

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE CONIDIOS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DEL TERRITORIO DE LA CIUDAD DE MÉXICO”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**I.A. BERENICE LÓPEZ CRUCEÑO**

**Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

**Director**

**Dra. RAQUEL ALATORRE ROSAS**

**Asesor**

**Dr. ERNESTO FAVELA TORRES**

**Asesor**

**México, Ciudad de México, Abril 2016**

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, en el nivel de Competencia Internacional con la referencia 001465”.

México, CDMX, a 26 de Abril del 2016

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Producción y formulación de conidios de hongos entomopatógenos aislados de zonas agrícolas de la Ciudad de México**

que presentó:

**I.A. Berenice López Cruceño**

Comité tutorial:

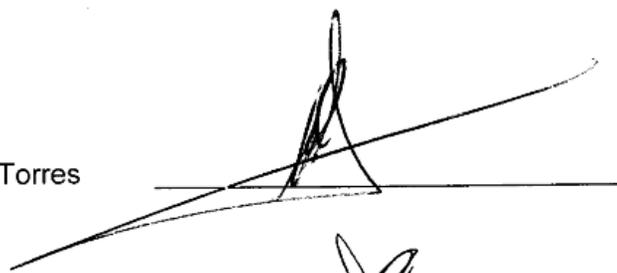
Director: Dr. Octavio Loera Corral      Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres      Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dra. Raquel Alatorre Rosas      Colegio de Postgraduados

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres



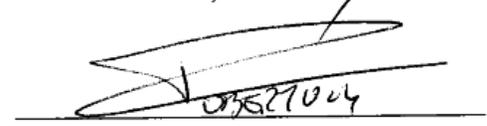
Secretario: Dra. Flor de María Cuervo López



Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas



Vocal: Dr. Roberto Montesinos Matías



## ***Agradecimientos***

A Dios

Por permitirme concluir esta meta tan importante en mi vida.

A Jesús Jair

Por estar conmigo durante este proyecto, por desvelarte a mi lado y porque fuiste mi motor para continuar, aprendí mucho de ti que necesitabas tanto de mí, aunque no pude estar siempre contigo, te amo mi niño hermoso. Espero entiendas que todo lo hago por ti.

A mi familia

Por su gran apoyo y comprensión, sin ustedes no sería lo que soy, ustedes han estado en cada etapa de mi vida y por ello les dedico con mucho cariño este logro más, Gracias.

A José Juan Sánchez

Por ser el compañero de mi vida, por tu comprensión y apoyo, porque siempre estás conmigo en las buenas y malas.

A Rosario Mancera

Por sus consejos, por su apoyo moral y por compartir este camino juntas.

A mis amigas Yolanda y Aurea

Por permitirme continuar con esta amistad tan grande y por su gran apoyo en esta nueva etapa.

Al Dr. Octavio Loera

Por su paciencia, por su confianza y entusiasmo al guiar este proyecto

A mis asesores Dra. Raquel Alatorre y Dr. Ernesto Favela

Por sus comentarios tan acertados, acerca de cómo seguir con el trabajo experimental, por sus enseñanzas, apoyo y dedicación para conmigo.

A la Dra. Ma. Gabriela Medina

Por su asesoría técnica en la identificación molecular y por ser una gran persona, además de una muy buena amiga.

Al Dr. Roberto Montesinos

Por su apoyo para permitirme aprender más sobre los hongos entomopatógenos, además por brindarme su amistad.

A mis compañeros del laboratorio

Por sus enseñanzas, compañía y apoyo durante este reto tan importante.

A CONACYT y SECITI

Por la beca otorgada.

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación agrícola de la Ciudad de México .....	1
1.2. Control biológico .....	5
1.3. Producción, formulación y aplicación de bioinsecticidas .....	6
1.4. Hongos entomopatógenos y su ciclo infectivo .....	12
1.5. Conservación de enemigos naturales .....	17
1.6. Pruebas de calidad.....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general .....	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1. Cepas de estudio .....	23
6.2. Identificación molecular.....	23
6.2.1. Extracción de ADN genómico .....	23
6.2.2. Reacción de PCR y análisis <i>in silico</i> del factor de elongación y $\beta$ -tubulina .....	24
6.2.3. Purificación y secuenciación.....	25
6.2.4. Reconstrucción filogenética.....	25
6.3. Reactivación y conservación de cepas .....	26
6.4. Producción sobre arroz .....	27
6.5. Rendimiento .....	28
6.6. Formulación en polvo humectable .....	28
6.7. Pruebas de Calidad.....	29
6.7.1. Viabilidad .....	29
6.7.2. Termotolerancia.....	29
6.7.3. Resistencia a estrés osmótico .....	30

