago López

Realmente fue una gran sorpresa y alegría que junto con Ivonn me llegara de premio extra una familia tan extraordinaria como ustedes. Gracias a Don Paulino, Sra. Claudia, Aarón, Audiel, Oscar y a Joselín. Todos nos han apoyado siempre de todas las formas posibles y de verdad me conmueve todo el cariño que nos tienen, y aunque lo duden, a ustedes también les debo haber podido concluir esto, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE CUADROS	6
CRÉDITOS DE FIGURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Los ortópteros	13
1.2 Biología	13
1.3 Comportamiento	15
1.4 Aspectos perjudiciales	16
1.5 Ortópteros plaga en México	17
1.5.1 Langostas	17
1.5.2 Chapulines o saltamontes	19
1.6 Manejo de ortópteros plaga por el gobierno mexicano	24
1.6.1 Campaña contra la langosta	24
1.6.2 Campaña contra el chapulín	25
1.7 Control biológico	28
1.8 Hongos del género <i>Metarhizium</i>	28
1.9 <i>Metarhizium acridum</i>	32
1.9.1 Proceso de infección	33
1.9.2 Uso de <i>M. acridum</i> como controlador biológico	36
1.9.3 Persistencia y viabilidad	37
1.9.4 Factores abióticos que afectan la viabilidad de <i>M. acridum</i>	39
1.9.4.1 Temperatura	39
1.9.4.2 Radiación Solar	40
1.9.4.3 Humedad	41
II. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo General	42
2.2 Objetivos Particulares	42
2.3 Justificación	43
2.4 Hipótesis	43
III. ANTECEDENTES	44
IV. METODOLOGÍA	49
4.1 Zonas de estudio	49
4.1.1 Tizimín	49
4.1.2 San Mateo Coatepec	50

4.2 Estandarización de las condiciones de extracción de ADN de <i>M. acridum</i>	51
4.2.1 Cultivo de <i>M. acridum</i>	51
4.2.1 Preparación de suspensiones de esporas para la extracción del ADN	51
4.2.3 Obtención de mechas de algodón inoculadas con <i>M. acridum</i>	51
4.2.4 Rompimiento de la pared de las esporas	51
4.2.5 Extracción del ADN	52
4.3 Detección de ADN de <i>M. acridum</i> utilizando oligonucleótidos AB28, TW81, Mac-ITS-spF y Mac-ITS-spR	52
4.3.1 Determinación de la sensibilidad	52
4.3.2 Detección en minitúnel de viento con mechas de algodón inoculadas con <i>M. acridum</i>	53
4.3.3 Detección de <i>M. acridum</i> en mezclas de múltiples hongos	54
4.3.4 Extracción y detección de ADN de <i>M. acridum</i> inoculado en muestras de suelo	54
4.4 Detección de ADN de <i>M. acridum</i> en muestras de campo de Tizimin	55
4.4.1 Detección de <i>M. acridum</i> en aire	55
4.4.2 Detección de <i>M. acridum</i> en suelo	56
4.5 Utilización de oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R	56
4.5.1 Estandarización de las condiciones de PCR para los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R y determinación de la sensibilidad	57
4.5.2 Determinación de la especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R	57
4.6 Detección de ADN de <i>M. acridum</i> en muestras de campo de San Mateo Coatepec, Puebla	59
4.6.1 Aspersión del hongo	59
4.6.2 Determinación de la persistencia	59
4.6.2.1 Colecta de muestras del suelo	59
4.6.2.2 Colecta de muestras de vegetación	60
4.6.2.3 Colecta de muestras del aire	60
4.6.2.4 Detección de ADN de <i>M. acridum</i> mediante trampa de esporas tipo Hirst	61
4.6.3 Análisis químico del suelo	62
4.6.4 Parametros climaticos	62
4.7 Análisis estadístico	62
V. RESULTADOS	63
5.1 Rompimiento de la pared de las esporas	63
5.2 Determinación de la sensibilidad para los oligonucleótidos AB28 y TW81 y Mac-ITS-spF y R	64
5.3 Detección en minitúnel de viento con mechas de algodón inoculadas con <i>M. acridum</i>	65
5.4 Detección de <i>M. acridum</i> en mezclas de múltiples hongos	67
5.5 Extracción y detección de ADN de <i>M. acridum</i> inoculado en muestras de suelo	68
5.6 Detección de <i>M. acridum</i> en aire de muestras de Tizimín	69
5.7 Detección de <i>M. acridum</i> en suelo de muestras de Tizimín	70
5.8 Estandarización de las condiciones de PCR y determinación de la sensibilidad para los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R	71
5.9 Determinación de la especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R	72
5.10 Detección de <i>M. acridum</i> en muestras de campo de San Mateo Coatepec, Puebla	73
5.11 Determinación de la persistencia	76
5.12 Detección de ADN de <i>M. acridum</i> mediante trampa de esporas tipo Hirst	79
5.13 Análisis estadístico	81
5.13.1 Correlaciones de UFC en el ambiente con parámetros meteorológicos	81
5.13.2 Análisis de Regresión múltiple	82
5.13.3 Correlaciones entre detección de ADN en aire y parámetros meteorológicos	83

5.13.4	Análisis de Regresión logística binaria.....	84
5.13.5	Correlaciones y análisis de regresión múltiple entre los parámetros fisicoquímicos del suelo y la cantidad de UFC encontradas en suelo.....	85
5.13.6	Análisis de regresión múltiple	85
VI.	DISCUSIÓN.....	87
6.1	Detección molecular de ADN de <i>M. acridum</i>	87
6.2	Optimización de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, 1R, 2F y 2R	88
6.3	Persistencia.....	89
6.4	Correlaciones con parámetros meteorológicos.....	93
6.5	Análisis de parámetros fisicoquímicos del suelo.....	95
6.6	Recomendación para el uso adecuado y eficiente de <i>M. acridum</i> en zonas rurales para lograr un control eficiente de chapulines y langostas.....	96
VII.	CONCLUSIONES	98
VIII.	LITERATURA CITADA.....	99
IX.	APÉNDICES	114

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. <i>Schistocerca piceifrons piceifrons</i> .	17
Fig. 2. <i>Sphenarium purpurascens</i> .	19
Fig. 3. <i>Melanoplus femurrubrum</i> .	20
Fig. 4. <i>Melanoplus differentialis</i> .	20
Fig. 5. <i>Melanoplus lakinus</i> .	20
Fig. 6. <i>Brachystola magna</i> .	21
Fig. 7. <i>Brachystola mexicana</i> .	21
Fig. 8. <i>Boopedon nubilum</i> .	22
Fig. 9. <i>Boopedon rufipes</i> .	22
Fig. 10. <i>Boopedon diabolicum</i> .	22
Fig. 11. <i>Idiarthron subquadratum</i> .	23
Fig. 12. <i>Taeniopoda eques</i> .	23
Fig. 13. <i>Mermiria bivittata</i> .	23
Fig. 14. Situación fitosanitaria de la campaña contra la langosta.	25
Fig. 15. Estados que operan la campaña contra el chapulín 2012.	26
Fig. 16. Colonia de <i>M. acridum</i> de 9 días a 28°C en medio Saburoud.	32
Fig. 17. Conidióforo de <i>M. acridum</i> en forma de candelabro con conidios organizados en cadenas.	32
Fig. 18. Fotomicrografía electrónica de barrido de conidios sobre la cutícula de la termita <i>Heterotermes tenui</i> .	34
Fig. 19. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando el tubo germinativo (GT) y apresorios (AP) desarrollado a partir de un conidio (CO). (d) Detalle de la degradación enzimática (ED) realizada por una hifa. Ambas fotos fueron tomadas sobre la cutícula de <i>Boophilus microplus</i> .	34
Fig. 20. Fotomicrografía de un corte longitudinal de la cutícula de <i>Boophilus microplus</i> teñido con ácido periódico de Schiff, mostrando numerosas hifas (H) en la cutícula (capa superior) y en tejidos adyacentes.	35
Fig. 21. Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando micelio de <i>Metarhizium</i> emergiendo del interior del cuerpo de la termita <i>Heterotermes tenui</i> (izquierda) y detalles de la conidiogénesis (derecha).	35
Fig. 22. Ubicación de Tizimín, Yucatán.	49
Fig. 23. Ubicación del poblado de San Mateo Coatepec, Puebla.	50
Fig. 24. Minitúnel de viento.	53
Fig. 25. Trampa de esporas Hirst.	55
Fig. 26. Tambor interno de la Trampa de esporas Hirst.	55
Fig. 27. Trozo de cinta de celofán Melinex.	55
Fig. 28. Muestreador de partículas viables de un paso (Andersen).	61
Fig. 29. Fotomicrografía de esporas de <i>M. acridum</i> antes (a) y después (b) de ser sometidas a un ciclo de molienda en equipo Fast-prep.	63
Fig. 30. PCR de curva de concentración de esporas con los oligonucleótidos AB28 y TW81.	64
Fig. 31. PCR de curva de concentración de esporas con los oligonucleótidos MacITSsp.	64
Fig. 32. Fotomicrografía de esporas de <i>M. acridum</i> en suspensión.	65
Fig. 33. Fotomicrografía de esporas de <i>M.</i> en cintas de celofán muestreadas en minitúnel de viento.	65
Fig. 34. PCR de experimentos en minitúnel de vientos con los oligonucleótidos AB28 y TW81.	66
Fig. 35. PCR de experimentos en minitúnel de vientos con los oligonucleótidos MacITSsp.	66
Fig. 36. PCR de experimentos en minitúnel de viento en presencia de múltiples hongos con los oligonucleótidos AB28 y TW81. El número indica el día y (al) indica uso de amortiguador de lisis.	67
Fig. 37. PCR de experimentos en minitúnel de vientos en presencia de múltiples hongos con los oligonucleótidos MacITSsp. El número indica el día y (al) indica uso de amortiguador de lisis.	67
Fig. 38. PCR con oligonucleótidos AB28 y TW81 de muestras de suelo, con y sin albúmina sérica bovina (ASB).	68
Fig. 39. PCR con oligonucleótidos Mac-ITS-spF y R de muestras de suelo, con y sin albúmina sérica bovina (ASB).	68

Fig. 40. PCR de muestras colectadas con la trampa de esporas en Tizimín mediante oligonucleótidos AB28 y TW81 durante la primera semana de noviembre de 2005.	69
Fig. 41. PCR de muestras colectadas con la trampa de esporas en Tizimín mediante oligonucleótidos AB28 y TW81 durante la primera semana de noviembre de 2005.	69
Fig. 42. PCR con oligonucleótidos AB28 y TW81 de muestras de suelo de Tizimín, Yucatán. SI (San Isidro), SM (Santa Martha), XC (X-Campech).	70
Fig. 43. PCR con oligonucleótidos Mac-ITS-spF y R de muestras de suelo de Tizimín, Yucatán. SI (San Isidro), SM (Santa Martha), XC (X-Campech).	70
Fig. 44. PCR con oligonucleótidos Opa OPA-04(526) 1F, IR (foto A) y Opa OPA-04(526) 2F, 2R (foto B) de suspensiones de conidios decrecientes (M: marcador 100 pb, T+: testigo positivo, T-: testigo negativo).	71
Fig. 45. PCR de cepas de referencia del género <i>Metarhizium</i> con oligonucleótidos OPA-04(526) 2F, 2R. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo negativo, 3: <i>M. acridum</i> (México), 4: <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> , 5: <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> , 6: <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> , 7: <i>M. flavoviride</i> tipo e, 8: <i>M. acridum</i> (Australia), 9: <i>M. acridum</i> (México), 10: <i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i> , 11: <i>M. acridum</i> (Nigeria), 12: <i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i> .	72
Fig. 46. PCR de cepas de referencia del género <i>Metarhizium</i> con oligonucleótidos Mac-Its spF y R. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo negativo, 3: <i>M. acridum</i> (México), 4: <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> , 5: <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> , 6: <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> , 7: <i>M. flavoviride</i> tipo e, 8: <i>M. acridum</i> (Australia), 9: <i>M. acridum</i> (México), 10: <i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i> , 11: <i>M. acridum</i> (Nigeria), 12: <i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i> .	72
Fig. 47. Hongos colectados del aire antes de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Muestreo de 15 min.	73
Fig. 48. Hongos colectados del aire después de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Muestreo de 15 min.	73
Fig. 49. Hongos colectados de la vegetación antes de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Dilución 10^{-2} .	74
Fig. 50. Hongos colectados de la vegetación después de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Dilución 10^{-2} .	74
Fig. 51. Hongos colectados del suelo antes de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Dilución 10^{-2} .	74
Fig. 52. Hongos colectados del suelo después de asperjar <i>M. acridum</i> en campo. Dilución 10^{-2} .	74
Fig. 53. PCR de diversas muestras colectadas de aire, vegetación y suelo. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo positivo, 3: testigo negativo, 4: muestra de aire después de la aspersion, 5: muestra de vegetación después de la aspersion, 6: muestra de suelo después de la aspersion, 7: muestra de aire antes de la aspersion, 8: muestra de vegetación antes de la aspersion, 9: muestra de suelo antes de la aspersion.	75
Fig. 54. Concentración de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008. (Las barras indican el error estándar).	76
Fig. 55. Concentración de unidades formadoras de colonias por gramo de vegetación (UFC/g) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008. (Las barras indican el error estándar).	77
Fig. 56. Concentración de unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m ³) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008 (las barras indican el error estándar). Los asteriscos indican que también se detectó presencia de ADN de <i>M. acridum</i> con la trampa de esporas Hirst.	78
Fig. 58. Fotomicrografía a 200 aumentos mostrando diversas partículas biológicas, sin presencia aparente de conidios de <i>M. acridum</i> . El muestreo se llevó a cabo 9 semanas después de la aspersion.	79
Fig. 57. Fotomicrografía a 200 aumentos mostrando conidios de <i>M. acridum</i> en la parte central así como otras partículas biológicas, capturadas durante la primera semana de muestreo.	79
Fig. 59. Detección de <i>M. acridum</i> en aire mediante trampa de esporas Hirst.	80

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Aislamientos de hongos entomopatógenos de acuerdo al sitio donde fueron colectados.</i>	31
<i>Cuadro 2. Especies del género <i>Metarhizium</i> utilizadas en el análisis de especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R.</i>	58
<i>Cuadro 3. Porcentaje de esporas rotas de acuerdo al número de periodos de molienda.</i>	63
<i>Cuadro 4. Días en que se detectó ADN de <i>M. acridum</i> en aire mediante PCR en cintas de trampa de esporas Hirst.</i>	80
<i>Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson entre el número de UFC encontradas en suelo, vegetación y aire, y los datos de precipitación, temperatura y velocidad del viento máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 18 (suelo), 12 (vegetación), 11 (aire).</i>	81
<i>Cuadro 6. Coeficientes de correlación de Pearson entre el número de UFC encontradas en suelo, vegetación y aire, y los datos de evaporación potencial, velocidad de viento promedio, humedad relativa, avapotranspiración de referencia y radiación solar máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 18 (suelo), 12 (vegetación), 11 (aire).</i>	81
<i>Cuadro 7. Coeficientes de correlación Tau de Kendall entre la presencia positiva de ADN de <i>M. acridum</i>, y los datos de precipitación, temperatura y velocidad del viento máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 30.</i>	84
<i>Cuadro 8. Coeficientes de correlación Tau de Kendall entre la presencia positiva de ADN de <i>M. acridum</i>, y los datos de evaporación potencial, velocidad de viento promedio, humedad relativa, avapotranspiración de referencia y radiación solar máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 30.</i>	84
<i>Cuadro 9. Correlaciones y su nivel de significancia entre la cantidad de UFC de <i>M. acridum</i> presentes en el suelo y los parámetros químicos registrados.</i>	85
<i>Cuadro 10. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>M. acridum</i> cuantificadas en suelo, vegetación y aire en la zona de estudio.</i>	114
<i>Cuadro 11. Parámetros químicos del suelo durante 14 fechas de evaluación.</i>	115
<i>Cuadro 12. Datos de precipitación, temperatura y velocidad y dirección del viento máximas registrados en cada día de muestreo.</i>	115
<i>Cuadro 13. Datos de dirección de viento promedio, humedad relativa, evapotranspiración de referencia, evaporación potencial, velocidad de viento promedio y radiación solar máxima registrados en cada día de muestreo.</i>	115

CRÉDITOS DE FIGURAS

Las siguientes figuras fueron tomadas de diversas fuentes y se cita el nombre o seudónimo del autor, el año en que se publicó y la página web (siempre que la información estuviera disponible). En algunos casos las figuras corresponden a artículos y la cita completa se encuentra en la sección de referencias bibliográficas.

Figura 1. *Schistocerca piceifrons piceifrons* (SENASICA, 2012) url:

[http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=imagenes/UID_849/IMG_7074\(6\).JPG&maxW=540&maxH=540](http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=imagenes/UID_849/IMG_7074(6).JPG&maxW=540&maxH=540)

Figura 2. *Sphenarium purpurascens* Charpentier, 1842. (Hector Mialma) url:

<http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5109098>

Figura 3. *Melanoplus ferrumubrum* (Gilles Gonthier) url:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fc/Melanoplus_femurrubrum_20070903.jpg/220px-Melanoplus_femurrubrum_20070903.jpg

Figura 4. *Melanoplus differentialis* (SENASICA, 2012) url:

http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=imagenes/UID_979/01%20Melanoplus%20differentialis.jpg&maxW=540&maxH=540

Figura 5. *Melanoplus lakinus* (Margarethe Brummermann) url:

<http://bugguide.net/node/view/586857/bqimage>

Figura 6. *Brachystola magna* (gilmoregirlz, 2008). url:

<http://bugguide.net/images/raw/Y05QO0GQF0NQ30GQPKKKA0PQT0EQV0PQT0PQD0ZK9KHK102QC04QD02Q2K7KJ07KY08KF08KF0WQRS.jpg>

Figura 7. *Brachystola mexicana* (SENASICA, 2012) url:

http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=imagenes/UID_979/02%20Brachystola%20mexicana%20nifa.jpg&maxW=540&maxH=540

Figura 8. *Boopedon nubilum* (JerryFriedman, 2009) url:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e6/Boopedon_nubilum_male1.jpg/719px-Boopedon_nubilum_male1.jpg

Figura 9. *Boopedon rufipes* (Hebard. 1932) url:

<http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/ShowImage.aspx?TaxonNameID=47274&ImageID=50997>

Figura 10. *Boopedon diabolicum* (P.Garcia) url:

<http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/ShowImage.aspx?TaxonNameID=47269&ImageID=73525>

Figura 11. *Idiarthron subquadratum* url: <http://www2.tap-ecosur.edu.mx/mip/fotos/Chacuatete3.jpg>

Figura 12. *Taeniopoda eques* (Matthew Schallan, 2011) url:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/67/Taeniopoda_eques_%28western_horse_I

[ubber_grasshopper%29.jpg/450px-Taeniopoda_eques_%28western_horse_lubber_grasshopper%29.jpg](#)

Figura 13. *Mermiria bivittata* (Aaron Goodwin, 2008). url: <http://bugguide.net/node/view/609930>

Figura 14. Situación fitosanitaria de la campaña contra la Langosta (SENASICA, 2012)
url:http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=images/UID_624/11estatuslangostaseptiembre.jpg&maxW=650&maxH=650

Figura 15. Estados que operan la campaña contra el chapulín 2012 (SENASICA,2012) url:
http://www.senasica.gob.mx/Includes/asp/resize.asp?ruta=images/UID_952/campa%F1a%20chapulin.jpg&maxW=650&maxH=650

Figura 17. Conidióforo de *M. acridum* en forma de candelabro con conidios organizados en cadenas (Jiménez-Gutierrez, 2006).

Figura 18. Fotomicrografía electrónica de barrido de conidios sobre la cutícula de la termita *Heterotermes tenui* (Moino *et al.*, 2002).

Figura 19. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando el tubo germinativo (GT) y apresorios (AP) desarrollado a partir de un conidio (CO). (d) Detalle de la degradación enzimática (ED) realizada por una hifa. Ambas fotos fueron tomadas sobre la cutícula de *Boophilus microplus* (Arruda *et al.*, 2005).

Figura 20. Microfotografía de un corte longitudinal de la cutícula de *Boophilus microplus* teñido con ácido periódico de Schiff, mostrando numerosas hifas (H) en la cutícula (capa superior) y en tejidos adyacentes. (Arruda *et al.*, 2005).

Figura 21. Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando micelio de *Metarhizium* emergiendo del interior del cuerpo de la termita *Heterotermes tenui* (izquierda) y detalles de la conidiogénesis. (Moino *et al.*, 2002).

RESUMEN

Las langostas son una de las principales plagas en México, seguidas por los chapulines y saltamontes. Sus efectos devastadores cubren numerosos estados de la República Mexicana y generan importantes pérdidas económicas. El hongo entomopatógeno *Metarhizium acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) ha sido empleado desde hace tiempo en México como agente microbiano para el control biológico de estos insectos. No obstante, aún permanecen sin dilucidar preguntas sobre la persistencia y viabilidad del hongo a largo plazo después de que ha sido asperjado en campo. En este estudio se desarrolló una técnica para detectar la presencia de conidios del aire del hongo *M. acridum* con gran precisión. Los conidios del aire fueron colectados mediante el uso de una trampa de esporas tipo Hirst. Se optimizó el método de extracción de ADN para conseguir el mayor recobro posible. Mediante el empleo de la prueba de PCR con oligonucleótidos específicos fue posible lograr la detección de hasta un sólo conidio, y se realizaron experimentos en un mini-túnel de viento para validar el método antes de su aplicación en campo. Subsecuentemente, esta técnica fue aplicada en una región agrícola de México, donde *M. acridum* fue asperjado para el control del saltamontes *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *M. acridum* fue asperjado durante agosto y octubre de 2007. Se monitoreó su presencia en aire, suelo y en la cubierta vegetal utilizando métodos moleculares y técnicas de cultivo. Los resultados mostraron que el hongo se mantuvo viable en suelo durante todo el período de seguimiento (66 semanas). Su población fluctuó de manera marcada, pero alcanzó hasta cuatro veces su concentración inicial y disminuyó hasta la mitad hacia el final del estudio. Las concentraciones iniciales del hongo en aire y en la cubierta vegetal decayeron de manera sostenida (con algunos pequeños incrementos) hasta su completa desaparición después de 8 meses. Por lo tanto, las aspersiones de *M. acridum* deben realizarse de manera frecuente (semanalmente) para lograr un mejor control de las plagas y es necesario determinar si la acumulación observada puede ser dañina para las personas expuestas u organismos no-blanco.

ABSTRACT

Locusts are one of the most predominant agricultural pests in Mexico, followed by non-migratory grasshoppers. Their devastating effects cover numerous Mexican states, generating important economic losses. *Metarhizium acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) has been employed in Mexico as a microbial agent for biological control for some time. However, questions related to the long-term persistence and viability of the fungus after it has been sprayed over crop fields remain to be elucidated. We describe a technique to detect the presence of airborne conidia from the fungus *M. acridum* with great accuracy. Airborne conidia were collected using Hirst-type spore traps. DNA extractions were optimized to achieve the best possible recovery. DNA was examined using polymerase chain reaction (PCR) with specific oligonucleotides to enable detection of a single conidium. Experiments using a mini-wind tunnel were conducted to validate the method. Subsequently, this technique was applied to an agricultural region of Mexico, where *M. acridum* was sprayed to control the grasshopper, *Sphenarium purpurascens*, population (Orthoptera: Pyrgomorphidae). The fungus *M. acridum* was sprayed during August and October 2007. Its presence in the air, soil, and vegetative cover was subsequently monitored using molecular methods and culture techniques. The results showed that the fungus was viable on the soil during the follow-up period (66 weeks). Its population fluctuated markedly, however, reaching four times its initial concentration and later decreasing to nearly half its initial concentration by the end of the study. The initial concentrations of the fungus in the air and in the vegetative cover decayed steadily (with some small, isolated recoveries) until its complete disappearance after eight months. Therefore, fungal spraying of *M. acridum* must be frequent (on a weekly basis) to achieve a better control of plagues and it is necessary to determine whether the cumulative concentrations over time could be harmful to non-target species or people exposed.

I. INTRODUCCIÓN

Las langostas y saltamontes son plagas comunes y altamente impredecibles. Son causantes de enormes pérdidas a los cultivos en todo el mundo, y cuando se dan las condiciones climáticas favorables para la eclosión de los huevos y el crecimiento de las plantas, las poblaciones pueden incrementarse rápidamente dando como resultado una conducta gregaria y migratoria. Si no se aplican medidas de control apropiadas y contundentes se pueden formar plagas con capacidades devastadoras. Esto ha ocurrido recientemente con la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* (Forskäl) en la cuenca del Mar Rojo en 1986 y en 1992, con la langosta migratoria *Locusta migratoria capito* (Sauss) en Madagascar en 1995, y con la langosta italiana *Calliptamus italicus* en Kazajstán en 1997 (Lomer *et al.*, 2001).

Los primeros intentos de control con plaguicidas químicos se basaron en el uso del compuesto organoclorado dieldrín, pero debido a su persistencia e impacto ambiental se procedió a sustituirlo por plaguicidas organofosforados, menos persistentes, como el fenitrotión y el malatión y la búsqueda de plaguicidas químicos menos tóxicos continua haciendo que se utilicen, actualmente, además de los organofosforados, carbamatos, piretroides y reguladores del crecimiento. Sin embargo, no se han podido eliminar del todo los efectos negativos sobre la vida silvestre, fuentes de agua y los mismos seres humanos causados por el uso de los plaguicidas químicos, tal como demostró una revisión de 1994 (Murphy *et al.*, 1994) en la que se encontró que los plaguicidas causaban mortalidades de más del 90 % en especies no-blanco; por ello, los programas integrales del manejo de plagas han buscado alternativas que conlleven a la reducción de la cantidad de plaguicidas que se aplican, sin que ello conlleve a una disminución en la eficiencia del control de las plagas (Lomer *et al.*, 2001).

El control biológico con patógenos desempeña un papel importante en las estrategias integrales de control de plagas y la utilización de hongos entomopatógenos como agentes microbianos en el control biológico de plagas representa una alternativa eficiente, que conjuntamente con otras medidas puede ser utilizada en la lucha biológica en programas de manejo integrado de plagas agrícolas (Alves, 1986; Prior y Greathead, 1989). Los hongos biorreguladores de plagas son parásitos de insectos perniciosos y sus repercusiones en los agroecosistemas carecen del costo ambiental que conlleva el uso de los plaguicidas químicos, y por lo general son inocuos para la salud

humana, de animales y de plantas (Mier *et al.*, 1989; Laird *et al.*, 1990; Mier *et al.*, 1994; Toriello *et al.*, 1999; Toriello, 2001).

Uno de los principales géneros de hongos entomopatógenos conocidos es el de *Metarhizium*. Este hongo de distribución cosmopolita fue inicialmente detectado en homópteros y evaluados en Filipinas contra el delfácido del arroz *Nilaparvata lugens* Stal. Posteriormente, fue reportado en Australia y las Islas Galápagos, Brasil, Madagascar (Goettel *et al.*, 1995) y México (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997), entre otras regiones. Desde entonces ha sido utilizado ampliamente como controlador biológico de insectos, principalmente de acrídidos. Sin embargo, se sabe poco acerca de cuestiones ecológicas básicas de *M. acridum*, principalmente en agroecosistemas (Meyling y Eilenberg, 2007). Es amplio el desconocimiento de aspectos tales como la posible presencia de poblaciones silvestres en los cultivos antes de la aplicación del hongo, así como los mecanismos de dispersión (incluidos los dependientes del aire), la persistencia y la viabilidad en el ambiente a mediano y largo plazo. La mayoría de los estudios se han enfocado en la capacidad del hongo de atacar a una especie de insecto en particular y pocos se han enfocado en determinar el destino del hongo una vez aplicado, y entre estos, la metodología predominante consiste en enterrar inóculos en campos experimentales controlados y cuantificar el porcentaje de ellos que permanecen viables y capaces de infectar al insecto de interés (Kaaya *et al.*, 1996; Vaenninen *et al.*, 2000; Hu y St. Leger, 2002; Ekesi *et al.*, 2005). Sin embargo, en las zonas agrícolas hay movimientos de materia y energía que hacen difícil extrapolar esos resultados. Por ello es importante determinar la persistencia de *M. acridum* en las zonas donde se aplica de manera regular, ya que esto permite conocer con mayor precisión la dinámica poblacional del hongo y de esta forma tomar las medidas adecuadas ante su posible aumento o disminución en un momento dado. El muestreo ambiental para el monitoreo de agentes entomopatógenos mediante técnicas moleculares basadas en PCR provee de las herramientas necesarias para llevar a cabo esta tarea (Castrillo *et al.*, 2007).

Por estas razones, en el presente trabajo se plantea el estudio de la persistencia y viabilidad en el ambiente (incluyendo aire, suelo y vegetación) de las esporas de *M. acridum* a lo largo de un ciclo anual después de ser asperjado en campo. Los datos obtenidos servirán para auspiciar una mayor competitividad de los agentes microbianos y apoyar así, en forma directa, la utilización de éstos en el campo agrícola, fortaleciendo una agricultura moderna que no contamine la salud del hombre, de los animales y de la vegetación, así como la calidad del ambiente, como ocurre con la aplicación indiscriminada de los insecticidas químicos no selectivos.

1.1 Los ortópteros

Con el nombre de ortópteros se hace referencia a insectos muy conocidos, tales como chapulines, saltamontes y langostas, que se agrupan bajo el orden Orthoptera (cuyo nombre en griego significa ala derecha) (Otte, 1981). Este orden, al que las opiniones recientes atribuyen un origen monofilético, incluye a más de 20,000 especies que se distribuyen por todo el mundo (Flook y Rowell, 1999). Los ortópteros se encuentran en casi todos los hábitats que se pueda concebir, desde cuevas oscuras hasta desiertos y alcanzan su mayor diversidad en los trópicos. Sus tamaños varían desde 5 mm hasta 12 cm aproximadamente y son un componente común de la fauna terrestre de cualquier lugar. Se alimentan de todas las formas vegetales y son considerados los segundos herbívoros en importancia después de los mamíferos, y alimento de muchos otros organismos, por lo que tienen un gran valor ecológico y la superfamilia Acridoidea es la más importante en términos económicos dado que muchos de sus integrantes son considerados plagas significativas en diversas partes del mundo (Kevan, 1982; Gorochoy, 1995).

El término langosta se aplica a ciertos acridoideos migratorios cuyo tamaño es grande, regularmente rebasan los 10 centímetros de longitud, los cuales debido a un incremento de población cambian de comportamiento, pasan de la forma/fase solitaria a una forma/fase gregaria, cambiando posteriormente de color y forma (transformación física), y requieren tener una zona geográfica de multiplicación y gregarización definida (área gregarígena) (Barrientos *et al.* 1992). Mientras que con el término de chapulines o saltamontes (“grasshoppers” en inglés) se denomina a aquellos acridoideos cuyo tamaño es de pequeño a mediano, su longitud varía de 2 a 7 centímetros, aunque algunos pueden llegar a rebasar este promedio, que carecen de una transformación física y de un área geográfica de multiplicación y gregarización específica (Gangwere, 1991; Launois y Launois-Luong, 1991).

1.2 Biología

La biología de todas las especies de acridoideos es similar, presentan metamorfosis simple o incompleta, pasando por las etapas de huevo, ninfa y adulto, por lo común hay de 5 a 6 estadios ninfales. La gran mayoría hibernan en estado de huevo, sin embargo, en ciertos lugares con invierno benigno lo pasan en estado de ninfas desarrolladas o en estado adulto (Navarro-Nava, 1999; Anaya-

Rosales *et al.*, 2000). Generalmente sólo existe una generación al año, aunque ciertas especies pueden tener tres generaciones sucesivas en una estación lluviosa o hasta cuatro o cinco con desarrollo ininterrumpido (e.g., *Abracris flavolineata* De Geer, 1773) (Barrientos *et al.*, 1992; Anaya-Rosales *et al.*, 2000).

En la cópula, los chapulines y las langostas se acoplan uniendo las partes terminales del abdomen, el macho se monta sobre la hembra y dependiendo de la especie el tiempo de unión puede variar desde algunos minutos hasta varias horas (Barrientos *et al.*, 1992). La hembra deposita las ootecas al introducir su abdomen en el suelo, enterrándolas a una profundidad de 3 a 5 cm en suelos baldíos, orillas de caminos, drenes y canales de riego, márgenes de predios y camellones, aunque algunas especies, como el género *Melanoplus*, ovipositan directamente en los terrenos de cultivo, especialmente cuando emigran (Navarro-Nava, 1999); en la mayoría de los casos, los huevecillos son puestos envueltos en una capa de materia espumosa. El potencial reproductivo puede considerarse elevado, en virtud de la predominancia de hembras (proporción de 10 a 1), el número de oviposturas que efectúa es de 6 a 8. El promedio de huevos que se encuentra en cada ooteca varía en cada especie, pero es del orden de varias decenas (Barrientos *et al.*, 1992) .

El estadio embrionario se desarrolla generalmente dentro del suelo, mientras que los otros dos estadios (ninfal y adulto) dentro o encima del suelo. La emergencia del embrión o ninfa ocurre al finalizar el desarrollo, ya sea espontáneamente o de forma inducida (lluvia y temperatura), en este momento la ninfa se encuentra envuelta por una cutícula, cuyas finas ornamentaciones de escamas facilitan su ascenso hasta la superficie del suelo siguiendo el eje del tapón espumoso de la ooteca, ésta se libera de la piel-membrana mediante una muda intermedia (falsa muda), para que sus apéndices se tornen funcionales en algunas horas (Barrientos *et al.*, 1992).

La ninfa de los acridoideos pasa por cuatro a ocho estadios verdaderos, según la especie, antes de transformarse en adulto. Las ninfas al nacer se encuentran agrupadas en pequeñas áreas y después se dispersan; pero si la alimentación es suficiente, permanecerán agrupadas por mucho tiempo antes de invadir o avanzar hacia los cultivos. Morfológicamente son similares a los adultos, sólo que son más pequeñas y sin alas (en el caso de especies aladas). Los adultos pueden encontrarse dispersos o agrupados, dependiendo de la densidad de población y de la escasez o abundancia de alimentos en que se encuentren (Navarro-Nava, 1999; Anaya-Rosales *et al.*, 2000).

1.3 Comportamiento

Característicamente son activos de día, presentan fototropismo o atracción hacia la luz. Como todos los insectos, los chapulines y las langostas son de sangre fría (poiquiloterms). Continuamente ganan y pierden calor del ambiente donde se desarrollan por medio de convección, conducción, radiación, evaporación y metabolismo; la temperatura de su cuerpo fluctúa de acuerdo con ello y su metabolismo en razón casi proporcional a la temperatura del cuerpo, excepto a los niveles extremos. A bajas temperaturas, los acridoideos buscan protección y permanecen inmóviles, mientras que a temperaturas altas permanecen muy activos y respiran con dificultad (Barrientos *et al.*, 1992)

El gradiente de temperatura del nivel del suelo hacia arriba es lo que determinará el comportamiento de los acridoideos de subir a las ramas, causando cambios apropiados en la fisiología de su cuerpo, así, los llamados “fitófilos” tienden a subir a la vegetación cuando la temperatura del suelo es extremadamente caliente, y descienden cuando la temperatura baja, mientras que los “geófilos”, o que viven en suelo, buscan escondrijos naturales como espacios en el mismo, en las piedras o hendiduras entre las rocas (Barrientos *et al.*, 1992; Sasketchawan, 2007).

La comunidad vegetal, con sus características de diversidad, composición, densidad, abundancia y apariencia influye en gran manera en el comportamiento de los acridoideos, ya que las plantas pueden servir como sitios de alimentación, de apareamiento, de oviposición o de refugio (Bell, 1991).

Tanto chapulines como langostas son de hábitos fitófagos, sin embargo, los más primitivos (Pyrgomorphidae, Romaleidae) se alimentan principalmente de plantas de hoja ancha, mientras que los más avanzados (Gomphocerinae, Acridinae) lo hacen con pastos. El consumo de alimento se incrementa en relación con el tamaño, el cual está en función del sexo y del estado biológico, por ejemplo, las hembras adultas de *Melanoplus scudderi* (peso medio 0.47 g) comen más (0.85 cm² en promedio de superficie foliar/ind/h) que los machos (peso medio 0.23 g, consumo promedio 0.629 cm²/ ind/h). Sin embargo, en relación con el peso del cuerpo, las hembras consumen menos (1.8 cm²/ g masa de la hembra/hora contra 2.72 cm²/ g masa del macho/hora). Este consumo menor por gramo-peso de las hembras en comparación con los machos puede atribuirse al mayor grado de actividad de los machos, existiendo una discrepancia similar entre ninfas y adultos. Por otra parte, individuos recién eclosionados y recién mudados son incapaces de alimentarse, debido a que sus

partes bucales están todavía demasiado débiles para la incisión y la masticación, por lo tanto, pasan un período de post-muda sin alimento, que de acuerdo a la especie varía desde algunas horas hasta un día o más, mientras que las ninfas comen más progresivamente con cada muda (incremento de tamaño), pero menos que los adultos de su mismo sexo y especie (Gangwere, 1991).

1.4 Aspectos perjudiciales

Los chapulines y langostas son parte importante de los ecosistemas de pastizales de todo el mundo y desempeñan un papel preponderante en el reciclamiento de nutrientes y sirven como fuente de alimento para la vida salvaje y, en años de explosiones poblacionales, compiten con el ganado y la fauna silvestre por el forraje (Fielding y Brusven, 1995; Olfert y Slinkard, 1999; Lockwood *et al.*, 2002). Desde la introducción de la agricultura, los chapulines y las langostas han sido una de las más importantes plagas, ello debido a que muchas especies de chapulines están bien adaptadas a los hábitats creados por las prácticas de agricultura occidentales (Pfadt, 1994), además de que actividades antrópicas, como la movilidad de productos agrícolas, son causa importante de dispersión (Corona-Vargas y Ritter-Ortiz, 2006).

La magnitud de los daños varía con el tiempo y las condiciones ambientales, pero en épocas de explosión poblacional estos insectos causan enormes daños. Una de las plagas más relevantes en el mundo ha sido la de la “langosta del desierto”, *Schistocerca gregaria*, que de 1939 a 1963 llegó a ocupar 13.6 millones de km² en África y en el suroeste de Asia (Uvarov, 1977). La langosta del desierto, *Schistocerca gregaria*, es una plaga capaz de causar daños extraordinarios. Una pequeña parte de una colonia promedio del insecto, de casi una tonelada de langostas, consume al día la misma cantidad de alimento que 2, 500 personas y recorre 200 Km en un sólo día (FAO, 2004). *Chortoicetes terminifera*, por su parte, fue una plaga importante de Australia durante los años setenta (Farrow, 1982). Del mismo modo, *Zonocerus variegatus* se ha considerado de importancia económica en Nigeria (Chapman y Page, 1979). Más recientemente, una variedad no identificada de langosta migratoria ha causado enormes daños en China (Diario-del-Pueblo, 2001). En Estados Unidos, varias especies de saltamontes del género *Melanoplus* son responsables de la destrucción del 23 % de todo el forraje disponible de la zona occidental de ese país, causando pérdidas anuales de varios cientos de millones de dólares (Branson, 2007). En Canadá la situación es similar, teniendo pérdidas de decenas de millones de dólares al año, debido a sólo cuatro especies de insectos pertenecientes al orden Orthoptera, tres de ellas del género *Melanoplus* y la cuarta al género *Camnula* (Saskatchewan, 2007).

Se ha propuesto que el avance y dispersión de las plagas está influenciado por numerosos factores, entre ellos la humedad del suelo, composición y altura de la vegetación, humedad, cobertura vegetal, velocidad del viento, disturbios (incendios), depredadores, competencia inter- e intra-específica, la edad de los chapulines, su estado fisiológico y su genética (Jeffrey *et al.*, 2000).

1.5 Ortópteros plaga en México

1.5.1 Langostas

La langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Fig. 1) es una de las plagas agrícolas importantes en el sureste de la República Mexicana, y se considera plaga potencial para otros estados de la vertiente del Golfo de México y del Pacífico (SENASICA, 2012).

Se conocen al menos 10 especies del género *Schistocerca*, con posibilidades de que haya varias especies aún no descritas. De todas estas, solamente *Schistocerca piceifrons piceifrons* es gregaria, con transformación fásica y con capacidad de emigrar grandes distancias (Barrientos, 2003). El área de distribución de *S. piceifrons piceifrons* se extiende desde el noreste de México hasta Costa Rica, siendo tradicionalmente una de las principales plagas agrícolas en el sureste de México (Yucatán, Campeche, Chiapas, Quintana Roo) y Centro América. Sin embargo, los hábitos migratorios de la langosta le permiten ir desplazándose y estableciéndose en otros estados donde las condiciones son propicias para su desarrollo. Actualmente al menos 10 estados tienen problemas con esta plaga en México (SENASICA, 2012a).



Fig. 1. *Schistocerca piceifrons piceifrons*.

Estos organismos tienen un cuerpo coriáceo de 10-50 mm, en ocasiones duro, alargado y cilíndrico. En México presentan dos generaciones anuales en la Península de Yucatán, y una generación al año en otras regiones del país. Pasan por tres estadios de desarrollo que son la etapa de huevo, ninfa y adulto. Tiene desplazamientos como esparción (moviendo del insecto en fase solitaria para cubrir sus necesidades alimentarias y otros requisitos), dispersión (movimiento de un mayor número de individuos para solventar sus necesidades de supervivencia y reproducción) y migración (movimiento masivo), además de pasar de su fase solitaria a gregaria formando grandes mangas (nombre con el que se le denomina a las agrupaciones de insectos adultos) que arrasan con todos los vegetales y plantíos por donde pasan (Ramírez-Sagahon *et al.*, 2001).