6.7.4. Infectividad.....	30
6.7.5. Germinación .....	31
6.7.6. Humedad .....	31
6.7.7. Contaminación del formulado .....	32
6.8. Patogenicidad sobre plagas de importancia económica .....	32
6.9. Prueba de aplicación.....	33
6.10. Análisis estadístico.....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
7.1. Caracterización de cepas comerciales.....	35
7.2. Identificación morfológica.....	37
7.3. Identificación molecular y filogenia.....	39
7.4. Viabilidad durante el proceso de conservación .....	45
7.5. Producción y calidad de conidios sobre 10 g de arroz .....	46
7.5.1. Viabilidad .....	48
7.5.2. Termotolerancia a 42°C.....	49
7.5.3. Resistencia a estrés osmótico .....	50
7.5.4. Infectividad .....	52
7.6. Efecto del ácido oxálico y gentamicina sobre la producción de conidios .....	54
7.7. Producción sobre 50 g de arroz con 0.075 M de ácido oxálico .....	58
7.8. Calidad del formulado y vida de anaquel .....	60
7.9. Patogenicidad sobre plagas de importancia económica: Picudo del nopal y chapulín de la milpa. ....	68
7.10. Prueba de aplicación en campo.....	72
8. RESÚMEN DE RESULTADOS.....	73
9. CONCLUSIONES.....	73
10. PERSPECTIVAS.....	74
11. GLOSARIO.....	75
12. BIBLIOGRAFIA.....	77

## Índice de figuras

Figura 1. Cultivos producidos en superficie de temporal en la Ciudad de México .....	1
Figura 2. <i>C. spinolae</i> (lado izquierdo estado larvario y pupa, derecho estado adulto). .....	4
Figura 3. Adulto de chapulín de la milpa ( <i>Sphenarium purpurascens</i> ). .....	5
Figura 4. Consideraciones a tomarse en cuenta para la formulación .....	9
Figura 5. Equipos para la aplicación de ULV .....	10
Figura 6. Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno.....	15
Figura 7. Aplicación en campo.....	34
Figura 8. Ausencia de crecimiento de <i>Metarhizium</i> a partir del producto Metarsil .....	35
Figura 9. Comparación de un producto comercial y conidios de <i>Metarhizium</i> .....	35
Figura 10. Crecimiento de <i>Metarhizium</i> del producto Metasin® en SDA. ....	36
Figura 11. Crecimiento de Metasin ® en SDA adicionado con gentamicina al 0.01%. ....	36
Figura 12. Larvas de <i>T. molitor</i> infectadas con Metasin®. ....	37
Figura 13. Micromorfología del producto Metasin® (objetivo 40X). ....	37
Figura 14. Morfología colonial en SDA de las cepas de la CDMX y comercial. ....	38
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (1%), para productos de PCR. ....	40
Figura 16. Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de <i>Metarhizium</i> usando 617 pb del gen de $\beta$ -tubulina .....	42
Figura 17. Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de <i>Metarhizium</i> usando 730 pb del gen de factor de elongación .....	43
Figura 18. Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de <i>Metarhizium</i> usando 1347 pb de los genes factor de elongación y $\beta$ -tubulina .....	44
Figura 19. Producción de conidios a los 10 días en SDA. ....	46
Figura 20. Rendimiento de conidios en 10 g de arroz a diez días (conidios gssi <sup>-1</sup> ).....	47
Figura 21. Viabilidad de conidios a los 10 días .....	48
Figura 22. Producción en 50 g de arroz con ácido oxálico y antibiótico .....	56
Figura 23. Resultado de porcentaje de germinación de espora libre almacenada a 25°C con aire para <i>Metarhizium</i> de la CDMX y cepa comercial. ....	62
Figura 24. Resultado de porcentaje de germinación de formulado almacenado a 25°C con aire para <i>Metarhizium</i> de la CDMX y cepa comercial. ....	62

Figura 25. Resultado de porcentaje de germinación de formulado almacenado a 4°C con aire para <i>Metarhizium</i> de la CDMX y cepa comercial. ....	64
Figura 26. Resultado de porcentaje de germinación de espora libre almacenada a 4°C con aire para <i>Metarhizium</i> de la CDMX y cepa comercial. ....	64
Figura 27. Porcentaje de mortalidad y micosis sobre picudo del nopal a 20 días .....	68
Figura 28. Muestra de insectos micosados ( <i>C. spinolae</i> ) .....	68
Figura 29. Porcentaje de mortalidad y micosis sobre chapulín de la milpa.....	69
Figura 30. Muestra de insectos micosados ( <i>S. purpurascens</i> ) .....	70

### Índice de tablas

Tabla 1. Bioinsecticidas comerciales basados en hongos entomopatógenos.....	11
Tabla 2. Medida de los conidios para las cepas de <i>Metarhizium</i> . ....	38
Tabla 3. Parámetros del proceso de conservación de las cepas de la CDMX y cepa comercial. ....	45
Tabla 4. Parámetros obtenidos para termotolerancia a 42°C, de las 4 cepas de <i>Metarhizium</i> . ....	49
Tabla 5. Resultados de la resistencia a estrés osmótico de cepas de la CDMX y cepa comercial. ....	51
Tabla 6. Parámetros de infectividad para cepas de <i>Metarhizium</i> usando larvas de <i>T. molitor</i> . ....	53
Tabla 7. Producción y calidad de conidios de 6 lotes producidos sobre 50 g de arroz a 10 días.....	58
Tabla 8. Pruebas de calidad evaluadas durante el tiempo de almacenamiento de la formulación para <i>M. robertsii</i> Xoch-8.1 y <i>M. brunneum</i> ABNMa201 .....	63
Tabla 9. Parámetros de infectividad de formulado y espora libre al inicio de la formulación. ....	67
Tabla 10. Parámetros de infectividad de la formulación y espora libre almacenadas a 4°C con aire .....	67

## Abreviaturas

ANDEVA	análisis de varianza
$a_w$	actividad de agua
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\text{CaCl}_2$	cloruro de calcio
CB	control biológico
CDMX	Ciudad de México
CESVDF	Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal
$\text{cm}^2$	centímetros cuadrados
CNRCB	Centro Nacional de Referencia de Control Biológico
conidios $\text{cm}^{-2}$	conidios por centímetro cuadrado
conidios $\text{g}^{-1}$	conidios por gramo
conidios $\text{gssi}^{-1}$	conidios por gramo de sustrato seco inicial
$\text{Ca}^{2+}$	calcio
CTAB	bromuro de hexadecil trimetil amonio
d	días
DEPC	dietilpirocarbonato
EF-1 $\alpha$ 5'	factor de elongación alfa cinco prima
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
$\mu\text{g}$	microgramo
g	gramo
gssi	gramo de sustrato seco inicial
h	hora (s)
ha	hectárea (s)
HE	hongos entomopatógenos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
ITS	espacios transcritos internos
Kg	kilogramo
$\mu\text{L}$	microlitro
L	litro
lbf	libra fuerza
M	concentración molar (mol/L)
$\text{Mg}^{2+}$	magnesio
mg	miligramo
min	minuto (s)
MIP	Manejo Integrado de Plagas
mm	milímetro
mM	milimolar (mmol/L)
mOsmol	miliosmol
NaCl	cloruro de sodio

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	reacción en cadena de la taq polimerasa
pb	pares de bases
pg	picogramo
pmoles	picomoles
ppm	partes por millón (mg/Kg o mg/L)
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDA	agar dextrosa Sabouraud
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
t	tiempo
TS <sub>50</sub>	tiempo en el cual el 50% de conidios aún son viables durante la conservación
TS' <sub>50</sub>	tiempo requerido para llegar al 50% de la sobrevivencia inicial en termotolerancia
UFC	unidad formadora de colonia
ULV	volumen ultra bajo
UV	ultra violeta

## RESUMEN

Existen ventajas en el uso de cepas endémicas para el control de plagas agrícolas, dentro de la zona de donde se aíslan. En este estudio se identificó, por secuenciación de los genes factor de elongación y beta tubulina, tres cepas aisladas previamente de zonas agrícolas de la Ciudad de México. Las cepas se identificaron como *Metarhizium robertsii*. Se realizó un estudio comparativo de estas cepas en cultivo sólido determinando la producción y calidad de los conidios. Se encontró que *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 presentó los mejores resultados de viabilidad ( $69.1 \pm 4\%$ ) e infectividad ( $TL_{10} = 6.31 \pm 2$  d), usando larvas de *Tenebrio molitor*. Al comparar esta cepa con la comercial identificada como *Metarhizium brunneum* (Metasin® de Agrobionsa®), mostró un 50% mayor tolerancia al estrés térmico, medido como tiempo de sobrevivencia de la mitad de los conidios ( $TS'_{50} = 6.14 \pm 1.4$  h para Xoch-8.1 y  $TS'_{50} = 2.16 \pm 0.4$  h para la especie comercial). Sin embargo, la especie comercial presentó diez veces más producción de conidios ( $1.18 \times 10^{10}$  conidios gssi<sup>-1</sup>) que la cepa endémica ( $1.2 \times 10^9$  conidios gssi<sup>-1</sup>).

Se realizó un escalamiento de producción de conidios en bolsas con 50 g de arroz. La adición al cultivo de 0.075 M de ácido oxálico, previene la contaminación sin afectar la producción de conidios para ambas especies. Dicho escalamiento, bajo las condiciones de estudio, no mostró diferencias estadísticas significativas entre las ellas en cuanto a producción de conidios, germinación y viabilidad. Con los conidios de los cultivos anteriores se realizó una formulación con tierra de diatomeas (Celite 501®). La vida de anaquel bajo diferentes condiciones, mostró que es posible mantener el 50% de la viabilidad de los conidios durante 120 días a 4°C, mientras a temperatura ambiente esta no se mantiene por más de 30 días.