Entre los primeros reportes sobre la presencia de mangas de langostas en el sur de Tamaulipas se tiene el de Trujillo (1975), quien indica que en 1964 se controlaron mangas de langostas voladoras o centroamericanas en la región de Mante, Tamaulipas. Posteriormente en 1980 se reportó una manga de langosta en González, Tamaulipas (García, 2001). A partir de 1998, las poblaciones de langosta empezaron a incrementarse en la región Huasteca (sur de Tamaulipas, oriente de San Luis Potosí, norte de Veracruz e Hidalgo) y ocasiona daños que pueden llegar hasta el 100 % en cultivos anuales y perennes (Pérez *et al.*, 2005).

Durante siglos México ha estado sujeto a fuertes infestaciones de langosta, las cuales se caracterizan por largos períodos de recesión, con el ocasional resurgimiento de la misma por varios años consecutivos. Llega a atacar hasta 400 especies vegetales dentro de las que se encuentran maíz, frijol, sorgo, arroz, soya, cacahuate, caña de azúcar, chile, tomate, cítricos, plátano, coco y pastizales. La langosta se distribuye en las entidades de menor altitud sobre el nivel del mar, como Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Con base en la distribución de este insecto se estima una zona de invasión de 3.6 millones de hectáreas (Ramírez-Sagahon *et al.*, 2001; SENASICA, 2012a).

La langosta tiene su área permanente de reproducción en la Península de Yucatán, Guatemala (en la zona costera del Pacífico), El Salvador, Honduras y Nicaragua. Diversos estudios demuestran que la langosta centroamericana, al igual que otros acrídidos, tiene la capacidad de seleccionar su alimento con base en el contenido nutrimental y, en ocasiones, cuando el alimento es escaso, la langosta puede variar su dieta consumiendo alimentos con bajo contenido nutricional por periodos prolongados. Se han hecho estudios que indican que la cantidad de alimento consumida

por una manga de mil kilómetros cuadrados es de 100 mil toneladas de alimento al día. Al respecto cabe mencionar que una manga de densidad media se conforma aproximadamente de 50 millones de langostas por kilómetro cuadrado (Anaya-Rosales *et al.*, 2000).

Entre los factores que han propiciado la proliferación de las langostas se encuentran el cambio en el uso o manejo de la tierra, los disturbios ecológicos, la falta de continuidad en las operaciones de control, la falta de continuidad en el monitoreo y vigilancia cuando los brotes ya han sido controlados, la deforestación, el abandono de cultivos tradicionales y áreas cultivadas y la introducción de nuevos cultivos (Barrientos *et al.*, 1992).

1.5.2 Chapulines o saltamontes

Diversas especies de chapulines o saltamontes (principalmente de los géneros: *Sphenarium*, *Melanoplus*, *Brachystola*, *Boopedon*, *Idiarthron* y *Taeniopoda*) constituyen también plagas de importancia económica en México

1.5.2.1 *Sphenarium purpurascens*. El principal y más importante es *Sphenarium purpurascens* (Fig. 2). Es probable que los aztecas lo conocieran como tlalchapolin o “chapulín de tierra”, llamado así por carecer de alas y sólo caminar en la tierra. Actualmente en el Valle de México es el ortóptero más abundante y se le conoce como chapulín de la milpa ya que puede encontrarse en aquellas regiones donde se cultiva el maíz (Navarro-Nava, 1999).



Fig. 2. *Sphenarium purpurascens*.

Este insecto presenta una amplia distribución geográfica en el centro, sur y occidente de la República Mexicana, en estados como Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Veracruz, Puebla,

Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, D. F. y Estado de México, y probablemente se extienda hasta algunas zonas de Chiapas y Tabasco. Se reporta como plaga en los estados de Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, Tlaxcala causando pérdidas en los cultivos de: maíz, frijol, alfalfa, calabaza, sorgo, trigo, caña de azúcar y pastizales, causando defoliaciones parciales o totales independientemente del desarrollo vegetativo del cultivo. Su rango de hospederos incluye además de cultivos agrícolas y una gran variedad de plantas silvestres (SENASICA, 2003c; 2012b).

1.5.2.2 Melanoplus. Las principales especies del género *Melanoplus* son *M. femurrubrum* (Fig. 3), *M. differentialis* (Fig. 4) y *M. lakinus* (Fig. 5), que se distribuyen en prácticamente todo el territorio mexicano. La plaga de estos chapulines ha causado daños a los cultivos desde 1970 en el sureste de la República Mexicana, mientras que en el centro de México se mencionan las primeras infestaciones de este insecto en 1974, por parte de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, dentro del Programa de Sanidad Vegetal de Puebla, aunque se estima que la plaga fue introducida a estos estados desde 1970 a 1972 provenientes del sureste del país (Anaya-Rosales et al., 2000).



Fig. 3. *Melanoplus femurrubrum*.



Fig. 4. *Melanoplus differentialis*.



Fig. 5. *Melanoplus lakinus*.

Son plagas importantes en Chihuahua, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Querétaro, Zacatecas, así como en la Planicie Huasteca, que comprende el oriente de San Luis Potosí, norte de Veracruz y sur de Tamaulipas (Garza, 2003; SENASICA-IFAI, 2007). Afectan cultivos de frijol y maíz, sorgo, trigo, caña de azúcar, pastizales, piña, pastos, avena, sorgo, alfalfa, y praderas inducidas y naturales. *Melanoplus lakinus*, por ejemplo, es responsable por pérdidas en las zonas forrajeras de hasta el 38 % (SENASICA, 2003b; Gurrola *et al.*, 2006a, b).

1.5.2.3 Brachystola. Los principales exponentes de este género son *B. magna* (Fig. 6) y *B. mexicana* (Fig. 7). Se encuentran en los estados de Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Aguascalientes, Jalisco, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato (SENASICA, 2003a). Se consideran plaga en los estados de Chihuahua, Guanajuato, Michoacán, Zacatecas, donde afecta cultivos de frijol, maíz, sorgo, trigo, caña de azúcar, pastizales, alfalfa, soya, algodón y árboles cadicifolios (SENASICA-IFAI, 2007).



Fig. 6. *Brachystola magna*.



Fig. 7. *Brachystola mexicana*.

1.5.2.4 Boopedon. Incluye tres especies: *B. nubilum*, *B. rufipes* y *B. diabolicum*. Sus zonas de distribución suelen ser las mismas que las de chapulines de género *Melanoplus* y *Sphenarium*, por lo que es difícil diferenciar la magnitud de los daños causados por unos u otros, y dichos daños varían de acuerdo con las densidades de población, pero se consideran plagas importante en Guanajuato, Michoacán, Tamaulipas y San Luis Potosí, donde afectan a cultivos de maíz, frijol, caña de azúcar y pastizales; de estos últimos han sido responsables de pérdidas del 12 al 20 % anual en 2006 (Gurrola *et al.*, 2006a, b).



Fig. 8. *Boopedon nubilum*.

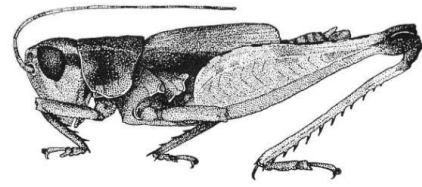


Fig. 9. *Boopedon rufipes*.



Fig. 10. *Boopedon diabolicum*.

1.5.2.5 *Idiarthron subquadratum*. *Idiarthron subquadratum* (Orthoptera: Tettigoniidae) (Fig. 11) es una especie que no pertenece a la superfamilia Acridoidea. Es una especie que comienza a causar problemas en México. Se le conoce como “chacuatete” y está extensamente distribuido en plantaciones del sureste de México. Es un insecto arbóreo, polífago y activamente nocturno. Se alimentan de las hojas y frutos de diversas plantas, café, plátano, naranja, chayote y papaya. Históricamente no se había constituido como una amenaza, pero en el 2005 su población alcanzó niveles tan altos que se volvió una plaga. Cambios en el clima y las modificaciones de su hábitat son considerados como posibles causantes de su incremento poblacional, así como reducciones en las poblaciones de sus enemigos naturales, pájaros, roedores, murciélagos y parásitos de insectos (Zavala *et al.*, 2005) .



Fig. 11. *Idiarthron subquadratum*.

1.5.2.6 *Taeniopoda eques* y *Mermiria bivittata*. Otras especies con impacto significativo son *Taeniopoda eques* (en Hidalgo) (Fig. 12) y *Mermiria bivittata* (en el norte del país) (Fig. 13). Son responsables de pérdidas importantes en cultivos de maíz y pastizales. La explosión poblacional más reciente de *Mermiria bivittata* ocurrió en 1998, aunque fueron controladas de manera natural por una epizootia del hongo *Entomophaga grillo*. Aunque los daños que ocasionan estas especies son considerables, pueden pasar desapercibidos en pastizales, ya que estos crecen en forma rápida y abundante (Barrientos y Ortiz, 2006; SENASICA-IFAI, 2007).



Fig. 12. *Taeniopoda eques*.



Fig. 13. *Mermiria bivittata*.

1.6 Manejo de ortópteros plaga por el gobierno mexicano

Debido a los daños ocasionados por estos insectos, el gobierno mexicano ha tomado cartas en el asunto en sus tres niveles de gobierno (federal, estatal y municipal) para el control de estas plagas, designando a la SAGARPA, en su órgano desconcentrado SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) como la responsable del combate a estas plagas. El SENASICA, en coordinación con los gobiernos de los estados y los organismos auxiliares, lleva a cabo campañas fitosanitarias y zoosanitarias, que son un conjunto de medidas para la prevención, combate y erradicación de plagas que afecten a los vegetales y animales en un área geográfica determinada y a través del Programa Alianza para Contigo, se transfieren recursos que se aplican en dichas campañas (SENASICA,2012a).

1.6.1 Campaña contra la langosta

La campaña contra la langosta opera en los estados Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Fig. 14). La estrategia de la campaña incluye acciones de exploración, muestreo, control químico y control biológico, así como capacitación y divulgación hacia los agricultores. Tiene como objetivo principal detectar oportunamente a la langosta y mantenerla bajo control, de tal forma que no represente riesgo para los cultivos agrícolas y pastizales, evitando la formación de mangas para restringir su desplazamiento y daño económico en áreas agrícolas sin presencia. La estructura operativa para el año 2012 consta de 54 técnicos, entre los que se encuentran coordinadores y responsables de la campaña, profesionales fitosanitarios y auxiliares de campo, asimismo se programó la contratación eventual de 3,904 jornales para apoyar en las acciones de exploración, muestreo y control.

La campaña ha sido exitosa en los últimos años, pues las acciones han permitido detectar y controlar de manera oportuna los brotes de la plaga, la exploración, el muestreo y el control se han realizado en montes bajos y en pastizales, reduciendo la presencia de la langosta dentro de los cultivos. Asimismo, las pérdidas económicas en la agricultura han sido mínimas. Hace varios años, los daños a los cultivos eran mucho mayores, las actividades de la campaña en algunos casos sólo eran de control de brotes. Sin embargo, hoy en día, las actividades fitosanitarias se realizan de forma permanente durante todo el año, sin importar si hay o no reportes de la plaga.

oportuno de los brotes de esta plaga. En 2012 la campaña opera en seis estados: Chihuahua, Guanajuato, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Zacatecas (Fig. 15). La estrategia operativa de la campaña incluye acciones de exploración, muestreo, control biológico y control químico, capacitación, divulgación y supervisión. En el presente año, se tiene una estructura operativa compuesta por 19 técnicos, entre los que se encuentran coordinadores de campañas, profesionales fitosanitarios y auxiliares de campo.

De 2008 a 2012 se ha realizado una inversión federal de 18.8 millones de pesos. Dejar de realizar la campaña traería como consecuencia el incremento en los niveles de infestación del chapulín, lo que afectaría a diversos cultivos, ocasionando pérdidas en el rendimiento y calidad, y aumento de los costos de producción. De acuerdo a los resultados del muestreo, en 2011 la superficie afectada por chapulín fue de 23,557 hectáreas, distribuidas en los estados de Chihuahua, Guanajuato, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, en donde se realizó el manejo de los focos de infestación, evitando con estas acciones pérdidas en el rendimiento y calidad de frutos y hortalizas. Los principales cultivos afectados fueron, en orden de superficie atendida, maíz, frijol, cebada, sorgo, avena, trigo, alfalfa, tomate de cáscara, agave, haba, brócoli, durazno, calabaza, cilantro, chile y cebolla. Sin embargo, cifras del SIAP para el 2011 indican que tan sólo la superficie de frijol, maíz y sorgo que podría ser afectada se ubica por arriba de los 2.8 millones de hectáreas, de donde se obtiene un volumen de producción aproximado de 6.7 millones de toneladas y cuyo valor supera los 23 mil millones de pesos (SENASICA, 2012b).



Fig. 15. Estados que operan la campaña contra el chapulín 2012.

Además de lo anterior, la importancia de estas plagas ha provocado que por lo menos en dos ocasiones (noviembre de 2003 y marzo de 2007), la cámara de diputados de México presente puntos de acuerdo con el fin de destinar mayor presupuesto a su combate (Gaceta-Parlamentaria, 2003, 2007).

En México, las estrategias de control de la langosta y los chapulines se establecen con base en el conocimiento de áreas gregarígenas o de reproducción permanente, el monitoreo de bandas (ninfas) y mangas (adultos), control químico y en algunos casos control biológico.

Entre los productos químicos recomendados para el control de la langosta están los organofosforados, como el fenitrotión y el malatión, reguladores del crecimiento como diflubenzuron/dimilin, y recientemente el pyrazol y fipronil. Todos estos productos ofrecen buenos resultados, pues con cantidades relativamente bajas de ingrediente activo/ha (e.g., 250 a 450 g de fenitrotión, 500-700 g de malatión y 6-8 g de fipronil/ha) es posible causar mortalidades de 90 % o más en tiempos relativamente cortos (Barrientos y Milner, 2001) .

De acuerdo con los procedimientos de la Dirección General de Sanidad Vegetal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con objeto de mantener una densidad de población baja, el manejo de las plagas debe ser integral, es decir, se deben aplicar dos o más métodos de control disponible. Los métodos de control que se sugieren en la normatividad son el cultural, biológico y químico.

Sin embargo, se le ha dado preferencia al uso del control químico, situación que conlleva riesgos muy elevados, ya que además de no ser selectivos (matan a la mayoría de los insectos presentes, alterando los ecosistemas), tiene efectos perjudiciales para la salud humana. Es por ello que debe dársele mayor énfasis al empleo del control biológico, con el fin de reducir riesgos y tener un manejo integrado de plagas lo menos dañino posible al ambiente (CNRCB, 2012).

1.7 Control biológico

La premisa del control biológico descansa en que bajo ciertas circunstancias, diversas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales.

El control biológico cuando funciona posee muchas ventajas como: a) poco o ningún efecto nocivo colateral, b) raros casos de resistencia, c) control de largo término, d) elimina por completo o sustancialmente el uso de insecticidas, e) relación costo/beneficio muy favorable, f) evita plagas secundarias, g) no provoca intoxicaciones, h) se puede usar con el manejo integrado de plagas, i) una vez establecido se requiere poco cuidado o mantenimiento (Bhatkar, 2003).

Entre las desventajas se tienen: a) se requiere de tiempo y dinero para encontrar un enemigo natural susceptible de ser utilizado como controlador biológico, b) falta de apoyo económico por parte de organismos gubernamentales para aplicarlo en gran escala, c) carencia de personal especializado, d) poca disponibilidad, e) al principio puede requerir una inversión económica alta, f) dificultad para aplicarlo en complejos de plagas, g) los agentes de control biológico son muy susceptibles a los plaguicidas, h) los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual, no proveen la supresión inmediata que se obtiene con los insecticidas, i) los resultados del control biológico no son espectaculares, y por lo mismo el agricultor tiene temor de perder su cosecha, j) Existe un riesgo inherente de que el controlador biológico pueda atacar especies no-blanco y k) no existen enemigos naturales adecuados para todas las plagas (Bhatkar, 2003; Vincent *et al.*, 2007).

La necesidad de introducir alternativas de control ambientalmente seguras, así como el empleo restringido de los productos químicos, impulsó el desarrollo de insecticidas biológicos para el control de langosta y saltamontes (Prior y Greathead, 1989; Milner y Prior, 1994; Jenkins *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 2001). Siendo una de las alternativas el uso de hongos entomopatógenos, principalmente los del género *Metarhizium*.

1.8 Hongos del género *Metarhizium*

Hasta el año 2000 la clasificación de *Metarhizium* estaba basada en caracteres morfológicos y fue revisada por Tulloch (1976) quien sólo aceptaba *M. flavoviride* y *M. anisopliae*, este último con dos variedades, var. *anisopliae* de esporas cortas y var. *majus* con esporas largas. *M. album* descrito por

Petch (1931) fue revisado por Tulloch y considerado como un espécimen inmaduro de *M. anisopliae*. Petch (1931) también describió *M. brunneum*, pero Latch (1965) concluyó que se trataba de un sinónimo de *M. anisopliae* a lo que Tulloch (1976) estuvo de acuerdo, y se especuló que *M. brunneum* podría tratarse de un mutante natural. Rombach y colaboradores (1986) revisaron la condición de *M. flavoviride* e incluyeron la var. *minus*, la cual fue nuevamente revisada en 1987 (Rombach *et al.*, 1987) y promovida a *M. album*, la cual había sido tratada como sinónimo de *M. anisopliae* y ahora separada como una especie nueva. Ellos establecieron como criterios taxonómicos primarios para la delimitación de especies la forma de los conidios y las células conidiógenas, la presencia o ausencia de una zona subhimenial y el hecho de que los conidios se adhirieran o no lateralmente para formar columnas prismáticas. Le dieron un valor secundario al color del micelio y los conidios y sugirieron que el tamaño conidial podría ser útil en la delimitación de especies.

Existen registros de otras especies de este género: *Metarhizium pingshaese*, *M. cylindrospora* (= *Nomuraea cylindrospora*; Tzean *et al.*, 1993), *M. guizhousense* (Guo *et al.*, 1986; Shimazu, 1989) y *M. taii* (= *Cordyceps taii* Liang *et al.*, 1991). Todas estas especies fueron descritas en China y Japón, pero no se conoce que alguna esté depositada en colecciones donde puedan ser analizadas (Driver *et al.*, 2000).

Entre los estudios más relevantes de taxonomía molecular se encuentra la revisión del género *Metarhizium* por Driver *et al.* (2000). Ellos se basaron en el análisis filogenético de datos de secuenciación de las regiones ITS 28S y D3 del ADN ribosómico, patrones de RAPD-PCR (utilizando seis oligonucleótidos) y características fenotípicas como termotolerancia y tamaño de los conidios de 123 cepas, de diferentes regiones geográficas y hospederos. El análisis filogenético agrupó a los aislamientos estudiados en 10 clados taxonómicos. Las cepas se agruparon en su mayoría en *M. anisopliae* y se reconocieron cuatro variedades: var. *anisopliae* (clado 9), var. *majus* (clado 10), var. *lepidiotum* (clado 8) y var. *acridum* (clado 7). De las cuales, las dos primeras variedades ya habían sido descritas en la clasificación del género *Metarhizium* utilizando caracteres morfológicos, mientras que las variedades *lepidiotum* y *acridum* son variedades nuevas con base en la secuencia de las regiones ITS. *M. album* (clado 1), *M. flavoviride* var. *flavoviride* (clado 6) y *M. flavoviride* var. *minus* (clado 5) fueron reconocidas y redefinidas. Se observaron dos variedades nuevas, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* (clado 3) y *M. flavoviride* var. *pemphigum* (clado 4). Un nuevo clado fue formado por *M. flavoviride* tipo E (clado 2), el cual debe ser estudiado de nuevo por presentar características diferentes de los demás clados. *M. flavoviride* fue redefinido en *M. anisopliae* var. *acridum*. Los

resultados también mostraron que entre especies la divergencia de los nucleótidos en la región ITS se encuentra en un intervalo de 14-18 %, mientras que a nivel de variedad se sitúan en menos del 5 %.

Bischoff y colaboradores (2007) realizaron un nuevo estudio que empleaba otros marcadores moleculares e incluían secuencias parciales de dos subunidades de la ARN polimerasa II y adicionaron una nueva especie al género: *M. anisopliae* var. *frigidum*. Los mismos autores complementaron el estudio con secuencias adicionales de otros genes, junto con el análisis de la morfología de otros aislamientos, y propusieron elevar a rango de especies a *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov. y *M. majus* stat. nov. Adicionalmente, describieron como especies nuevas a *M. globosum*, *M. robertsii*, resucitaron el nombre de *M. brunneum* y mostraron que *M. taii* es un sinónimo de *M. guizhouense* (Bischoff et al., 2009) .

La adopción del nombre *M. acridum* ha sido paulatina y aún es posible encontrar artículos recientes que utilicen el nombre anterior de *M. anisopliae* var. *acridum*. Por ello y para reducir la posible confusión derivada del manejo de estos nombres, se tomó la decisión en esta tesis de uniformar los nombres como *M. acridum*, aunque el autor original lo hubiera referido como *M. anisopliae* var. *acridum* (en las referencias se coloca la cita textual). Otro detalle relativamente frecuente en citas anteriores a 2007 es que algunos autores no colocaban la variedad y se referían únicamente al hongo como *M. anisopliae*, lo que podía indicar cuatro variedades: *anisopliae*, *acridum*, *lepidiotum* y *majus*; en estos casos sólo se utilizaron referencias que indicaran control biológico de acrididos, ya que la variedad *anisopliae* es específica de hemípteros y las variedades *lepidiotum* y *majus* son poco utilizadas, no obstante, en la tesis se mantuvo el nombre de *M. anisopliae* debido a la incertidumbre de la variedad de que pudiera tratarse, y el mismo caso se presenta en la colección de entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (ver a continuación).

En cuanto a las especies de hongos entomopatógenos que se han reportado en México, hasta mayo de 2010 se tenían las siguientes descritas y almacenadas en la colección de entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (SENASICA-INFOMEX, 2010) (cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos de hongos entomopatógenos de acuerdo al sitio donde fueron colectados.

Origen	Especie	Número de aislamientos
Colima	<i>Metarhizium acridum</i>	35
	<i>M. anisopliae</i>	11
Guanajuato	<i>M. anisopliae</i>	1
Jalisco	<i>M. anisopliae</i>	14
Michoacán	<i>M. anisopliae</i>	1
	<i>Metarhizium acridum</i>	2
Nayarit	<i>M. anisopliae</i>	2
Oaxaca	<i>M. anisopliae</i>	2
San Luis Potosí	<i>M. anisopliae</i>	5
Tamaulipas	<i>M. anisopliae</i>	1
Tomatlán (estado no especificado)	<i>M. anisopliae</i>	1
Veracruz	<i>M. anisopliae</i>	7

1.9 *Metarhizium acridum*

Metarhizium acridum es un hongo mitosporico, que en medio de cultivo sólido presenta colonias de color amarillo o verde olivo pulverulentas (Fig. 16), con micelio aterciopelado formando conidios a partir de células especializadas llamadas fiálides, mientras que en cultivo sumergido forma micelio agrupado en pelotillas, que consisten en una colonia esferoidal desarrollada en un cultivo líquido, particularmente en un cultivo con agitación y células aisladas (Fargues *et al.*, 2001). Los conidios son elipsoidales de $7-9 \times 4.5-5.5 \mu\text{m}$, enteroblásticos y producidos en sucesión basípeta, dispuestos en columnas que se forman por la agrupación de conidióforos en forma de candelabro (Fig. 17; Samson *et al.*, 1988)



Fig. 16. Colonia de *M. acridum* de 9 días a 28°C en medio Sabouroud.

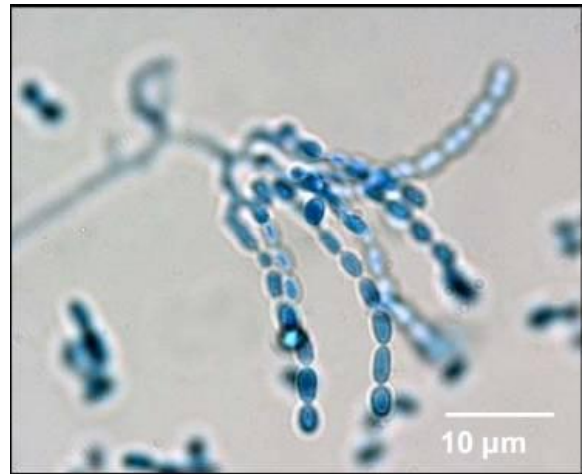


Fig. 17. Conidióforo de *M. acridum* en forma de candelabro con conidios organizados en cadenas.

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, por su parte, se describe como un hongo mitosporico, lo cual significa que pertenece a una agrupación artificial de hongos, que constituye el segundo grupo más grande de estos organismos (15,000 especies), y también se conocen como Deuteromicetes, Fungi Imperfecti, Deuteromycotina, hongos imperfectos, hongos asexuales u hongos conidiales. Se les llama hongos mitosporicos porque se reproducen asexualmente o parasexualmente por mitosis o supuesta mitosis (no han sido correlacionados con ningún estado meiótico). Muchos han sido correlacionados con teleomorfos en los Ascomicetes y Basidiomicetes, de manera que los hongos mitosporicos se pueden calificar como anamorfos o estados anamórficos de esos grupos. Son hongos conidiales que carecen de un medio de reproducción sexual (aunque manifiestan el fenómeno de parasexualidad); representan los estados asexuales de Ascomicetes y

Basidiomicetes, de hecho, *Metarhizium anisopliae* por sus características miceliales correspondería a un ascomiceto mitospórico. Anteriormente, estos hongos eran considerados como una sola clase taxonómica (Deuteromycetes), y como *Fungi Imperfecti*; en algunas clasificaciones eran frecuentemente separados en tres clases, Blastomycetes, Hyphomycetes y Coelomycetes, de la subdivisión Deuteromycotina. Exceptuando la familia Agonomycetaceae (antes considerada como el orden Mycelia sterilia) de la antigua clase Hyphomycetes, cuyos representantes típicamente carecen de esporas de cualquier índole y sólo se propagan por fragmentación al azar del micelio vegetativo o por medio de esclerocios, todos los demás se reproducen por medio de esporas especiales conocidas como conidios (Ulloa y Hanlin, 2002).

Un conidio es una espora asexual, no móvil, usualmente formada en el ápice o en la parte lateral de una célula fértil especializada llamada célula conidiógena. Estos conidios, dependiendo de la especie, se producen en diversos momentos, pero es norma general que los conidios se produzcan en mayor cantidad cuando las condiciones ambientales sean poco favorables, de lo contrario se favorece la producción de micelio sobre la conidiogénesis (Herrera y Ulloa, 1998; Ulloa y Hanlin, 2006).

En 1991 se describió un teleomorfo para *Metarhizium taii* que resultó ser *Cordyceps taii*, lo cual colocaría al género *Metarhizium* dentro de la familia Clavicipitaceae de la clase Sordariomycetes del filum Ascomycota (Liang *et al.*, 1991)

1.9.1 Proceso de infección

De manera general el proceso inicia cuando los conidios de estos hongos caen sobre la cutícula de un hospedero favorable, entonces ocurre la adhesión y germinación, desencadenándose procesos de reconocimiento y producción de enzimas que facilitan la invasión. Los hongos entomopatógenos invaden directamente a través del exoesqueleto, sin embargo, la infección suele ocurrir a menudo entre las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y facilita la penetración. Se considera que estos organismos actúan por contacto, ya que las unidades infectivas (conidios) se adhieren a la superficie de la cutícula (Fig. 18) a través de fuerza hidrófobas (Alatorre, 2005) .

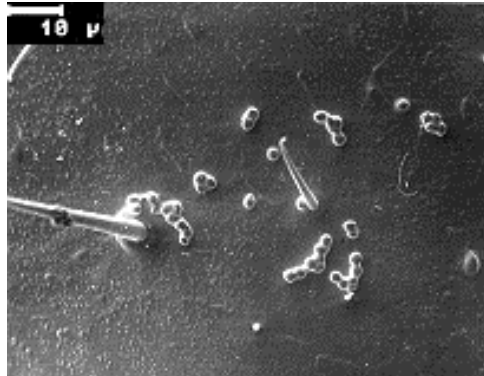


Fig. 18. Fotomicrografía electrónica de barrido de conidios sobre la cutícula de la termita *Heterotermes tenui*.

Una vez en contacto con la cutícula, el hongo produce un tubo que empieza a deslizarse sobre ella buscando puntos que facilitan su penetración (Fig. 19a). La penetración es ayudada por la formación de células apresoriales que ejercen presión física sobre el exoesqueleto. En el caso de *Metarhizium* el apresorio utiliza para su formación altas concentraciones de energía en las que se involucra directamente AMPc e iones de Ca^{+2} . El hongo, al atravesar la epicutícula, forma placas que van invadiendo y destruyendo los diferentes estratos. En la degradación de la cutícula intervienen enzimas como proteasas y quitinasas (Fig.19d).

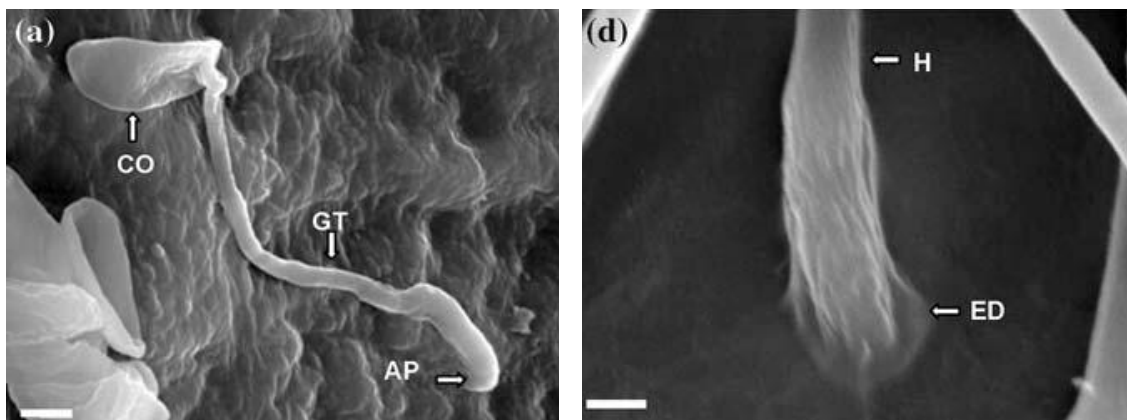


Fig. 19. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando el tubo germinativo (GT) y apresorios (AP) desarrollado a partir de un conidio (CO). (d) Detalle de la degradación enzimática (ED) realizada por una hifa. Ambas fotos fueron tomadas sobre la cutícula de *Boophilus microplus*.

Una vez dentro del hemocele el hongo realiza la colonización por medio de blastosporas (desarrollo de tipo levaduriforme) y por el micelio (Fig. 20). Éste crece abundantemente en la hemolinfa y provoca la muerte del hospedero debido a una combinación de daños mecánicos (producidos por el crecimiento del hongo), por desnutrición (durante su desarrollo el hongo utiliza los azúcares y proteínas presentes en la hemolinfa) y por la acción de metabolitos secundarios o toxinas (Alatorre, 2005).

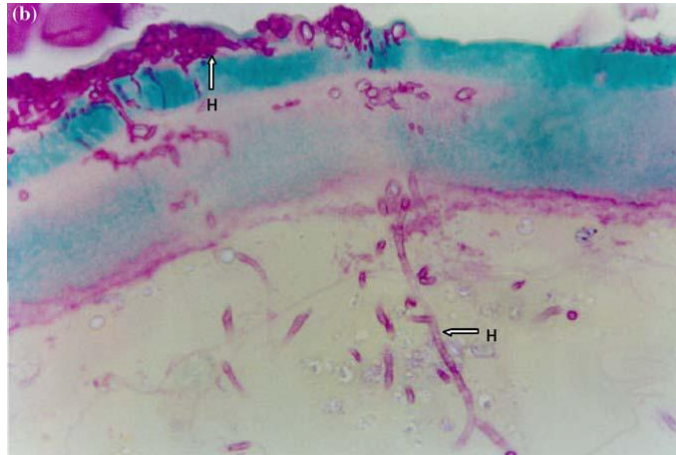


Fig. 20. Fotomicrografía de un corte longitudinal de la cutícula de *Boophilus microplus* teñido con ácido periódico de Schiff, mostrando numerosas hifas (H) en la cutícula (capa superior) y en tejidos adyacentes.

Poco después de la muerte del insecto hospedero, el hongo completa su desarrollo, emerge del cadáver y ocurre la esporulación o conidiogénesis (Fig. 21). Esto permitirá la transmisión vertical u horizontal de la infección dentro de la población de insectos. La presencia de esporas resistentes producidas en el interior del cuerpo del insecto permite la sobrevivencia del hongo por largos periodos en condiciones adversas (Alatorre, 2005).

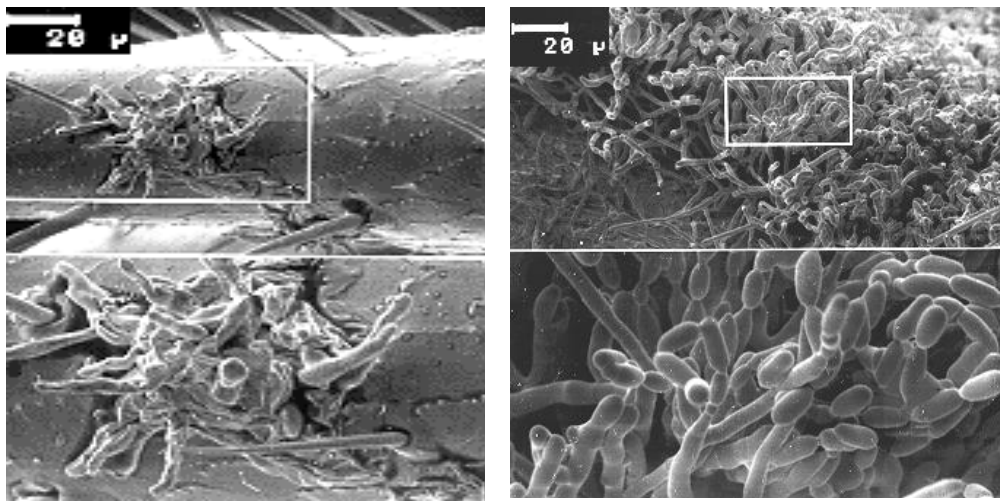


Fig. 21. Fotomicrografía electrónica de barrido mostrando micelio de *Metarhizium* emergiendo del interior del cuerpo de la termita *Heterotermes tenui* (izquierda) y detalles de la conidiogénesis (derecha).

1.9.2 Uso de *M. acridum* como controlador biológico

Durante el desarrollo del programa de control biológico de langosta y chapulines en África (LUBILOSA, Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux), *M. acridum* (anteriormente clasificado como *M. flavoviride*) fue el entomopatógeno más común y con mayor dispersión en poblaciones de acrididos (Moore, 2008). A fines de los años 90, el hongo fue aislado en Brasil, Madagascar (Goettel *et al.*, 1995) y México (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997). Estudios posteriores demostraron que este hongo posee alta virulencia contra *S. gregaria* (Sieglaff *et al.*, 1997, 1998; Blanford y Thomas, 2001).

Numerosas investigaciones se han enfocado a la evaluación de la virulencia de diversos aislamientos de este hongo, así como su factibilidad de uso como agentes microbianos útiles (Driver *et al.*, 2000). El resultado de ello es un biopesticida comercial de nombre Green Muscle®, que demostró ser efectivo contra la langosta del desierto (*Schistocerca gregaria*), la langosta roja (*Nomadacris septemfasciata*) y otras especies de saltamontes africanos (Kooyman *et al.*, 2003; Aston, 2004). Investigaciones posteriores en Australia con diferentes aislamientos dieron origen a Green Guard®, un biopesticida comercial, efectivo contra la langosta australiana (*Chortoicetes terminifera*), la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) y varias especies más (Hunter, 2005; Zhang y Hunter, 2005).

La eficacia del hongo para controlar la plaga de la langosta ha sido evaluada en distintas ocasiones y lugares como África (Lomer *et al.*, 2001), Australia (Hunter *et al.*, 2001; Hunter, 2005) Brasil (Magalhães *et al.*, 2001) y México (Hernandez-Velazquez *et al.*, 2000), demostrando su efectividad en todos esos lugares.

En México se ha trabajado desde principios de la década de los 1990 en la búsqueda de entomopatógenos potencialmente útiles para el control biológico de la langosta y se ha demostrado que ésta es susceptible de ser atacada por el hongo *Metarhizium acridum*. En el año 2000 se comenzó a utilizar en la realización de algunas pruebas de efectividad (Hernández-Velázquez *et al.*, 2000).

El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), en Colima, lleva a cabo un programa de carácter regional y nacional contra insectos plaga de importancia económica, donde se evalúan aislamientos del hongo *M. acridum* (SENASICA-INFOMEX, 2010). Asimismo, en el estado de Campeche se evaluó el aislado MaPL40 del hongo en diferentes dosis y tipos de formulaciones, observándose una disminución en la población de ninfas de *S. piceifrons piceifrons* (Poot, 2000).

En 2009 se trabajó en la implementación del control microbiano de langosta con *M. acridum* dentro de un programa de Manejo Integrado de la Langosta en Yucatán, Tamaulipas, San Luís Potosí y Veracruz, para lo cual el Laboratorio de Producción de Hongos Entomopatógenos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, ubicado en Irapuato, Guanajuato, produjo formulado del hongo, bajo la tecnología transferida por el CNRCB, para ser aplicado en 20,000 ha (SENASICA-INFOMEX, 2009).

Durante el año 2011 se aplicó formulado de *M. acridum* durante los meses de julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre, en 369 ha de 2103 ha con problemas de langosta (18 % del total, el resto correspondió a control químico) en los estados de Yucatan y Campeche. Durante el año 2012 se utilizó también en Campeche y Yucatán, pero solamente en 149 ha de las 2,731 ha en las que se aplicaron medidas de control contra la langosta (5 % del total) (SENASICA, 2012c).

Respecto al chapulín, en 2011 se utilizó *M. acridum* en 5656 ha, de un total de 38,830 ha (14.5 % del total) en los estados de Chihuahua, Guanajuato y Tlaxcala. Para 2012 se aplicó en los mismos estados en 7,512 ha de un total de 54,056 ha con problemas (14 %) (SENASICA, 2012d)

Por lo anterior, es evidente que el control biológico con *M. acridum*, aunque no sea la medida de defensa principal, se ha constituido como una alternativa importante para el manejo de plagas y por ello deben profundizarse los estudios biológicos de este agente microbiano.

1.9.3 Persistencia y viabilidad

El control biológico es una alternativa favorable para el control de plagas agrícolas; sin embargo, se requiere de amplios estudios multidisciplinarios sobre aspectos genéticos, fisiológicos y biológicos, entre otros, de los organismos utilizados en dicho control para poder llegar a formulados eficientes para la aplicación en el campo agrícola y que sean inocuos para el hombre, los animales y el

ambiente. Uno de estos aspectos, que ha sido poco estudiado, es la persistencia del hongo, que se entiende como la duración de organismos viables en el ambiente después de que han sido aplicados. En este sentido, el micoinsecticida puede ser transferido por tres vías al insecto blanco: a) impacto directo con las gotas asperjadas; b) infección secundaria por residuos de la aspersión en vegetación y/o suelo, y c) transmisión horizontal del patógeno o ciclo secundario (Bateman *et al.*, 1998).

Cuando los insectos son impactados directamente por la aspersión, es de poca importancia la persistencia de las esporas (Jenkins, 1996); sin embargo, sí lo es en la contaminación por residuos en vegetación y suelo y esta ruta de infección puede ser fundamental en el éxito de la aplicación, la cual depende en gran medida de la formulación y los factores abióticos que debe tolerar el formulado como son la temperatura, humedad relativa e intensidad de luz (Moore *et al.*, 1992; Bateman *et al.*, 1993; Morley-Davies *et al.*, 1996). Diversos estudios con *M. acridum* han mostrado diferentes niveles de virulencia del hongo. También se ha observado que estos mismos factores influyen en el crecimiento normal del hongo y en su virulencia hacia el insecto (Matthew y Jenkins, 1997) .

Otro aspecto crítico que no ha sido evaluado aún y que pudiera tener gran importancia es la persistencia y viabilidad en el aire de esporas de *M. acridum* después de haber sido asperjado el formulado. La mayoría de los estudios se han enfocado en la capacidad del hongo de atacar a una especie de insecto en particular y pocos se han dirigido en determinar el destino del hongo una vez asperjado, y entre éstos, la metodología predominante consiste en enterrar inóculos en campos experimentales controlados y cuantificar el porcentaje de ellos que permanecen viables y capaces de infectar al insecto estudiado (Kaaya *et al.*, 1996; Vaenninen *et al.*, 2000; Hu y St Leger, 2002; Ekesi *et al.*, 2005).

Es complicado extrapolar estos resultados a las regiones agrícolas, ya que éstas son ecosistemas dinámicos en los que hay flujos constantes de materia y energía, interacciones diversas entre especies, aunado al efecto de la actividad humana. Se sabe, por ejemplo, que las zonas de cultivo son altamente perturbadas debido a los procesos de cosecha, y las comunidades de hongos entomopatógenos en suelos arables son diferentes de las comunidades de hábitats menos perturbados (Steenberg *et al.*, 1995; Bidochka *et al.*, 1998; Meyling y Eilenberg, 2006).