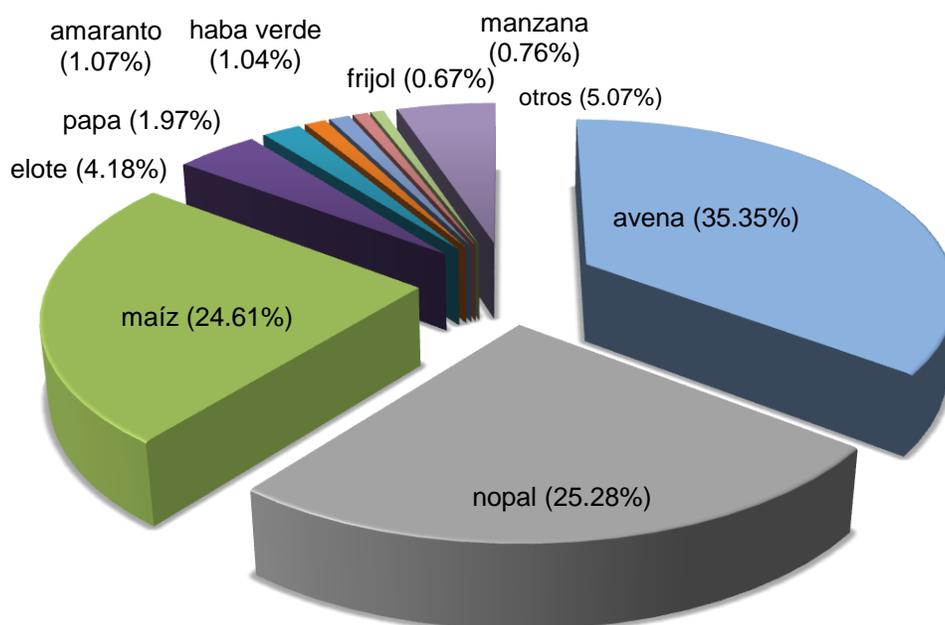
En bioensayos en laboratorio para determinar la patogenicidad de *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201, se confirmó que ambas son patógenas para los insectos plaga *Cactophagus spinolae* y *Sphenarium purpurascens*. Además la formulación de ambas cepas con tierra de diatomeas presenta potencial para aplicarse con mochila de aspersión convencional.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Situación agrícola de la Ciudad de México

La Ciudad de México ocupa una extensión territorial de 149, 830 ha, las cuales se dividen en dos áreas considerando las actividades que se llevan a cabo: área de desarrollo urbano y área de conservación ecológica (**suelo de conservación**), esta última favorece la existencia de flora y fauna de valor comercial, ofrece bienes y servicios ambientales, además de la producción de productos agrícolas para los habitantes de la Ciudad de México (Gastelum, 2010); la cual cuenta con más de 87, 000 ha destinadas a este uso, 58% del territorio total (NOTICDMX, 2015).

Las delegaciones que cuentan con producción agrícola son: Álvaro Obregón, Cuajimalpa de Morelos, Gustavo A. Madero, Iztapalapa, Magdalena Contreras, Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Xochimilco (PAOT, 2013). Con una superficie sembrada total de 22, 878 ha (0.1% del total nacional), de las cuales 20,131 ha son de superficie de temporal con cultivos importantes (Figura 1) y 2,747 son de riego (INEGI, 2013).



**Figura 1.** Cultivos producidos en superficie de temporal en la Ciudad de México (SAGARPA, 2013).

El gobierno de la CDMX generó políticas que contribuyen a que las actividades agrícolas sean rentables y se garantice una seguridad alimentaria para sus habitantes. El gabinete de desarrollo rural propone el desarrollo agropecuario, apoyo a cultivos endémicos como el nopal, desarrollo de tecnología en maíz, apoyo a pérdidas por desastres naturales y promueve la producción orgánica de los cultivos (Cortés-Miranda, 2013). Se entiende por agricultura orgánica a “sistemas agrícolas, pecuarios y de transformación que promueven la producción sana y segura de alimentos desde el punto de vista ambiental, social y económico”. Para ello se fomenta el uso de abonos orgánicos, el control biológico de plagas, rotación de cultivos, entre otros; lo que elimina las necesidades de insumos externos como aditivos, plaguicidas y abonos químicos que son dañinos a la salud del ser humano y medio ambiente (FAO, 2014).

Los cultivos de temporal y con mayor producción en la Ciudad de México son el nopal y maíz. A continuación se muestran algunas de las plagas más comunes de estos cultivos durante su producción (CESVDF, 2004; León-Martínez, 2007; SENASICA, 2009; Takahashi *et al.*, 2012; SEMARNAP, 2014; Catalogue of life, 2016).

#### **Plagas más comunes de nopal**

- Picudo del nopal, *Cactophagus spinolae* Champón, G.C. (Coleóptera: Dryophthoridae).
- Picudo de la espina, *Cylindrocopturus biradiatus* Champ (Coleóptera: Curculionidae).
- Gusano blanco, *Laniifera cyclades* Druce (Lepidóptera: Crambidae).
- Chinche roja, *Hesperolabops nigriceps* Reuter (Hemíptera: Miridae).
- Gusano de alambre *Agriotes* ssp. Say (Coleóptera: Elateridae).
- Escarabajo ciego, *Phyllophaga lempira* Moron y Robbins (Coleóptera: Melolonthidae).
- Cochinilla o grana, *Dactylopius bassi* Targioni Tozzetti (Hemíptera: Dactylopiidae).

- Caracol, *Helix aspersa* Müller (Pulmonata: Helicidae).

### **Plagas más comunes de maíz**

- Gusano elotero, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae).
- Pulgón del maíz, *Rhopalosiphum maidis* Fitch (Hemiptera: Aphididae).
- Gusano soldado, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).
- Araña roja, *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae).
- Trozador negro, *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lepidoptera: Noctuidae).
- Chapulín de la milpa, *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Ortóptera: Pyrgomorphidae).
- Gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* Smith y Abbot (Lepidoptera: Noctuidae).
- Barrenador del maíz, *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae).

El picudo del nopal *C. spinolae* es una de las plagas que más afecta el nopal *Opuntia* spp. (Caryophyllales: Cactaceae) en los estados del centro de México, los daños en el cultivo causan una pérdida económica importante (JOURNALMEX, 2015, Catalogue of life, 2016). Los adultos aparecen en mayo, son de 2.3-2.6 cm de largo, de color negro con manchas rojas en la parte anterior del protórax y tienen dos bandas de color naranja en los élitros (Figura 2). Se alimentan de los márgenes de los jóvenes cladodios o pencas y ponen sus huevos en el interior de éstas. Las larvas blancas de 2.5-3.1 cm de largo (Figura 2) forman galerías en el interior de los cladodios de color amarillo marrón convirtiéndose finalmente en negro, se produce una secreción pegajosa, por los tallos infestados y se acumula en la base de los cladodios dañados (Orduño-Cruz *et al.*, 2011). Esta plaga reduce la producción de plantas y en algunos casos llega a destruirlas. Las medidas de control incluyen la extracción de las larvas de las zonas dañadas por medio de cuchillos hortícolas, además de la utilización de algunos insecticidas como: endosulfán, malatión y folidol (SEMARNAP, 2014). En los últimos años el Comité Estatal de Sanidad Vegetal en

Milpa Alta ha realizado el control de esta plaga utilizando como alternativa biológica principalmente a *B. bassiana* (CESVDF, 2004).



**Figura 2.** *C. spinolae* (lado izquierdo estado larvario y pupa, derecho estado adulto).

Por otra parte el chapulín de la milpa *S. purpurascens* es una plaga importante durante el cultivo del maíz *Zea mays* L. (Poales: Poaceae) (Catalogue of life, 2016). Esta plaga se distribuye en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y CDMX (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009). Presenta dimorfismo sexual, siendo la hembra de mayor tamaño con color verde, el macho presenta coloración verde o café con manchas oscuras con una generación por año y un desarrollo hemimetábolo (pasa de huevo a ninfa y adulto). El adulto es de cuerpo robusto, sin alas o con alas que no le sirven para vuelo (Figura 3). La hembra deposita de 29-31 huevos (4 mm), en grupos envueltos por una sustancia blanquecina denominada ooteca, estos necesitan de humedad (precipitación), para que nazcan los chapulines y de la acumulación de calor, para que cambien de un estado de desarrollo a otro. Pasa por cinco estadios ninfales, presentando alta mortalidad a temperaturas menores a 20°C. Se encuentran en sus primeras etapas de desarrollo desde mayo hasta julio, sin embargo se recomienda conocer las fechas en que la mayor parte de la población se encuentre en tercer instar, momento en que se sugiere realizar el control. Los adultos son lo que causan el mayor daño al cultivo, debido a que se alimentan de las hojas y la mazorca del maíz, lo cual puede generar pérdidas económicas muy importantes (SIAFEG, 2015).



**Figura 3.** Adulto de chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*).

## **1.2. Control biológico**

El control biológico (CB), es una práctica agrícola, componente importante del Manejo Integrado de Plagas (MIP) (León-Martínez, 2007); que consiste en la regulación de patógenos e insectos plaga, mediante el uso de sus enemigos naturales (Téllez-Jurado *et al.*, 2009), como son bacterias, hongos, nemátodos, protozoos y virus (Lacey *et al.*, 2001), aquellos microorganismos que enferman a artrópodos e insectos se denominan entomopatógenos (León-Martínez, 2007). El CB también se puede definir como la utilización o manipulación por el hombre de los enemigos naturales; parasitoides, depredadores, patógenos (Téllez-Jurado *et al.*, 2009; Lacey *et al.*, 2001; León-Martínez, 2007), para mantener las poblaciones de los insectos dañinos en niveles que no causen daño a los cultivos (Alatorre-Rosas, 2007). Esta tecnología es generalmente dirigida a una plaga objetivo, muestra poca o nula toxicidad y se considera poco perjudicial para el ambiente, además permite el desarrollo adecuado del cultivo de manera sin afectar su rendimiento (Hynes *et al.*, 2006).