La importancia de la persistencia puede ser abordada desde dos puntos de interés: en uno de ellos se busca que el hongo tenga una duración limitada en el tiempo que minimice posibles

aspectos perjudiciales a especies no-blanco; en el otro, se busca que el hongo persista el mayor tiempo posible para que se reduzca la necesidad de aspersiones continuas (Zimmermann, 2007). Por ello es importante determinar la persistencia de *M. acridum* en las zonas donde se aplica de manera regular, ya que esto permite conocer con mayor precisión la dinámica poblacional del hongo y de esta forma tomar las medidas adecuadas ante su posible aumento o disminución en un momento dado. El muestreo ambiental para el monitoreo de agentes entomopatogénicos mediante técnicas moleculares basadas en PCR, junto con técnicas de cultivo, proveen las herramientas necesarias para llevar a cabo esta tarea (Castrillo *et al.*, 2007).

1.9.4 Factores abióticos que afectan la viabilidad de *M. acridum*

El crecimiento y supervivencia de los hongos están determinados, en primer lugar, por los factores abióticos, principalmente temperatura, radiación solar y humedad. Otros factores meteorológicos, como la lluvia y el viento, contribuyen a la eficacia y dispersión de los entomopatógenos en campo, pero el impacto del clima en la efectividad de *M. acridum* no ha sido ampliamente estudiado, y debe hacerse hincapié en que la mayoría de los datos obtenidos acerca de los factores abióticos han sido adquiridos de pruebas de laboratorio, por lo tanto, los datos obtenidos deben contrastarse con pruebas en campo e investigarse más a fondo las interacciones entre los diversos parámetros meteorológicos (Ignoffo, 1992; Inglis *et al.*, 2001).

1.9.4.1 Temperatura

La temperatura actúa no sólo en la germinación de las esporas de hongos y en el desarrollo de las hifas, sino también en la velocidad y cantidad de la esporulación (Benz, 1987). La temperatura ambiental en la mayoría de los agroecosistemas se sitúa en un intervalo entre 10 y 40 °C durante la estación de crecimiento (Ignoffo, 1992). Varios estudios han determinado que *M. acridum* no se ve adversamente afectado por la mayoría de las temperaturas situadas en este rango. La temperatura óptima de crecimiento para *M. acridum* es de 28-30 °C, con algún grado de crecimiento observado entre los 15 y 30 °C, pero esto varía de acuerdo con el origen y tipo de aislamiento (Welling *et al.*, 1994). Una comparación de aislamientos de Australia y México (Milner *et al.*, 2003a) demostró que los aislamientos estudiados exhibieron un crecimiento óptimo a 28 °C sobre Sabouraud-Dextrosa-Agar (SDA), pero se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento, siendo uno de

los aislamientos mexicanos el que más rápido crecía, además, este mismo aislamiento era el único capaz de producir conidios por encima de los 35 °C.

Otros estudios se han enfocado en la tolerancia térmica de formulaciones oleosas de *M. acridum*. McClatchie y colaboradores (1994) observaron un ligero descenso en la germinación de conidios de una formulación oleosa que fueron expuestos a 60 °C por 5 h. Incluso después de 5 h a 80 °C el 10 % de los conidios expuestos fueron capaces de germinar. Almacenados a 55 °C durante 6 semanas mostraron un 20 % de viabilidad. Morley-Davies *et al.* (1996) demostraron tasas de germinación mayores al 75 % después de 90 días de almacenaje a temperaturas entre -10 a 40 °C para Green Muscle®, en el caso de formulaciones secas y oleosas.

Estudios adicionales han investigado los efectos de regímenes fluctuantes de temperatura sobre la virulencia en bioensayos de acrídidos. Inglis *et al.* (1999) determinaron un tiempo letal medio de 4.8 días para ninfas de saltamontes infectadas con un aislamiento brasileño de *M. flavoviride* bajo un régimen de 20/30 °C (fotoperíodo 12 h:12 h), comparado con los 5.4 días para los incubados a 25 °C de manera constante. Ambos esquemas produjeron casi 80 % de colonización externa en cadáveres, comparado con 24 % de colonización externa para ninfas que habían sido incubadas bajo un régimen de 10/40 °C (fotoperíodo 12 h/12 h).

1.9.4.2 Radiación Solar

Ignoffo (1992) declaró que la luz solar es el factor ambiental más destructivo que afecta la persistencia de los entomopatógenos. Se ha determinado que longitudes de onda en el intervalo de los 285 a 315 nm (UV-B) son las más dañinas para los hongos. Morley-Davies y colaboradores (1996) expusieron formulaciones oleosas de conidios de *M. flavoviride* a luz solar simulada durante 24 h (hasta alcanzar una temperatura de 40 °C), para tener condiciones aproximadas a las del ecuador. El impacto en la germinación de conidios fue severo, con la germinación reducida a 28.6 %. Después de sólo 8 h la germinación declinó a 39.4 %. Fargues *et al.* (1996) encontraron resultados similares, con tasas de germinación del 11.1 % después de 8 h de radiación.

1.9.4.3 Humedad

El agua libre es un elemento crítico para la germinación de esporas y la esporulación. Mientras que la disponibilidad del agua en el microclima de la cutícula del hospedero es crucial para la germinación de los conidios, la conidiogénesis sobre los cadáveres de insectos es altamente dependiente de la humedad atmosférica circundante. Ibrahim et al. (1999) determinaron que los conidios de *M. anisopliae* requerían humedad relativa mayor al 98 % para germinación. El tipo de formulación (acuoso u oleoso) no influía en este requisito. Ellos también demostraron la habilidad del agua de difundirse del hemocele, a través de la cutícula hacia la superficie, presumiblemente a través de canales en los poros. Otros investigadores, (Magalhães et al., 2000), observaron que *M. acridum* esporulaba internamente dentro del saltamontes *Rhammatocerus schistocercoides* bajo humedades relativas de 53 y 75 %. Fargues et al. (1997) encontraron que un intervalo de 13 a 100 % de humedad relativa no tuvo efecto en la mortalidad acumulativa, micosis acumulativa o tiempo letal medio en langostas tratadas con *M. flavoviride*. Un tiempo letal medio de 5 días fue establecido por Bateman et al. (1993) para langostas inoculadas con formulaciones oleosas de *M. flavoviride* e incubadas bajo humedad relativa del 35 %.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la persistencia y la viabilidad de *Metarhizium acridum* en el ambiente de zonas rurales a lo largo de un ciclo anual, después de ser aplicado como agente microbiano para el control biológico de la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons*, y el chapulín *Sphenarium purpurascens*.

2.2 Objetivos Particulares

- a) Desarrollar métodos adecuados para la detección molecular de esporas del hongo *Metarhizium acridum* obtenidas del aire, del suelo y de la vegetación.
- b) Cuantificar las concentraciones de *Metarhizium acridum*, una vez que ha sido aplicado como agente de control biológico en zonas rurales, y correlacionarlo con cambios en los parámetros atmosféricos, y fisicoquímicos del suelo.
- c) Establecer recomendaciones para el uso adecuado y eficiente del hongo en zonas rurales para lograr un control eficiente de langostas y chapulines.

2.3 Justificación

En México, una de las plagas de insectos más devastadoras es la de la langosta (*Schistocerca piceifrons piceifrons*), y en menor escala la de los chapulines (principalmente de los géneros: *Sphenarium*, *Melanoplus*, *Brachystola*, *Boopedon*, *Idiarthron* y *Taeniopoda*). Sus efectos se extienden por numerosos estados de la República y generan cuantiosas pérdidas económicas, lo que obliga al uso, y en ocasiones abuso, de plaguicidas químicos que poseen evidentes propiedades tóxicas. La utilización de hongos entomopatógenos como agentes microbianos para el control biológico representa una alternativa viable para el combate de ortópteros, como la langosta y los chapulines. El empleo de este hongo como agente microbiano ha sido utilizado en México desde hace tiempo; sin embargo, aún falta por conocer aspectos biológicos importantes como la persistencia y la viabilidad, después de que éste ha sido aplicado en campo. Esta información incidirá directamente sobre un mejor control biológico de estos insectos dañinos, promoviendo una agricultura moderna que no contamine el ambiente y no afecte la salud del hombre, de los animales y de la vegetación, como ocurre con la aplicación indiscriminada de insecticidas químicos no selectivos.

2.4 Hipótesis

Se detectará la presencia y viabilidad de *Metarhizium acridum* en el ambiente de la zona de estudio, durante un ciclo anual, después de ser asperjado como controlador biológico de ortópteros.

III. ANTECEDENTES

Para determinar la persistencia de un organismo a través del tiempo se requiere contar con métodos que permitan establecer si dichos organismos se encuentran viables, las concentraciones que presentan en el ambiente y la tasa con la que declinan a través del tiempo. Se han desarrollado diversos métodos de monitoreo para identificar y cuantificar microorganismos y la elección del método depende del nivel de especificidad requerido. En el caso de agentes de control biológico, un método que permita discriminar entre diversos aislamientos es necesario si en el ambiente se encuentran organismos nativos, de lo contrario, la especificidad requerida puede ser menor. Entre los métodos de monitoreo de control biológico el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) después de dilución en placa, o el uso de medios semiselectivos o selectivos ha sido utilizado frecuentemente y con éxito considerable para monitorear el tamaño de poblaciones o agentes microbianos de control (Donegan *et al.*, 1991; Teixido *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2008). Este método por sí solo, aunque es simple y barato, está basado en características morfológicas. Asimismo, el empleo del microscopio como única herramienta para la detección de esporas pequeñas producidas por muchos hongos, y del empleo de medios de cultivo inapropiados para su desarrollo, o por no cultivarse *in vitro*, han influido en las especies que pueden ser detectadas. Por lo anterior, se han desarrollado métodos moleculares para el diagnóstico de una gran variedad de hongos, principalmente patógenos involucrados en enfermedades de plantas (Williams *et al.*, 2001), aunque ya el potencial de estas técnicas para la detección de esporas anemófilas había sido reconocido por MacNeil *et al.* (1995) y McCartney *et al.* (1997). Los métodos de detección basados en ADN han mostrado gran potencial para lograr una detección sensible y específica, como se demostró para *Pneumocystis carinii* mediante PCR (Olsson *et al.*, 1996; Wakefield, 1996) y para las esporas de *Stachybotrys chartarum* muestreadas del aire, utilizando el mismo método (Haugland *et al.*, 1999).

Investigaciones recientes, desarrollaron, compararon y optimizaron las técnicas de extracción de ADN, y los métodos basados en PCR para la detección de esporas de hongos patógenos del aire, así como los niveles más sensibles de detección. Asimismo, las esporas de hongos fitopatógenos colectadas de la atmósfera de campos agrícolas, como *Leptosphaeria maculans*, *Pyrenopeziza brassicae* y *Sclerotinia sclerotiorum*, fueron detectadas en PCR mediante el uso de oligonucleótidos específicos (Williams *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002a y b; Freeman *et al.*, 2002).

También se han utilizado métodos moleculares para la detección de ADN específico de diversos hongos en suelo, como *Tuber melanosporum* (Suz et al., 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (Theodoro et al., 2005), *Trichoderma harzianum* (Rubio et al., 2005) y *Colletotrichum coccodes* (Dauch et al., 2003), por mencionar algunos, así como para la detección de ADN de diversos hongos en plantas, como *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella melonis* (Zhang y Hunter, 2005) y *Ammophila arenaria* (Kowalchuk et al., 2002).

El desarrollo de marcadores moleculares basados en PCR permite la detección de secuencias de ADN específicas y ofrecen la posibilidad de diferenciar aislamientos estrechamente emparentados de la misma especie (Olive y Bean, 1999). Cuando las secuencias de ADN no están disponibles en bases de datos para el diseño de oligonucleótidos de PCR, la búsqueda de un blanco anónimo de ADN ha probado ser exitosa (Williams et al., 1990). La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP, por sus siglas en inglés) es el método más usado para distinguir entre distintos aislamientos de la misma especie debido a su fácil uso y alto poder discriminatorio. No obstante, la reproducibilidad puede ser un problema para la aplicación del método RAPD-PCR, especialmente para bandas débilmente amplificadas. Como RADP está basado en el uso de oligonucleótidos cortos para la amplificación de ADN genómico bajo condiciones no restrictivas, la carencia de reproducibilidad se mantiene como uno de sus mayores inconvenientes. No obstante, la transformación de oligonucleótidos RADP en oligonucleótidos SCAR (regiones amplificadas de secuencia caracterizada, SCAR por siglas en inglés) (Paran y Michelmore, 1993) ha permitido una amplificación reproducible de un fragmento específico de ADN (Scheda et al., 2002; Loncaric et al., 2008).

Los marcadores SCARS son reproducibles, específicos y pueden representar un sólo locus en el genoma, ventajas de las que carecen los marcadores RADP; sin embargo, es crucial durante su diseño evaluar su capacidad de discriminar entre aislamientos cercanamente emparentados para evitar la mayor cantidad posible de falsos positivos, situación que reduce su utilidad (Abbasi et al., 1999; De Clercq et al., 2003; Pujol et al., 2005; Nunes et al., 2008).

Se han llevado a cabo numerosos estudios de taxonomía molecular empleando la metodología de RADP-PCR a ejemplares del género *Metarhizium* (Cobb y Clarkson, 1993; Fegan et

al., 1993; Bidochka *et al.*, 1994; Leal *et al.*, 1994; Driver *et al.*, 2000; Bidochka *et al.*, 2001; Hu y St. Leger, 2002; Cano, 2003), pero fue hasta 2005 que Entz y colaboradores diseñaron los primeros marcadores SCARS específicos para la detección de *Metarhizium acridum* (Entz *et al.*, 2005) .

En proyectos previos, se ha procedido a la caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos de *M. anisopliae* de México, de la colección del Centro de Referencia de Control Biológico (DGSV, SAGARPA) de Tecomán, Colima, y de la UNAM (Ayala-Zermeño *et al.*, 1999; Cano-Ramírez *et al.*, 2002; Navarro-Barranco *et al.*, 2002; Toriello y Reyes-Montes, 2002; Toriello *et al.*, 2003). Los protocolos publicados para PCR de hongos requieren de múltiples pasos complejos, diseñados para romper la pared celular, liberar los ácidos nucleicos, purificarlos y concentrarlos de forma conveniente para que la PCR pueda llevarse a cabo. Estos pasos requieren, normalmente, la transferencia de una muestra entre múltiples tubos, separación de fases o filtración y cada uno de estos pasos puede reducir significativamente la sensibilidad debido a la pérdida de ácidos nucleicos e incrementar la probabilidad de contaminación (McDevitt *et al.*, 2004). Estos problemas pueden no ser muy serios en casos donde se tengan muestras abundantes y en gran cantidad, pero en el caso de detección de hongos del aire se vuelven críticos, esto debido a que, normalmente, los organismos se encuentran en cantidades mínimas por lo que se requieren equipos capaces de succionar grandes cantidades de aire, durante largos períodos de tiempo, para lograr coleccionar cantidades apreciables de material genético, es por ello que uno de los aspectos cruciales para una identificación mediante PCR de partículas aerobiológicas es una gran sensibilidad.

Una limitación importante que suele encontrarse en las pruebas de PCR para muestras ambientales es la presencia de sustancias exógenas, llamadas inhibidores, los cuales son comúnmente encontrados en muestras ambientales. Estos inhibidores pueden interferir con la amplificación por PCR (McDevitt *et al.*, 2004; McDevitt *et al.*, 2007). Los inhibidores pueden interferir con la lisis celular, necesaria para la extracción del ADN, o causar la falla completa o parcial de la reacción de PCR dando lugar a la presencia de falsos negativos, resultado de no detectar ácidos nucleicos que sí están presentes. Los inhibidores pueden provenir de muchas fuentes e interferir con la PCR en múltiples formas (McDevitt *et al.*, 2007). Wilson (1997) elaboró una lista de diferentes sustratos e inhibidores asociados a ellos. Pequeñas cantidades de ácidos húmicos, metales pesados, constituyentes de células bacteriales, enzimas proteolíticas y altas concentraciones de ADN no-blanco han sido asociados con la inhibición de la PCR en matrices ambientales como aire, suelo, aguas naturales, aguas residuales y sedimentos (Alvarez *et al.*, 1995; Keswani *et al.*, 2005).

La inhibición puede ser superada por la adición a la mezcla de reacción de compuestos que posean alta afinidad con el inhibidor, uso de polimerasas termoestables, que suelen ser más resistentes a los inhibidores, la dilución de muestras y el empleo de oligonucleótidos anidados puede facilitar la amplificación (Álvarez *et al.*, 1995; Wilson, 1997; Cruz-Perez *et al.*, 2001; Haugland *et al.*, 2002).

La mayoría de los métodos de detección de hongos basados en PCR no son fácilmente adaptables para su uso en campo, por lo que se requiere de técnicas especializadas que cubran los aspectos de un muestreo adecuado, extracción y purificación de ADN que evite al máximo la pérdida de material genético, y finalmente una reacción de PCR específica y sensible, asimismo la aplicación de técnicas moleculares de detección resulta útil y rápida para la detección de esporas de hongos que son transportadas en el aire y que pueden ser fuentes potenciales para la dispersión de epidemias o para su control.

En cuanto a la persistencia de especies del género *Metarhizium*, Hu y St. Leger (2002) encontraron que ejemplares recombinantes de *M. acridum* aplicados en suelos de zonas templadas decaen en su concentración inicial de $10^5/g$ de suelo a $10^3/g$ de suelo al cabo de unos meses, excepto en la zona de la rizósfera donde se mantienen las concentraciones iniciales. Milner *et al.* (2003b) evaluaron la persistencia de formulaciones comerciales de *M. anisopliae*, variedades *anisopliae* y *lepidotonium*, aplicadas en campos de cultivo de caña de azúcar australianos y encontraron que mantuvieron su persistencia en el suelo durante 3.5 años; similar a lo reportado por Vaenninen *et al.*, (2000), cuando evaluaron la persistencia de aplicaciones de *M. anisopliae* en zonas de cultivo finlandesas (con nieve en invierno), descubriendo que muestras de suelo de estas zonas son capaces de infectar a larvas de *Tenebrio* sp. hasta 3 años después de ser aplicadas. También se sabe que *M. anisopliae* tiene la capacidad de mantenerse viable en arena estéril hasta 8 meses a 25 °C (Kaaya *et al.*, 1996), y 183 días en suelo de zonas de cultivo (Ekesi *et al.*, 2005).

La persistencia en la cubierta vegetal ha sido poco estudiada. La viabilidad de *M. acridum* en la cubierta vegetal es muy susceptible a las condiciones ambientales, tal como lo demostraron Inyang *et al.* (2000) al simular lluvia y encontrar reducciones importantes en la viabilidad de las esporas. Hunter *et al.* (2001) reportaron que la persistencia de *M. acridum* se mantuvo cerca de 7 días en la vegetación en zonas australianas plagadas con *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera:

Acrididae). Moore y colaboradores (1996) reportaron que la vida media de conidios sobre vegetación tratada fue de 4.3 días.

Respecto a la persistencia de esporas de *M. acridum* en el aire no hay estudios que la evalúen. En cuanto a *Metarhizium anisopliae* (sin especificar variedad), sólo se ha publicado un estudio. Darbro y Thomas (2009) evaluaron la persistencia de conidios de *Metarhizium anisopliae* en ambientes cerrados (con el objetivo de evaluar su efectividad contra mosquitos vectores de malaria y dengue) y encontraron que los aislamientos usados por ellos mantuvieron su viabilidad sólo por una semana, y además, las concentraciones iniciales decayeron de 7,000 conidios/m³ a 500 conidios/m³ en sólo 48 h.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Zonas de estudio

La evaluación de la persistencia y viabilidad de las esporas asperjadas como controlador biológico de langostas y chapulines se realizó en dos poblados: Tizimín, Yucatán y San Mateo Coatepec, Puebla.

4.1.1 Tizimín

Tizimín (21°09' N 88°09' O) (Fig. 22) es una pequeña ciudad en el noreste del estado de Yucatán con grandes poblaciones de langostas. Se encuentra ubicada a 160 Km al este de la capital, Mérida, a 200 km al oeste de la ciudad de Cancún, así como a 42 km al sur de Río Lagartos. El clima es cálido y húmedo, con temperaturas promedio de 25.8 °C, con una precipitación promedio anual de 1084 mm³ y fuerte actividad ganadera (Ayuntamiento-Tizimín, 2007).

Durante noviembre del 2005 se realizaron dos visitas para evaluar la factibilidad del estudio y gracias al apoyo de la Junta Local de Sanidad Vegetal fue posible dejar funcionando el muestreador [trampa de esporas Hirst (Burkard) durante 6 meses aproximadamente]. Sin embargo, los problemas de carácter técnico, así como la lejanía de la zona, hicieron recomendable la búsqueda de un nuevo lugar donde realizar el estudio, siendo elegido para este propósito el poblado de San Mateo Coatepec, Puebla, no obstante, no dejarán de reportarse algunos resultados obtenidos en esta localidad.



Fig. 22. Ubicación de Tizimín, Yucatán.

4.1.2 San Mateo Coatepec

San Mateo Coatepec (Fig. 23) es una pequeña localidad perteneciente al municipio de Atzitzihuacan, Puebla. Se localiza en la parte centro oeste del estado. Sus coordenadas geográficas son 18°48'33.45"N y 98°39'10.82"O. Posee una población de aproximadamente 2,000 habitantes que se dedican principalmente a actividades agrícolas, entre las que sobresalen el cultivo de maíz (*Zea mays*), frijol (*Judaphaseolus vulgaris*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). El clima es de tipo semicálido, subhúmedo con lluvias en verano, carece de fuentes de agua cercanas (ríos o arroyos) y el tipo de suelo predominante es cambisol (Ayuntamiento-Atzitzihuacan, 2007).

Desde mediados de los años 90 la región ha sido infestada por una población de chapulines de la especie *Sphenarium purpurascens*, que se ha controlado exclusivamente mediante el uso de plaguicidas químicos y nunca se ha aplicado el hongo *Metarhizium acridum* como controlador biológico, razones que hicieron de esta población un lugar adecuado para el estudio a largo plazo.

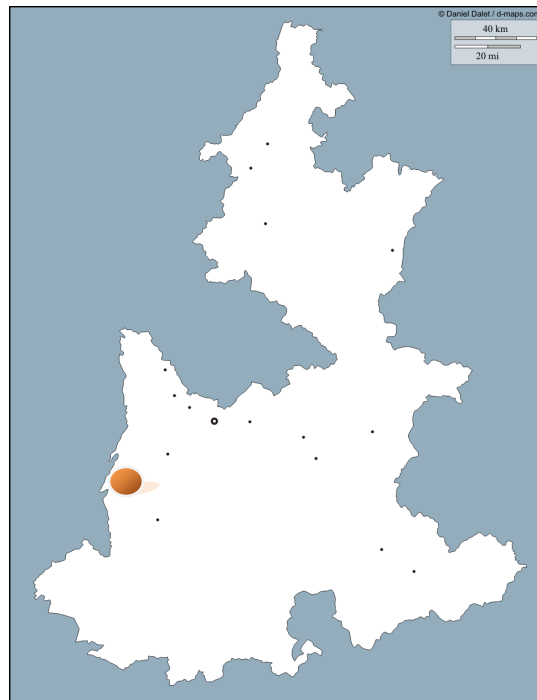


Fig. 23. Ubicación del poblado de San Mateo Coatepec, Puebla.

4.2 Estandarización de las condiciones de extracción de ADN de *M. acridum*

4.2.1 Cultivo de M. acridum

Para este estudio se utilizó el cultivo monospórico EH-502/8 de *Metarhizium acridum* (el mismo que se aplica en campo), el cual se mantuvo en medio Agar-Dextrosa-Papa (ADP) hasta su esporulación (a 28°C durante 2-3 semanas de incubación).

4.2.1 Preparación de suspensiones de esporas para la extracción del ADN

Se obtuvo una suspensión de conidios de placas de ADP agregando sobre la superficie de la placa 5 ml de Nonidet P40 estéril al 0.1 %. La suspensión fue ajustada mediante la cuantificación de conidios en la cámara de Neubauer, y se hicieron diluciones seriadas log 10¹⁰ para usarlas en la extracción de ADN.

4.2.3 Obtención de mechas de algodón inoculadas con M. acridum

Se inocularon mechas de algodón con conidios de *M. acridum* impregnadas con medio de cultivo ADP y se mantuvieron a 28 °C durante 3 semanas para realizar los experimentos en un minitúnel de viento (Fig. 29).

4.2.4 Rompimiento de la pared de las esporas

El método usado para el rompimiento de la pared de las esporas y la posterior extracción del ADN fue adaptado primero por Williams et al. (2001) y posteriormente por Calderón et al. (2002a). Se tomaron 250 µl de las suspensiones de esporas y se agregaron a microtubos de 2 ml que contenían previamente 0.2 g de perlas de vidrio (400 a 455 µm de diámetro y lavadas con ácido clorhídrico). Los tubos fueron agitados en el equipo FastPrep (Thermo), realizándose pruebas para buscar la velocidad y el tiempo óptimo de agitación, con el fin de determinar las condiciones más eficientes que permitieron obtener la mayor cantidad de esporas rotas. El ensayo inició con las condiciones reportadas por Calderón et al. (2002a), es decir, 2 períodos de 40 s, a 6 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada período. Se analizaron las suspensiones de esporas resultantes

bajo el microscopio, para determinar el tiempo y velocidades óptimas en las que se obtuvo el mayor porcentaje de esporas rotas y su contenido liberado dentro de la suspensión.

4.2.5 Extracción del ADN

A partir de 50 µl de la suspensión resultante se purificó el ADN siguiendo el método de Lee y Taylor (1990) y modificado por Williams et al. (2001), consistiendo en la adición de 50 µl de amortiguador de lisis (Tris, EDTA, SDS y β-mercaptoetanol), agitación en vortex durante 5 s e incubación a 65 °C por 1 hora. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de fenol/cloroformo 1:1, se agitó nuevamente en vórtex 10 s y se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min. La fase acuosa fue transferida a otro tubo que contenía 60 µl de isopropanol frío, 4 µl de acetato de amonio 6 M y 20 µg de glicógeno (Roche). Se dejaron reposar una hora a -20 °C y después se centrifugaron 15 min a 14,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el botón se lavó con 100 µl de etanol al 70 % frío. De nuevo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el botón de ADN fue resuspendido en 50 µl de agua estéril Milli-Q (Millipore) y 5 µl de dicha suspensión fueron utilizados en la prueba de PCR.

4.3 Detección de ADN de *M. acridum* utilizando oligonucleótidos AB28, TW81, Mac-ITS-spF y Mac-ITS-spR

4.3.1 Determinación de la sensibilidad

Para realizar la detección de ADN específico para *M. acridum* se utilizaron los oligonucleótidos específicos desarrollados por Entz y colaboradores (2005). El primer par incluye a los oligos AB28 (5`GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC3`) y TW81 (5`ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT3`) que amplifican una región de longitud variable de ADN ribosómico común a todos los hongos, y que es de 605 pb para *M. acridum*; y de los oligonucleótidos Mac-ITS-spF (5`CTG TCA CTG TTG CTT CGG CGG TAC3`) y Mac-ITS-spR (5`CCC GTT GCG AGT GAG TTA CTA CTG3`) que amplifican una región de 420 pb exclusiva para *M. acridum* contenida dentro del producto de PCR de los primeros oligonucleótidos (esto se hace con el fin de aumentar la sensibilidad final y recibe el nombre de PCR anidada). Estos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de aislamientos diferentes de los que se utilizan en México, por lo que hubo que probar su sensibilidad. Para la primera PCR (oligonucleótidos AB28, TW81) cada 25 µl contenían 1.5 Mm MgCl₂, 0.025 Mm desoxirribonucleótidos trifosfatados, 10

pmol de ambos iniciadores, 2.5 unidades de Taq polimerasa y 5 µl de muestra de ADN. Las condiciones del ensayo fueron: 1 ciclo 94 °C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1.5 min y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Se utilizó ADN extraído de *M. acridum* de 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10, 1 y 0 conidios. Para la segunda PCR (oligonucleótidos Mac-ITS-spF, Mac-ITS-spR). Cada 25 µl contenían 1.5 Mm MgCl₂, 0.025 Mm desoxirribonucleótidos trifosfatados, 10 pmol de ambos iniciadores, 2.5 unidades de Taq polimerasa y 1 µl del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos anteriores. Las condiciones del ensayo fueron: 1 ciclo 94 °C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min.

4.3.2 Detección en minitúnel de viento con mechas de algodón inoculadas con *M. acridum*

Se colocaron las mechas de algodón inoculadas con esporas de *M. acridum* dentro de un minitúnel de viento (Fig.24) (construido en el taller mecánico del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM). El túnel mide 90 cm de largo, por 15 cm de ancho y 15 cm de altura, y está unido a una cámara de 35 cm de alto, por 24 cm de largo y 24 cm de ancho, donde se acopla un humidificador para control de humedad, y situado afuera se encuentra el ventilador eléctrico. Posee compartimentos para la introducción y colocación de muestras.



Fig. 24. Minitúnel de viento.

A las mechas de algodón se les aplicó una corriente de aire de 4 m/s durante 3 períodos de 4 horas (un período por día), tiempo en el cual las esporas liberadas se impactaron en cintas de celofán impregnadas con una mezcla de vaselina y hexano (1:5), esto con el fin de simular las condiciones de campo al utilizar la trampa de esporas Hirst (Burkard). Las cintas fueron colocadas dentro de tubos Eppendorf de 1.5 ml para la extracción de ADN y su posterior análisis mediante PCR y reemplazadas cada día por cintas libres de esporas.

4.3.3 Detección de *M. acridum* en mezclas de múltiples hongos

Una vez determinada la sensibilidad se procedió a verificar su capacidad de detectar ADN de *M. acridum* de una mezcla de múltiples hongos. Para ello, se inocularon mechas de algodón en cajas Petri con medio ADP y los siguientes hongos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, y otros hongos del aire no identificados (se dejaron varias mechas expuestas al aire por un par de horas). Las cajas se incubaron a 28 °C durante dos semanas (hasta que esporularon) y las mechas se colocaron en el minitúnel de viento junto con otras mechas inoculadas con *M. acridum*, y se repitió el mismo procedimiento de los anteriores muestreos en el minitúnel de viento, con la salvedad de que sólo se cambiaron las cintas durante 2 días.

Con el fin de optimizar y eficientizar las condiciones de extracción, se probó si la inclusión del amortiguador de lisis era necesario para una adecuada extracción.

4.3.4 Extracción y detección de ADN de *M. acridum* inoculado en muestras de suelo

Se prepararon una serie de tubos cónicos con tapa de rosca que contenían 200 mg de suelo y 200 mg de perlas de vidrio. A estos tubos se les agregaron esporas de *M. acridum* para alcanzar concentraciones de 20 000, 2000, 200, 20, 2 y 0.2 conidios/ μ l. Posteriormente, se les adicionaron 400 μ l de Nonidet P40 al 0.1 %. Los tubos fueron agitados en el equipo FastPrep (Thermo), con 5 períodos de 40 s, a 6 m/s, con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo, para asegurar el rompimiento de las esporas y los siguientes pasos de la extracción de ADN fueron los mismos ya citados, los oligonucleótidos utilizados fueron AB28, TW81, Mac-ITS-spF y Mac-ITS-spR. Como testigo positivo se utilizó el ADN extraído de 10 000 conidios y como testigo negativo la mezcla de PCR sin ADN. Las muestras se hicieron por duplicado y a la mitad de los tubos se les agregaron 120 ng de Albúmina Sérica Bovina (ASB), con el fin de probar si mejoraba la amplificación por PCR como

recomienda Frías de León (2007). El producto de ambas PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio.

4.4 Detección de ADN de *M. acridum* en muestras de campo de Tizimin

4.4.1 Detección de *M. acridum* en aire

Una vez que se probó la capacidad de los oligonucleótidos para detectar el ADN de *M. acridum* se procedió a realizar un análisis con ellas en muestras traídas de una zona rural de Tizimín, Yucatán, donde se aplicó el hongo *M. acridum* como controlador biológico de la langosta.

La colecta de esporas del aire se llevó a cabo con una trampa de esporas Hirst (Burkard) (Fig. 25). Este equipo succiona 10 L de aire por min y puede funcionar 24 h durante los 365 días del año. El muestreador tiene integrado un tambor (Fig. 26) que gira en la dirección de las manecillas del reloj, sobre el cual se adhiere una cinta de celofán (Melinex), cubierta con una delgada capa de vaselina con hexano 1:5, donde se impactan las partículas colectadas del aire. Esta cinta se remueve cada semana y se corta en trozos de 24 mm los cuales corresponden a 24 h de muestreo (Fig. 27).



Fig. 25. Trampa de esporas Hirst.



Fig. 26. Tambor interno de la Trampa de esporas Hirst.



Fig. 27. Trozo de cinta de celofán Melinex.

Estos segmentos de cinta se colocaron en tubos de 1.5 ml y se sometieron al método de extracción y detección de ADN, ya indicado. Se hicieron dos visitas a Tizimín durante noviembre del 2005, y el equipo se dejó en un rancho ganadero donde se asperjó *M. acridum*.

4.4.2 Detección de *M. acridum* en suelo

Se repitió la extracción de ADN y el análisis por PCR (con las mismas condiciones señaladas anteriormente) de muestras de suelo colectadas durante noviembre de 2005 en tres ranchos ganaderos cercanos a Tizimín, Yucatán. El primero se llama San Isidro, y en ese lugar se había asperjado formulado comercial de *M. acridum* para el control de la langosta durante 2001. El segundo rancho se llama Santa Martha, y el formulado se aplicó en 2004, y finalmente el tercer rancho se llama X-Campech, y en este se habían realizado 2 aspersiones previas (dos semanas antes de la recolección de las muestras de suelo, con intervalos de una semana entre aspersiones). En los tres casos la cantidad de formulado aplicado fue de 20 g de esporas (4×10^{12} conidios) de *M. acridum* suspendidas en 1 litro de citrolina (aceite mineral) suficiente para una ha.

Para la recolección de las muestras se quitó la capa superficial de vegetación y se tomaron cerca de 100 g de suelo (a una profundidad de 5 cm, aproximadamente).

4.5 Utilización de oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R

Aunque los oligonucleótidos desarrollados por Entz y colaboradores (2005) son adecuados para la detección específica de *M. acridum*, están construidos sobre la base de aislamientos diferentes de los que se aplican en México, además de que pueden dar respuesta positiva para otras variedades y especies del género *Metarhizium* (Entz *et al.*, 2005), por ello, y basándose en aislamientos mexicanos de *M. acridum*, (los mismos que se aplican en campo) se diseñaron dos pares de oligonucleótidos específicos para este hongo. El primer par incluye a los oligonucleótidos: OPA-04(526) 1F (5' GGC-TGA-CCG-ACG-AGG-TTA-T 3') y OPA-04(526) IR (5' GAC-TGA-CGC-AAG-CTT-CAT-CC 3'), que amplifican una región de ADN de 461 pb. El segundo par incluye a los oligonucleótidos: OPA-04(526) 2F (5' GCC-GCA-AGT-TGG-ACT-ACG 3') y OPA-04(526) 2R (5' CAA-GCT-TCA-TCC-GGC-ACT-T 3'), que amplifican una región de ADN de 293 pb, que se encuentran contenidos dentro de la región amplificada por el primer par de oligonucleótidos, es decir, son oligonucleótidos diseñados para trabajar en conjunto usando una técnica de PCR anidada.

4.5.1 Estandarización de las condiciones de PCR para los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R y determinación de la sensibilidad

Se probaron diferentes condiciones de PCR para estos oligonucleótidos con el fin de encontrar las óptimas. Para ello, se hicieron modificaciones a las siguientes condiciones base: cada 25 µl de mezcla de reacción de PCR contenían 2.5 mM MgCl₂, 0.200 mM de desoxirribonucleótidos trifosfatados (DNTP's) (Bioselec), 10 picomoles de ambos iniciadores, 1.5 unidades de Taq polimerasa (Biogénica) y 5 µl de muestra de ADN, correspondiente a una concentración de 2,000 conidios/µl (es decir, el ADN de 10,000 conidios). Las condiciones del ensayo para ambas PCR's fueron: 1 ciclo 94 °C por 3 min, seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Como testigo positivo se utilizó el ADN extraído de 10,000 conidios y como testigo negativo la mezcla de PCR sin ADN. Según el caso se fueron modificando los parámetros (uno a la vez) y una vez determinadas las mejores condiciones se realizó una prueba de sensibilidad con el ADN extraído de *M. acridum* de 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10, 1 y 0 conidios. El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 80 V, en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM). Se empleó un marcador estándar de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen) y las imágenes se capturaron en un fotodocumentador Digi-Doc- It (UVP).

4.5.2 Determinación de la especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R

Una vez optimizadas las condiciones de PCR, se procedió a evaluar la especificidad de estos oligonucleótidos, para ello se probaron con extractos de ADN de nueve cepas tipo de referencia del género *Metarhizium* de acuerdo con Driver *et al.* (2000) y dos aislamientos monospóricos mexicanos.

Cuadro 2. Especies del género *Metarhizium* utilizadas en el análisis de especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R.

Especie	Clave ARSEF* o CSIRO**	Clado*** (grupo)	origen
<i>M. acridum</i>	EH-502/8	7	México
<i>M. acridum</i>	EH-531	7	México
<i>M. flavoviride</i> var. <i>majus</i>	1914*	10	Filipinas
<i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	1184*	6	Francia
<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i>	2037*	5	Filipinas
<i>M. flavoviride</i> tipo <i>E</i>	2498*	2	Brasil
<i>M. acridum</i>	fi-985**	7	Australia
<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i>	fi-147**	8	Australia
<i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i>	f1-698**	3	Nueva Zelanda
<i>M. acridum</i>	fi-987**	7	Nigeria
<i>M. anisopliae</i> var. <i>pemphigum</i>	fi-72**	4	Inglaterra

* Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF)

** Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO)

***Clados de *Metarhizium* caracterizados genotípicamente por Driver et al. (2000).

Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 1.5 mM MgCl₂, 0.125 mM desoxirribonucleótidos trifosfatados, 50 pmol de ambos iniciadores, 1.5 unidades de Taq polimerasa (Biogénica) y 10 ng de ADN (1 µl del producto de la primera PCR para el segundo par de oligonucleótidos). Como testigo positivo se utilizó el ADN extraído de 10,000 conidios y como testigo negativo la mezcla de PCR sin ADN. También se realizó una comparación con los resultados obtenidos utilizando los oligonucleótidos de Entz y colaboradores (2005). Las condiciones del ensayo fueron las ya descritas para cada par de oligonucleótidos.

4.6 Detección de ADN de *M. acridum* en muestras de campo de San Mateo Coatepec, Puebla

4.6.1 Aspersión del hongo

Análisis previos, realizados durante mayo y junio del 2007, mostraron la ausencia de *M. acridum* en muestras de aire, suelo y vegetación provenientes de San Mateo Coatepec, Puebla. Los experimentos se realizaron en una parcela agrícola de 1 ha, utilizada para el cultivo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). El hongo fue producido por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, usando una técnica de fermentación sólida bifásica sobre granos de arroz entero y la viabilidad de los conidios fue mayor del 95 %. El formulado del hongo fue asperjado los días 17 de agosto y 9 de octubre de 2007 con un aspersor Micron Ulva+ (Bromyard, UK), con un flujo de 60ml/min y una velocidad de marcha de 1m/s, durante las primeras horas de la mañana, a una concentración de 4×10^{12} conidios/ha, mediante una técnica de ultra bajo volumen con base oleosa (aceite vegetal). Al momento de la aspersión, las plantas de amaranto tenían una altura promedio de 30 cm y se tuvo cuidado de distribuir el formulado de *Metarhizium acridum* de manera uniforme sobre las plantas.

4.6.2 Determinación de la persistencia

Se hicieron 26 muestreos del aire, suelo y cubierta vegetal de la zona de estudio a lo largo de 16 meses para cuantificar la cantidad de partículas viables de *M. acridum* en cada uno de ellos.

4.6.2.1 Colecta de muestras del suelo

En cada fecha de muestreo se eligieron de manera aleatoria tres sitios dentro de la zona asperjada y se colectaron aproximadamente 100 g de suelo a una profundidad de 15 cm (lo más cerca posible de las raíces de las plantas, pero sin dañarlas). La profundidad de 10-15 cm se escogió porque estudios previos mostraron que a esas profundidades (y en la zona de la rizósfera) se encuentran las mayores concentraciones de conidios viables de *M. acridum* (Hu y Leger, 2002). Un gramo de cada muestra fue resuspendido en una solución de Nonidet P40 al 0.1 %, agitado por medio de un vórtex durante 3 min y se dejó reposar durante 7 min. La mezcla fue diluida hasta una concentración de 10^{-3} (por duplicado). Las muestras fueron sembradas sobre cajas de Petri con medio agar-dextrosa-papa (ADP), adicionado con 500 mg de cloranfenicol por litro e incubadas a

28°C durante 7 días. Las colonias desarrolladas con características del género *Metarhizium* fueron purificadas por resiembra y confirmada su identidad mediante PCR. Las colonias de *M. acridum* fueron cuantificadas para determinar el número de UFC/g de suelo. Los resultados muestran el promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones. El resto del suelo se utilizó para los análisis fisicoquímicos.