El uso de microorganismos entomopatógenos para el control de plagas de insectos fue propuesto por los pioneros en patología de invertebrados depredadores: Agostino Bassi, Louis Pasteur y Elie Metchnikoff. En 1835, el italiano Agostino Bassi demostró que el hongo *Beauveria bassiana* causaba la muerte al gusano de seda y la enfermedad era transmitida a otros gusanos de seda. El francés, Louis Pasteur propuso que un hongo podría ser utilizado contra la filoxera en la vid, *Dactylospheera*

*vitifoliae* Fitch (Hemíptera: Phylloxeridae) (Travis, 2004). Sin embargo, en 1878, Elie Metchnikoff ganador de Premio Nobel en medicina, fue el primero que utilizó *M. anisopliae* como agente para el control del escarabajo de cereales, *Anisoplia austriaca ambigua* Mulsant (Coleóptera: Rutelidae). Metchnikoff llevó a cabo los primeros experimentos de infección exitosas con larvas de *A. austriaca* y el picudo de la remolacha azucarera, *Cleonus punctiventris* Schoenherr (Coleóptera: Curculionidae), con ello se inició la producción masiva del hongo para experimentos de campo (Travis, 2004).

Algunos casos de éxito de CB en México lo constituye el aislamiento de 55 hongos entomopatógenos obtenidos de langosta, entre los principales géneros se encuentran: *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea*. En 1997 se reportó el aislamiento, identificación y conservación de entomopatógenos detectados en gallina ciega. En 2002 se constata la efectividad de las cepas CHE-CNRCB 206 (clave anterior MaPL32) y CHE-CNRCB 213 (MaPL40) de *M. anisopliae* var. *acridum* contra poblaciones de langosta con una efectividad mayor al 90% (CNRCB, 2011). En 2009 el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) otorga licencia de uso de la cepa CHE-CNRCB 303 (AMBAS1) de *I. fumosorosea* a tres laboratorios privados con el fin de abastecer el insumo para el control del pulgón café de los cítricos en Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Quintana Roo (CNRCB, 2011).

### **1.3. Producción, formulación y aplicación de bioinsecticidas**

Los insecticidas biológicos, bioinsecticidas o bioplaguicidas son microorganismos o sus productos (formulados) que causan patologías con acción letal en los insectos huéspedes (Carrero-Fernández, 1996). Los bioinsecticidas o micoinsecticidas formulados con hongos entomopatógenos que actualmente se comercializan, tienen como ingrediente activo a *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* e *I. fumosorosea* (García-Gutiérrez y González- Maldonado, 2013). Una ventaja del uso de CB, es la baja o nula toxicidad para mamíferos, de acuerdo a pruebas

toxicológicas realizadas en ratones (Toriello-Nájera *et al.*, 2006; Zimmermann, 2007), además de su bajo impacto ambiental y de su especificidad, ya que no atacan o tienen un bajo efecto sobre insectos no blanco (Barrera-Gaytán, 2007). La compatibilidad entre la producción, preparación y técnicas de aplicación es vital para el uso exitoso de los bioplaguicidas microbianos (León-Martínez, 2007).

Los métodos de producción varían considerablemente, dependiendo del país y recursos económicos. En los cultivos bifásicos, se desarrolla el inóculo en cultivo líquido agitado (de forma rápida) o estático (más lento) y luego se pasa al soporte sólido. En estos sistemas siempre se optimiza el cultivo de la fase líquida para que promueva un rápido crecimiento del hongo. Esta técnica es la más usada a nivel mundial por su corto tiempo de producción y formación de estructuras infectivas de alta calidad, además es semi-artesanal (Hernández-Torres *et al.*, 2006).

Los cultivos líquidos agitados tienen un alto grado de automatización, con cortos tiempos de producción, alto nivel de aprovechamiento de nutrientes, con la desventaja de que algunas cepas tienden a formar pellets de micelio y/o blastoesporas (esporas formadas por gemación a partir de fragmentos de micelio). Este tipo de cultivo se lleva a cabo a nivel industrial (Hernández-Torres *et al.*, 2006). El cultivo líquido estático es un tipo de producción artesanal, donde se requiere menos equipamiento y se realizan varias operaciones manuales que permiten obtener estructuras infectivas de alta calidad a concentraciones bajas debido a la formación de conidios solo en la superficie (Hernández-Torres *et al.*, 2006).