4.6.2.2 Colecta de muestras de vegetación

Se tomaron aproximadamente 30 g de hojas de la vegetación presente de 3 sitios elegidos de manera aleatoria dentro de la zona donde se asperjó *M. acridum*. Un gramo de cada muestra de hoja fue resuspendido en una solución de Nonidet P40 al 0.1 %, agitado por medio de un vórtex durante 3 min y se dejó reposar durante 7 min. La mezcla fue diluida hasta una concentración de 10^{-3} (por duplicado). Las muestras fueron sembradas sobre cajas de Petri con medio ADP (adicionado con 500 mg de cloranfenicol por litro) e incubadas a 28 °C durante 7 días. Las colonias desarrolladas con características del género *Metarhizium* fueron purificadas por resiembra y confirmada su identidad mediante PCR. Las colonias de *M. acridum* fueron cuantificadas para determinar el número de UFC/g de vegetación. Los resultados muestran el promedio y error estándar de 4 repeticiones

4.6.2.3 Colecta de muestras del aire

La determinación del porcentaje de partículas viables se realizó mediante el uso de un muestreador de partículas viables de una etapa marca Thermo-Andersen (Fig. 28) el cual succiona aire a razón de 1 pie cúbico por min (28.3 L/min) y lo impacta en una caja petri de 90 mm de diámetro. La caja Petri contenía 30 ml medio ADP, con 500 mg de cloranfenicol por litro de medio. El muestreador se colocó a 70 cm de altura, siempre en el mismo lugar (a un lado de la trampa de esporas Hirst) y se dejó funcionar durante 10 y 15 min cada vez, dando un total de 2 muestreos en cada ocasión. De acuerdo a las instrucciones del fabricante se calculó el número de partículas viables mediante la siguiente fórmula $\text{UFC/ m}^3 \text{ de aire} = [(CPC/t)/ 0.0283]$ (donde CPC= conteo de colonias por caja, t= tiempo de muestreo en minutos y 0.0283 es el factor de equivalencia entre 1ft^3 y 1m^3). Cuando se presentaron más de 300 colonias por caja se ajustó el valor mediante la siguiente formula:

$$Pr = N[1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + \dots 1/N-r+1]$$

donde Pr es el número esperado de partículas viables que producen “r” cantidad de colonias por caja y N es el total de orificios del muestreador (400 en este caso). Esto se debe a que el flujo de aire arrastra partículas viables por los orificios y los impacta en la caja Petri con medio. Este arrastre es al azar y cuando un sitio dentro de la caja es ocupado, quedan menos lugares disponibles, por lo que aumenta la posibilidad de que una partícula viable formadora de colonias no se impacte dentro de la caja y sea arrastrada fuera de ella. Hasta 300 colonias la probabilidad es poco significativa, pero por arriba de este valor se vuelve importante y hay que considerarla. Por ejemplo 100 UFC corresponderían en realidad a 115 UFC (las 15 no registradas se estima que fueron arrastradas fuera de la caja), y 320 UFC corresponderían a 644 UFC.



Fig. 28. Muestreador de partículas viables de un paso (Andersen).

4.6.2.4 Detección de ADN de *M. acridum* mediante trampa de esporas tipo Hirst

Para observar con mayor detalle la dinámica de *M. acridum* en aire se utilizó una trampa de esporas Hirst (Burkard, Reino Unido) ya descrita. La cinta de celofán se reemplazó cada semana durante los días jueves a la 1 pm y se cortó en segmentos de 24 mm, los cuales corresponden a 24 h de muestreo. Estos segmentos se colocaron en tubos de 1.5 ml y se sometieron al método de extracción y detección de ADN explicado anteriormente. Esto permitió determinar la presencia de ADN de *Metarhizium acridum* durante cada uno de los días de muestreo. El equipo se retiró de la zona de estudio el 13 de agosto de 2008.

4.6.3 Análisis químico del suelo

Se tomaron 14 muestras representativas del suelo colectado (cubriendo los meses de agosto de 2007 a diciembre de 2008) y fueron analizadas por la Dra. Lucía Mora Palomino del Departamento de Edafología del Instituto de Geología (UNAM). Se determinó el pH, la conductividad, y mediante cromatografía de intercambio iónico los cationes intercambiables: K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y Na^+ , fósforo disponible y porcentajes totales de carbono y nitrógeno. Estos valores se correlacionaron con la cantidad de UFC cuantificadas en suelo.

4.6.4 Parametros climaticos

Se recabó información climática de la zona de estudio mediante una estación meteorológica perteneciente a la Red Nacional de Estaciones Estatales Agroclimatológicas. Esta estación reporta de manera continua las condiciones ambientales de la zona (<http://clima.inifap.gob.mx/redclima/clima/est.aspx?numest=26806>) y esta información fue utilizada para correlacionarla con las variaciones en la persistencia y viabilidad del hongo en el campo una vez asperjado. Las variables meteorológicas registradas fueron: precipitación, temperatura máxima, media y mínima, velocidad del viento promedio y máxima, humedad relativa, evapotranspiración de referencia y radiación solar máxima.

4.7 Análisis estadístico

Se cuantificó el número de UFC de cada tipo de muestra, se obtuvo el promedio, desviación estándar y se graficó de acuerdo a las fechas de colecta (las barras indican el error estándar). Los resultados fueron correlacionados con las variables meteorológicas a fin de determinar su influencia en la población del hongo a lo largo del tiempo, y finalmente se realizó un análisis de regresión múltiple para determinar la influencia de todos los factores ambientales en su conjunto. En el caso de los resultados de la trampa de esporas Hirst se utilizó el coeficiente de correlación Tau de Kendall para datos ordinales, con el fin de probar si existió asociación entre las variables meteorológicas y la detección positiva de ADN de *M. acridum*, así como un análisis de regresión logística binaria para medir la influencia de todos los factores ambientales en su conjunto. Todos los análisis se realizaron con ayuda del software Minitab ver. 15.0, las gráficas con NCSS2000, y en caso de la correlación Tau de Kendall con el programa Kendall tau Rank Correlation (versión 1.0.10) (Wessa, 2008).

V. RESULTADOS

5.1 Rompimiento de la pared de las esporas

Las condiciones iniciales mostraron ser satisfactorias en cuanto al número de esporas rotas, sin embargo, y con el fin de optimizar el método se decidió probar un período de molienda adicional. Los resultados se muestran en el cuadro 3, donde se observa un porcentaje de esporas rotas cercano al 100 %, razón por la que todos los experimentos con rompimiento de esporas en Fast-prep incluyeron 3 períodos de molienda a 6 m/s durante 40 segundos.

Cuadro 3. Porcentaje de esporas rotas de acuerdo al número de periodos de molienda.

Periodos de molienda	% esporas rotas
1	48.0
2	93.4
3	99.6

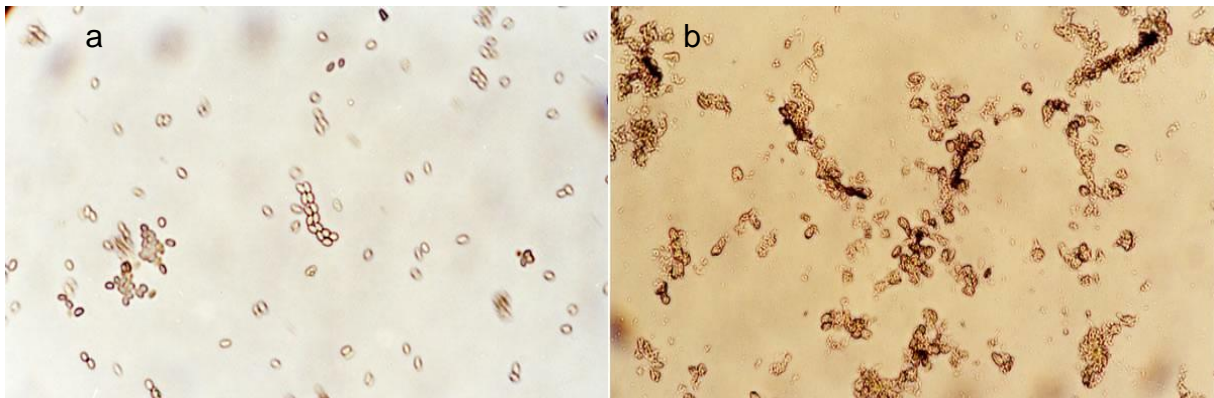


Fig. 29. Fotomicrografía de esporas de *M. acridum* antes (a) y después (b) de ser sometidas a un ciclo de molienda en equipo Fast-prep.

5.2 Determinación de la sensibilidad para los oligonucleótidos AB28 y TW81 y Mac-ITS-spF y R

El límite mínimo de detección (Fig. 30) para los oligonucleótidos AB28 y TW81 correspondió al ADN contenido en 1000 esporas.

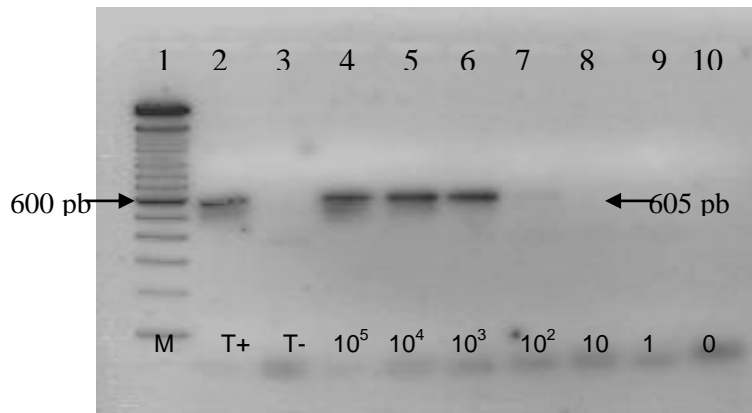


Fig. 30. PCR de curva de concentración de esporas con los oligonucleótidos AB28 y TW81.

El límite de detección para los oligonucleótidos Mac-ITS-spF y R correspondió al ADN de una espora (Fig. 31).

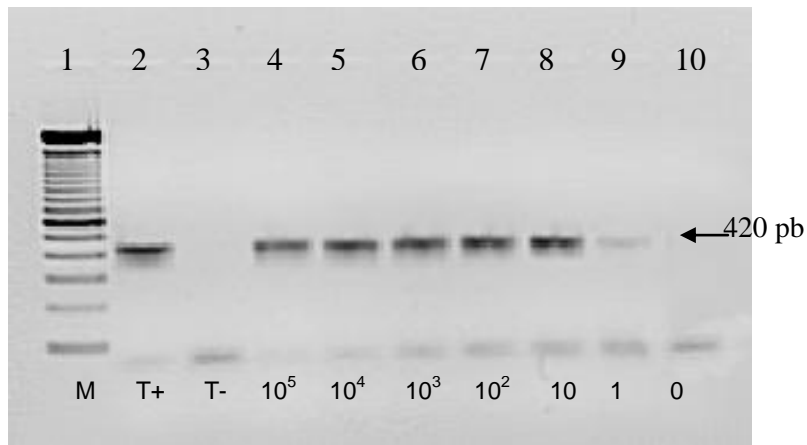


Fig. 31. PCR de curva de concentración de esporas con los oligonucleótidos MacITSsp.

5.3 Detección en minitúnel de viento con mechas de algodón inoculadas con *M. acridum*

El objetivo de los experimentos en el minitúnel de viento es simular la presencia de esporas en el aire para su posterior colecta, cuantificación y extracción de ADN. La cuantificación se realizó observando al microscopio la mitad de la cinta que no se utilizó para la extracción de ADN, en busca de esporas del hongo, y su concentración se determinó con base en su número, sin embargo, no fue posible cuantificar las esporas de *M. acridum* colectadas del aire debido a la falta de características distintivas (Fig. 32), lo que las hace difíciles de distinguir del resto de aeropartículas impactadas en la cinta de celofán muestreada (Fig. 33), razón por la que los resultados serán manejados en términos meramente cualitativos.

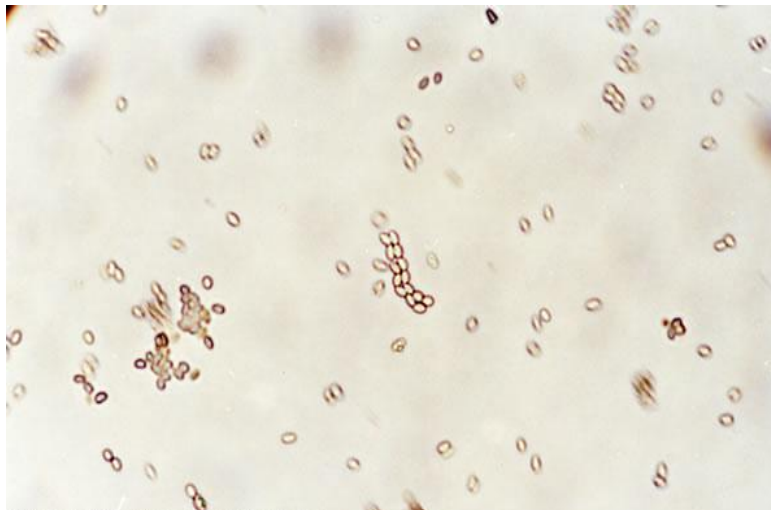


Fig. 32. Fotomicrografía de esporas de *M. acridum* en suspensión.

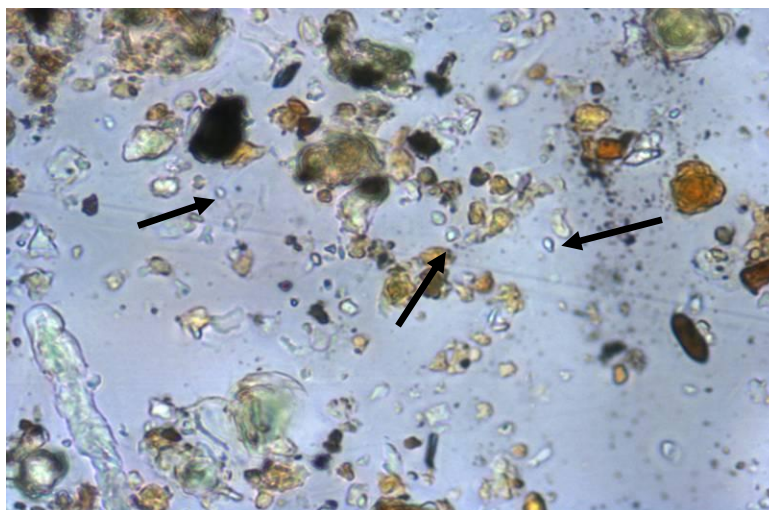


Fig. 33. Fotomicrografía de esporas de *M.* en cintas de celofán muestreadas en minitúnel de viento.

Los resultados de la figura 34 muestran que los oligonucleótidos AB28 y TW81 son capaces de dar una respuesta positiva con cintas del primer y segundo día.

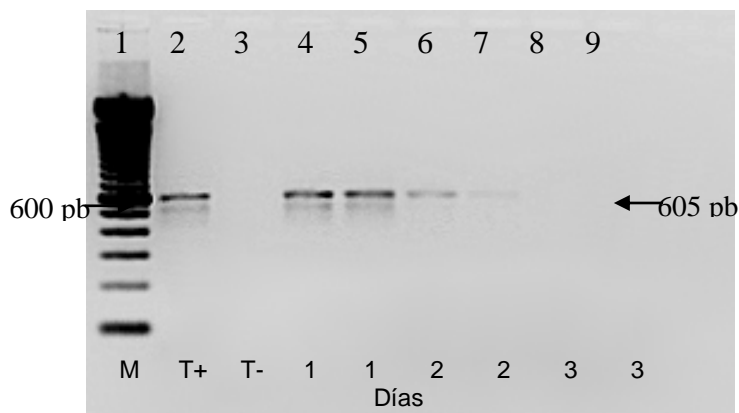


Fig. 34. PCR de experimentos en minitúnel de vientos con los oligonucleótidos AB28 y TW81.

La figura 35 muestra que durante los 3 días muestreados fue posible detectar esporas en el minitúnel de viento con los oligonucleótidos MacITSp.

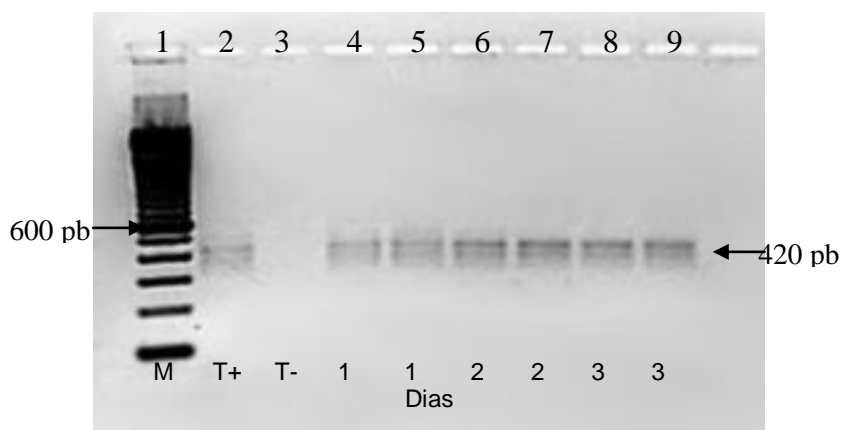


Fig. 35. PCR de experimentos en minitúnel de vientos con los oligonucleótidos MacITSp.

5.4 Detección de *M. acridum* en mezclas de múltiples hongos

Los resultados de la figura 36 (oligonucleótidos AB28 y TW81) detectan presencia de ADN de hongos durante ambos días, aunque en menor cantidad el segundo como se esperaba. La figura 37, utilizando los oligonucleótidos específicos Mac-ITS-spF y Mac-ITS-spR, muestra la presencia de ADN de *M. acridum* ambos días, demostrando con esto la capacidad de la sonda específica de detectar su ADN dentro de un marco amplio de ADN de diversas especies de hongos, que es el escenario que se espera encontrar en campo. También se corroboró que la presencia del amortiguador de lisis no es necesaria para una adecuada extracción de ADN.



Fig. 36. PCR de experimentos en minitúnel de viento en presencia de múltiples hongos con los oligonucleótidos AB28 y TW81. El número indica el día y (al) indica uso de amortiguador de lisis.

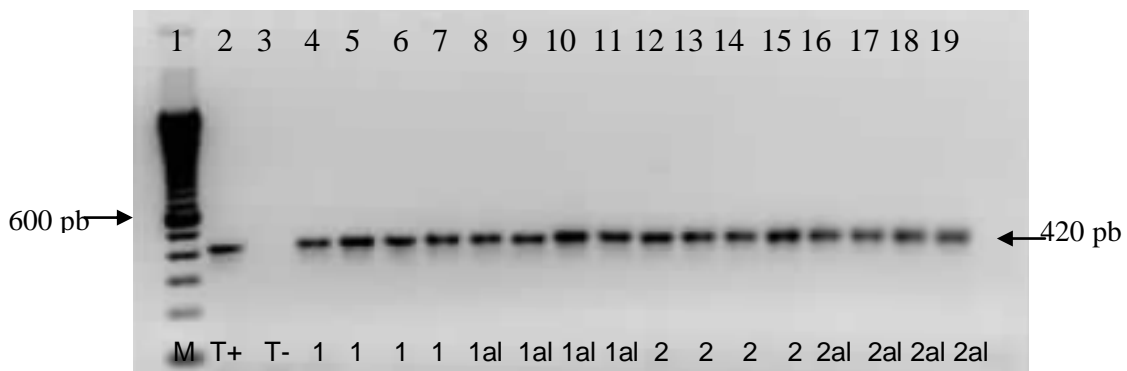


Fig. 37. PCR de experimentos en minitúnel de vientos en presencia de múltiples hongos con los oligonucleótidos MacITSsp. El número indica el día y (al) indica uso de amortiguador de lisis.

5.5 Extracción y detección de ADN de *M. acridum* inoculado en muestras de suelo

En la figura 38 se observa que el límite de detección (oligonucleótidos AB28 y TW81) sin albúmina sérica bovina (ASB) fue de 10 000 esporas y con ASB de 1000 esporas.

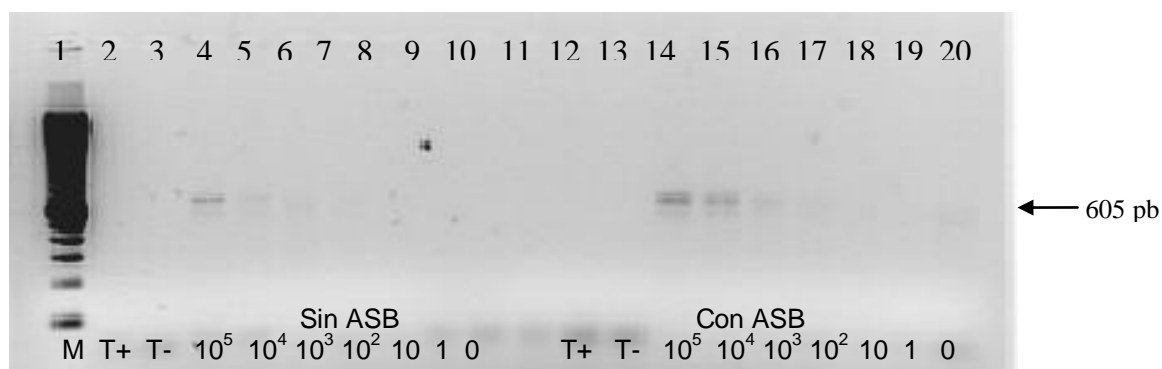


Fig. 38. PCR con oligonucleótidos AB28 y TW81 de muestras de suelo, con y sin albúmina sérica bovina (ASB).

El resultado de la PCR anidada con los oligonucleótidos específicos Mac-ITS spF y R se muestra en la figura 39. Tal como se aprecia, la adición de ASB no interfirió con el límite de detección que es de 1 espora para ambos casos (con y sin ASB) y también se puede apreciar que usar una PCR anidada incrementa la sensibilidad y por eso se pudo detectar hasta 1 conidio.

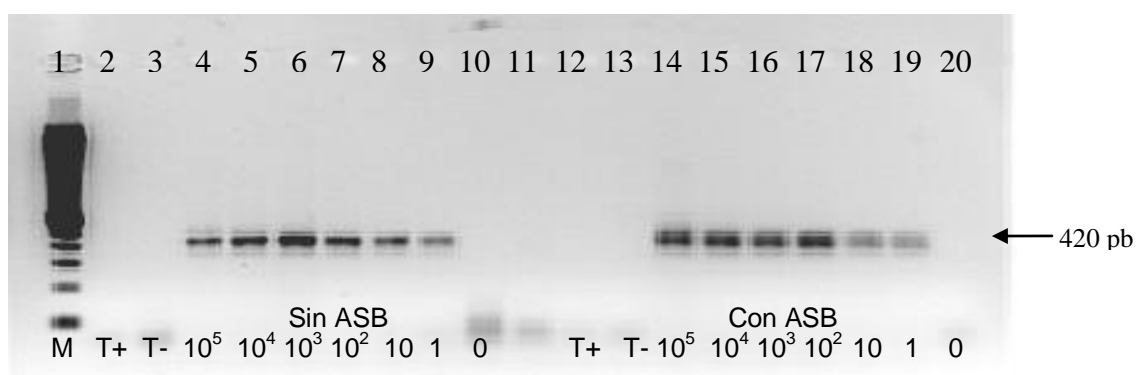


Fig. 39. PCR con oligonucleótidos Mac-ITS-spF y R de muestras de suelo, con y sin albúmina sérica bovina (ASB).

5.6 Detección de *M. acridum* en aire de muestras de Tizimín

Las siguientes figuras corresponden a muestras colectadas del aire durante el estudio piloto, específicamente en el período comprendido del 1 al 8 de noviembre de 2005 (5 días después de ser asperjado el hongo) observándose que los oligonucleótidos AB28 y TW81 detectaron esporas de hongos en el aire los días 5 y 6 de noviembre tal como se muestra en la figura 40.

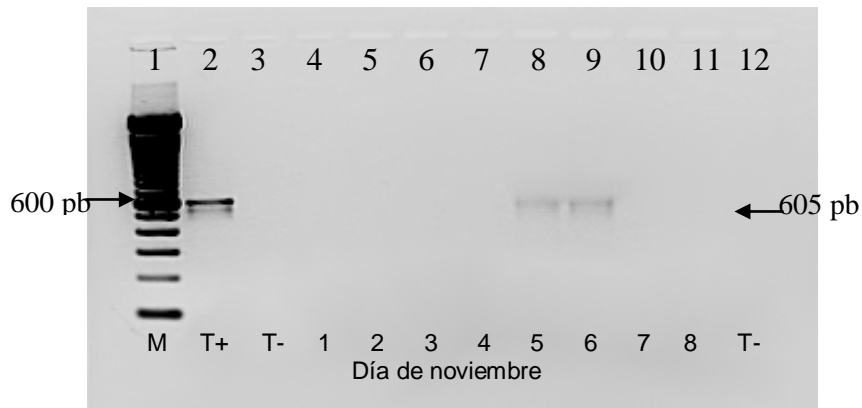


Fig. 40. PCR de muestras colectadas con la trampa de esporas en Tizimín mediante oligonucleótidos AB28 y TW81 durante la primera semana de noviembre de 2005.

El uso de los oligonucleótidos específicos (Fig. 41) indica la presencia del hongo *M. acridum* durante todos los días de esa semana de muestreo, lo que indica que el hongo asperjado se mantiene en el aire por lo menos 12 días después de ser aplicado en esa zona.

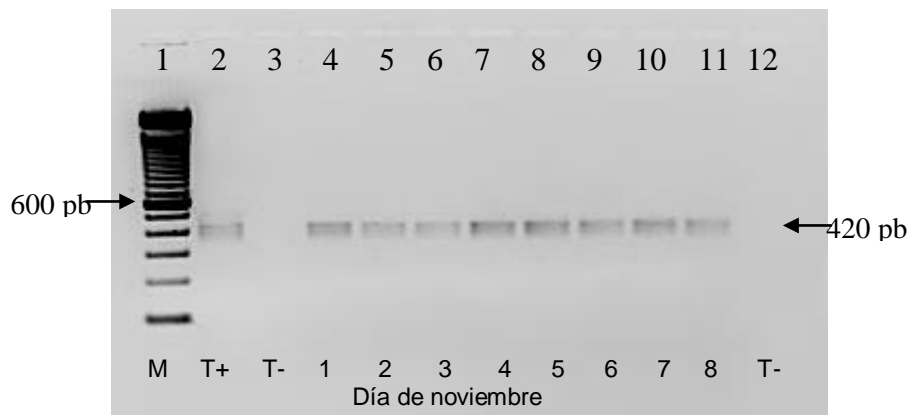


Fig. 41. PCR de muestras colectadas con la trampa de esporas en Tizimín mediante oligonucleótidos AB28 y TW81 durante la primera semana de noviembre de 2005.

5.7 Detección de *M. acridum* en suelo de muestras de Tizimín

Como puede apreciarse en la figura 42 no hubo amplificación para ninguna de las muestras analizadas, señal de concentraciones muy bajas de hongos en la tierra, ya que los oligonucleótidos utilizados son universales para hongos (AB28 y TW81).

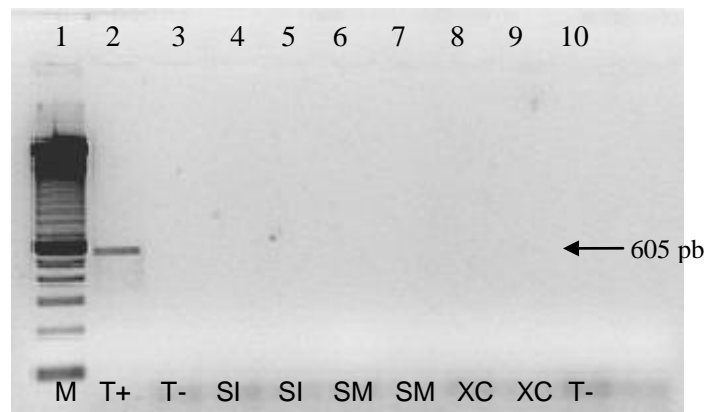


Fig. 42. PCR con oligonucleótidos AB28 y TW81 de muestras de suelo de Tizimín, Yucatán. SI (San Isidro), SM (Santa Martha), XC (X-Campech).

La PCR anidada con los oligonucleótidos específicos de *M. acridum* mostrada en la figura 43 sólo presentó amplificación en el testigo positivo, señal de que no hubo presencia del hongo en las muestras analizadas.

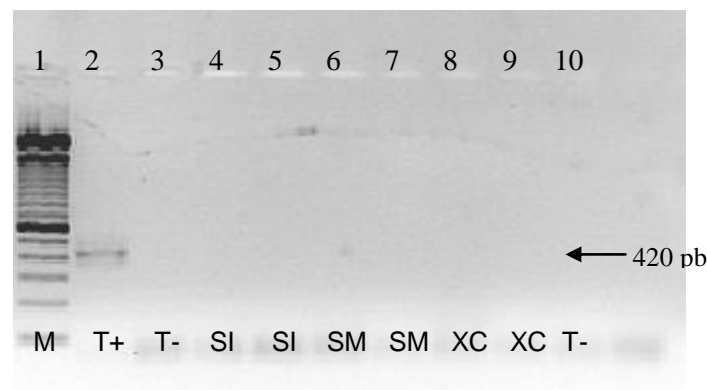


Fig. 43. PCR con oligonucleótidos Mac-ITS-spF y R de muestras de suelo de Tizimín, Yucatán. SI (San Isidro), SM (Santa Martha), XC (X-Campech).

5.8 Estandarización de las condiciones de PCR y determinación de la sensibilidad para los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, 1R, y OPA-04(526) 2F, 2R

En resumen, las condiciones de PCR elegidas para trabajar con los oligonucleótidos OPA-04(526)1F, 1R, 2F y 2R fueron: 50 pmol de cada sonda, 1.5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de dNTP's, 1.5 U de Taq-Polimerasa y el programa del termociclador para los oligonucleótidos OPA-04(526)1F y 1R consistirá de: 1 ciclo 94 °C por 3 min, seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Para los oligonucleótidos OPA-04(526)2F y 2R el programa elegido fue el siguiente: 1 ciclo 94 °C por 3 min, seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min.

Se probó el límite de detección de estos oligonucleótidos con las condiciones anteriormente señaladas y se obtuvo lo siguiente: Con el primer par de oligonucleótidos el límite de detección correspondió al ADN contenido en 10,000 esporas, como puede observarse en la figura 44A. En la figura 44B se aprecia que la sensibilidad aumentó y permitió detectar el ADN contenido en una sola espora.

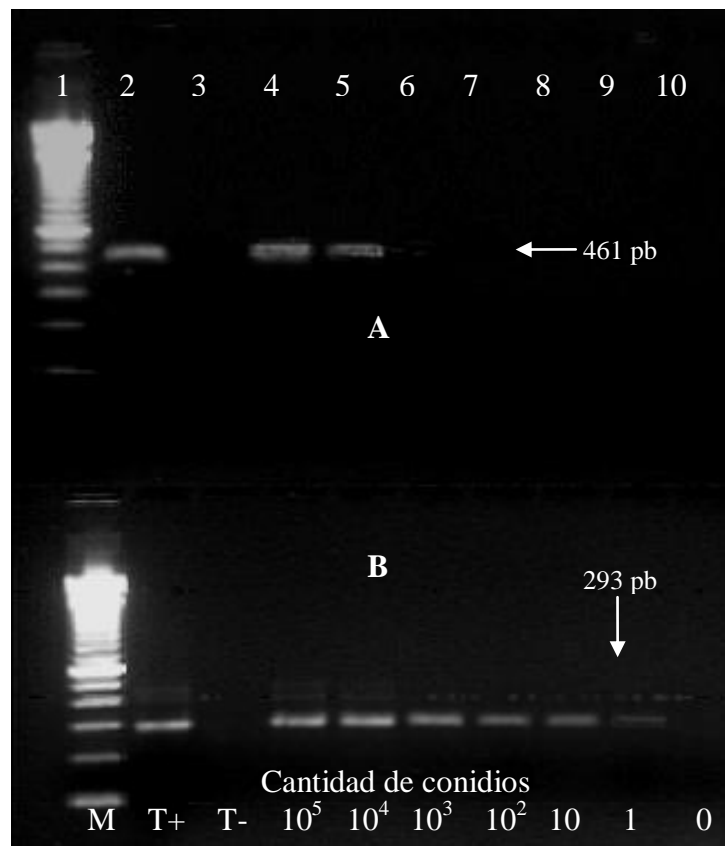


Fig. 44. PCR con oligonucleótidos Opa OPA-04(526) 1F, 1R (foto A) y Opa OPA-04(526) 2F, 2R (foto B) de suspensiones de conidios decrecientes (M: marcador 100 pb, T+: testigo positivo, T-: testigo negativo).

5.9 Determinación de la especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, IR, y OPA-04(526) 2F, 2R

El par de oligonucleótidos OPA-04(526) 2F, 2R mostraron ser específicas únicamente para *M. acridum* tal como se aprecia en la figura 55, al contrario de los oligonucleótidos Mac-Its spF y R (Fig. 45) las cuales mostraron una respuesta positiva para todos los aislamientos probados, excepto *M. flavoviride* var. *flavoviride* y *M. flavoviride* var. *pemphigum*. Esta mayor especificidad de los oligonucleótidos OPA-04(526) las hace la elección obvia para la detección de *M. acridum* en campo, por sobre las de Entz *et al.* (2005) (Fig. 46) que son, hasta el momento, las únicas reportadas para la detección de este hongo.

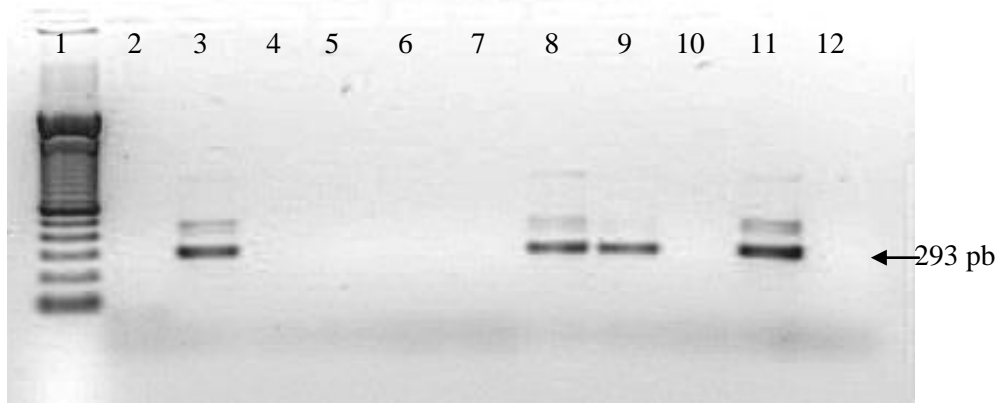


Fig. 45. PCR de cepas de referencia del género *Metarhizium* con oligonucleótidos OPA-04(526) 2F, 2R. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo negativo, 3: *M. acridum* (México), 4: *M. anisopliae* var. *majus*, 5: *M. flavoviride* var. *flavoviride*, 6: *M. flavoviride* var. *minus*, 7: *M. flavoviride* tipo e, 8: *M. acridum* (Australia), 9: *M. acridum* (México), 10: *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, 11: *M. acridum* (Nigeria), 12: *M. flavoviride* var. *pemphigum*.

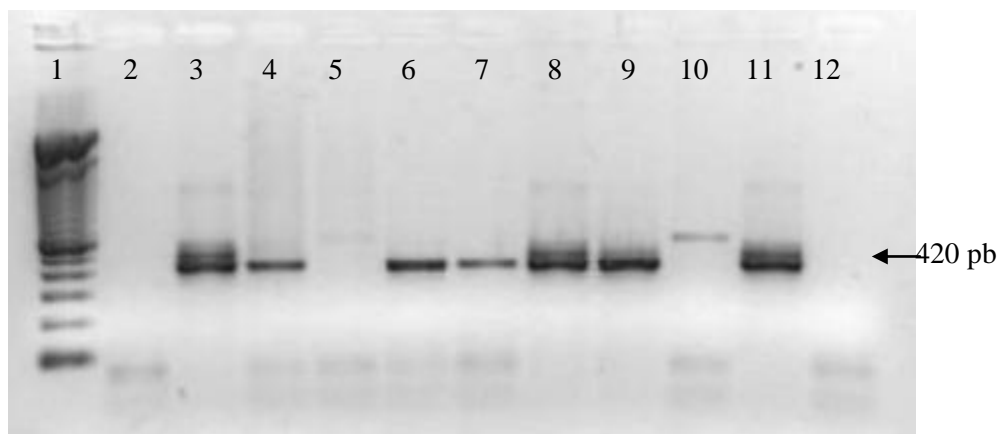


Fig. 46. PCR de cepas de referencia del género *Metarhizium* con oligonucleótidos Mac-Its spF y R. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo negativo, 3: *M. acridum* (México), 4: *M. anisopliae* var. *majus*, 5: *M. flavoviride* var. *flavoviride*, 6: *M. flavoviride* var. *minus*, 7: *M. flavoviride* tipo e, 8: *M. acridum* (Australia), 9: *M. acridum* (México), 10: *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, 11: *M. acridum* (Nigeria), 12: *M. flavoviride* var. *pemphigum*.

5.10 Detección de *M. acridum* en muestras de campo de San Mateo Coatepec, Puebla

La serie de figuras de la 58 a la 63 corresponden a fotografías de cultivos de hongos colectados del aire, de la vegetación y del suelo antes y después de la aspersión del formulado de *M. acridum* en la zona de estudio y después de una semana de cultivo a 28 °C en Agar-Dextrosa-Papa. Tal como se aprecia, existió esporulación del hongo en las muestras colectadas del aire y de la vegetación pero no en el suelo y el motivo es desconocido, aunque en muestras posteriores sí ocurrió.



Fig. 47. Hongos colectados del aire antes de asperjar *M. acridum* en campo. Muestreo de 15 min.

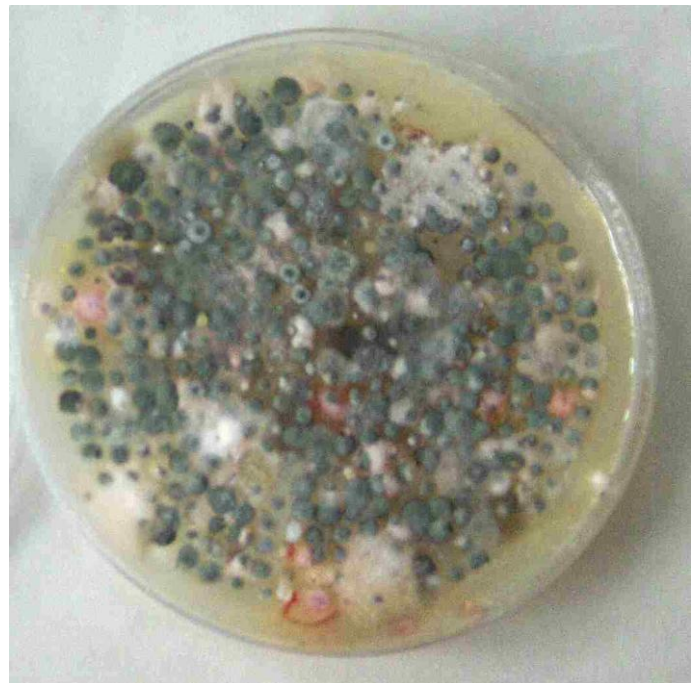


Fig. 48. Hongos colectados del aire después de asperjar *M. acridum* en campo. Muestreo de 15 min.



Fig. 49. Hongos colectados de la vegetación antes de asperjar *M. acridum* en campo. Dilución 10^{-2} .



Fig. 50. Hongos colectados de la vegetación después de asperjar *M. acridum* en campo. Dilución 10^{-2} .

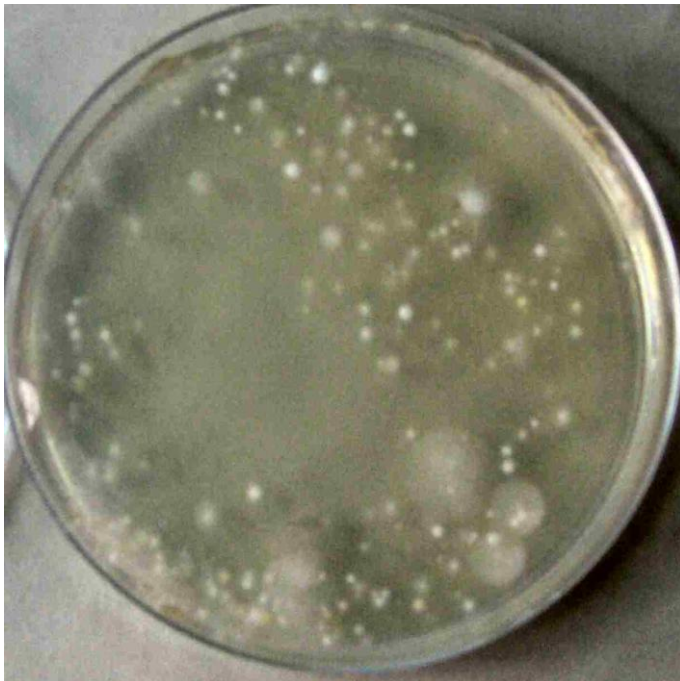


Fig. 51. Hongos colectados del suelo antes de asperjar *M. acridum* en campo. Dilución 10^{-2} .



Fig. 52. Hongos colectados del suelo después de asperjar *M. acridum* en campo. Dilución 10^{-2} .

La confirmación de que existe presencia de *M. acridum* se encuentra en la figura 53, que consiste en una PCR de las muestras anteriores con oligonucleótidos específicos Mac-lts-spF y R.

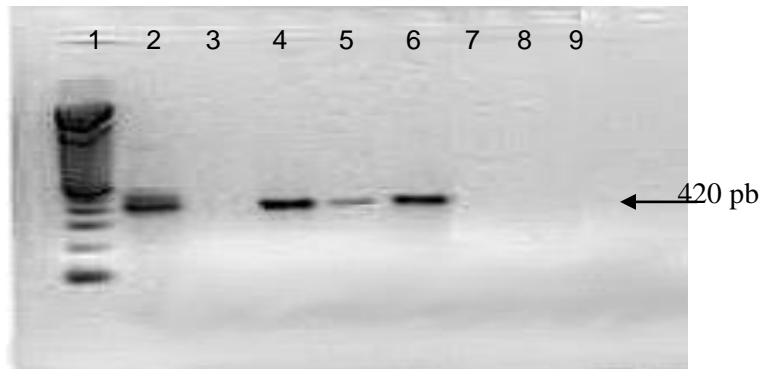


Fig. 53. PCR de diversas muestras colectadas de aire, vegetación y suelo. Carril 1: marcador 100 pb, 2: testigo positivo, 3: testigo negativo, 4: muestra de aire después de la aspersion, 5: muestra de vegetación después de la aspersion, 6: muestra de suelo después de la aspersion, 7: muestra de aire antes de la aspersion, 8: muestra de vegetación antes de la aspersion, 9: muestra de suelo antes de la aspersion.

5.11 Determinación de la persistencia

Desde el momento que se asperjó el hongo en suelo se observan ciclos de aumento y disminución en la cantidad de UFC/g de suelo colectadas conforme transcurrió el tiempo, pero con una clara tendencia hacia la disminución en la población del hongo (fig. 54). A partir del 7 de marzo de 2008 se presentó un incremento en la cantidad de UFC/g suelo colectadas ($142,666 \pm 71,703.1$), más del 400 % por arriba de los valores registrados el día de la aspersión inicial ($31,000 \pm 4,000$). Dicho aumento se mantuvo hasta el 25 de abril y posteriormente presentó una tendencia a la baja hasta que ya no se encontró el 1 de octubre de 2008. Sólo en el caso de suelo se presentaron unidades formadoras de colonias ($4,133 \pm 230.9$) durante el mes de diciembre, que fue el último mes que se muestreó.

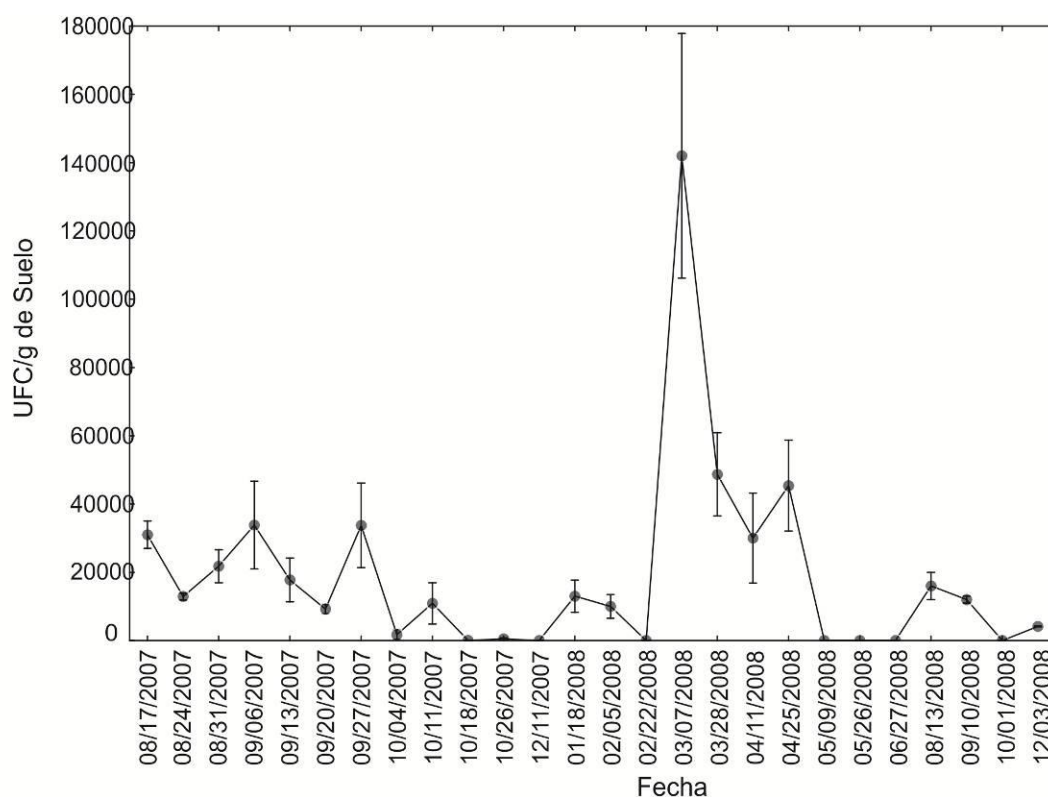


Fig. 54. Concentración de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008. (Las barras indican el error estándar).

La misma tendencia se aprecia en el caso de las UFC/g de vegetación (Fig. 55). Una disminución más abrupta en la cubierta vegetal que en el suelo, ya que se aprecia una caída de 245,000 UFC a 0 UFC/g vegetación en sólo 1 semana, con un breve repunte después del 9 de octubre, que fue cuando se realizó la segunda aspersión del hongo. Posteriormente, se mantuvo en niveles muy bajos, hasta el 7 de marzo donde alcanzó casi los mismos valores que se cuantificaron al momento de la aspersión inicial ($116,000 \pm 130,066.6$ contra $122,500 \pm 43,133.5$). A partir de mayo ya no se volvió a encontrar en la cubierta vegetal.

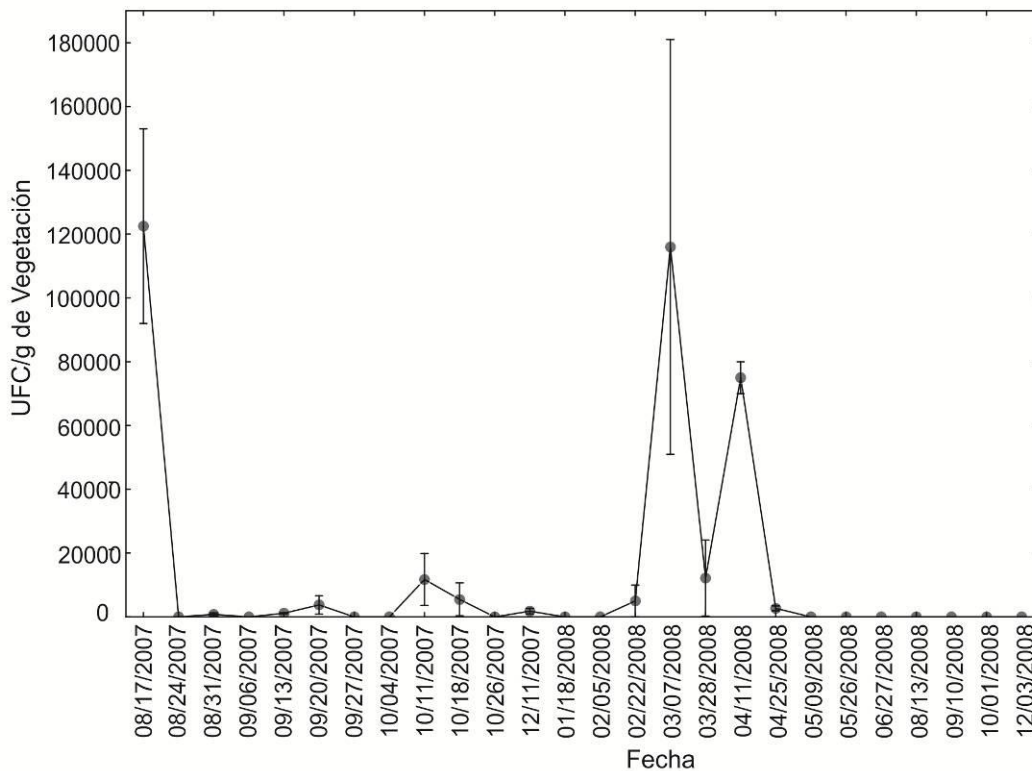


Fig. 55. Concentración de unidades formadoras de colonias por gramo de vegetación (UFC/g) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008. (Las barras indican el error estándar).

En el caso del aire (Fig. 56) se observó que existe una tendencia clara hacia la disminución de la cantidad de UFC/m³ de aire presentes, y a diferencia de los casos del suelo y la vegetación, el repunte después del 7 de marzo fue mínimo. Posteriormente, ya no se detectó sino hasta el 13 de agosto (con 1±1.67 UFC/m³ de aire), y posterior a esa fecha ya no se volvió a detectar en el aire.

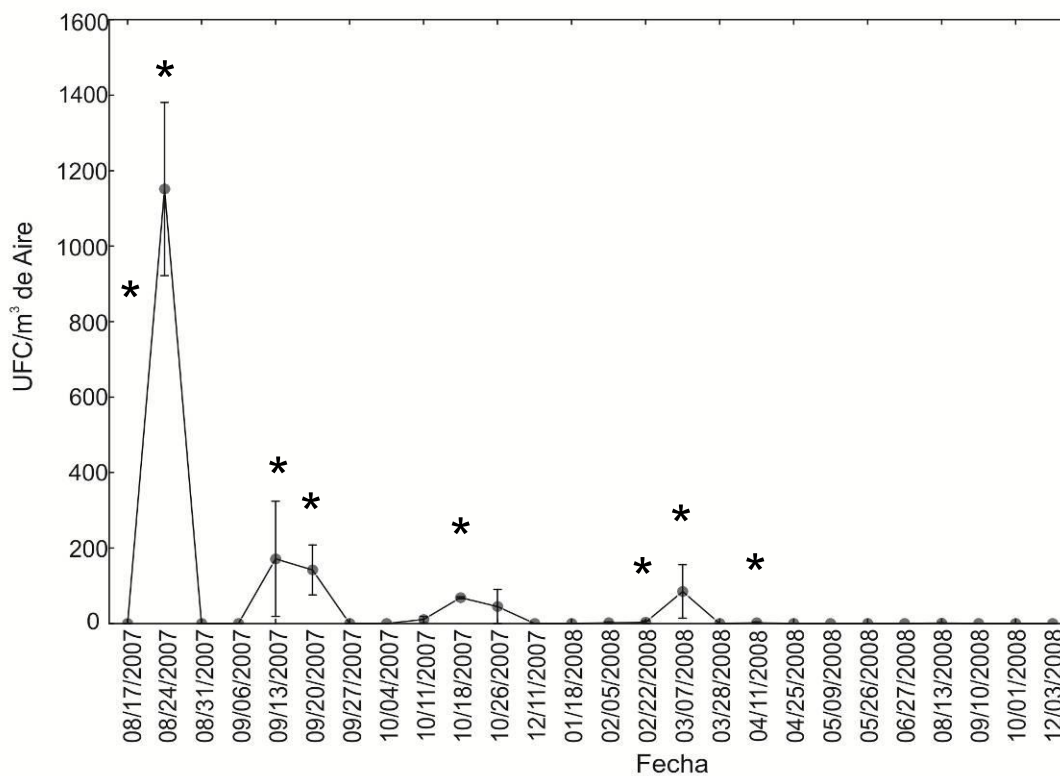


Fig. 56. Concentración de unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m³) en el periodo comprendido entre el 17 de agosto de 2007 y el 3 de diciembre de 2008 (las barras indican el error estándar). Los asteriscos indican que también se detectó presencia de ADN de *M.acridum* con la trampa de esporas Hirst.

5.12 Detección de ADN de *M. acridum* mediante trampa de esporas tipo Hirst

La trampa de esporas tipo Hirst se usó del 17 de agosto de 2007 al 13 de agosto de 2008 y permitió observar con mayor detalle las variaciones en la persistencia del hongo en el aire. En las siguientes figuras se muestran fotomicrografías de porciones de la cinta de celofán con partículas capturadas en la zona de estudio durante la primera semana de muestreo (Fig. 57) y 9 semanas después (Fig. 58).

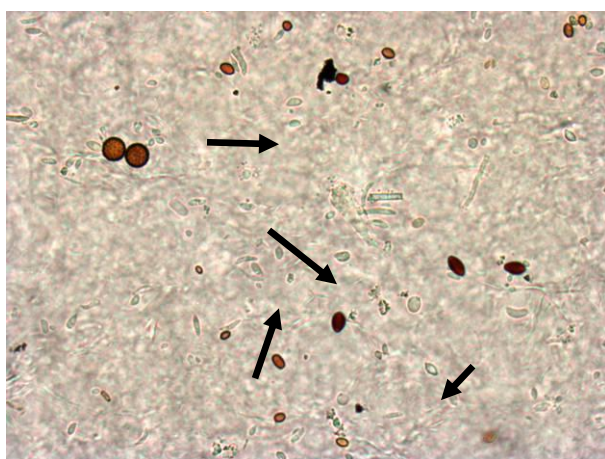


Fig. 57. Fotomicrografía a 200 aumentos mostrando conidios de *M. acridum* en la parte central así como otras partículas biológicas, capturadas durante la primera semana de muestreo.



Fig. 58. Fotomicrografía a 200 aumentos mostrando diversas partículas biológicas, sin presencia aparente de conidios de *M. acridum*. El muestreo se llevó a cabo 9 semanas después de la aspersión.

En la primera semana se observaron conidios de *M. acridum* así como algunas partículas adicionales. En la novena semana no se aprecia ningún conidio, además de que la cantidad de otras partículas (entre ellas polen y esporas de otros hongos) aumentó considerablemente, sin embargo, en el análisis por PCR de la muestra colectada 9 semanas después si se encontró ADN de *M. acridum*. Esto ejemplifica la importancia de utilizar pruebas moleculares para determinar la existencia de partículas biológicas en el aire.

A continuación, en el cuadro 5 y en la figura 59 se presentan las fechas en las que hubo detección positiva de ADN de *M. acridum* durante el período de estudio, en total se encontró en 32 días.

Cuadro 4. Días en que se detectó ADN de *M. acridum* en aire mediante PCR en cintas de trampa de esporas Hirst.

Fecha	Presencia de ADN	Fecha	Presencia de ADN	Fecha	Presencia de ADN	Fecha	Presencia de ADN
17/08/2007	positiva	15/09/2007	positiva	02/10/2007	positiva	23/01/2008	positiva
18/08/2007	positiva	16/09/2007	positiva	13/10/2007	positiva	22/02/2008	positiva
24/08/2007	positiva	17/09/2007	positiva	16/10/2007	positiva	23/02/2008	positiva
08/09/2007	positiva	18/09/2007	positiva	17/10/2007	positiva	06/03/2008	positiva
11/09/2007	positiva	19/09/2007	positiva	18/10/2007	positiva	07/03/2008	positiva
12/09/2007	positiva	20/09/2007	positiva	27/10/2007	positiva	08/03/2008	positiva
13/09/2007	positiva	21/09/2007	positiva	30/10/2007	positiva	09/03/2008	positiva
14/09/2007	positiva	22/09/2007	positiva	20/01/2008	positiva	11/04/2008	positiva
						total	32

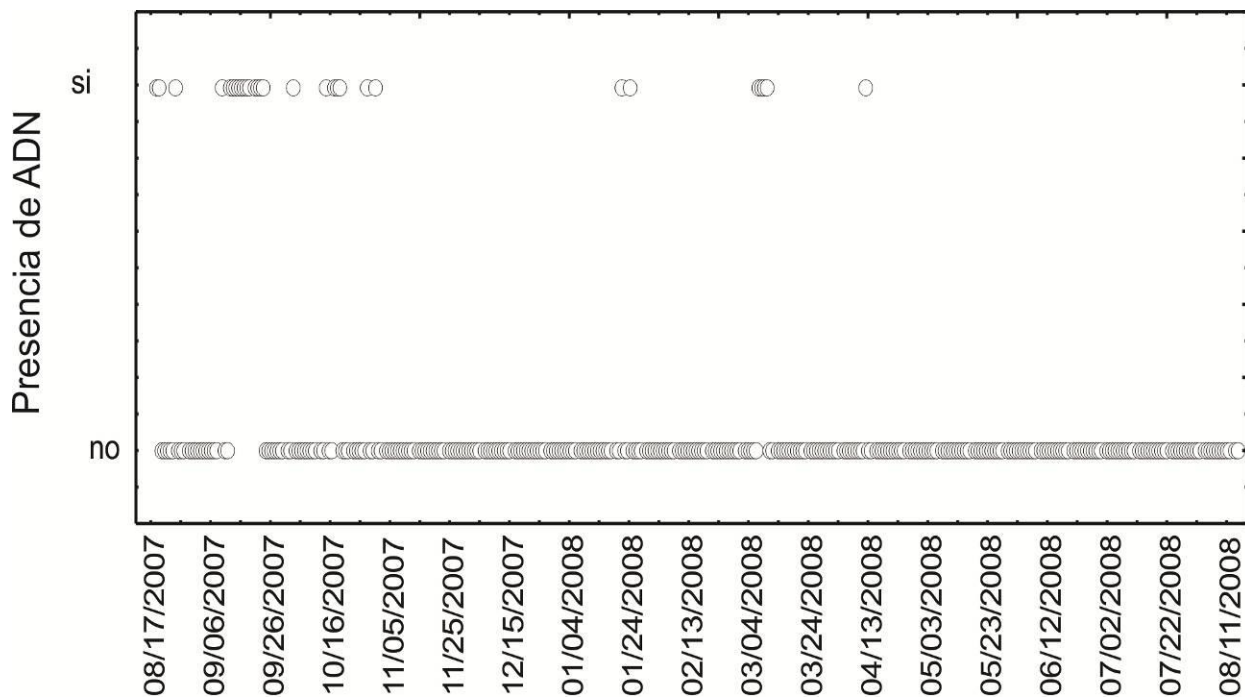


Fig. 59. Detección de *M. acridum* en aire mediante trampa de esporas Hirst.

5.13 Análisis estadístico

5.13.1 Correlaciones de UFC en el ambiente con parámetros meteorológicos

Los datos meteorológicos se correlacionaron con las UFC presentes en el ambiente, con el fin de determinar la posible influencia del clima sobre la persistencia y viabilidad a lo largo del tiempo y se obtuvo lo siguiente (cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson entre el número de UFC encontradas en suelo, vegetación y aire, y los datos de precipitación, temperatura y velocidad del viento máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 18 (suelo), 12 (vegetación), 11 (aire).

	Precipitación	T. Máx	T.Mín	T. Med	Velocidad viento máx
UFC/g suelo	0.015	0.101	-0.067	0.131	0.424
Nivel de significancia (p)	(0.943)	(0.640)	(0.744)	(0.524)	(0.031)*
UFC/g vegetación	0.375	0.154	0.057	0.193	0.317
Nivel de significancia (p)	(0.059)	(0.453)	(0.782)	(0.345)	(0.115)
UFC/m ³ aire	0.447	-0.179	0.170	-0.131	-0.203
Nivel de significancia (p)	(0.022)*	(0.381)	(0.406)	(0.524)	(0.321)

*= $p \leq 0.05$

Cuadro 6. Coeficientes de correlación de Pearson entre el número de UFC encontradas en suelo, vegetación y aire, y los datos de evaporación potencial, velocidad de viento promedio, humedad relativa, avapotranspiración de referencia y radiación solar máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 18 (suelo), 12 (vegetación), 11 (aire).

	Evaporación potencial	Velocidad viento promedio	Humedad relativa	Evapotrans. de referencia	Radiación solar máx
UFC/g suelo	0.466	0.485	-0.400	0.429	0.166
Nivel de significancia (p)	(0.016)*	(0.012)*	(0.043)*	(0.029)*	(0.439)
UFC/g vegetación	0.353	0.364	-0.359	0.332	0.267
Nivel de significancia (p)	(0.077)	(0.068)	(0.085)	(0.098)	(0.187)
UFC/m ³ aire	-0.178	-0.193	0.269	-0.053	0.433
Nivel de significancia (p)	(0.383)	(0.344)	(0.183)	(0.796)	(0.027)*

*= $p \leq 0.05$

De acuerdo con los cuadros 5 y 6, se puede apreciar que existieron cinco correlaciones significativas en el caso del suelo y fueron entre la cantidad de UFC y velocidad máxima del viento, velocidad de viento promedio, evaporación potencial, humedad relativa y evapotranspiración de referencia. En el caso de las UFC en vegetación no existió ninguna correlación. En el caso del aire se presentaron correlaciones entre la cantidad de UFC presentes en el aire y la precipitación y la radiación solar máxima.

5.13.2 Análisis de Regresión múltiple

La influencia individual de los demás factores meteorológicos posiblemente no es lo suficientemente grande como para manifestarse mediante esta prueba estadística, por ello se realizó un análisis de regresión múltiple junto con un análisis de varianza para determinar si la suma de todos ellos puede explicar las variaciones en la viabilidad del hongo.

La mejor ecuación para las UFC encontradas en suelo fue:

$$\text{UFC/g suelo} = 780795 + 559 (\text{Precipitación}) - 40092 (\text{temperatura máxima}) + 5331 (\text{temperatura mínima}) + 24412 (\text{temperatura promedio}) + 6896 (\text{velocidad de viento máxima}) - 40292 (\text{velocidad de viento promedio}) - 5694 (\text{humedad relativa}) + 29745 (\text{evapootranspiracion referencia}) - 45297 (\text{evaporación potencial}) - 0.0494 (\text{ufc/g hojas}) + 43.8 (\text{ufc/m}^3 \text{aire}) + 197 (\text{radiación solar máxima}).$$

Con un valor de $r^2 = 0.542$, $F = 3.26$, $p = 0.03$, lo que quiere decir que las variaciones encontradas en la cantidad de UFC/g de suelo pueden ser explicadas en un 54.2 % con los parámetros meteorológicos registrados, lo cual también es señal de que otros factores tienen influencia. El análisis también mostró que la temperatura máxima, la velocidad del viento máxima, la velocidad del viento promedio y la humedad relativa fueron las variables que tuvieron influencia significativa sobre la cantidad de UFC/g de suelo encontradas.

Para el caso de las UFC/g de vegetación la mejor ecuación encontrada fue:

$$\text{UFC/g vegetación} = 1588458 + 3544 (\text{Precipitación}) - 97926 (\text{temperatura máxima}) + 42501 (\text{temperatura mínima}) + 40213 (\text{temperatura promedio}) + 38409 (\text{velocidad de viento máxima}) - 171683 (\text{velocidad de viento promedio}) - 12561 (\text{humedad relativa}) + 40860 (\text{evapotranspiración referencia}) - 44817 (\text{evaporación potencial}) - 2.28 (\text{ufc/g hojas}) + 187 (\text{ufc/m}^3 \text{ aire}) + 334 (\text{radiación solar máxima}).$$

Con un valor de $r^2 = 0.0$, $F = 1.0$, $p = 0.507$.

Finalmente, para el caso de las UFC presentes en el aire se obtuvo:

$$\text{UFC/m}^3 \text{ aire} = -725 - 1.01 (\text{Precipitación}) + 40 (\text{temperatura máxima}) + 8.8 (\text{temperatura mínima}) - 48.1 (\text{temperatura promedio}) - 3.8 (\text{velocidad de viento máxima}) + 23.2 (\text{velocidad de viento promedio}) + 4.33 (\text{humedad relativa}) - 51.3 (\text{evapotranspiración referencia}) + 59 (\text{evaporación potencial}) + 0.00060 (\text{ufc/g suelo}) + 0.000056 (\text{ufc/g vegetación}) + 0.22 (\text{radiación solar máxima}).$$

Con un valor de $r^2 = 0.0$, $F = 0.42$, $p = 0.926$.

5.13.3 Correlaciones entre detección de ADN en aire y parámetros meteorológicos

Dada la naturaleza de los datos, en el que la detección de ADN en el aire sólo puede ser expresada mediante dos valores, ausencia o presencia, no es posible emplear el coeficiente de correlación de Pearson, ya que éste está limitado a datos de tipo continuo. En su lugar se decidió utilizar la prueba de correlación Tau de Kendall. Ésta es una prueba no-paramétrica usada para medir el grado de correspondencia entre dos rangos y establecer la significancia de la correspondencia, en otras palabras, mide la fuerza de la asociación (Kendall, 1990).

Para el análisis de los datos presentados se procedió a agrupar las variables meteorológicas en rangos y después se comparó si el orden de dichos rangos variaba si existía presencia o no de ADN de *M. acridum* en la atmósfera. El análisis se hizo con el programa estadístico Kendall tau Rank Correlation v1.0.10 (Wessa, 2008), y los datos se presentan en los cuadros 7 y 8 junto con su nivel de significancia.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación Tau de Kendall entre la presencia positiva de ADN de *M. acridum*, y los datos de precipitación, temperatura y velocidad del viento máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 30.

	Precipitación	T. Máx	T. Mín.	T. Med	Velocidad viento máx
Presencia de ADN	0.025	-0.090	-0.002	-0.041	-0.065
Nivel de significancia (p)	(0.596)	(0.037)*	(0.957)	(0.336)	(0.128)

*= $p \leq 0.5$

Cuadro 8. Coeficientes de correlación Tau de Kendall entre la presencia positiva de ADN de *M. acridum*, y los datos de evaporación potencial, velocidad de viento promedio, humedad relativa, avapotranspiración de referencia y radiación solar máxima registradas en cada día de muestreo. Los niveles de significancia se presentan entre paréntesis. g.l.= 30.

	Evaporación potencial	Velocidad viento promedio	Humedad relativa	Evapotrans, de referencia
Presencia de ADN	-0.051	-0.066	0.076	0.005
Nivel de significancia (p)	(0.234)	(0.123)	(0.075)	(0.891)

*= $p \leq 0.5$

De acuerdo con los resultados, la única correlación significativa se encontró con la temperatura máxima, con un valor -0.090, lo cual quiere decir que la probabilidad de detectar ADN del hongo en la atmósfera disminuye ligeramente conforme aumenta la temperatura.

5.13.4 Análisis de Regresión logística binaria

La influencia individual de los demás factores meteorológicos posiblemente no es lo suficientemente grande como para manifestarse mediante esta prueba estadística, por ello se realizó un análisis de regresión para determinar si la suma de todos ellos puede explicar las variaciones en la presencia de ADN del hongo. De nueva cuenta se aclara que la presencia o ausencia de ADN no es una variable continua y por ello no se puede usar una prueba de regresión lineal normal ya que sólo es aplicable para datos de tipo continuo. Sin embargo, un análisis de regresión logística binaria puede emplearse en este caso. El objetivo primordial que resuelve esta técnica es el de modelar cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos (Molinero, 2001). Este análisis se realizó con el programa Minitab v 15.0 y el resultado mostró un valor de significancia (p) de 0.015 y las variables

meteorológicas que mostraron asociación estadísticamente significativa fueron la humedad relativa y la evaporación potencial.

5.13.5 Correlaciones y análisis de regresión múltiple entre los parámetros fisicoquímicos del suelo y la cantidad de UFC encontradas en suelo

Los parámetros fisicoquímicos medidos en suelo se correlacionaron con la cantidad de UFC/g y se obtuvo lo siguiente (cuadro 9).

Cuadro 9. Correlaciones y su nivel de significancia entre la cantidad de UFC de *M. acridum* presentes en el suelo y los parámetros químicos registrados.

	pH ^a	CE eléctrica	Cationes intercambiables				P disponible	% C total	% N total
			Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺			
UFC/g suelo	-0.114	0.919	0.150	0.207	-0.010	0.420	-0.122	-0.138	0.855
Nivel de significancia (p)	0.712	(0.028)*	0.624	0.497	0.974	0.153	0.691	0.745	(0.007)**

^a. la correlación se hizo sobre la base de los datos transformados del pH

*= p ≤ 0.05

**= p ≤ 0.01

Como se puede apreciar en el cuadro 9, existe una fuerte correlación entre la conductividad eléctrica (CE) y el porcentaje de nitrógeno total con las UFC cuantificadas.

5.13.6 Análisis de regresión múltiple

La influencia individual de los demás factores químicos posiblemente no es lo suficientemente grande como para manifestarse mediante esta prueba estadística, por ello se realizó un análisis de regresión múltiple junto con un análisis de varianza para determinar si la suma de todos ellos puede explicar las variaciones en la viabilidad del hongo.

La mejor ecuación para las UFC encontradas en suelo fue:

$$\text{UFC g/suelo} = - 214724 + 13557 (\text{ph}) - 3831 (\text{Ca}^{++}) + 5969 (\text{Mg}^{++}) + 54374 (\text{K}^+) + 121188 (\text{Na}^+) + 2485 (\text{fosforo}).$$

Con un valor de $r^2 = 0.141$, $F = 1.33$, $p = 0.37$.

El resultado fue de: $R\text{-Sq (adj)} = 14.1\%$, lo que quiere decir que las variaciones encontradas en la cantidad de UFC/g de suelo pueden ser explicadas en un 14.1 % con los parámetros químicos registrados, sin embargo, el valor de significancia (p) de 0.370 no es significativo e indica que este resultado podría ser debido al azar.

Los porcentajes de C y N se evaluaron de manera separada ya que no se tienen valores para las muestras de agosto de 2007 a febrero de 2008. Los resultados mostraron

$$\text{UFC/g suelo} = 12580 - 131478 (\text{C total}) + 1333115 (\text{N total}).$$

Con un valor de $r^2 = 0.867$, $F = 23.83$, $p = 0.003$.

De estos análisis se desprende que las concentraciones de C y N son más importantes para el crecimiento del hongo, que el resto de los parámetros químicos evaluados.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Detección molecular de ADN de *M. acridum*

Variantes de la técnica combinada entre muestreo del aire-detección molecular, se han utilizado con anterioridad para la detección de otros hongos, principalmente fitopatógenos (Freeman *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2002a). Pero éste es el primer trabajo en que se utilizan para hongos entomopatógenos, y particularmente para *M. acridum*. En estos estudios, el objetivo era desarrollar una prueba diagnóstica que permitiera identificar esporas de hongos fitopatógenos justo en el momento en que aparecían las primeras esporas en zonas de cultivo, susceptibles de ser infectados, y aplicar las técnicas paliativas convenientes. Obviamente, en el caso de *M. acridum* el interés es otro, ya que esta técnica, combinada con otras que puedan determinar la viabilidad de los conidios, puede ayudar a precisar el momento en que estos propágulos dejan de ser útiles como controladores biológicos, y por sí sola esta técnica facilita en gran medida la caracterización de patrones de dispersión por aire, los cuales aún no han sido estudiados de manera satisfactoria en *M. acridum* (Meyling y Eilenberg, 2007).

La extracción de ADN de pequeños organismos y/o propágulos colectados del aire es laboriosa debido a que éstos suelen encontrarse en pequeñas cantidades, así que, en principio, el método de muestreo debe ser el más adecuado. En el caso del método planteado aquí, se utiliza una trampa de esporas tipo Hirst (Burkard) para colectar las muestras. Este tipo de muestreador es de funcionamiento continuo por lo que se puede colectar cantidad suficiente de conidios de *M. acridum* para realizar una extracción adecuada de ADN. Otro aspecto crucial consiste en la ruptura de la pared celular. La manera más común de realizar esto es mediante el uso de nitrógeno líquido y posterior maceramiento en un mortero. Aunque este método puede ser adecuado para micelio y esporas en grandes cantidades, en el caso de los pequeños conidios colectados del aire se corre el riesgo de perder gran cantidad de ADN durante el proceso, por ello la utilización del equipo Fast-prep (Thermo) facilita este paso y junto con el empleo del glicógeno, que es un acarreador de ADN, se pueden recobrar cantidades de ADN que aunque mínimas son suficientes para llevar a cabo una reacción de PCR. Aunque hay que resaltar el hecho de que deben adecuarse las condiciones de velocidad y tiempo de este equipo, y como puede apreciarse el método de extracción planteado permite la detección de hasta un conidio de muestra.

Los oligonucleótidos utilizados tienen la particularidad de trabajar en un esquema de PCR anidada, lo cual aumenta la sensibilidad, aunque duplica el tiempo de reacción requerido. En una PCR anidada el producto de la primera PCR se utiliza como molde para la segunda, hay más ciclos de replicación y la sensibilidad aumenta, aunque se presenta el inconveniente de que este incremento en la sensibilidad deje al descubierto señales de contaminación que en una PCR simple no se hubieran detectado, por ello debe tenerse especial cuidado al momento de manipular los tubos y sus contenidos.

Otra razón de la gran sensibilidad encontrada radica en los oligonucleótidos utilizados. Estos oligonucleótidos fueron diseñados usando las regiones ITS del ADNr. Estas regiones ITS evolucionan rápidamente y por consiguiente son altamente variables, mostrando diferencias entre especies cercanamente emparentadas a *Metarhizium acridum* (Driver *et al.*, 2000). Como el ADNr está presente en múltiples copias en la mayoría de los genomas fúngicos, la detección por PCR de estas regiones es más sensible que regiones de una sola copia.

6.2 Optimización de los oligonucleótidos OPA-04(526) 1F, 1R, 2F y 2R

Los marcadores AB28, TW81, MacITSspF y R, diseñados por Entz y colaboradores (2005), mostraron una gran sensibilidad y resultaron específicos para todos los aislamientos de *M. acridum* probados según lo publicado por ellos. Sin embargo, y según los mismos autores, también dieron una reacción positiva a aislamientos de *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, y con excepción de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* que no dio una reacción positiva con estos oligonucleótidos, ninguna otra especie o variedad de los clados del género *Metarhizium* propuestos por Driver y colaboradores en 2000 fueron analizados. En nuestro estudio se analizaron estas mismos oligonucleótidos con otras especies y variedades y se demostró que estos oligonucleótidos (los de Entz *et al.* 2005) tuvieron una respuesta positiva para: *M. anisopliae* var. *majus*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* tipo e y *M. flavoviride* var. *novazealandicum*. Esta falta de especificidad representa un problema que puede ser más o menos grave dependiendo del sitio del que provengan los potenciales nuevos aislamientos que se deseen estudiar con estos marcadores, ya que no todas las especies y variedades del género *Metarhizium* presentan la misma distribución en el mundo (Driver *et al.*, 2000).

Durante 2005 y sobre la base de los estudios de taxonomía molecular de Cano (2003), Arroyo (2005) desarrolló marcadores SCARS específicos para la detección de *M. acridum* que fueron

denominados Ma160opa05a y b. Estos marcadores a pesar de ser altamente específicos carecían de una sensibilidad adecuada, ya que sólo permitían la detección de concentraciones superiores a los 1000 conidios. Debido a ello, se rediseñaron y se obtuvieron 2 pares de oligonucleótidos que trabajan de manera conjunta en un esquema de PCR anidada, similar al empleado por Entz y colaboradores (2005). Esos marcadores resultantes son los OPA-04(526) que se analizaron en este estudio.

El uso de la PCR-anidada tiene la ventaja de una gran sensibilidad comparada con una PCR normal de un solo paso. Como se puede apreciar en la figura 53A el primer par de marcadores detectó hasta 10,000 conidios, mientras que el segundo par detectó hasta 1 conidio. Esta misma sensibilidad fue mostrada por los oligonucleótidos de Entz y colaboradores (figura 54B). Otra ventaja es que la potencial presencia de inhibidores de PCR se reduce de manera significativa durante la segunda reacción de PCR. Las desventajas de la PCR anidada, consisten en que se duplica el tiempo requerido para la reacción y la misma sensibilidad puede revelar contaminación que no sería visible en una PCR normal, razón por la cual deben extremarse las precauciones al momento de manipular las diferentes muestras con el fin de evitar contaminación.

En cuanto a la especificidad se encontró que los oligonucleótidos son específicos únicamente para *M. acridum*. Se probaron aislamientos de Australia, México y Nigeria y en los 3 casos la amplificación por PCR se llevó a cabo, lo cual demuestra que pueden ser utilizados de manera extensa. Con el resto de especies y variedades empleadas no existió respuesta positiva lo cual asegura su especificidad. Por lo anterior, los oligonucleótidos OPA-04(526) son un instrumento valioso y adecuado para la identificación molecular del hongo entomopatógeno *M. acridum* y tiene potencial de ser mejorado mediante el uso de PCR en tiempo real, lo que permitiría cuantificar el número de conidios presentes.

6.3 Persistencia

Los resultados presentados indican que el hongo *M. acridum* tiene la capacidad de mantenerse viable y detectable 1 año 4 meses en suelo, y cerca de 9 meses en la cubierta vegetal y en el aire, con periodos de ausencia entre las detecciones. Estudios previos han encontrado que este hongo es capaz de persistir viable por tiempos variables en suelo: Hu y Leger (2002) reportaron que ejemplares recombinantes de *M. acridum* aplicados en suelos de zonas templadas decaen en su concentración inicial de $10^5/g$ de suelo a $10^3/g$ de suelo al cabo de unos meses, excepto en la zona

de la rizósfera donde se mantienen las concentraciones iniciales. Milner y colaboradores (2003a) evaluaron la persistencia de formulaciones comerciales de *M. anisopliae* variedades *anisopliae* y *lepidiotum* aplicadas en campos de cultivo de caña de azúcar australianos y descubrieron que mantuvieron su persistencia en el suelo durante 3.5 años, similar a lo publicado por Vaenninen *et al.* (2000) cuando evaluaron la persistencia de aplicaciones de *M. anisopliae* en zonas de cultivo finlandesas (con nieve en invierno) y descubrieron que muestras de suelo de estas zonas son capaces de infectar a larvas de *Tenebrio* sp. hasta 3 años después de haber sido aplicadas. También se sabe que *M. anisopliae* tiene la capacidad de mantenerse viable en arena estéril hasta 8 meses a 25 °C (Kaaya *et al.*, 1996) y 183 días en suelo de zonas de cultivo (Ekesi *et al.*, 2005) por lo que los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con los intervalos de tiempo reportados por estos autores. El período de estudio terminó después de 18 meses, detectándose todavía el hongo, así que es probable que se mantenga viable más tiempo.

Un aspecto en que difieren nuestros resultados de los estudios mencionados anteriormente, es que en ellos la concentración de *M. anisopliae* declinaba de manera continua y en nuestro caso hay períodos en los que la concentración aumenta de manera importante (principalmente durante el mes de marzo), lo que también se ve reflejado en la cubierta vegetal y en menor medida en el aire (Figs. 65-67).

Aunque la mayoría de los estudios no reportan incrementos en las concentraciones del hongo conforme transcurre el tiempo, al menos uno de ellos da cuenta de manera indirecta de un aumento en las concentraciones. Bruck y Donahue (2007) inocularon *M. anisopliae* junto con tierra en recipientes para plantas ornamentales y evaluaron el porcentaje de mortalidad del gorgojo *Otiorhynchus sulcatus*, y encontraron una tasa decreciente en la mortalidad para después medir un incremento en la mortalidad a las 23 semanas. Aunque estos autores no cuantificaron la concentración de *M. anisopliae*, establecieron como hipótesis que las concentraciones del hongo debieron de haber aumentado y por eso se elevó la tasa de mortalidad.

El incremento en la cantidad de UFC/g de suelo medido por nosotros podría haberse manifestado debido a prácticas agrícolas. Observaciones de campo durante el período en que se detectó la elevación mostraron que el suelo fue removido para preparar la próxima siembra. Proponemos la hipótesis de que esta actividad movilizó los conidios que se situaban a profundidades mayores de 15 cm (profundidad máxima de muestreo de este estudio) hacia la superficie e incluso los liberó a la atmósfera, ya que también fueron detectados aumentos súbitos en la cubierta vegetal y

en el aire. Esto se reafirma observando los resultados de los análisis químicos del suelo, ya que de febrero a marzo se detecta un incremento importante en el pH y el calcio que no pueden ser atribuidos a la aplicación de fertilizantes. Esto se explica porque el tipo de suelo de la zona de estudio es un cambisol calcáreo (Ayuntamiento-Atzitzihuacan, 2007). Este tipo de suelos presentan capas de rocas calcáreas a 20-50 cm de profundidad y al momento de preparar la tierra, porciones de esta capa son arrastradas a la superficie y como consecuencia aumenta el pH y las concentraciones de calcio.

Se requiere realizar más investigaciones acerca de la persistencia en zonas agrícolas para verificar si este comportamiento se repite, ya que otros estudios han mostrado que *M. anisopliae* es una especie que es más común en ambientes perturbados por el hombre, como sucede en Canadá, donde este hongo es más frecuente en campos agrícolas (Bidochka *et al.*, 1998), o en Dinamarca donde se ha encontrado que es más abundante en hábitats expuesto al sol como los campos de cultivo (Steenberg *et al.*, 1995) y Jabbour y Barbercheck (2009) publicaron un artículo en que habían hecho determinaciones de la presencia de hongos entomopatógenos en campos de cultivo y observaron con mayor frecuencia presencia de *Metarhizium anisopliae* en los campos donde había existido gran trabajo del arado.

La gran cantidad de UFC cuantificadas en suelo demuestra el potencial de acumulación de *M. acridum*, sin embargo, estas unidades se sitúan a una profundidad de 10 a 15 cm, situación que las hace inaccesibles para los chapulines de la especie *Sphenarium purpurascens*, ya que estos insectos pasan la mayor parte de su vida sobre la cubierta vegetal, además de que para esas fechas ya había concluido su ciclo de vida; e incluso las grandes concentraciones tendrían poco efecto sobre las ootecas, porque los individuos de esta especie las entierran a una profundidad de 3 cm en promedio (Cueva Del Castillo, 2003). Es poco probable que en la superficie del suelo se encuentren conidios viables en concentraciones apreciables, debido a que éstos son muy sensibles a altas temperaturas y a la radiación solar. En la zona de estudio se alcanzan temperatura en la superficie del suelo de más de 45°C durante los meses de secas y sin abrigo de plantas cercanas. A dichas temperaturas se empieza a perder viabilidad de los conidios rápidamente (Rangel *et al.*, 2005), por lo tanto, las altas concentraciones registradas en suelo tendrían poco efecto como controladores biológicos de *Sphenarium purpurascens*.