Por su parte los cultivos sobre soportes sólidos requieren menos equipamiento y se realizan numerosas operaciones manuales que permiten obtener altas concentraciones de estructuras infectivas con alta calidad y un alto aprovechamiento de nutrientes (Hernández-Torres *et al.*, 2006). En la industria se utilizan biorreactores sellados altamente automatizados, con principios similares a una fermentación líquida, lo que reduce costos de mano de obra y permite un control eficiente del proceso de producción donde se logra biomasa de alto valor infectivo y más resistente a condiciones ambientales adversas. Uno de los factores limitantes para el uso de agentes de biocontrol es la producción de biomasa y conidios a gran escala

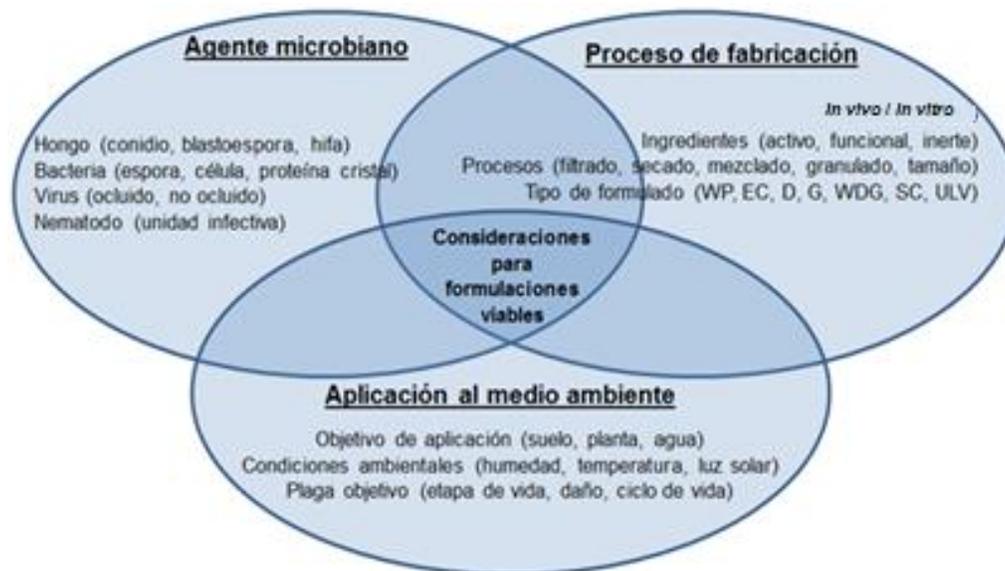
en sustratos artificiales (Behle y Birthisel, 2014). Se han utilizado una gran variedad de granos y sustratos orgánicos para la producción de conidios, tales como: arroz, cebada, avena, centeno, trigo, salvado, bagazo, remolacha, yuca, garbanzo y mijo, algunos de ellos son adicionados con dextrosa o cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Jaronski y Jackson, 2012).

Las condiciones en el proceso de producción y el uso de materia orgánica durante el cultivo, lo hacen susceptible a la contaminación bacteriana, es por ello que se recomienda el uso de antibióticos como cloranfenicol o gentamicina durante la producción de *Metarhizium* (Fernandes *et al.*, 2010; Jaronski y Jackson, 2012; Porcayo-Loza, 2014).

Una alternativa para prescindir del uso de antibiótico es la utilización de ácidos orgánicos como el ácido láctico para inhibir el crecimiento bacteriano, que es comúnmente utilizado en medios de cultivo selectivos para el aislamiento de hongos entomopatógenos (Cañedo y Ames, 2004). Por otra parte, se ha mostrado que el oxalato que se produce en algunas plantas es uno de los principales ácidos orgánicos secretados por una variedad de especies de hongos (Kirkland *et al.*, 2005). Este compuesto induce la acidificación en tejidos del insecto y se asocia a la patogénesis, además del secuestro de iones metálicos como calcio, manganeso, magnesio y hierro; y la posible interrupción de las respuestas de defensa del hospedero, por la capacidad de solubilizar elastina y colágeno, componentes de la cutícula (Jarosz-Wilkolazka y Gadd, 2003).

También se han identificado cristales de oxalato en cadáveres de insectos infectados por hongos (Moino *et al.*, 2002). El ácido oxálico no es utilizado como fuente de carbono por el hongo y es de bajo costo, por lo que es posible su uso para disminuir el pH del cultivo y evitar el crecimiento bacteriano. Por otro lado los hongos toleran un amplio rango de pH de (4-7), pero su crecimiento es generalmente mayor con un pH ligeramente ácido (no menor a 5.5), este último resulta ser demasiado ácido para bacterias y levaduras, que normalmente son los agentes contaminantes durante los cultivos sólidos (Zimmermann, 2007).