Por lo anterior sería recomendable evaluar el impacto del hongo sobre organismos no-blanco de la zona de estudio, ya que las altas concentraciones podrían significar un riesgo para los

organismos del suelo que sean susceptibles. Se ha demostrado que ácaros colémbolos, dípteros pequeños y larvas de coleópteros son susceptibles a algunos aislamientos de *Metarhizium* y capaces de transportar los conidios pasivamente a través de las capas del suelo (Zimmermann y Bode, 1983).

En lo referente al comportamiento del hongo en la cubierta vegetal, en este estudio se encontró que las concentraciones iniciales en la cubierta vegetal fueron muy altas, superiores casi 5 veces a las cuantificadas en suelo, pero éstas decayeron casi totalmente después de una semana. El hecho de que fue posible detectar ADN de *M. acridum* sobre la cubierta vegetal, pero no cuantificar conidios desarrollados (una vez procesadas las muestras en el laboratorio), indica que estos se encontraban presentes pero no eran viables. Se ha demostrado que la radiación ultravioleta del sol puede causar la inactivación de los conidios en horas (Braga *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2004) y la lluvia reducir su viabilidad en algunos días (Inyang *et al.*, 2000). Los ligeros repuntes en la concentración, detectados posteriormente, probablemente se deban a conidios transportados por el viento desde el suelo hacia la cubierta vegetal.

Existen pocos estudios publicados en los que se evaluó la persistencia en cubierta vegetal, los cuales mostraron resultados similares a los nuestros. Moore *et al.*, (1996) reportaron que la vida media de conidios sobre vegetación tratada fue de 4.3 días. Inyang y colaboradores (2000) simularon lluvia y encontraron reducciones en la viabilidad de las esporas al cabo de una semana. Hunter *et al.*, (2001) reportaron que la persistencia de *M. acridum* se mantuvo cerca de 7 días en la vegetación de zonas de cultivo australianas. La disminución abrupta en las concentraciones de *M. acridum* en la cubierta vegetal, observada en este estudio, demuestra que un manejo eficiente de plagas debe incluir aspersiones frecuentes con intervalos de una semana entre ellos, para mantener elevadas concentraciones de conidios en las plantas con el fin de lograr la infección de los insectos, sobre todo si las precipitaciones son abundantes.

Respecto a la persistencia en aire, es posible apreciar que no se detectaron conidios el día de la aspersión del hongo (cuadro 5) con el muestreador de partículas viables, pero sí con la trampa de esporas tipo Hirst (cuadro 8). Los conidios de *M. acridum* se encontraban dispersos en una base oleosa al momento de ser asperjados, y estos resultados muestran que los conidios pueden liberarse del aceite acarreador tiempo después (algunas horas) y transportarse al aire desde el suelo y la cubierta vegetal, por lo que sí se detectan en la trampa de esporas Hirst ese mismo día. Esto ejemplifica la necesidad de usar muestreadores de tipo continuo para conocer con precisión la dinámica atmosférica de partículas biológicas en los campos de cultivo. Sólo se ha reportado un

estudio que evalúe persistencia de conidios en aire. Darbro y Thomas (2009) estudiaron la persistencia de conidios de *Metarhizium anisopliae* en ambientes cerrados (con el objetivo de analizar su efectividad contra mosquitos vectores de malaria y dengue). Estos autores aplicaron un formulado oleoso a piezas de tela situadas en el techo (a una concentración de 2.0×10^{13} conidios) y después pusieron un muestreador 180 cm debajo de las telas y midieron la concentración de conidios en el aire. Los investigadores encontraron que los aislamientos usados por ellos mantuvieron su viabilidad sólo por una semana, en cambio, en este estudio aún se detectaban 1151 UFC/m³ viables en el aire una semana después, a pesar de ser un campo abierto. Hay que aclarar que trabajaron con *M. anisopliae* (sin especificar variedad) y reconocen que algunos aislamientos usados por ellos han demostrado tener viabilidad de más de 3 semanas en otros experimentos. En cuanto a concentraciones, Darbro y Thomas (2009) reportaron que sus concentraciones iniciales decayeron de 7,000 conidios/m³ a 500 conidios/m³ en sólo 48 h. Como puede apreciarse, dada la naturaleza diferente de ambos estudios, es difícil hacer una comparación pero los dos coinciden en la rapidez con la que se pierde viabilidad.

Finalmente, la revisión de Zimmerman (2007) reporta que *M. anisopliae* no se encuentra naturalmente en el aire, aunque puede ser transportado por agentes externos. Los resultados, tanto del muestreador de partículas viables como de la trampa de esporas muestran que los conidios asperjados en campo tienen la capacidad de ser introducidos en la atmósfera, ya que fueron detectados en numerosas ocasiones (32 días según la trampa de esporas tipo Hirst).

6.4 Correlaciones con parámetros meteorológicos

Varios estudios se han enfocado en el efecto de las variables climáticas, encontrándose que las principales son la humedad, radiación solar y temperatura (Bateman *et al.*, 1993; Rangel *et al.*, 2004, 2005). En general, la humedad debe ser alta para lograr la germinación de los conidios, pero no hay estudios publicados que indiquen el efecto de ésta a largo plazo. En este estudio hay 4 variables relacionadas con la humedad, que son la precipitación, la humedad relativa, la evaporación potencial y la evapotranspiración de referencia. De manera interesante la precipitación sólo mostró correlaciones significativas con la cantidad de UFC en aire.

McCartney (1991) demostró que grandes gotas de lluvia que caen sobre una planta pueden provocar la liberación de esporas de dos formas. En la primera, el impacto del agua sobre la hoja puede agitarla e impartir movimiento a la espora. La otra forma puede deberse a corrientes de aire

provocadas por las gotas de lluvia. De esta forma, la liberación de los conidios de la cubierta vegetal provoca un aumento en la concentración de conidios en el aire.

La humedad relativa indica el porcentaje de humedad que contiene el aire respecto al total que podría alcanzar y tiene una relación estrecha y directa con la temperatura y humedad del suelo. En el caso de las UFC encontradas en suelo se presentó una correlación negativa, probablemente debido a que la intensa humedad favorece el crecimiento de organismos competidores y depredadores de *M. acridum*, lo que reduce su población, tal como plantean Keller y Zimmermann (1989) y Hajek (1997), quienes establecen que las especies del género *Metarhizium* son pobres competidores de los recursos orgánicos, comparados con los hongos saprófitos oportunistas; o también podría deberse a una reducción en los niveles de oxígeno (Jabbour y Barbercheck, 2009). Ésto parece confirmarse con las correlaciones encontradas en los casos de la evaporación potencial y la evapotranspiración de referencia. Estas son medidas que indican la pérdida de agua de una zona y como puede apreciarse (cuadro 9) las correlaciones fueron positivas para suelo, justo lo contrario de lo observado con la humedad relativa. Estos datos parecen validar la hipótesis de que un exceso de humedad es perjudicial para la sobrevivencia del hongo a largo plazo en el campo.

En cuanto al viento, se notó una correlación positiva con las UFC detectadas en suelo, probablemente debido a que el flujo de aire remueve los conidios de la cubierta vegetal o de los insectos y los deposita en el suelo. Aunque no se ha determinado la velocidad del viento necesario para remover conidios de *Metarhizium acridum* de la cubierta vegetal, experimentos con *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* spp. y *Penicillium* spp. (Pasanen *et al.*, 1991) han descrito que se necesitan velocidades de viento entre 0.5 m/s y 1 m/s. En la zona de estudio que evaluamos, las velocidades del viento varían de 1.08 m/s (velocidad promedio) a 6.6 m/s (velocidad máxima).

Otra correlación observada fue entre la cantidad de UFC en aire respecto a la radiación solar máxima. De manera inesperada la correlación fue positiva, lo cual indica que parece existir un aumento en la concentración conforme se incrementa la radiación solar máxima. Diversos estudios como los ya citados de Braga *et al.* (2001) y Rangel *et al.* (2004), muestran que la radiación UV del sol puede producir la inactivación de los conidios en cuestión de horas. Una posible explicación del resultado mostrado por nosotros podría deberse a que la radiación solar provoca la elevación de temperatura sobre la superficie foliar y disminuye la humedad sobre la hoja, de esta manera la tensión superficial que mantiene el conidio unido a la hoja disminuye y puede ser liberado, tal como plantean Jones y Harrison (2004).

6.5 Análisis de parámetros fisicoquímicos del suelo

Las únicas correlaciones significativas encontradas fueron con la conductividad eléctrica y el porcentaje de nitrógeno. Debido a problemas técnicos no se pudieron evaluar todas las fechas con las que se hicieron los otros análisis, pero se decidió incluir la información debido a que las condiciones del suelo son bastante estables en el tiempo, pero se advierte del hecho para tomar las debidas reservas al momento de considerar estos resultados. Hasta el momento no se ha determinado el efecto de la conductividad eléctrica sobre el crecimiento de *M. acridum* u otros hongos entomopatógenos, pero se sabe que conductividades eléctricas altas pueden favorecer el crecimiento de hongos saprófitos como *Phytophthora cryptogea* (MacDonald, 1984).

En cuanto al porcentaje de nitrógeno, Gao *et al.* (2007) analizaron *in vitro* el efecto de las concentraciones de carbono y nitrógeno en el crecimiento y esporulación de varios aislamientos de hongos biocontroladores, entre ellos *Metarhizium anisopliae*. Encontraron que intervalos en las proporciones de C:N de 10:1 a 80:1 son los mejores para provocar crecimientos óptimos del hongo. Sin embargo, esas concentraciones de C:N tienen un impacto negativo sobre la esporulación, ya que los resultados de Gao *et al.* (2007) mostraron que las tasas de esporulación son bajas a esas proporciones de C:N (observaron que las máximas cantidades de conidios se producen a proporciones de C:N de 160:1). Asimismo, Mustafa y Kaur (2009) reportaron que las tasas de crecimiento y esporulación también se ven influidas por el aislamiento en sí mismo y por la fuente de carbono y de nitrógeno. De los datos obtenidos se ha estimado que las proporciones de C:N de la zona de estudio estuvieron en un intervalo de 5.8:1 a 11.1:1, suficientes para un crecimiento óptimo de *M. acridum*, lo que podría explicar en parte el incremento detectado en las concentraciones del hongo en suelo.

6.6 Recomendación para el uso adecuado y eficiente de *M. acridum* en zonas rurales para lograr un control eficiente de chapulines y langostas

De acuerdo con V. M. Hernández Velázquez (com. pers.), la concentración letal media de *M. acridum* para *Sphenarium purpurascens* es de 1.4×10^4 conidios. Durante la aspersión inicial los individuos alcanzados directamente por el formulado reciben la cantidad necesaria de conidios para causarles la muerte. En el caso de los individuos a los que la ráfaga inicial no les alcanzó, o que llegaron después a la zona, pueden ser infectados al momento de alimentarse de la vegetación con residuos de conidios.

Con los resultados obtenidos se puede apreciar que las concentraciones de *M. acridum* presentes en el área de estudio sólo son suficientes durante la primera semana para infectar a los chapulines y se puede concluir que un manejo eficiente de la plaga debe incluir aspersiones frecuentes, con intervalos de una semana entre ellos para mantener concentraciones de conidios en las plantas lo suficientemente grandes para lograr la infección de los individuos no alcanzados directamente, sobre todo si las precipitaciones son abundantes. El número de aspersiones debería basarse en observaciones de campo, pero dado que los chapulines tardan en morir de 1 a 2 semanas, se sugieren al menos dos aspersiones. De hecho, este es el esquema que sigue actualmente en diversas partes del país para el control de la langosta (*Schistocerca piceifrons piceifrons*), por ejemplo en Yucatán y Tamaulipas, sólo que los intervalos entre aspersiones son de 2 ó 3 semanas, el número de aspersiones son tres y se inician cuando los organismos juveniles están emergiendo (información proporcionada por la Junta Local de Sanidad Vegetal de Tizimín, Yucatán). Sin embargo, los datos de la presencia de *M. acridum* en suelo hacen recomendar prudencia antes de tomar la determinación de realizar varias aspersiones. Hay evidencia de que *M. acridum* puede causar reacciones alérgicas en humanos (Goettel *et al.*, 2001) y se ha documentado que *M. anisopliae* (sin especificar variedad) provocó reacciones asmáticas en campesinos brasileños de campos de caña de azúcar, donde se emplea de manera abundante como agente microbiano contra varias plagas (Barbieri *et al.*, 2005). Otros estudios realizados en ratas y ratones mostraron evidencia contradictoria respecto al potencial del hongo de causar enfermedades pulmonares (ver revisión en Zimmermann, 2007). Experimentos adicionales han demostrado que algunos aislamientos de *M. anisopliae* presentan resistencia a los antimicóticos terapéuticos más usados (itraconazol, fluconazol, ketoconazol y 5-flucitosina) (Burgner *et al.*, 1998; Revankar *et al.*, 1999). Debido a lo anterior,

Zimmermann (2007) recomienda tomar precauciones para evitar el contacto del hongo con la piel, como puede ser el uso de guantes y evitar la inhalación prolongada de los conidios.

Según los resultados obtenidos de este estudio, el posible riesgo derivado de la inhalación de conidios se presentaría sólo durante la primera semana, de acuerdo con los datos del muestreador de partículas viables, donde se indica que las mayores concentraciones en la atmósfera se presentan durante la primera semana, y con ayuda de la trampa de esporas Hirst se puede observar que la presencia de ADN del hongo se limita a algunos días.

Un hombre saludable en reposo respira de 6 a 10 litros de aire por minuto y el volumen puede incrementarse hasta 200 litros con actividad física intensa (Platonov, 2002). Haciendo algunos cálculos, durante 2 h se aspirarían al menos 0.72 m^3 de aire (estando en completo reposo) y si la actividad es intensa hasta 24 m^3 . Por lo tanto, y dependiendo de la intensidad de la actividad física, una persona situada 2 horas en el campo donde se asperjó el hongo podría respirar de 828 hasta 27,624 conidios durante los primeros días. Por lo anterior se recomienda, con el fin de minimizar riesgos, tratar de no visitar la zona donde se asperjó el hongo por un par de días (si es posible) o emplear mascarillas.

En resumen, varias aspersiones de *M. acridum* con intervalos de una semana entre ellas parecen ser la mejor forma de lograr las concentraciones necesarias del hongo y estables en el tiempo para poder reducir las poblaciones de chapulines. También se recomienda el uso de guantes y reducir la exposición prolongada al aire de la zona, sin protección, durante los primeros días luego de las aspersiones.

Finalmente, se solicita prudencia al extrapolar estos resultados a otras regiones. Cambios en las condiciones ambientales, edafológicas, así como variaciones en el tipo de cubierta vegetal podrían ocasionar que el comportamiento de *M. acridum* fuera diferente, tal como se presentó en las tres rancherías de Tizimín, donde no fue posible detectar a *M. acridum* a pesar de haber sido asperjado varias veces, por lo tanto, la recomendación final es hacer, en la medida de lo posible, evaluaciones periódicas de la población del hongo para determinar si hay acumulación o abatimiento de las concentraciones y actuar en consecuencia.

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que llegó este trabajo son las siguientes:

1. Las técnicas moleculares empleadas y desarrolladas en este estudio demostraron ser adecuadas y útiles para la detección molecular del hongo entomopatógeno *Metarhizium acridum* en el ambiente de zonas rurales. En particular, los oligonucleótidos OPA-04(526) mostraron ser altamente específicos para los aislamientos del hongo empleados en México.
2. En cuanto a la determinación de persistencia, la población de *M. acridum* fluctúa de manera importante a través del tiempo y tiene el potencial de acumularse en suelo si las condiciones son propicias. Las condiciones meteorológicas que mostraron correlaciones positivas fueron la velocidad del viento, evaporación potencial y evapotranspiración de referencia. La humedad relativa mostró una correlación negativa. En cuanto a parámetros fisicoquímicos, la conductividad eléctrica y el porcentaje de carbono-nitrógeno presentaron correlaciones positivas.
3. Respecto a la cubierta vegetal, se observó que los conidios presentes decaen rápidamente minimizando su efecto como agentes microbianos. Por ello, las aspersiones deben hacerse de manera frecuente (semanalmente) para lograr un mejor control de las plagas a combatir. No se encontraron correlaciones significativas con los parámetros meteorológicos.
4. En el caso del aire, se detectan concentraciones elevadas de conidios los primeros días, por ello se recomienda reducir la exposición de las personas con el fin de minimizar los posibles riesgos. Únicamente la precipitación y la radiación solar mostraron correlaciones significativas con las concentraciones de *M. acridum* en el aire durante el tiempo de estudio.
5. Aunque estudios de bioseguridad demuestran que este hongo afecta relativamente pocos organismos no-blanco, sería conveniente efectuar más investigaciones para descartar algún posible perjuicio ecológico a otras especies, debido a las grandes cantidades que puede alcanzar en el suelo.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abbasi, P. A., Miller, S. A., Meulia, T., Hoitink, H. A. J. and Kim, J. M. 1999. Precise detection and tracing of *Aureobasidium pullulans* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5421–5426.
- Alatorre, R. 2005. Hongos entomopatógenos. *XVI Curso Nacional de Control Biológico. San Miguel de Allende, Gto. México*. Noviembre 2005.
- Álvarez, A. J., Buttner, M. P. and Stetzenbach, L. D. 1995. PCR for bioaerosol monitoring sensitivity and environmental interference. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3639-44.
- Alves, A., J. 1986. *Controle microbiano de insetos*. Sao Paulo, Brasil. Manole.
- Anaya-Rosales, S., Romero-Nápoles, J. and López-Martínez, L.-M. 2000. *Manual de Diagnóstico para las Especies de Chapulines (ORTHOPTERA:ACRIDOIDEA) del Estado de Tlaxcala y estados adyacentes*. Montecillos, México. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados
- Arroyo, E. 2005. Obtención de marcadores de regiones amplificadas de secuencias caracterizadas para la identificación del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37:231-44.
- Aston, R. 2004. Medium scale field trials with the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ("Green Muscle") against desert locust (*Schistocerca gregaria*) in Niger. In *Draft project report OSRA/RAF/801/USA*. Rome, Italy. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ayala-Zermeño, M. A., Navarro-Barranco, H., Mier, T. and Toriello, C. 1999. Effect of agro-chemicals on in vitro growth of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41:223-229.
- Ayuntamiento-Atzitzihuacan. 2007. Enciclopedia de los Municipios de México. Página Web. Revisada Julio 2007. Disponible via http://www.e-mexico.gob.mx/work/EMM_1/Puebla/Mpios/21022a.htm.
- Ayuntamiento-Tizimín. 2007. Enciclopedia de los Municipios de México. Página Web. Revisada Julio 2007. Disponible via <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/yucatan/municipios/31096a.htm>.
- Barbieri, R. T., Croce, J., Gandra, R. F., Gagete, E., Paula, C. R. and Gambale, W. 2005. Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae*. Obtainment and characterization. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 15:131-139.

- Barrientos, L. y Ortiz, A. C. 2006. Gomphocerinae (Orthoptera: Acrididae) comunes y de importancia económica en el noreste de México. *En: Entomología mexicana*. Texcoco, Edo. México. Sociedad de Entomología A. C. Colegio de Postgraduados.
- Barrientos, L. 2003. *Orthopteros plaga de México y Centroamérica. Guía de campo*. Cd. Victoria Tamaulipas. Instituto Tecnológico de Cd. Victoria. SEP-CONACYT.
- Barrientos, L. y Milner, R. 2001. Uso actual y potencial de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* para el control biológico de acridoideos en América Latina. *En: Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta Schistocerca piceifrons piceifrons Walter*, 43-48. Yucatán, México. Sagarpa.
- Barrientos, L., Astacio, O., Poot, O. y Alvarez, F. 1992. *Manual técnico sobre la langosta voladora (Schistocerca piceifrons piceifrons Walker, 1870) y otros acridoideos de Centroamérica y Sureste de México*. San Salvador, El Salvador. F. A.O./ O. I. R. S. A.
- Bateman, R. P., Douro-Kpindou, O. K., Kooyman, C., Lomer, C. and Ouambama, Z. 1998. Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Protection* 17:151-158.
- Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D. and Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology* 122:145-152.
- Bell, W. 1991. *Searching Behaviour. The Behavioural Ecology of Finding Resources*. London. Chapman and Hall.
- Benz, G. 1987. Environment. *In: Epizootiology of Insect Diseases* eds. J. R. Fuxa and Y. Tanada, 177-214. Toronto, Canada. John Wiley & Sons.
- Bhatkar, A. 2003. Frequently Asked Questions About Biological Control of Weeds. Biological Control of Weeds in Texas. Página Web. Revisada noviembre 2007. Disponible vía <http://bc4weeds.tamu.edu/faq.html>.
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J. and De Croos, J. N. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology* 67:1335-42.
- Bidochka, M. J., Kasperski, J. E. and Wild, G. A. M. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany* 76:1198-1204.
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., St. Leger, R. J. and Roberts, D. W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 25:107-113.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. and Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101:512-30.
- Bischoff, J. F., Rehner, S., A. and Humber, R. A. 2007. *Metarhizium frigidum* sp. nov. a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia* 98:737-745.

- Blanford, S. and Thomas, M. B. 2001. Adult survival, maturation and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acidum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78:1-8.
- Braga, G. U., Flint, S. D., Messias, C. L. anderson, A. J. and Roberts, D. W. 2001. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. A study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology* 73:140-6.
- Branson, D. 2007. Grasshopper Ecology and Preventative Management. Página Web. Revisada abril 2007. Disponible via <http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=11897>.
- Bruck, D. J. and Donahue, K. M. 2007. Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* in container-grown ornamentals. *Journal of Invertebrate Pathology* 95:146-50.
- Burgner, D., Eagles, G., Burgess, M., Procopis, P., Rogers, M., Muir, D., Pritchard, R., Hocking, A. and Priest, M. 1998. Disseminated invasive infection due to *Metarhizium anisopliae* in an immunocompromised child. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1146-50.
- Calderón, C., Ward, E., Freeman, J., Foster, S. J. and McCartney, H. A. 2002a. Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathology* 51:303-310.
- Calderón, C., Ward, E., Freeman, J. and McCartney, A. 2002b. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal of Aerosol Science* 33:283-296.
- Cano-Ramírez, C., Reyes-Montes, M., R., Vásquez-Sosa, A., Hernández-Velázquez, V. and Toriello, C. 2002. Patrón polimórfico de aislados de México de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* por medio de RAPD-PCR. In: XXV Congreso Nacional de Control Biológico, 6-8. Hermosillo, Sonora. Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Cano, C. 2003. Caracterización genotípica de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* por medio de RAPD-PCR y determinación *in vitro* de su virulencia en langosta (Orthoptera: Acrididae), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Castrillo, L. A., Thomsen, I. M., Juneja, P. and Hajek, A. 2007. Detection and quantification of *Entomophaga maimaga* resting spores in forest soil using real-time PCR. *Mycological Research* 111:324-331.
- CNCRB, 2012. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Página web. Revisada noviembre 2012. url: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4157>
- Cobb, B. D. and Clarkson, J. M. 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiological Letters* 112:319-24.
- Corona-Vargas, M. and Ritter-Ortiz, W. 2006. *Dispersión del chapulín Sphenarium purpurascens en Tlaxcala*. México. Tesis. Colegio de Postgraduados. Tlaxcala, México.

- Cruz-Pérez, P., Buttner, M. P. and Stetzenbach, L. D. 2001. Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 15:129-38.
- Cueva Del Castillo, R. 2003. Body Size and Multiple Copulations in a Neotropical Grasshopper with an Extraordinary Mate-Guarding Duration. *Journal of Insect Behavior* 16:503-522.
- Chapman, F. and Page, W. 1979. Factors affecting the mortality of the grasshopper *Zenocerus variegatus*, in Southern Nigeria. *Journal of Animal Ecology* 48:271-288.
- Darbro, J. M. and Thomas, M. B. 2009. Spore persistence and likelihood of aeroallergenicity of entomopathogenic fungi used for mosquito control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80:992-997.
- Dauch, A. L., Watson, A. K. and Jabaji-Hare, S. H. 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *Journal of Microbiological Methods* 55:51-64.
- De Clercq, D., Cognet, S., Pujol, M., Lepoivre, P. and Jijakli, M. H. 2003. Development of a SCARmarker and a semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple fruit surfaces. *Postharvest Biology and Technology* 29:237-247.
- Diario-del-Pueblo. 2001. Se agrava plaga de langosta en Isla de Hainan, China. Página Web. Revisada Abril 2005. Disponible via http://spanish.peopledaily.com.cn/spanish/200109/27/sp20010927_49457.html.
- Donegan, K., Matyac, C., Seidler, R. and Porteous, A. 1991. Evaluation of methods for sampling, recovery and enumeration of bacteria applied to the phylloplane. *Applied and Environmental Microbiology* 57:51-56.
- Driver, F., Milner, R. J. and Trueman, J. W. H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104:134-150.
- Ekési, S., Maniania, N. K., Mohamed, S. A. and Lux, S. A. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biological Control* 35:83-91.
- Entz, S. C., Johnson, D. L. and Kawchuk, L. M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research* 109:1302-12.
- FAO. 2004. La secuela es el hambre. Escenas de la lucha contra la langosta. Página Web. Revisada abril 2007 Disponible via <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51040/index.html>.
- Fargues, J., Smits, N., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G. and 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.
- Fargues, J., Ouedraogo, A., Goettel, M. S. and Lomer, C. J. 1997. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology* 7:345-356.

- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., Lomer, C. J. and Rougier, M. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135:171-181.
- Farrow, R. 1982. Population dynamics of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Walter), in Central New South Wales. II. Factors influencing natality and survival. *Australian Journal of Zoology* 30:199-222.
- Fegan, M., Manners, J. M., MacLean, D. J., Irwin, J. A. G., Samuels, K. D. Z., Holdom, D. G. and Li, D. P. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of General Microbiology* 139:2075-2081.
- Fielding, J. and Brusven, M. 1995. Ecological correlates between rangeland grasshopper (Orthoptera: Acrididae) and plant communities of southern Idaho. *Environmental Entomology* 24:1432-1441.
- Flook, K. and Rowell, K., S. 1999. A combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera and its implications for their higher systematics. *Systematic Biology* 48:233-253.
- Freeman, J., Ward, E., Calderón, C. and McCartney, A. 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 108:877-886.
- Gaceta-Parlamentaria. 2007. Página Web. Revisada mayo 2007. Disponible via <http://gaceta.diputados.gob.mx/Gaceta/60/2007/mar/20070315-II.html>.
- Gaceta-Parlamentaria. 2003. Página Web. Revisada mayo 2007. Disponible via <http://gaceta.diputados.gob.mx/Gaceta/59/2003/nov/20031119.html>.
- Gangwere, K. 1991. *Food Habits and Feeding Behavior of Locusts and Grasshoppers*. The Orthopterists' Society .
- Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z. and Che, Y. S. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111:87-92.
- García, S. 2001. Situación actual del problema de la langosta en el sur del estado de Tamaulipas. In *Manejo integrado de la Langosta voladora (Schistocerca piceifrons piceifrons Walter) (Orthoptera: Acrididae) en el sur de Tamaulipas*. *Entomología mexicana 2006*, eds. J. Avila-Valdez, L. Barrientos-Lozano and P. García-Salazar. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Sociedad de Entomología A. C.
- Garza, C. J. 2003. El chapulin *Melanoplus* sp. y su manejo en la planicie Huasteca. Página Web. Revisada mayo 2007. Disponible via <http://www.oeidrus-slp.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=110>.
- Goettel, M. S., Hajek, A. E., Siegel, J. P. and Evans, H. C. 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, eds. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan. Wallingford, UK. CABI International.

- Goettel, M. S., Johnson, D. L. and Inglis, G. D. 1995. The role of fungi in the control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany/Revue Canadienne de Botanique* 73:S71-S75.
- Gorochov, V. 1995. Contribution to the system and evolution of the order Orthoptera. *Zoologicheskyy Zhurnal* 74:39-45.
- Guo, H., L., Ye, B., L., Yue, Y., Y., Chen, Q., T. and Fu, C., S. 1986. Three new species of *Metarhizium*. *Acta Mycologica Sinica* 5:177-184.
- Gurrola, N., Meré, A. y Echavarría-CH, G. 2006a. Impacto de los chapulines *Boopedon nubilum* (Say) y *Melanoplus lakinus* sobre el recurso pastizal. En: *III simposio internacional de pastizales*, 39. Chihuahua, México. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Gurrola, N., Chairez, I. y Gutiérrez, R. 2006b. Utilización de plantas hospedantes por *Brachystola magna* y *Melanoplus lakinus* en pastizales de durango. En: *III simposio internacional de pastizales*. Dr. Martín González H. Alanís, 63. Chihuahua, Mexico. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Hajek, A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology* 15:193-249.
- Haugland, R. A., Brinkman, N. and Vesper, S. J. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 50:319-23.
- Haugland, R. A., Vesper, S. J. and Wymer, L. J. 1999. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan(TM) fluorogenic probe system. *Molecular and Cellular Probes* 13:329-340.
- Hernández-Velázquez, V., M., Berlanga-Padilla, A., M. and Garza-González, E. 1997. Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia* 4:45-46.
- Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M. and Barrientos-Lozano, L. 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* to control the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research* 9:223-227.
- Herrera, T. and Ulloa, M. 1998. *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. México, D.F. Fondo de Cultura Económica.
- Hu, G. and St. Leger, R. J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6383-6387.
- Hunter, D. M. 2005. Mycopesticides as part of integrated pest management of locusts and grasshoppers. *Journal of Orthoptera Research* 14:197-201.

- Hunter, D. M., Milner, R. J. and Spurgina, P. A. 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bulletin of Entomological Research* 91:93-99.
- Ibrahim, L., Butt, T. M., Beckett, A. and Clark, S. J. 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 103:901-907.
- Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist* 75:516-525.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. and Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*, eds. T. M. Butt, C. W. Jackson and N. Magan. Wallingford. CABI Publishing.
- Inglis, G. D., Duke, G. M., Kawchuk, L. M. and Goettel, M. S. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biological Control* 14:111-120.
- Inyang, E. N., McCartney, H. A., Oyejola, B., Ibrahim, L., Pye, B. J., Archer, S. A. and Butt, T. M. 2000. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research* 104:653-661.
- Jabbour, R. and Barbercheck, M. E. 2009. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control* 51:435-443.
- Jeffrey, N., Lockwood, A. and Schell, S. 2000. Rangeland grasshopper movement as a function of wind and topography, implications for pest management. *Journal of Orthoptera Research* 9:111-120.
- Jenkins, J., Bateman, R. and Thomas, M. 1998. The LUBILOSA Programme-Development of a mycoinsecticide for locust and grasshopper Control. En: *Memoria del XXI Congreso Nacional de Control biológico*. Rio Bravo, Tam. México. Sociedad Mexicana de Control biológico.
- Jenkins, N. E. 1996. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. *Pesticide Science* 46:299-306.
- Jiménez-Gutierrez, M. P. 2006. Transición del 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. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F.
- Jones, A. M. and Harrison, R. M. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - A review. *Science of the Total Environment* 326:151-180.
- Kaaya, G. P., Mwangi, E. N. and Ouna, E. A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrates Pathology* 67:15-20.

- Keller, S. and Zimmermann, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. *In: Insect-Fungus Interactions*, eds. N. Wilding, N. M. Collins, P. M. Hammond and J. F. Webber, 239-270. London, UK: Academic Press.
- Kendall, M. G. 1990. *Rank correlation methods*. 5th ed. N.Y. Oxford University Press.
- Keswani, J., Kashon, M. L. and Chen, B. T. 2005. Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust. *Journal of Environmental Monitoring* 7:311-8.
- Kevan, K. 1982. *Orthoptera. In: Synopsis and Classification of Living Organisms* New York. McGraw Hill.
- Kooyman, C., Bahana, J., Godonou, I., Katheru, J. N., Magorna, R. N., Seyourn, E. and Spurgin, P. 2003. Operational trial of Green Muscle against red locust nymphs in the Wenbere plains. Tanzania *Project report of projects DFID R7818 and FAO TCP/URT/201/NOR*.
- Kowalchuk, G. A., de Souza, F. A. and van Veen, J. A. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11:571-81.
- Laird, M., Lacey, L. A. and Davidson E, W. 1990. *Safety of Microbial Insecticides*. Boca Raton. CRC Press.
- Latch, G. C. M. 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8:384-390.
- Launois, M. and Launois-Luong, M. 1991. *The Senegalese grasshopper, Oedaleus senegalensis (Kraus, 1877), in West Africa. The Orthopterists' Society Series of Field Guides. C7E. The Orthopterists' Society Series of Field Guides. C7E*.
- Leal, S. C. M., Bertoli, D. J., Butt, T. M. and Peberdy, J. F. 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycological Research* 98:1077-1081.
- Lee, S. and Taylor, J. 1990. Isolation of ADN from fungal mycelia and single spores. *In: PCR protocols. A guide to methods and applications*, eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, 282-287. San Diego, California. Academic Press.
- Liang, Z., Q., Liu, A., Y. and Liu, J., L. 1991. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium anamorph*. *Acta Mycologica Sinica* 10:257-262.
- Lockwood, J. anderson-Sprecher, R. and Schell, S. 2002. When less is more. Optimization of reduced agent area treatments (RAATs) for management of rangeland grasshoppers. *Crop Protection* 21:551-562.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. and Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46:667-702.

- Loncaric, I., Donat, C., Antlinger, B., Oberlerchner, J. T., Heissenberger, B. and Moosbeckhofer, R. 2008. Strain-specific detection of two *Aureobasidium pullulans* strains, fungal biocontrol agents of fire blight by new, developed multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* 104:1433-41.
- MacDonald, J. 1984. Salinity effects on the susceptibility of *Chrysanthemum* roots to *Phytophthora cryptogea*. *Ecology and Epidemiology* 74:621-624.
- MacNeil, L., Kauri, T. and Robertson, W. 1995. Molecular techniques and their potential application in monitorin the microbiological quality of indoor air. *Canadian Journal of Microbiology* 41:657-665.
- Magalhães, B., de Faria, M., Lecoq, M., Schmidt, F., Silva, J., Frazao, H. S., Balanca, G. and Foucart, A. 2001. The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Journal of Orthoptera Research* 10:199-202.
- Magalhães, B. P., Goettel, M. S. and Frazão, H. D. S. 2000. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:162-164.
- Matthew, B. and Jenkins, N. 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper *Zenocerus variegates*. *Mycological Research* 101:1447-1469.
- McCartney, H. A., Fitt, B. D. L. and Schmechel, D. 1997. Sampling bioaerosols in plant pathology. *Journal of Aerosol Science* 28:349-364.
- McCartney, H. A. 1991. Airborne dissemination of plant fungal pathogens. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 70:s39-s48.
- McClatchie, G. V., Moore, D., Bateman, R. P. and Prior, C. 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycological Research* 98:749-756.
- McDevitt, J. J., Lees, P. S. J., Merz, W. G. and Schwab, K. J. 2007. Inhibition of quantitative PCR analysis of fungal conidia associated with indoor air particulate matter. *Aerobiologia* 23:35-45.
- McDevitt, J. J., Lees, P. S., Merz, W. G. and Schwab, K. J. 2004. Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples. *Mycopathologia* 158:325-335.
- Meyling, N. V. and Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems. Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.
- Meyling, N. V. and Eilenberg, J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113:336-341.

- Mier, T., Rivera, F., Rodríguez-Ponce, M. P., Carrillo-Farga, J. and Toriello, C. 1994. Infectivity of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in mice and guinea pigs. *Revista latinoamericana de microbiología* 36:107-111.
- Mier, T., Perez, J., Carrillo-Farga, J. and Toriello, C. 1989. Study on the innocuity of *Hirsutella thompsonii*. I. Infectivity in mice and guinea pigs. *Entomophaga* 34:105-110.
- Milner, R. J., Lozano, L. B., Driver, F. and Hunter, D. 2003a. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* - strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. *BioControl* 48:335-348.
- Milner, R. J., Samson, P. and Morton, R. 2003b. Persistence of conidia of *Metarhizium anisopliae* in sugarcane fields. Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years. *Biocontrol Science and Technology* 13:507-516.
- Milner, R. J. and Hunter, D. M. 2001. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *Journal of Orthoptera Research* 10:271-276.
- Milner, R. J. and Prior, C. 1994. Susceptibility of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* and the wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*, to the fungi *Metarhizium* spp. *Biological Control* 4:132-137.
- Moino, A., Jr., Alves, S., Lopes, R., Oliveira, P., Neves, J., Pereira, R. and Aparecida, S. 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola* 59:267-273.
- Molinero, L. 2001. La regresión logística. Página Web. Revisada Noviembre 2008. Disponible via <http://www.seh-lilha.org/rlogis1.htm>.
- Moore, D. 2008. A plague on locusts - the Lubilosa story. *Outlooks on Pest Management* 19:14-17.
- Moore, D., Douro-Kpindou, O. K., Jenkins, N. E. and Lomer, C. J. 1996b. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 6:51-61.
- Moore, D., Reed, M., Le Patourel, G., Abraham, Y. J. and Prior, C. 1992. Reduction of feeding by the desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60:304-307.
- Morley-Davies, J., Moore, D. and Prior, C. 1996. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycological Research* 100:31-38.
- Murphy, C., Jepson, P. and Croft, B. 1994. Database analysis of the toxicity of antilocus pesticides to non-target, beneficial invertebrates. *Crop Protection* 13:413-420.
- Mustafa, U. and Kaur, G. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research* 4:922-930.

- Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V. y Toriello, C. 2002. Termotolerancia de aislados de México y de cepas de referencia del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. En: *XXV Congreso Nacional de Control Biológico*, 218-220. Hermosillo, Sonora. Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Navarro-Nava, R. 1999. Distribución geográfica del chapulín *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Pyrgomophidae) en la región noreste del Estado de México, FES Cuautitlán, UNAM, México, D.F.
- Nunes, C., Bajji, M., Stepien, V., Manso, T., Torres, R., Usall, J. and Jijakli, M. H. 2008. Development and application of a SCAR marker to monitor and quantify populations of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biology and Technology* 47:422–428.
- Olfert, O. and Slinkard, A. 1999. Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) damage to flowers and pods of lentil (*Lens culinaris* L.). *Crop Protection* 18:527-530.
- Olive, D. M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1661-9.
- Olsson, M., Sukura, A., Lindberg, L. A. and Linder, E. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 28:279-282.
- Otte, D. 1981. *North American grasshoppers -Acrididae: Gomphocerinae and Acridinae*. Cambridge, Mass. Harvard Univ. Press.
- Paran, I. and Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985–993.
- Pasanen, A. L., Pasanen, P., Jantunen, M. J. and Kalliokoski, P. 1991. Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment - Part A General Topics* 25 A:459-462.
- Pérez, M., Sánchez, J., Ramirez, J. y Bello, A. 2005. El problema de la langosta voladora o centroamericana en México. Pasado, presente y futuro. En: *Manejo integrado de la Langosta voladora (Schistocerca piceifrons piceifrons Walter) (Orthoptera: Acrididae) en el sur de Tamaulipas*. *Entomología Mexicana 2006*, eds. J. Avila-Valdez, L. Barrientos-Lozano and P. García-Salazar. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Sociedad de Entomología A. C.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 15:67-71.
- Pfadt, R. 1994. *Field Guide to Common Western Grasshoppers*. 2nd ed. Wyoming Agricultural Experiment Station. Bulletin 912.
- Platonov, V. 2002. *Teoría general del entrenamiento deportivo olímpico*. Buenos Aires, Argentina. Paidotribo.
- Poot, M. 2000. Validación de un hongo patógeno a la langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Walter, 1870) (Orthoptera: Acrididae) bajo condiciones de campo en el estado de Campeche, México, Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México.

- Prior, C. and Greathead, D. J. 1989. Biological control of locusts, the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin* 37:37-48.
- Pujol, M., Badosa, E., Cabrefiga, J. and Montesinos, E. 2005. Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *FEMS Microbiological Letters* 249:343-52.
- Ramírez-Sagahon, J., C., Sánchez-Anguiano, H., M. y Rodríguez-Quiroz, M. 2001. *En: Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta Schistocerca piceifrons piceifrons Walter*, 9-15. Yucatán, Mer. México. SAGARPA.
- Rangel, D. E., Braga, G. U. anderson, A. J. and Roberts, D. W. 2005. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* conidia. *Journal of Invertebrates Pathology* 90:55-8.
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Flint, S. D. Anderson, A. J. and Roberts, D. W. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrates Pathology* 87:77-83.
- Revankar, S. G., Sutton, D. A., Sanche, S. E., Rao, J., Zervos, M., Dashti, F. and Rinaldi, M. G. 1999. *Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *Journal of Clinical Microbiology* 37:195-8.
- Rombach, M. C., Humber, R. A. and Evans, H. C. 1987. *Metarhizium album* a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. *Transactions of the British Mycological Society* 37:37-45.
- Rombach, M. C., Humber, R. A. and Roberts, D. W. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 27:87-92.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. and Monte, E. 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbiological Ecology* 49:25-33.
- Samson, R. A., Evans, H. C. and Latgé, J.-P. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Berlin. Springer-Verlag, Wetenschappelijke Uitgeverij Bunge.
- Saskatchewan. 2007. Grasshoppers. Agricultura and Food. Página Web. Revisada mayo 2007. Disponible via <http://www.agr.gov.sk.ca/docs/production/grasshopperff.asp>.
- Schena, L., Sialer, M. F. and Gallitelli, D. 2002. Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease* 86:54-60.
- SENASICA-IFAI. 2007. Información del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) obtenida a partir del Instituto Federal de Acceso a la Información Pública (IFAI). Número de folio de la solicitud: 0821000004507.
- SENASICA-INFOMEX. 2010. Información obtenida a partir del Instituto Federal de Acceso a la Información Pública. Número de folio de la solicitud: 08210000006410 .

- SENASICA-INFOMEX. 2009. Información obtenida a partir del Instituto Federal de Acceso a la Información Pública. Número de folio de la solicitud: 082100000709.
- SENASICA. 2012a. LANGOSTA. Página Web. Revisada noviembre 2012. Disponible via <http://www.senasica.gob.mx/?id=4517>.
- SENASICA. 2012b. CHAPULÍN. Página Web. Revisada noviembre 2012. Disponible via <http://www.senasica.gob.mx/?id=4523>
- SENASICA. 2012c. Informes quincenales de la situación fitosanitaria de la campaña contra la Langosta. Disponibles vía web: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4620>
- SENASICA. 2012d. Informes mensuales de la situación fitosanitaria de la campaña contra el Chapulín. Disponibles vía web: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4642>
- SENASICA. 2003a. Ficha técnica “Chapulín gordinflón”. Página Web. Revisada 2003 2007. Disponible via <http://www.cesaveg.org.mx/html/fichastecnicas/fichatecnicabrachystolamexicana.pdf>.
- SENASICA. 2003b. Ficha técnica “Chapulín de patas rojas”. Página Web. Revisada 2003 2007. Disponible via <http://www.cesaveg.org.mx/html/fichastecnicas%5Cfichatecnicamelanoplusfemurrubrum.pdf>.
- SENASICA. 2003c. Ficha técnica “Chapulín de la milpa”. Página Web. Revisada mayo 2007. Disponible via <http://www.cesaveg.org.mx/html/fichastecnicas/fichatecnicasphenariumpurpurascens.pdf>.
- Shimazu, M. 1989. *Metarhizium cylindrospora* Chen Et Guo (Deuteromycotina, Hyphomycetes), the Causative Agent of an epizootic on *Graptopsaltria nigrofuscata* Motchulski (Homoptera, Cicadidae). *Applied Entomology and Zoology* 24:430-434.
- Sieglaff, D. H., Pereira, R. M. and Capinera, J. L. 1998. Microbial Control of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) by *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) instar Dependent Mortality and Efficacy of Ultra Low Volume Application under Greenhouse Conditions. *Journal of Economic Entomology* 91:76-85.
- Sieglaff, D. H., Pereira, R. M. and Capinera, J. L. 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) to *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Economic Entomology* 90:1539-1545.
- Steenberg, T., Langer, V. and Esbjerg, P. 1995. Entomopathogenic fungi in predatory beetles (Col. Carabidae and Staphylinidae) from agricultural fields. *Entomophaga* 40:77-85.
- Suz, L. M., Martin, M. P. and Colinas, C. 2006. Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil. *FEMS Microbiological Letters* 254:251-7.
- Teixido, N., Usall, J. and Vinas, I. 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mold on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology* 50:203–210.

- Theodoro, R. C., Candeias, J. M., Araujo, J. P., Jr., Bosco Sde, M., Macoris, S. A., Padula, L. O., Franco, M. and Bagagli, E. 2005. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Medical Mycology* 43:725-9.
- Toriello, C., Reyes-Montes, M. y Hernández-Velázquez, V. 2003. Aspectos generales de la tipificación del género entomopatógeno *Metarhizium*. *Ficha Técnica. CNRCB, DGSV, SAGARPA.*
- Toriello, C y Reyes-Montes, M. R. 2002. El género *Metarhizium*: hongos entomopatógenos utilizados en el control microbiano de plagas agrícolas. *Gaceta de la Sociedad Mexicana de Micología* 6:9-12.
- Toriello, C. 2001. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Paper read at Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. Mérida, Yucatán.
- Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Martínez-Jacobo, A. y Mier, T. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. *Revista Mexicana de Micología* 15:123-125.
- Trujillo, G. 1975. *El problema de la langosta Schistocerca paranaenses* (Burd). Tijuana, B. C., México. Sociedad de Geografía y Estadística de Baja California.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* 66:514-519.
- Tzean, S. S., Hsieh, L. S., Chen, J. L. and Wu, W. J. 1993. *Nomuraea-Cylindrospora* Comb-Nov. *Mycologia* 85:514-519.
- Ulloa, M. y Hanlin, R. 2006. *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society Press.
- Ulloa, M. and Hanlin, R. T. 2002. *Illustrated Dictionary of Mycology*. second edition. St. Paul, Minn. Amer Phytopathological Society, APS, Press.
- Uvarov, P. 1977. *Grasshopper and Locusts*. London. Centre of Overseas Pest Research.
- Vaenninen, I., Tyni-Juslin, J. and Hokkanen, H. 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl* 45:201-222.
- Vincent, C., Goettel, M. S. and Lazarovits, G. 2007. *Biological Control, A Global Perspective, Case Studies From Around The World*. Wallingford, England; Cambridge, MA. CABI.
- Wakefield, A. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of Clinical Microbiology* 34:1754-1759.
- Welling, M., Nachtigall, G. and Zimmermann, G. 1994. *Metarhizium* spp. isolates from madagascar. Morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Entomophaga* 39:351-361.

- Wessa, P. 2008. Kendall Tau Rank Correlation (v1.0.10) *In*: Free Statistics Software (v1.1.23-r3).
Página Web. Revisada Disponible via http://www.wessa.net/rwasp_kendall.wasp.
- Wilson, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 97:3741–3751.
- Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.
- Williams, R. H., Ward, E. and McCartney, H. A. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2453-2459.
- Zavala, J. A., Barrera, J. F., Morales, H. and Rojas-Wiesner, M. L. 2005. Design and evaluation of traps for *Idiarthron subquadratum* (Orthoptera: Tettigoniidae) with farmer participation in coffee plantations in Chiapas, Mexico. *Journal of Economic Entomology* 98:821-835.
- Zhang, L. and Hunter, D. M. 2005. Laboratory and field trails of Green Guard (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*) (Orthoptera: Acrididae) in China. *Journal of Orthoptera Research* 14:27-30.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17:879-920.
- Zimmermann, G. and Bode, E. 1983. Untersuchungen zur Verbreitung des insektenpathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti, Moniliales) durch Bodenarthropoden. *Pedobiologia* 25:65-71.

IX. APÉNDICES

Cuadro 10. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. acridum* cuantificadas en suelo, vegetación y aire en la zona de estudio.

Fecha	UFC/g suelo (Promedio ± Desv. Est.)	UFC/g vegetación (Promedio ± Desv. Est.)	UFC/m ³ aire (Promedio ± Desv. Est.)
31/05/07	0±0	0±0	0±0
12/06/07	0±0	0±0	0±0
20/06/07	0±0	0±0	0±0
03/07/07	0±0	0±0	0±0
17/08/07	31000±4000.00	122500±43133.51	0±0
24/08/07	12900±1489.96	0±0	1151±324.29
31/08/07	21767±8352.44	800±909.21	0±0
06/09/07	33833±22250.46	0±0	0±0
13/09/07	17767±11111.40	1166.66±288.67	171±215.64
20/09/07	9225±2698.61	3750±5678.90	142±93.61
27/09/07	33725±24800.18	0±0	0±0
04/10/07	1750±2872.28	0±0	0±0
11/10/07	10900±12128.75	11733.33±14100.11	11±11.70
18/10/07	50±100.00	5500±10344.08	69±3.34
26/10/07	500±577.35	0±0	45±63.52
11/12/07	0±0.00	1800±1681.26	0±0
18/01/08	13000±9451.63	0±0	0±0
05/02/08	10000±6928.20	0±0	2±2.50
22/02/08	0±0.00	5000±10000	4±5.01
07/03/08	142666±71703.09	116000±130066.65	85±100.29
28/03/08	48700±24371.29	12200±23867.41	0±0
11/04/08	30000±22842.06	75000±70710.67	2±2.50
25/04/08	45400±26640.32	2700±1509.96	0±0
09/05/08	0±0	0±0	0±0
26/05/08	0±0	0±0	0±0
27/06/08	0±0	0±0	0±0
13/08/08	16000±5656.85	0±0	1±1.67
10/09/08	12000±1414.21	0±0	0±0
01/10/08	0±0	0±0	0±0
03/12/08	4133±230.94	0±0	0±0

Cuadro 11. Parámetros químicos del suelo durante 14 fechas de evaluación.

Fecha	pH	Conductividad eléctrica us/cm	Cationes intercambiables cmol/kg				P disponible mg/kg	% C Total	% N Total
			Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺			
01/08/07	7.84	1770.5	8.60	2.69	3.01	0.029	216.20	N.D.	*
17/08/07	5.39	448.0	9.35	3.37	1.49	0.061	43.36	*	*
16/09/07	4.17	418.5	4.40	1.28	0.71	0.024	62.39	*	*
26/10/07	4.83	95.8	7.36	2.12	0.44	0.038	36.67	*	*
11/12/07	5.17	255.5	7.38	1.87	0.39	0.051	65.77	*	*
22/02/08	4.96	125.0	7.27	2.16	0.45	0.045	53.34	*	*
07/03/08	6.26	*	9.05	2.80	0.07	1.02	47.04	1.45	0.25
11/04/08	6.02	*	7.49	2.37	0.04	0.89	35.44	1.26	0.12
09/05/08	5.72	*	8.49	2.57	0.07	0.81	37.53	1.47	0.16
27/06/08	5.24	*	5.37	1.28	0.05	0.43	44.36	1.41	0.14
13/08/08	5.64	*	6.93	1.97	0.06	0.62	38.49	1.47	0.14
10/09/08	5.53	*	5.93	1.42	0.06	0.32	50.02	1.41	0.14
01/10/08	6.07	*	11.36	3.65	0.05	0.89	24.64	1.89	0.17
03/12/08	5.82	*	8.73	2.41	0.02	0.49	34.34	1.37	0.13

Cuadro 12. Datos de precipitación, temperatura y velocidad y dirección del viento máxima registrados en cada día de muestreo.

Fecha	Precipitación (mm)	T. Máx (°C)	T. Mín (°C)	T. Med (°C)	Velocidad viento máx (Km/hr)	Dirección viento v máx
17/08/2007	47	26	14.5	19.6	8.7	O
24/08/2007	34.2	24.7	14.3	17.86	8.4	S
31/08/2007	29.2	25.3	13.6	18.51	7.6	N
06/09/2007	5	25.3	13	18.3	14.9	N
13/09/2007	0.2	25.1	13.9	19.16	6.0	SO
20/09/2007	1.2	25	12.8	18.46	7.5	SO
27/09/2007	1.6	24.1	12.8	18.35	9.4	SO
04/10/2007	0	24.1	11.6	17.01	11.1	SO
11/10/2007	0	25.4	11.2	18.29	8.1	S
18/10/2007	0	25.2	14.1	18.44	13.2	SO
26/10/2007	0	23.1	9.1	18.72	6.7	S
11/12/2007	0	26.2	12.5	18.05	7.3	SE
18/01/2008	0	22.6	8.5	15.72	18.8	SO
05/02/2008	0	26.5	10	18.23	19.2	O
22/02/2008	0	28.9	10.5	19.69	11.2	SO
07/03/2008	0	25.5	9.9	18.62	21.2	SO
28/03/2008	0	30.9	13.1	22.19	11.7	SO
11/04/2008	0	31.6	14.1	22.78	26.1	N
25/04/2008	0	31.6	13.7	22.59	23.3	NE
09/05/2008	0	30.7	16.4	23.82	15.3	SO
26/05/2008	12.2	27.2	15.3	20.5	12.0	SO
27/06/2008	0.6	26.4	13.2	19.41	13.1	SO
13/08/2008	0	25.5	12.2	18.53	15.2	O
10/09/2008	3.2	25.7	15.4	19.54	8.5	SO
01/10/2008	0	26.8	8.6	17.67	11.8	E
03/12/2008	0	24.4	6.5	14.87	10.7	SO

Cuadro 13. Datos de dirección de viento promedio, humedad relativa, evapotranspiración de referencia, evaporación potencial, velocidad de viento promedio y radiación solar máxima registrados en cada día de muestreo.

Fecha	Dirección viento promedio	Humedad relativa (%)	Evapotranspiración referencia (mm/día)	Evaporación potencial (mm/día)	Velocidad viento promedio	Radiación solar máx (w/m ²)
17/08/2007	SO	78.88	4	2.67	2.63	1123.3
24/08/2007	SO	86.14	4.3	2.7	2.57	1171.4
31/08/2007	SO	76.3	3.3	2.57	3.04	1041.8
06/09/2007	S	81.68	4.4	2.82	2.63	1030.1
13/09/2007	SE	74.46	4.8	3.2	2.52	1041.8
20/09/2007	SO	78.27	4.6	3.04	2.84	1048.6
27/09/2007	O	82.44	2.7	2.11	2.21	1027.1
04/10/2007	NO	79.43	4	2.73	3.22	1024.2
11/10/2007	O	73.52	4.4	3.03	2.56	1027.6
18/10/2007	O	79.68	3.2	2.38	3.12	1024.2
26/10/2007	SO	53.86	2.5	4.44	3.69	914.8
11/12/2007	SO	42.3	4.2	4.05	4.04	853.2
18/01/2008	O	54.08	4	3.59	6.13	931.4
05/02/2008	S	34.46	5.5	4.86	5.74	931.4
22/02/2008	S	33.67	5.2	4.6	4.11	958.2
07/03/2008	E	17.66	6.3	6.01	7.23	1039.3
28/03/2008	O	35.57	5.9	4.75	3.73	1018.3
11/04/2008	SO	29.56	7	5.56	6.09	1031.0
25/04/2008	SO	41.61	6.6	4.84	5.34	1034.9
09/05/2008	SO	52.38	5.4	4.02	4.75	993.4
26/05/2008	S	68.89	3.8	2.72	2.6	1132.3
27/06/2008	O	66.74	4.2	3.23	3.77	1106.7
13/08/2008	SO	78.77	5.3	3.21	3.55	1123.3
10/09/2008	NO	83.23	4.4	2.79	2.41	1048.6
01/10/2008	O	52.94	5.3	4.05	3.54	1024.2
03/12/2008	O	44.67	4.1	4	3.78	893.2

Molecular detection of the airborne entomopathogen fungus *Metarhizium acridum* using specific oligonucleotides

C. Calderón-Ezquerro · I. Santiago-López ·
C. Guerrero-Guerra · M. R. Reyes-Montes ·
M. E. Calderón-Segura · C. Toriello

Received: 24 January 2011 / Accepted: 22 September 2011 / Published online: 9 October 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract We describe a technique to detect the presence of airborne conidia from the fungus *M. acridum* (formerly *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Hypocreales: Clavicipitaceae) with great accuracy. Airborne conidia were collected using Hirst-type spore traps. DNA extractions were optimized to achieve the best possible recovery. DNA was examined using polymerase chain reaction (PCR) with specific oligonucleotides to enable the detection of a single conidium. Experiments using a mini-wind tunnel were conducted to validate the method. Subsequently, this technique was applied to an agricultural region of Mexico, where *M. acridum* was sprayed to control the grasshopper, *Sphenarium purpurascens*, population (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *M. acridum* conidia were detected 2 days after spraying in San Mateo Coatepec (Puebla, site of grasshopper study).

Keywords Molecular detection · Airborne conidia · PCR · *Metarhizium acridum* · Hypocreales · Clavicipitaceae

C. Calderón-Ezquerro (✉) · I. Santiago-López ·
C. Guerrero-Guerra · M. E. Calderón-Segura
Centro de Ciencias de la Atmósfera, Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de
México (UNAM), 04510 México, D.F., Mexico
e-mail: mclce@atmosfera.unam.mx

M. R. Reyes-Montes · C. Toriello
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad
de Medicina, UNAM, 04510 México, D.F., Mexico

1 Introduction

Locusts and grasshoppers are both common and unpredictable pests. They cause enormous losses to crops throughout the world. In weather conditions that favor egg eclosion and plant growth, these insect populations can increase rapidly to yield gregarious migratory populations (Lomer et al. 2001). Unless proper and definitive control measures are applied, these pests can reach devastating proportions (Wilps 1997).

Currently, synthetic pesticides used to control the desert locust and other harmful Orthoptera are toxic for the environment and human health. For this reason, there has been a growing interest in the development of biological-control options. Among the best choices for this purpose is the use of the entomopathogenic fungus, *M. acridum* (formerly *M. anisopliae* var. *acridum*) (Driver and Milner) J.F. Bischof., Rehner and Humber stat. nov.; (Lacey et al. 2001; Lomer et al. 2001).

Numerous studies have focused on the assessment of the virulence of various isolates of this fungus, as well as the feasibility of its use as a microbial agent (Hernández-Velázquez et al. 2003; Hunter et al. 2005). As a result, the commercial pesticide Green Muscle[®] has been developed, which has proven to be effective in controlling the desert locust (*Schistocerca gregaria*) and red locust (*Nomadacris septemfasciata*) and several species of African grasshoppers (Aston 2004; Kooyman et al. 2003). More recent research in Australia, using various fungal isolates, led to the

production of Green Guard[®], another commercial pesticide effective against the Australian locust (*Chortoicetes terminifera*), the migratory locust (*Locusta migratoria*), and several more species (Hunter 2005).

Fungal efficacy in controlling locust populations has been demonstrated in several places such as Africa (Douthwaite et al. 2001; Lomer et al. 2001), Australia (Hunter 2005; Milner and Hunter 2001), Brazil (Magalhães et al. 2001), and Mexico (García-Gutiérrez et al. 2002; Hernandez-Velazquez et al. 2000). However, despite these studies, little is known regarding the basic ecological issues concerning fungi, mainly in agroecosystems (Meyling and Eilenberg 2007). To produce a more efficient biological-control agent, factors such as persistence, viability, and dispersion of the microbial agent after its application in the field, in addition to the effects of agricultural practices, are indispensable (Barbosa 1998).

A review by Meyling and Eilenberg (2007) reveals that there is lack of available information concerning these factors for the entomopathogenic fungus *M. acridum*. In addition, there is no information on the possible presence of indigenous *M. acridum* populations in agroecosystems prior to fungal application. A simple, molecular method using specific fungal DNA oligonucleotides would be very useful in environmental investigations of this fungus. Conventional identification and counting methods for fungi and other airborne microorganisms are dependent on light microscopy or adequate culture techniques, which are both cumbersome and time-consuming (Calderon et al. 1995; Williams et al. 2001). These difficulties have hindered routine sampling of biological particles.

Other methods have been developed to overcome these drawbacks. Among the new approaches to detect and identify diverse biological airborne particles are immunoassays and ELISA (Brasel et al. 2005; Kennedy et al. 1999; Kennedy and Wakeham 2008; Schmechel et al. 1996; Wakeham and Kennedy 2010). However, the application of these methods is limited by the difficulty in obtaining sufficiently specific antibodies.

Methods based on DNA detection are currently more commonly used. Polymerase chain reaction (PCR) is a fast and specific procedure that allows the detection of DNA target molecules in complex mixtures, thus offering an alternative method for fungal identification (Jurado et al. 2005). Several

studies have used traditional PCR methods to identify fungal species (Buchheidt and Hummel 2005; Calderon et al. 2002a, b; Freeman et al. 2002; Mayoral et al. 2005; Taylor et al. 2005), whereas more recent studies have used real-time PCR (Hamal 2007; Keswani et al. 2005; Klingspor and Jalal 2006; Rogers et al. 2009).

Most of the PCR-based fungal detection methods are not readily adaptable for use in the field. Therefore, specialized techniques are required that allow adequate sampling such as DNA extraction and purification, avoiding genetic material loss, and the availability of specific oligonucleotides for specific fungal species, and a specific and sensitive PCR assay.

This study describes the development of a molecular detection technique specific for *M. acridum* airborne conidia. In addition, this technique was used to detect *M. acridum* in an amaranth crop in Puebla, Mexico, after a fungal application was used to control the grasshopper *S. purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae).

2 Materials and methods

2.1 Area of study

San Mateo Coatepec is a small community that is part of the Atzizihuacán municipality located in the western part of the state of Puebla. Its geographical coordinates are 18° 48' 33.45" N and 98° 39' 10.82" W. It consists of about 2,000 inhabitants.

The town is mainly dedicated to agricultural activities, and it produces maize (*Zea mays*), beans (*Phaseolus vulgaris*), squash (*Cucurbita pepo*), and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). It has a semi-warm, subhumid climate with summer rains. There are no sources of water (rivers or springs) within the vicinity of the town. The predominant soil type is cambisol (Ayuntamiento-Atzizihuacan 2007).

Since the mid-1990s, this region has been infested with grasshoppers (*S. purpurascens*), which have been exclusively controlled using chemical pesticides. *M. acridum* has never been applied as a biological-control agent.

2.2 Spore source

Monospore *M. acridum* culture EH-502/8 was used in this study. This culture was derived from the original

MaPL40 strain, which has been successfully applied in field trials (Hernández-Velázquez et al. 2003). Strain EH-502/8 was stored in a 10% glycerin solution in liquid nitrogen at -196°C . It was deposited in the Basic Mycology Laboratory culture collection in the Microbiology and Parasitology Department in the Faculty of Medicine at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and registered in the World Database Center for Microorganisms, WDCM, as BMFM-UNAM 834 (C. Toriello, director). The original culture was isolated from locust (*Schistocerca piceifrons* ssp. *piceifrons*) from the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico of Mexico (Dirección General de Sanidad Vegetal, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). The fungus was cultured in potato dextrose agar (PDA) media for 2–3 weeks at 28°C until spores formed.

2.3 Spore suspension for DNA extraction

A conidial suspension from PDA plates was obtained by adding 5 ml of 1% sterile Nonidet P40 onto the surface of the plate. The suspension was adjusted by conidial quantification in a Neubauer chamber. Subsequently, serial \log_{10} dilutions were performed and used for DNA extractions.

2.4 Spore walls rupture

The methods used to break spore walls and extract DNA were described by Williams et al. (2001) and Calderón (2002a). A 250- μl spore suspension was placed into 2-ml microtubes containing 0.2 g of glass beads (400–455 μm in diameter that had been washed with hydrochloric acid). Microtubes were shaken in a Fast-Prep vortex (Thermo Savant NY, USA) three times for 40-s period at 6 m/s and placed on ice for 2 min between periods. The same method and conditions were used to DNA extraction from the conidia impacted on the Melinex tape used in the Hirst-type spore traps.

2.5 DNA extraction

DNA purification was carried out in 50 μl of spore suspension using the method described by Lee and Taylor (1990) and modified by Williams et al. (2001). Briefly, 100 μl of phenol/chloroform (1:1) were added

to each microtube, vortexed for 10 s, and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. The supernatant was transferred to another tube containing 60 μl of cold isopropanol, 4 μl of 6 M ammonium acetate, and 20 μg of glycogen (Roche, Switzerland). Microtubes were stored at -20°C for 1 h and centrifuged for 15 min at $14,488 \times g$. The supernatant was discarded, and the pellet was rinsed with 100 μl of ethanol (70%) that had been stored at -20°C . The samples were further centrifuged, the supernatant was discarded, and the DNA pellet was air-dried and resuspended in 50 μl of Milli-Q sterile water (Millipore, MA, USA). We used 5 μl of this suspension for each PCR assay.

2.6 Specific DNA detection of *M. acridum* by PCR

Based on isolates collected in Mexico, two pairs of specific oligonucleotides for *M. acridum* were designed. The first pair of oligonucleotides is OPA-04₄₆₁ 1F (5' GGC-TGA-CCG-ACG-AGG-TTA-T 3') and OPA-04₄₆₁ IR (5' GAC-TGA-CGC-AAG-CTT-CAT-CC 3'), which amplify a 461-bp DNA region (Gene Bank, access number 1317318). The second pair of oligonucleotides is OPA-04₂₉₃ 2F (5' GCC-GCA-AGT-TGG-ACT-ACG 3') and OPA-04₂₉₃ 2R (5' CAA-GCT-TCA-TCC-GGC-ACT-T 3'), which amplify a 293-bp DNA region that is within the region amplified by of the first pair of oligonucleotides, that is, the primers are designed to work in conjunction with each other by using nested PCR. Amplicons were confirmed by sequencing (data not shown).

PCR conditions were 1.5 mM MgCl_2 , 0.125 mM deoxyribonucleotide triphosphates, 50 pmol of both primers, 1.5 U Taq polymerase (Biogenica, Mexico), and 1 μl of the first primer-pair PCR product for the second probe-pair PCR. The following PCR controls were used: (1) the positive control consisted of DNA extracted from 10,000 conidia and (2) the negative control was the PCR mixture without DNA. The assay conditions for the first primer-pair PCR, OPA-04₄₆₁ 1, were 1 cycle at 94°C for 3 min; followed by 25 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final cycle at 72°C for 5 min. The assay conditions for the second probe-pair PCR, OPA-04₂₉₃ 2, were 1 cycle at 94°C for 3 min; followed by 25 cycles at 94°C for 1 min, 72°C for 2 min, 72°C for 1 min; and a final cycle at 72°C for 5 min.

2.7 Visualization of PCR products

All PCR products were visualized by gel electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide. The gel was run at 80 V in $0.5 \times$ TBE buffer (45 mM Tris base, 45 mM boric acid, and 1 mM EDTA). A 100-bp DNA standard ladder (Invitrogen, CA, USA) was used. Images were captured in a photodocumentation device Digi-Doc-It (UVP, CA, USA).

2.8 Spore traps

To collect airborne fungal conidia, Hirst-type spore traps were maintained continuously for 7 days (Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, UK). Details on how they function can be found in Lacey and West (2006) and Lacey and Venette (1995). Briefly, a sampler suctions 10 l of air per minute, 24 h a day, 365 days a year. This trap has an integrated rotating drum (spinning in clockwise direction) containing cellophane tape (Melinex, Rickmansworth, UK) covered with a thin layer of Vaseline/hexane (5:1) in which airborne conidia get trapped. The tape is subsequently withdrawn and cut into 48-mm pieces that correspond to 24-h samplings. The pieces are placed inside conic microtubes with glass beads, and DNA is extracted by the same method mentioned previously in spore walls rupture section. A review of the tape under a microscope showed that there is nothing attached to it after the breakup of the spores.

2.9 Mini-wind tunnel experiments

Prior to detecting airborne conidia in the field, we detected conidia using a mini-wind tunnel (90 cm long, 15 cm wide, and 15 cm high). Cotton wicks (impregnated with PDA media covered with *M. acridum* conidia) were placed inside the tunnel. The tunnel is connected to a chamber (35, 24, and 24 cm) that is coupled to a humidifier. An electric fan is located outside this device. The samples are placed in compartments found within the tunnel (Fig. 1).

A 4 m/s wind draft was applied so that conidia attached to the wicks would be released and captured by the Hirst-type spore traps. Subsequently, the adhesive tape was recovered, and DNA was extracted from the samples collected to confirm that *M. acridum* DNA could be detected.



Fig. 1 Mini-wind tunnel

2.10 Field experiments

During August 2007, Hirst-type spore traps were placed in amaranth fields in San Mateo Coatepec, Puebla. The fields chosen for this study are in an area plagued with the grasshoppers (*S. purpurascens*).

In this area, an oil solution containing *M. acridum* conidia (strain EH-502/8, 1×10^{12} conidia/Ha) was sprayed (Hernandez-Velazquez et al. 2000). Traps were left for 1 week prior to and 1 week after spraying took place to determine the capacity to detect *M. acridum* conidia.

3 Results

3.1 PCR detection sensitivity using *M. acridum* spore DNA primers

Various conidia suspension densities were evaluated to obtain the lowest *M. acridum* detection limit using the different primers (Fig. 2). The lowest detection limit for the OPA-04₄₆₁ 1F and 1R primers was 100 conidia, as shown in Fig. 2a.

Otherwise, the lowest detection limit for the OPA-04₂₉₃ 2F and 2R primers was 1 spore, as shown in Fig. 2b.

3.2 Experiments using *M. acridum* inoculated cotton wicks in the mini-wind tunnel

Cellophane tape that contained fungal conidia, due to spore dispersion, were collected from day 1 to day 7.

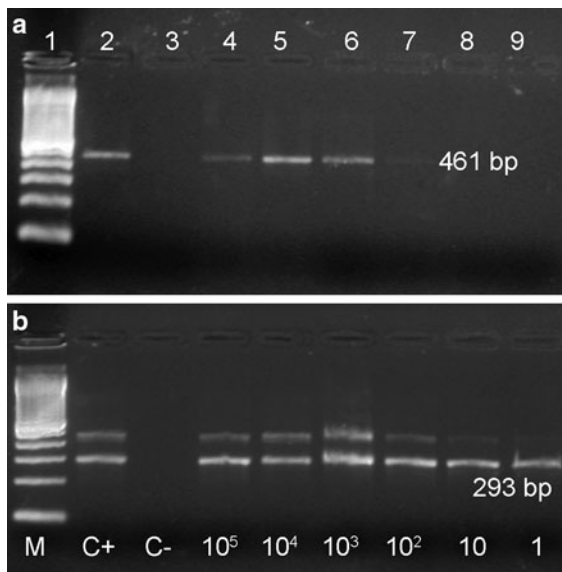


Fig. 2 PCR results showing the number of conidia detected by oligonucleotides OPA-04(526) 1F and 1R **a**, and OPA-04(526) 2F and 2R **b**. M: 100-bp marker, C+ positive control, C- negative control

No detection was possible using the OPA-04₄₆₁ 1F and 1R primers. Detection using the OPA-04₄₆₁ 1F and 1R primers was possible after 2 days collection on days 3 and 6.

3.3 Molecular detection of airborne *M. acridum* conidia collected with Hirst-type traps in crop fields

Once the detection limit of the specific primers to detect (*M. acridum*) fungal DNA was determined, samples were collected in San Mateo Coatepec, in August 2007, where it was being used to control grasshopper populations. *M. acridum* detection was possible on days 2 and 6 after fungal application.

4 Discussion

The entomopathogenic fungus, *M. acridum* has been widely used as a microbial agent to control acridids in Australia (Hunter et al. 1999; Hunter et al. 2001), Brazil (Magalhães et al. 2001), China (Lee et al. 2000), Africa (Lomer et al. 2001), and Mexico (Hernández-Velázquez et al. 2003). Currently, *M. acridum* is being

developed for use as a biopesticide targeted against locusts and grasshoppers in China and Mexico.

However, the basic ecological characteristics of *M. acridum* are still unclear, and the use of molecular techniques would largely contribute to clarify many fundamental points, allowing a better understanding of its ecological niche.

Molecular detection to detect airborne fungi has previously been employed, mainly in phytopathogen detection (Calderon et al. 2002a, b; Freeman et al. 2002). This is the first study that detects airborne entomopathogenic fungi, specifically *M. acridum*. Previously, a molecular diagnostic test was developed to detect phytopathogenic fungi spores once the first propagules began to appear in agricultural areas susceptible to fungal infection, allowing convenient and timely palliative techniques (McCartney et al. 2003). In the present study, we were interested in this molecular technique because it could be used to establish conidia air propagation patterns, not yet studied for *M. acridum*, in addition to contributing to the knowledge of conidial dispersion and persistence (Meyling and Eilenberg 2007).

In this study, Hirst-type spore traps (Burkard) were chosen for the collection of samples because of the small quantities of airborne fungal spores that were present. This allowed the collection of sufficient airborne conidia for DNA extraction from the cellophane tape using a continuous flow of 10 l of air/min. The use of Fast-Prep equipment facilitates airborne fungal cell wall rupture. The extraction method proposed allowed the detection of a single conidium (Fig. 2).

The method employed in this study was successful in detecting *M. acridum* airborne conidia, although one must bear in mind that this technique is mainly qualitative; thus, the number of airborne conidia cannot be determined. However, this technique can be greatly improved using real-time PCR in conjunction with methods to test spore viability. In addition, this study may provide a basis for future research to evaluate the long-term persistence of spores in the environment.

Acknowledgments This study was financed by the Program to Support Research and Technological Innovation Projects (PAPIIT, UNAM), projects IN-213303 and IN-206504. We want to express our gratitude to M.Sc. Miguel Meneses (Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM) for his collaboration in building the wind tunnel; to Engineers Gutiérrez López Wilfrido

and García Espinosa León Manuel for their technical assistance; to the auxiliary president of San Mateo Coatepec, Paulino Valle, for his invaluable assistance during the field experiments; and to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for the support given to C. Guerrero-Guerra during the present study as part of his doctoral thesis in Biology.

References

- Aston, R. (2004). *Médium scale fiel trials with the insect pathogenic fungus M. anisopliae* ("Green Muscle") against Desert Locust (*S. gregaria*) in Niger. Draft project report OSRA/RAF/801/USA. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ayuntamiento-Atzitzihuacan (2007). Enciclopedia de los Municipios de México. Available <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/puebla/Mpios/21022a.htm>. Cited Jan 2009.
- Barbosa, P. (1998). *Conservation biological control*. San Diego: Academic Press.
- Brasel, T. L., Douglas, D. R., Wilson, S. C., & Straus, D. C. (2005). Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 114–122.
- Buchheid, D., & Hummel, M. (2005). *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. *Medical Mycology*, *43*, S139–S145.
- Calderon, C., Lacey, J., McCartney, H. A., & Rosas, I. (1995). Seasonal and diurnal variation of airborne basidiomycete spore concentrations in Mexico City. *GRANA*, *34*, 260–268.
- Calderon, C., Ward, E., Freeman, J., Foster, S. J., & McCartney, H. A. (2002a). Detection of airborne inoculum of *Lep-tosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oil-seed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathology*, *51*, 303–310.
- Calderon, C., Ward, E., Freeman, J., & McCartney, A. (2002b). Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal of Aerosol Science*, *33*, 283–296.
- Douthwaite, B., Langewald, J., & Harris, J. (2001). *Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide*. Ibadan, Nigeria: Impact Series, IITA.
- Freeman, J., Ward, E., Calderon, C., & McCartney, A. (2002). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 877–886.
- García-Gutiérrez, K., Castellanos-Moguel, J., Cano-Ramírez, C., Mier, T., Hernández-Velázquez, V. M., Toriello, C. (2002). Actividad de proteasas y tiempo letal medio en langosta (Orthoptera: Acrididae) de aislados de *M. anisopliae* var. *acridum* de México. In: Sociedad Mexicana de Control Biológico (Ed.), XXV Congreso Nacional de Control Biológico, Sonora, México.
- Hamal, P. (2007). Molecular genetic methods in medical mycology: Current state and perspectives. *Klinicka mikrobiologie a infekcni lekarstvi*, *13*, 136–144.
- Hernandez-Velazquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M., & Barrientos-Lozano, L. (2000). Vegetable and mineral oil formulations of *M. anisopliae* var *acridum* to control the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, *9*, 223–227.
- Hernández-Velázquez, V. M., Hunter, D. M., & Barrientos-Lozano, L. (2003). Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *M. anisopliae* var *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Laboratory and field trials. *Journal of Orthoptera Research*, *12*, 89–92.
- Hunter, D. M. (2005). Mycopesticides as part of integrated pest management of locusts and grasshoppers. *Journal of Orthoptera Research*, *14*, 197–201.
- Hunter, D. M., Milner, R. J., Scanlan, J. C., & Spurgin, P. A. (1999). Aerial treatment of the migratory locust, *L. migratoria* (L.) (Orthoptera: Acrididae) with *M. anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Crop Protection*, *18*, 699–704.
- Hunter, D. M., Milner, R. J., & Spurgin, P. A. (2001). Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *M. anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bulletin of Entomological Research*, *91*, 93–99.
- Jurado, M., Vazquez, C., Patiño, B., & Gonzalez-Jaen, M. (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, *28*, 562–568.
- Kennedy, R., & Wakeham, A. J. (2008). Development of detection systems for the sporangia of peronospora destructor. *European Journal of Plant Pathology*, *122*, 147–155.
- Kennedy, R., Wakeham, A. J., & Cullington, J. E. (1999). Production and immunodetection of ascospores of *Mycosphaerella brassicicola*: Ringspot of vegetable crucifers. *Plant Pathology*, *48*, 297–307.
- Keswani, J., Kashon, M. L., & Chen, B. T. (2005). Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust. *Journal of Environmental Monitoring*, *7*, 311–318.
- Klingspor, L., & Jalal, S. (2006). Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp from clinical samples using real-time PCR. *Clinical Microbiology & Infection*, *12*, 745–753.
- Kooyman, C., Bahana, J., Godonou, I., Katheru, J. N., Magorna, R. N., Seyourn, E., Spurgin, P. (2003). Operational trial of Green Muscle against red locust nymphs in the Wenbere plains. Tanzania Project report of projects DFID R7818 and FAO TCP/URT/201/NOR.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, *21*, 230–248.
- Lacey, J., & Venette, J. (1995). Outdoor sampling techniques. In C. S. Cox & C. M. Wathes (Eds.), *Bioaerosols handbook*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Lacey, M. E., & West, J. S. (2006). *The air spora* (p. 156). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Lee, B. I., Bateman, R., Guoyou, L. I., Meng, L., & Zheng, Y. A. (2000). Field trial on the control of grasshoppers in

- mountain grassland by oil formulation of *Metarhizium flavoviride*. *Chinese Journal of Biological Control*, 16, 145–147.
- Lee, S., & Taylor, J. (1990). Isolation of ADN from fungal mycelia and single spores. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46, 667–702.
- Magalhães, B., de Faria, M., Lecoq, M., Schmidt, F., Silva, J., Frazao, H. S., et al. (2001). The use of *M. anisopliae* var *acidum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Journal of Orthoptera Research*, 10, 199–202.
- Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P. E., González, I., & García, T. (2005). Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 27–34.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, 59, 129–142.
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *M. anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145–155.
- Milner, R. J., & Hunter, D. M. (2001). Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *Journal of Orthoptera Research*, 10, 271–276.
- Rogers, S. L., Atkins, S. D., & West, J. S. (2009). Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. *Plant Pathology*, 58, 324–331.
- Schmechel, D., McCartney, H. A., & Magan, N. (1996). A novel approach for immunomonitoring airborne fungal pathogens. In G. Marshall (Ed.), *Diagnostics in crop production*. Farnham, UK: British Crop Protection Council.
- Taylor, M. L., Ruíz-Palacios, G. M., Reyes-Montes, M. D. R., Rodríguez-Arellanes, G., Carreto-Binaghi, L. E., Duarte-Escalante, E., et al. (2005). Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45, 435–441.
- Wakeham, A. J., & Kennedy, R. (2010). Risk assessment methods for the ringspot pathogen *Mycosphaerella brassicicola* in vegetable *Brassica* crops. *Plant Disease*, 94, 851–859.
- Williams, R. H., Ward, E., & McCartney, H. A. (2001). Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2453–2459.
- Wilps, H. (1997). Ecology of *S. gregaria* (Forsk.) (Forsk.): observations in West Africa from 1990 to 1994. In S. Krall, R. Peveling, & D. Ba-Diallo (Eds.), *New strategies in locust control*. Basel, Switzerland: Birkhauser.

Study of the persistence and viability of *Metarhizium acridum* in Mexico's agricultural area

César Guerrero-Guerra · María del Roció Reyes-Montes · Conchita Toriello · Víctor Hernández-Velázquez · Ivonn Santiago-López · Lucia Mora-Palomino · María Elena Calderón-Segura · Silvia Docampo Fernández · Carmen Calderón-Ezquerro

Received: 28 June 2012 / Accepted: 25 September 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract Locust is one of the most predominant agricultural pests in Mexico, followed by non-migratory grasshoppers. Their devastating effects cover numerous Mexican states, generating important economic losses. *Metarhizium acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) has been employed in Mexico as a microbial agent for biological control for some time. However, questions related to the long-term persistence and viability of the fungus after it has been sprayed over crop fields remain to be elucidated. To resolve these questions, we performed a study in a crop field where an abundant population of the grasshopper *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) is present. The fungus *M. acridum* was sprayed

during August and October 2007. Its presence in the air, soil and vegetative cover was subsequently monitored using molecular methods and culture techniques. The results showed that the fungus was viable on the ground during the follow-up period (66 weeks). Its population fluctuated markedly, however, reaching four times its initial concentration and later decreasing to nearly half its initial concentration by the end of the study. The initial concentrations of the fungus in the air and in the vegetative cover decayed steadily (with some small, isolated recoveries) until its complete disappearance after 8 months.

Keywords Persistence · Biological control · *Metarhizium acridum* · *Sphenarium purpurascens*

C. Guerrero-Guerra · I. Santiago-López ·
M. E. Calderón-Segura · C. Calderón-Ezquerro (✉)
Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional
Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, C.P. 04510 México, D.F., Mexico
e-mail: mclce@atmosfera.unam.mx

C. Guerrero-Guerra
Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000,
C.P. 04360 Coyoacán, D.F., Mexico

María del R. Reyes-Montes · C. Toriello
Departamento de Micología y Parasitología Facultad de
Medicina, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

V. Hernández-Velázquez
Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad
Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

L. Mora-Palomino
Departamento de Edafología, Instituto de Geología,
UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C.P.
04510 México, D.F., Mexico

S. D. Fernández
Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, Apdo. 59, 29080 Málaga, Spain

1 Introduction

Locusts and grasshoppers (Orthoptera) are common and highly unpredictable agricultural pests. These insects cause enormous losses to crops all over the world because when the climatic conditions are favourable for plant growth and egg eclosion, their populations can increase rapidly with devastating consequences. If appropriate control measures are not taken, outbreaks of these pests can proliferate without control (Wilps 1997).

Currently, the management and control of the desert locust and other harmful acridid rely on the application of synthetic pesticides, which have been shown to be toxic to the environment and human health (WHO 2004; PAN 2009).

The advent of chemical insecticides in the mid-twentieth century created the concept that insect pests could be all but eliminated from threatened crops. A succession of compounds has appeared since then. Initially, many were quite toxic and environmentally damaging. In recent years, however, new materials have appeared, which address human and environmental safety concerns caused by the earlier materials. In parallel, scientists have realised the inadvisability of using chemicals as the only strategy for pest control, and integrated pest management schemes have evolved to employ a variety of cultural, chemical and biological tools to manage (not eradicate) pest invasion to a point below an economic threshold (Jaronski 2010).

Hence, considerable effort has been directed toward the development of alternative approaches, such as biological control within an integrated pest management programme. Among the most effective biological control measures is the use of entomopathogenic fungi; *Metarhizium acridum* (Driver and Milner) J. F. Bisch., Rehner and Humber 2009 (Hypocreales: Clavicipitaceae) (formerly *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) is one of the most studied (Lomer et al. 2001).

A great deal of research has focused on assessing the virulence of fungal isolates and their feasibility as effective microbial agents (Lomer et al. 2001; Prior and Streett 1997; Milner and Hunter 2001). One result of these efforts in Africa has been the development of a commercial biopesticide called Green Muscle[®], which is effective against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera: Acrididae), the red locust, *Nomadacris septemfasciata* (Serville, 1883)

(Orthoptera: Acrididae), and other African grasshopper species (Aston 2004; Kooyman et al. 2003). Further research in Australia with different fungal isolates has produced another commercial biopesticide, Green Guard[®], which is effective against the Australian locust, *Chortoicetes terminifera* (Walker, 1870) (Orthoptera: Acrididae), the migratory locust (*Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) and other species (Zhang and Hunter 2005; Hunter 2005). The efficacy of *M. acridum* for controlling locust swarms has also been assessed elsewhere, such as in Brazil (Magalhaes et al. 2001) and Mexico (Hernández-Velázquez et al. 2000).

Most studies have focused on the efficiency of this fungus in controlling insect pests, and the usual method to determine the latter characteristic is to quantify the percentage of viable fungi in field samples that are capable of infecting a particular insect species (Kaaya et al. 1996; Vaenninen et al. 2000; Hu and St. Leger 2002; Ekesi et al. 2005).

Extrapolating these studies to different agricultural regions is complicated because these are dynamic ecosystems in which constant interchanges of matter and energy take place and which are strongly affected by human activity. For example, crop areas are highly perturbed during the harvest season, and entomopathogenic fungal communities in arable soils are different from those in less disturbed habitats (Steenberg 1995; Bidochka et al. 1998; Meyling and Eilenberg 2006).

The inconsistent performance of biological control agents is often associated with an incomplete understanding of the ecological constraints of the biological system in which they are placed. This is particularly true for entomopathogenic fungi. There is little or no knowledge of their biology outside of their insect host. However, these fungi are often inundatively introduced into the environment in the absence of their host in the hope that they will persist and infect their target once the host immigrates into the treated area (Bruck 2005).

However, questions related to the long-term persistence and viability of the fungus after it has been sprayed over crop fields remain to be elucidated.

Fungal persistence is important to consider for at least two reasons. First, it is desirable for the fungus to have a limited time span to minimise its possible harmful effects on non-target species. On the other hand, the fungus should persist for as long as possible to reduce the need for continuous spraying (Zimmermann 2007).

Several studies have shown that *M. anisopliae* can survive for days, months or even years in the field. However, this persistence depends largely on the environmental conditions of each area and the fungal isolate used (Fargues and Robert 1985; Vaenninen et al. 2000; Milner et al. 2003; Van der Valk 2007; Zimmermann 2007). Hence, the extrapolation of results to other regions is not straightforward.

Consequently, it is crucial to determine the persistence of *M. acridum* in the areas where it is regularly used. Precise knowledge of the amount of fungal spores that remain will enable managers to take appropriate measures in response to population increases or declines at any given time.

Molecular techniques based on PCR provide the necessary tools to undertake environmental sampling to monitor the entomopathogenic fungi (Castrillo et al. 2007).

In Mexico, *M. acridum* is commonly applied as a microbial agent to control the Central-American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons*) (SENASICA 2010) and has been proved effective in biological control of locusts, reaching up to 90 % mortality in field (Hernández-Velázquez et al. 2003; Barrientos-Lozano et al. 2005). To date, however, its persistence and viability after it has been sprayed over crop fields have not been determined. Therefore, this study was designed to determine the persistence and viability of *M. acridum* in the environment (soil, vegetation and air) of an agricultural area (an amaranth crop field) over a 66-week period after the fungus had been sprayed as a biological control for the grasshopper *Sphenarium purpurascens*. This insect can become a major agricultural pest in vast regions of Mexico.

2 Materials and methods

2.1 Study area

San Mateo Coatepec is a small community in the state of Puebla, Mexico. Its geographical coordinates are 18° 48' 33.45" N and 98° 39' 10.82" W. The town is mainly dedicated to agricultural activities, especially the growing of maize (*Zea mays*), beans (*Phaseolus vulgaris*), squash (*Cucurbita pepo*) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). It has a semi-warm subhumid climate with summer rains and classified as ecoregion 14.4.1 (Balsas Depression with Low

Tropical Deciduous Forest and Xerophytic Shrub) (Wiken et al. 2011). The town has no water sources (rivers or springs) in its vicinity. This site was chosen for a long-term study because since the 1990s, the region has been infested by grasshoppers (*S. purpurascens*). Previously, these insects had been exclusively controlled with chemical pesticides. The fungus *M. acridum* had not been previously applied as a biological control agent.

Climatic variables including rainfall; maximum, average and minimum temperatures; average and maximum wind speeds; relative humidity; potential evaporation; and maximum solar radiation were obtained from a meteorological station (located at 2.5 m above the ground) belonging to the national climatology net (Red Nacional de Estaciones Estatales Agroclimatológicas (RNEEA). <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/>).

2.2 Fungal spraying

Monospore *M. acridum* culture EH-502/8 was used in this study. This culture was derived from the original MaPL40 strain, which has been successfully applied in field trials (Hernández-Velázquez et al. 2003) and registered in the World Database Center for Microorganisms, WDCM, as BMFM-UNAM 834 (C. Toriello, director). The fungus was produced by the State Plant Health Committee of Guanajuato using biphasic solid substrate fermentation. Whole rice was used for the solid phase and the viability of the conidia was greater than 95 %.

Experiments were conducted in a 1 ha crop field used for amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivation. The fungus was sprayed during the early morning on 17 August and 9 October 2007 with a Micron Ulva + sprayer (Bromyard, UK) at a flow of 60 ml/min and walking speed of 1 m/s. The concentration was 4×10^{12} conidia/Ha, and an oil-based ultra-low-volume technique was employed to spread the fungus. Mineral oil used was citrolina (primaveral dormant spray). At the time of spraying, the amaranth plants exhibited an average height of 30 cm. Care was taken to distribute the fungal mixture uniformly over the plants.

2.3 Samples

Air, soil and vegetation samples (twenty-six duplicate samples) were collected in the study area throughout

the 1 year and four months (68 weeks) of the study to quantify the amount of viable *M. acridum* particles in each substrate. The crop area was divided into plots of equal size (400 cm² approx.) (excluding the parts that people use to cross the field) and two were selected randomly for the sampling in each date. These selected areas were not considered for subsequent sampling. For air samples, these were collected always on the same location (see details below).

2.4 Soil sampling

On each sampling date, 250 g of soil was collected to a depth of 15 cm in the sprayed area (except the day of spraying, this day the samples were taken from the soil surface). The soil was collected from as near as possible to the plant roots without damaging them because the highest concentrations of the fungus occur in this area (Hu and St. Leger 2002). The samples were collected with sterile metallic spoons and put individually in sterile plastic bags for transfer to the laboratory. Each soil sample was stored at 4 °C until analysis (typically 1–2 days).

2.5 Plant sampling

On each sampling date, approximately 50 g of leaves was collected from the vegetation within the area where *M. acridum* had been applied. Leaves were taken from the crop and the vegetation nearby. Samples were cut with sterile scissors and put individually in sterile plastic bags for transfer to the laboratory and stored at 4 °C until analysis (typically 1–2 days).

2.6 CFU quantification

One gram of each soil or vegetation sample was resuspended in a 1 % Nonidet P40 (Roche®, Germany) solution, stirred in a vortex for 3 min and left to stand for 7 min. This mixture was then serially diluted to achieve dilutions of 10⁻² and 10⁻³, both dilutions were used for analysis, and this procedure was performed two times for each sampling date. Samples were seeded on Petri dishes containing a potato-dextrose-agar medium (PDA) (Bioxon®, Mexico) supplemented with 500 mg/l of chloramphenicol and incubated at 28 °C for 7 days. Developing colonies with general characteristics of the genus *Metarhizium*

(colour, conidia size, conidia shape, etc.) was grouped and 2 colonies from each group were removed from the Petri dish to confirm their identity by PCR (see details below). *M. acridum* colonies were quantified to determine the number of CFU/g of soil or vegetation. The remainder of each soil sample was used for physicochemical analyses.

2.7 CFU quantification in air samples

To determine the viability of *M. acridum* (CFU's in air), a N6 Single-Stage Viable Andersen Cascade Impactor (Thermo-Andersen) was used. The sampler draws in air at a rate of 1 cubic foot per minute and impacts it on a Petri dish (90 mm in diameter). The Petri dish contains 30 ml of PDA medium supplemented with 500 mg/l of chloramphenicol. The sampler was placed at a height of 70 cm above ground level and was always in the same position next to the Hirst spore trap (see below). It was run for intervals of 5 and 10 min. The number of viable particles was derived from the formula CFU/m³ of air = (CCD/*t*)/0.0283, where CCD is the colony count per dish, *t* is the sampling time in minutes, and 0.0283 is the equivalence factor between 1 ft³ and 1 m³. When more than 300 colonies per dish were present, the value was adjusted using the following equation: $P_r = N [1/N + 1/N - 1 + 1/N - 2 + \dots + 1/N - (r + 1)]$, where P_r is the expected number of viable particles that are produced by a number '*r*' of colonies in the dish, and *N* is the total number of holes in the sampler (400 in this case). Two colonies from each group were removed from the Petri dish to confirm their identity by PCR (see details below).

To assess the dynamics of *M. acridum* in the air in more detail, a Hirst spore trap (Burkard Manufacturing Co®, UK) was employed. This equipment draws in 10 l of air per minute and can operate 24 h a day during a whole year. The sampler incorporates a rotating drum that moves clockwise. Collected air particles impact on cellophane tape (Melinex Dupont®, USA) that is adhered over the surface of the drum and covered with a thin layer of a mixture (1:5) of Vaseline (Racel®, Mexico) and hexane (J. T. Baker®, USA). This tape was replaced every week on Thursday at 13:00 h. The tape was then cut into 7 pieces of 48 mm, each piece corresponding to 24 h of sampling. These pieces were placed in 1.5-ml microtubes for DNA extraction and detection. The methodology is described below. Thus,

the presence or absence of *M. acridum* DNA in the air was determined on each day of sampling. The equipment was removed from the study area on 13 August 2008.

2.8 DNA extraction

The rupture of spore walls and extraction of DNA initially followed an adaptation of the method of Williams et al. (2001) and later followed an adaptation of the method of Calderon et al. (2002). The colonies chosen for PCR analysis were placed in 2-ml microtubes that had been previously filled with 0.2 g of glass beads (400–455 µm in diameter, rinsed with hydrochloric acid) and 250 µl of 1 % Nonidet P40 (Roche®, Germany) solution was added. The microtubes were stirred using a FastPrep vortex (Thermo® MA, USA) three times for 40 s each at 6 m/s and cooled on ice for 2 min between each vortexing.

Subsequently, 50 µl of the resulting suspension was used for DNA purification following the method of Lee and Taylor (1990) as modified by Williams et al. (2001). Briefly, 100 µl of a phenol/chloroform (J. T. Baker, USA) mixture (1:1) was added to each microtube, and the mixture was stirred using a vortex for 10 s and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. The supernatant was transferred to another tube containing 60 µl of cold isopropanol (J. T. Baker®, USA), 4 µl of 6 M ammonium acetate (J. T. Baker®, USA) and 20 µg of glycogen (Roche®, Switzerland). The microtubes were stored at –20 °C for 1 h and centrifuged for 15 min at 14,000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was rinsed with 100 µl ethanol (70 %) at –20 °C. The microtubes were centrifuged again, the supernatant was discarded, and the DNA pellet was air-dried and resuspended in 50 µl of Milli-Q sterile water (Millipore®, MA, USA). For the PCR assay, 5 µl of this suspension was used.

2.9 Detection of *M. acridum* DNA by nested PCR

Based on isolations of *M. acridum* collected in Mexico, two pairs of specific oligonucleotides were designed for *M. acridum* (Calderón-Ezquerro et al. 2012). The first pair consisted of the DNA primers OPA-04(461) 1F (5' GGC-TGA-CCG-ACG-AGG-TTA-T 3') and OPA-04(461) IR (5' GAC-TGA-CGC-AAG-CTT-CAT-CC 3'), which amplify a 461-bp DNA region (Gene Bank, access number GU724978).

The second pair consisted of the primers OPA-04(526) 2F (5' GCC-GCA-AGT-TGG-ACT-ACG 3') and OPA-04(526) 2R (5' CAA-GCT-TCA-TCC-GGC-ACT-T 3'), which amplify a 293-bp DNA fragment.

The first PCR was performed in a 50-µl reaction mixture containing 0.125 mM dNTPs (all reagents were obtained from Fermentas®, Hanover, MD), 1.5 mM MgCl₂, 1 µM of each primer, 1.5 U Taq DNA polymerase and 5 µl of DNA. The cycling conditions consisted of 1 cycle at 94 °C for 3 min followed by 25 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final step at 72 °C for 5 min. For the second (nested) PCR, the 50-µl reaction mixture contained 0.125 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM of each primer, 1.5 U Taq DNA polymerase and 1 µl of the first reaction product. The cycling conditions consisted of 1 cycle at 94 °C for 3 min followed by 25 cycles at 94 °C for 1 min, 72 °C for 2 min and 72 °C for 1 min and a final step at 72 °C for 5 min. The following controls were performed: (1) a positive control consisting of DNA extracted from 10,000 conidia and (2) a negative control consisting of the PCR mixture without DNA.

Amplification products were electrophoresed through 2 % agarose in 0.5 % Tris–borate–EDTA buffer (45 mM Tris base, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA). Electrophoresis was conducted at 80 V for 60 min. The 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®) was used as a molecular size standard. The bands were visualised with a UV transilluminator after ethidium bromide staining (10 µg/ml). Images were captured using a Digi-Doc-It photodocumentation system (UVP®, USA).

2.10 Soil chemical analysis

The remainder of each soil sample was used to measure pH and interchangeable cations (K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ and Na⁺), which were measured by ionic exchange chromatography. Values for available phosphorus were also recorded.

2.11 Statistical analysis

For each CFU sample, mean values and standard error were calculated and plotted. The results were correlated (Pearson correlation) with climatic variables (obtained with the RNEEA: rainfall; maximum, average and minimum temperatures; average and maximum wind speeds; relative humidity; potential evaporation; and

maximum solar radiation) to determine their influence on fungal populations. All analyses were carried out with Statistica® software version 8.

3 Results

Four analyses carried out in May and June 2007, before the application of the microbial agent on the amaranth crop field, showed no CFUs of *M. acridum* in the soil, vegetation and air samples. Data obtained from the samples collected during the period between 17 August 2007 and 3 December 2008 are shown in Figs. 1, 2 and 3.

From the fungal application (17 August 2007) to the end of the sampling period (3 December 2008), the number of *M. acridum* CFUs/g in the soil samples (identity confirmed by PCR) varied widely, showing a 400 % increase in soil collected on 7 March 2008 (162,600) compared to the day of application (31,000). However, the number of CFUs tended to decline until the last soil samples were collected on 3 December 2008 (Fig. 1).

The decline of the fungus was more abrupt in the plants than in the soil (Fig. 2). A decline from 122,500 CFU/g of vegetation to 0 CFU/g occurred

in 1 week, with a brief recovery after 9 October 2007 when a second spraying took place. Subsequently, fungal concentrations remained low until 7 March 2008 when they rose to the same magnitude observed after the initial spraying. From May onward, no fungi were detected in the vegetative cover.

After the fungal application, airborne spores (1,120 spores/m³ air) were detected on 24 August 2007 and decreased to zero a week later. These values fluctuated slightly until 7 March 2008; after that date, no *M. acridum* CFUs were detected in the air (Fig. 3).

3.1 Correlations with recorded climatic parameters

Table 1 shows the correlations between the recorded climatic variables and CFUs in the soil, air and vegetation. For the soil samples, significant correlations (Pearson's correlations) were found between the number of CFUs and the following variables: maximum wind velocity, average wind velocity, potential evaporation and relative humidity. For the vegetation samples, no correlation was found between the number of CFUs and any of the recorded variables. For airborne fungi, the number of CFUs was correlated with rainfall and maximum solar radiation.

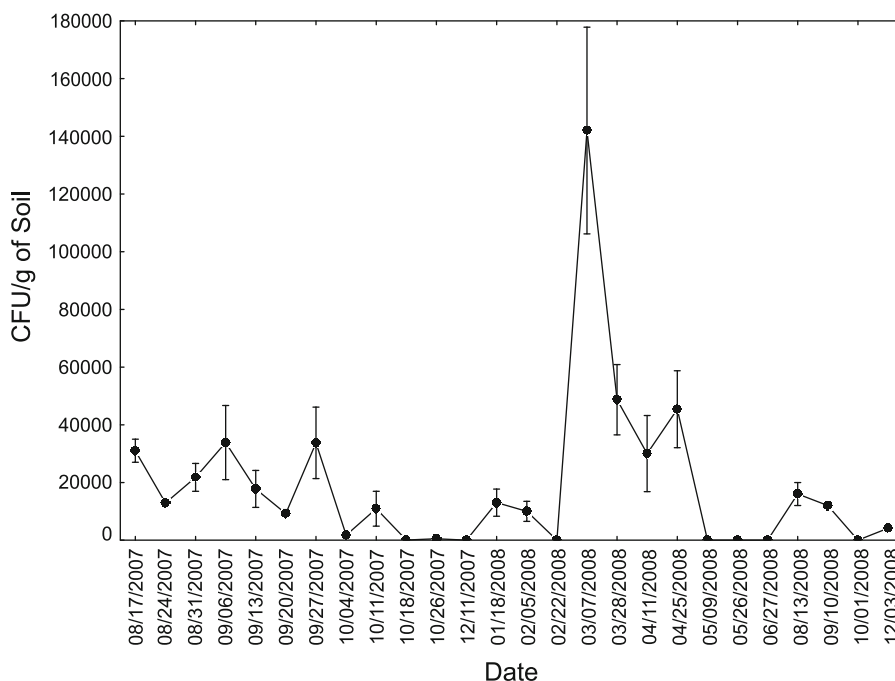


Fig. 1 CFU concentrations in the soil during sampling (bars represent SE)

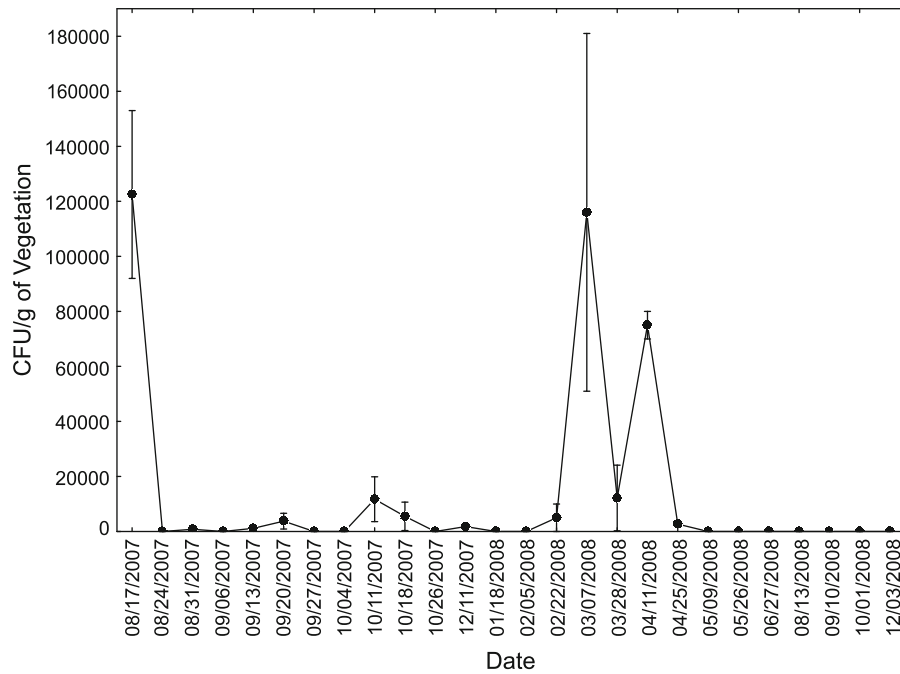


Fig. 2 CFU concentrations in the vegetative cover during sampling (*bars* represent SE)

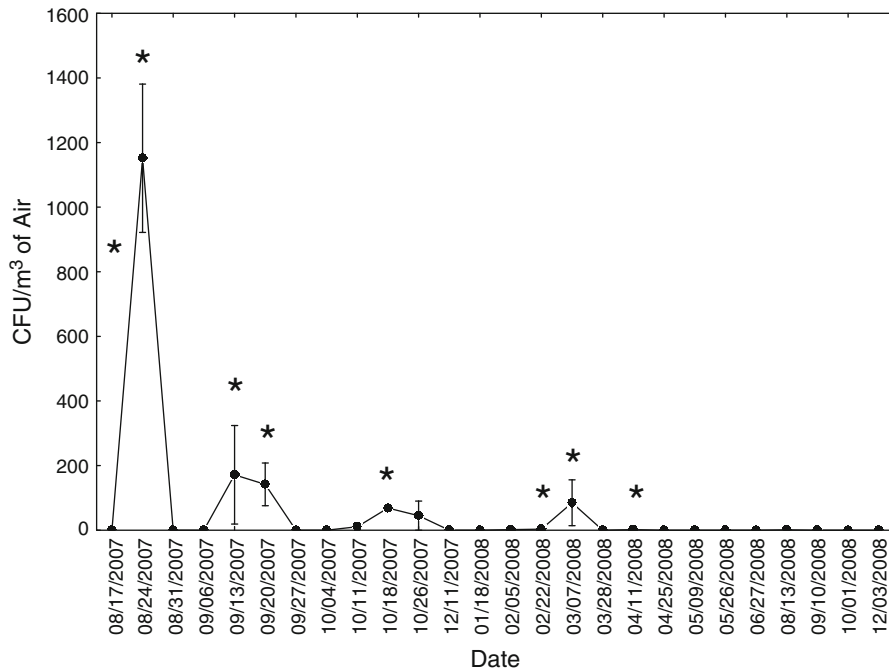


Fig. 3 CFU concentrations in the air during sampling (*bars* represent SE). *Asterisk* indicates DNA detection of *M. acridum* in airborne samples collected using Hirst spore trap on the same dates

Table 1 Pearson's correlation coefficients between the numbers of CFUs found in the soil, vegetative cover, and air and the recorded climatic parameters

	Rainfall	Temperature Max	Wind speed		Potential evaporation	Relative humidity	Maximum solar radiation		
			Min	Average					
CFU/g of soil	0.015	0.101	-0.067	0.131	0.424*	0.485*	0.466*	-0.400*	0.166
CFU/g of vegetative cover	0.375	0.154	0.057	0.193	0.317	0.364	0.353	-0.359	0.267
CFU/m ³ of air	0.447*	-0.179	0.170	-0.131	-0.203	-0.193	-0.178	0.269	0.433*

* $p < 0.05$

3.2 Correlations with soil physicochemical parameters

Table 2 shows the correlations between the numbers of CFUs and the chemical parameters analysed in soil samples from the study area. No correlation was found between the number of CFUs/g in the soil and the soil physicochemical parameters recorded.

3.3 Airborne conidia detection using Hirst spore traps

Hirst spore traps were used from 17 August 2007 to 13 August 2008. These traps allowed the variations in the persistence of airborne fungi to be observed in greater detail, as shown in Fig. 4. This graph shows the dates (a total of 32 days throughout the year) on which *M. acridum* DNA was detected from air-suspended conidia.

4 Discussion

Our results indicate that the fungus *M. acridum* remains viable and detectable for 1 year and 4 months in the soil and for approximately eight months in plant leaves and in the air, with negative periods between

Table 2 Pearson's correlation coefficients between the numbers of *M. acridum* CFUs present in the soil and the recorded chemical parameters

	pH	Interchangeable cations				Available p
		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K+	Na+	
CFU/g of soil	-0.114	0.150	0.207	-0.010	0.420	-0.122

detections. Milner et al. (2003) assessed the persistence of commercial formulations of *M. anisopliae* and *M. anisopliae* var. *lepidiotum* sprayed on sugarcane cultivars in Australia and found that the fungi persisted in the soil for 3.5 years. This result is similar to those obtained by Vaenninen et al. (2000), who evaluated the persistence of *M. anisopliae* in Finnish crops (with snow during winter) and reported that soil samples were capable of infecting larvae of *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) up to 3 years after the fungal application. Moreover, other reports have asserted that *M. acridum* can remain viable on sterile sand for 8 months at 25 °C (Kaaya et al. 1996) and for 183 days in cultivated soil (Ekesi et al. 2005). Even it has been determined that *M. acridum* applications may effect some years later and have a significant effect on the desert locust (Bak et al. 2007).

The results of the present study are consistent with the time intervals given by these authors. During our study, the fungus was detected after 1 year and 4 months, so it probably has a longer viability.

Our results differ from those of the above-mentioned studies in that they observed continuous declines in *M. acridum* concentrations, whereas we observed periods in which the fungal population in the soil increased markedly, especially in March 2008. This increase was also reflected in the vegetative cover and to a lesser extent in the air (Figs. 1, 2, 3).

The increase in the number of CFU/g of soil may have been due to agricultural practices. Field observations during the period in which the fungal population increased showed that the soil had been fallowed to prepare it for the next sowing season. We hypothesise that this activity released conidia to the soil surface and even into the air, resulting in the

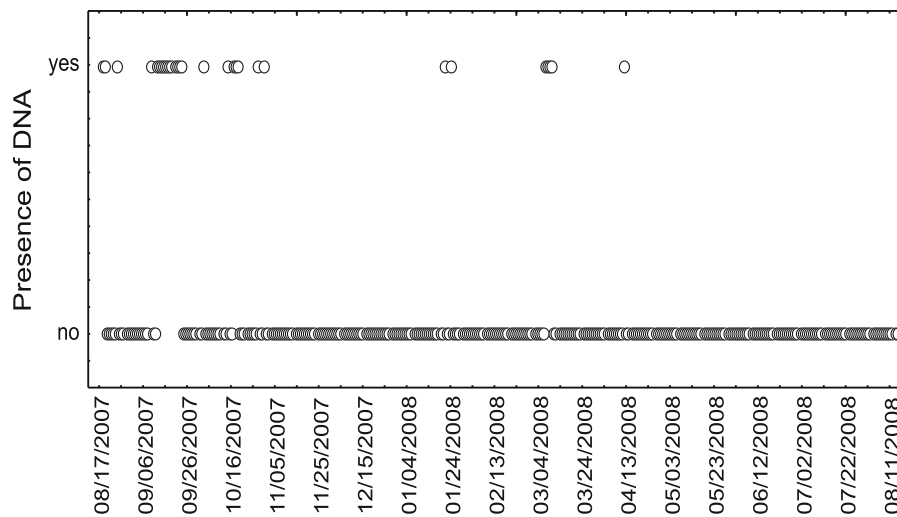


Fig. 4 DNA detection of *M. acridum* in airborne samples collected using Hirst spore trap during the period from August 2007 to August 2008

sudden increases detected in both the vegetative cover and the air. Further research concerning the persistence of the fungus in agricultural areas is needed to verify whether this behaviour is repeated.

Other studies have reported that *Metarhizium* is a common species in environments perturbed by humans. In Canada, for example, this fungus is more frequent in agricultural fields than in forests (Bidochka et al. 1998); in Denmark, *Metarhizium* is abundant in crop fields (Steenberg 1995). Jabbour and Barbercheck (2009) measured entomopathogenic fungi in crop fields and determined that *M. anisopliae* was more frequent in ploughed fields.

The large number of CFUs in the soil demonstrates the potential for *M. acridum* to accumulate. However, these CFUs were sampled at a depth of 15 cm, which is inaccessible to grasshoppers of the species *S. purpurascens*. These insects spend most of their life cycles on the aboveground vegetation. Additionally, the increase in CFUs during March occurred after the life cycle of the grasshoppers had ended. Moreover, the high concentrations of fungi would have a negligible effect on the oothecae of the grasshoppers, which are buried at an average depth of about 3 cm (Cueva del Castillo 2003). Therefore, high fungal concentrations in the soil would have almost no effect as a biological control for *S. purpurascens*.

The solar radiation causes the soil temperature can reach over 40 °C on the surface of the study area, so the viability of conidia at low depth is reduced,

especially after harvest (during the month of October, approximately) when there are no plants to protect the soil, as a result, the concentrations of viable conidia are smaller than the depth of 15 cm. Probably, *M. acridum* concentrations at these depths may be high enough to infect the oothecae of *S. purpurascens*, but we do not evaluate this. However, perhaps other grasshoppers' species that spend more time on the ground are more susceptible to these high fungal concentrations, so this possible effect should be studied in more detail.

In the vegetative cover, that initial concentrations of the fungus were very high, up to five times those observed in the soil. However, these concentrations almost disappeared within one week. Ultraviolet solar radiation can cause conidium inactivation over a period of hours (Braga et al. 2001), and rain can reduce conidium viability within days (Inyang et al. 2000). August 2007 was particularly rainy in the study area, 334 mm of rain against 130 mm of rain of other years.

Small increases in fungal concentration detected during the sampling period may be due to conidia transported from the soil to the leaves.

Although little information is available on fungal persistence in the vegetative cover, the results of the few previous studies are in agreement with our findings. Moore et al. (1996) reported that the half-life of conidia in treated vegetation was 4.3 days. Inyang et al. (2000) simulated rainfall and showed a reduction in spore viability after 1 week. Hunter et al.

(2001) reported that *M. acridum* persisted for almost 7 days in the vegetation of agricultural areas in Australia. Finally, a review performed for Van der Valk (2007) for experiments conducted against the desert locust in Africa showed a half-life of conidia of 3.3 to 34 days in treated vegetation.

The abrupt decrease in *M. acridum* concentrations in the vegetative cover observed in this study shows that efficient pest management must employ frequent sprayings at one-week intervals to maintain high conidial concentrations in plants and ensure that insects become infected. Even more frequent sprayings may be required if rainfall is abundant.

Concerning fungal persistence in the air, no conidia were detected on the day of spraying using the viable particle sampler, but positive DNA detection was accomplished using the Hirst spore traps. The conidia of *M. acridum* were suspended in an oil base at the time of spraying, and our results show that the conidia may freed themselves from the oil after a period of hours and may have been carried by the wind from the soil and vegetative cover to the air. As a result, the Hirst spore traps could detect them on the same day. This observation highlights the need to employ continuous-type samplers to more accurately understand the atmospheric dynamics of biological particles in crop fields.

Finally, Zimmermann (2007) has asserted that *M. anisopliae* is not naturally found in the air, although it can be transported by external agents. The results obtained using the viable particle sampler as well as those obtained using the Hirst spore traps reveal that conidia sprayed on the fields can become suspended in the air, where they were detected on several occasions (on 32 days during the one-year period of sampling using the Hirst spore traps).

Several studies have focused on the effects of climatic variables, among which humidity, solar radiation and temperature are the most relevant (Rangel et al. 2004, 2005). In general, humidity must be high to induce the germination of conidia, but no studies have shown a long-term effect of this variable. In the present study, three weather variables associated with moisture were analysed: rainfall, relative humidity and potential evaporation. Interestingly, only rainfall was significantly correlated with the number of CFUs disseminated in the air.

McCartney (1991) has demonstrated that raindrops falling on a plant can cause spore release in two ways. First, the impact of water on a leaf can shake it and

provide momentum to the spore. Second, the raindrops may create wind currents. In this manner, the release of conidia from the plant surface can increase the concentration of airborne conidia.

The number of CFUs in the soil was negatively correlated with relative humidity, probably because high humidity favours the growth of competitors and predators of *M. acridum*, thus reducing its population, as stated by Keller and Zimmermann (1989) and Hajek (1997). These authors have established that *Metarhizium* species are poor competitors for organic resources compared to opportunistic saprobic fungi. Another reason may be a reduction in oxygen levels (Jabbour and Barbercheck 2009). This explanation is reinforced by the correlation found with potential evaporation, which indicate water loss in an area; this variable was positively correlated with soil CFUs, unlike relative humidity. These data support the hypothesis that excessive humidity is detrimental for long-term fungal survival in the field.

Wind velocity was positively correlated with soil CFUs, probably because airflow removes conidia from the vegetation or from insects and deposits them in the soil. Nevertheless, the wind velocity necessary to remove *M. acridum* conidia from the vegetative cover has not yet been established. Experiments with *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. (Pasanen et al. 1991) have found that wind speeds between 0.5 m/s and 1 m/s are required. In our study area, wind velocities vary from 1.08 m/s (average speed) to 6.6 m/s (maximum speed).

The number of airborne CFUs was also correlated with the maximum solar radiation. Unexpectedly, this correlation was positive, indicating an increase in CFUs depending on an increase in maximum solar radiation. Several studies, including those of Braga et al. (2001) and Rangel et al. (2004), have demonstrated that solar UV radiation can inactivate conidia in a matter of hours. One explanation for our results may be that solar radiation increases the temperature at the leaf surface, which in turn reduces the humidity around the leaf. As a consequence, the surface tension that binds conidia to the leaf decreases, causing their release, as suggested by Jones and Harrison (2004). However, further research under controlled climatic conditions is needed to corroborate this hypothesis.

More research is needed to determine whether the concentrations of *M. acridum* recorded in this study may be capable of causing harm to people exposed to the

fungus as farmers. Zimmermann's biosecurity review (2007) describes cases of some people with allergic reactions to high concentrations of *M. acridum* and people with asthmatic symptoms exposed to *M. anisopliae* in sugar cane crops, but, as the author suggests, are rare cases. Currently, there are no published records of disease due to *M. acridum* in Mexico, but is prevalent to work in the crops without protection of any kind and is rare that farmers seek medical attention with the first symptoms of the disease, so the risk may be higher in case of the use of *M. acridum* spreading; therefore, more research is needed.

5 Conclusions

The results of this study show that the population of *M. acridum* fluctuates importantly through time and has the potential of accumulating in the soil given the proper conditions. With respect to the vegetative cover and air, conidia present in these areas decay rapidly so their effect as a microbial agent is minimised. Therefore, fungal spraying must be frequent (on a weekly basis) to achieve a better control of plagues.

Finally, it is necessary to determine whether the cumulative concentrations over time could be harmful to non-target species or people exposed.

Acknowledgments We want to express our gratitude to Posgrado de Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for the support given to the student C. Guerrero-Guerra for the present study as part of his Doctoral thesis and to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACYT) for the scholarship granted (203979). We also want to express our gratitude to M.Sc. Miguel Meneses and the engineers Gutiérrez López W. and García y Espinos M. for their technical assistance.

References

Aston, R. (2004). Medium scale field trials with the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ("Green Muscle") against the desert locust (*Schistocerca gregaria*) in Niger. *Draft project report OSRA/RAF/801/USA*. February 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Bak, J., Fisker, E., & Kooyman, C. (2007). Evaluating the importance of residual effects from previous years' treatment on the efficiency of different strategies for control of Sahelian grasshoppers with *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Biocontrol Science and Technology*, 2007(17), 413–422.

Barrientos-Lozano, L., Hunter, D. M., Ávila-Valdéz, J., García-Salazar, P., & Horta-Vega, J. V. (2005). Control biológico de la langosta centroamericana *Schistocerca piceifrons piceifrons* walker (orthoptera: Acrididae) en el noreste de México. *Vedalia*, 12, 119–128.

Bidochka, M. J., Kasperski, J. E., & Wild, G. A. M. (1998). Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany*, 76, 1198–1204.

Braga, G. U. L., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74, 734–739.

Bruck, D. (2005). Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: Implications for pest management. *Biological Control*, 32, 155–163.

Calderon, C., Ward, E., Freeman, J., Foster, J. S., & McCartney, H. A. (2002). Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathology*, 51, 303–310.

Calderón-Ezquerro, C., Santiago-López, I., Guerrero-Guerra, C., Reyes-Montes, M. R., Calderón-Segura, M. E., & Toriello, C. (2012). Molecular detection of the airborne entomopathogen fungus *Metarhizium acridum* using specific oligonucleotides. *Aerobiologia*, 28, 233–239.

Castrillo, L. A., Thomsen, L., Juneja, P., & Hajek, A. (2007). Detection and quantification of *Entomophaga maimaiga* resting spores in forest soil using real-time PCR. *Mycological Research*, 111, 324–331.

Cueva del Castillo, R. (2003). Body size and multiple copulations in a Neotropical grasshopper with an extraordinary mate-guarding duration. *Journal of Insect Behavior*, 16, 503–522.

Ekési, S., Maniania, N., & Lux, S. (2005). Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 157–167.

Fargues, J., & Robert, P. H. (1985). Persistence des conidiospores des Hyphomycetes entomopathogenes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize dans le sol, en conditions controlees. *Agronomie*, 5, 73–80.

Hajek, A. E. (1997). Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology*, 15, 193–249.

Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M., & Barrientos-Lozano, L. (2000). Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to control the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 9, 223–227.

Hernández-Velázquez, V. M., Hunter, D. M., & Barrientos-Lozano, L. (2003). Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Laboratory and Field Trials. *Journal of Orthoptera Research*, 12, 89–92.

- Hu, G., & Leger, St. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 6383–6387.
- Hunter, D. M. (2005). Mycopenicidides as part of integrated pest management of locusts and grasshoppers. *Journal of Orthoptera Research*, *14*, 197–201.
- Hunter, D. M., Milner, R. J., & Spurgin, P. A. (2001). Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bulletin of Entomological Research*, *91*, 93–100.
- Inyang, N., McCartney, A., Oyejola, B., Ibrahim, L., Pye, J., Archer, A., et al. (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research*, *104*, 653–661.
- Jabbour, R., & Barbercheck, M. E. (2009). Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control*, *51*, 435–443.
- Jaronski, S. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, *55*, 159–185.
- Jones, A. M., & Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—A review. *Science of the Total Environment*, *326*, 151–180.
- Kaaya, G., Mwangi, E., & Ouna, E. (1996). Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *67*, 15–20.
- Keller, S., & Zimmermann, G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In N. Wilding, N. M. Collins, P. M. Hammond, & J. F. Webber (Eds.), *Insect-fungus interactions*. London: Academic Press.
- Kooyman, C., Bahana, J., Godonou, I., Katheru, J. N., Magorna, R. N., Seyourn, E., Spurgin, P. (2003). Operational trial of Green Muscle against red locust nymphs in the Wenbere plains. *Tanzania Project report of projects DFID R7818 and FAO TCP/URT/201/NOR*.
- Lee, S., & Taylor, J. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols. A guide to methods and applications*. California: Academic Press.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, *46*, 667–702.
- Magalhaes, B. P., de Faria, M. R., Lecoq, M., Schmidt, F. G. V., Silva, J. B. T., Frazao, H. S., et al. (2001). The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Journal of Orthoptera Research*, *10*, 199–202.
- McCartney, H. A. (1991). Airborne dissemination of plant pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, *70*, 49S–59S.
- Meyling, N., & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *113*, 336–341.
- Milner, R. J., & Hunter, D. M. (2001). Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *Journal of Orthoptera Research*, *10*, 271–276.
- Milner, R. J., Samson, P., & Morton, R. (2003). Persistence of conidia of *Metarhizium anisopliae* in sugarcane fields: Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years. *Biocontrol Science and Technology*, *13*, 507–516.
- Moore, D., Higgins, P. M., & Lomer, C. J. (1996). Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and interactions with temperature. *Biocontrol Science and Technology*, *6*, 63–76.
- PAN (Pesticide Action Network). (2009). *Pesticide database*. <http://www.pesticideinfo.org>. Cited June 2009.
- Pasanen, A. L., Pasanen, P., Jantunen, M. J., & Kalliokoski, P. (1991). Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment*, *25*, 459–462.
- Prior, C., & Streett, D. A. (1997). Strategies for the use of entomopathogens in the control of the desert locust and other acridoid pests. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, *129*, 5–25.
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, *88*, 116–125.
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Flint, S. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2004). Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, *87*, 77–83.
- SENASICA. (2010). *Estrategia operativa de la campaña contra la langosta*. Dirección General de Sanidad Vegetal. DPF/CNRF, 2010. url: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=17723&idurl=25936>.
- Steenberg, T. (1995). Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to *Sitona* species and other insects in Lucerne. Ph.D. Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- Vaenninen, I., Tyni-Juslin, J., & Hokkanen, H. (2000). Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl*, *45*, 201–222.
- Van der Valk, H. (2007). Review of the efficacy of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against the Desert Locust. Plant Production and Protection Division. Locusts and other migratory pests group. No. AGP/DL/TS/34. *Desert Locust Technical Series*. FAO.
- WHO (World Health Organization). (2004). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification*. Geneva: WHO.
- Wiken, E. D., Jiménez Nava, F., & Griffith, G. (2011). *North American terrestrial ecoregions—Level III*. Montreal, Canada: Commission for Environmental Cooperation.
- Williams, R. H., Ward, E., & McCartney, A. (2001). Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 2453–2459.
- Wilps, H. (1997). Ecology of *Schistocerca gregaria* (Forskål): Observations in West Africa from 1990 to 1994. In S. Krall,

- R. Peveling, & D. Ba-Diallo (Eds.), *New strategies in locust control*. Basel: Birkhauser.
- Zhang, L., & Hunter, D. M. (2005). Laboratory and field trials of Green Guard (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*) (Orthoptera: Acrididae) in China. *Journal of Orthoptera Research*, *14*, 27–30.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*, 879–920.