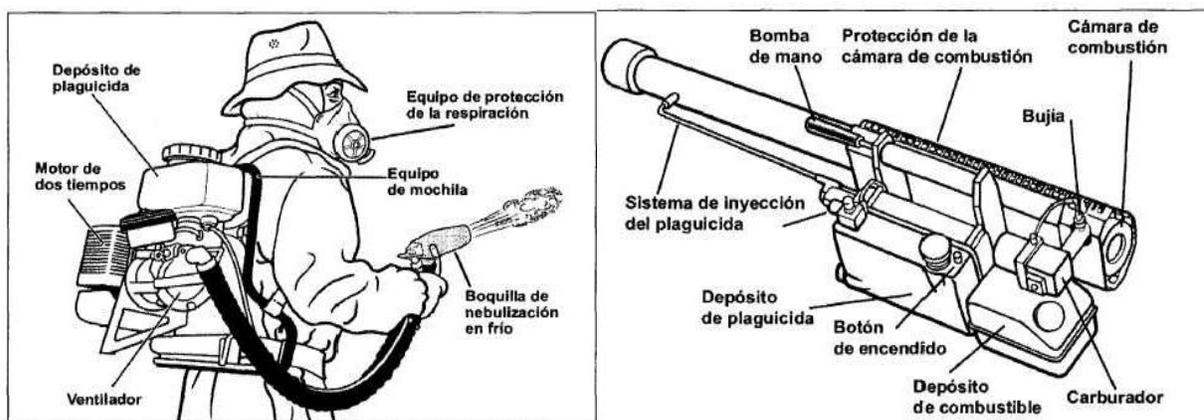
Una formulación consiste en una combinación específica de ingredientes, procesos y equipos para formar un producto comercial definido (Behle y Birthisel, 2014). La producción de bioinsecticidas a base de gránulos sigue siendo el estándar con la mayoría de productos. La formulación de bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos (HE) involucra puntos como la simple aplicación de los conidios, formulados en agua con agentes humectantes (Travis, 2004) o la formulación a base de aceite, polvos y formulaciones flotantes (Lee *et al.*, 2015). Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, son los más utilizados como ingrediente activo en la formulación, se les adiciona un acarreador, un material inerte como soporte y adyuvantes que promueven y mantienen su viabilidad protegiéndolo de la radiación UV, la lluvia, temperatura y desecación; esto facilita su manejo, aplicación y efectividad (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013). Existen diferentes factores que se deben considerar para la formulación (Figura 4), tales como: el agente microbiano a utilizar, forma del producto, proceso e ingredientes; variables que resultan en múltiples combinaciones posibles para elaborar un producto comercial (Behle y Birthisel, 2014).



**Figura 4.** Consideraciones a tomarse en cuenta para la formulación (Behle y Birthisel, 2014). WP: polvo humectable, EC: concentrado emulsificable o emulsionable, D: polvo, G: gránulos, WDG: gránulos solubles en agua, SC: suspensión en capsulas y ULV: ultra bajo volumen.

La forma más común de aplicación es la pulverización y aspersion la cual consiste en poner el plaguicida en forma líquida y fraccionarlo en volumen de pequeñas gotas, en forma de emulsión, solución o suspensión (Casals-Bustos, 2003). Otra forma de aplicación es por Ultra Bajo Volumen (ULV, por sus siglas en inglés). La aplicación de los bioplaguicidas basados en hongos entomopatógenos se realiza con equipo convencional y se enfoca en la cobertura de la aspersion, de goteo y en la penetración entre las hojas (Jaronski y Jackson, 2012).

El ULV se puede utilizar para asperjar formulaciones aceitosas en bajas cantidades y para menos de 51 ha (Behle y Birthisel, 2014) (Figura 5). Los sistemas de pulverización hidráulica se utilizan para formulaciones a base de agua en cultivos; las tecnologías de aire comprimido, se usan para aplicaciones de bajo volumen, la más exitosa es la de un gran número de goteos con un alto contenido de conidios por gota. Muchos métodos son probados para la aplicación de gránulos conteniendo hongos o conidios para suelo, incluyendo el uso de semillas barrenadas en la superficie de aplicación (Travis, 2004).



**Figura 5.** Equipos para la aplicación de ULV, lado izquierdo equipo portátil termo nebulizador (generador de niebla caliente), lado derecho generador de niebla en frío (INFOLEG, 2014).

Durante los últimos 25 años diferentes productos a base de HE han sido comercializados y registrados en muchos países (Tabla 1), algunos continúan en el mercado y otros han desaparecido (Zimmermann, 2007, Jaronski y Jackson, 2012).

**Tabla 1.** Bioinsecticidas comerciales basados en hongos entomopatógenos.

Ingrediente activo	Producto	Empresa fabricante	Plaga objetivo	País
<i>I. fumosorosea</i> cepa FE9901	Nofly	FUTURECO BIOSCIENCE S.A. de C.V.	mosca blanca, áfidos y trips	España
Mezcla de hongos entomopatógenos	Inbiol	Control biológico orgánico	mosquita blanca, pulgones, trips, araña roja	Chile
<i>Beauveria bassiana</i>	Adral ® W.P.	Bio-Crop	Picudos del algodón, plátano y broca del café, chizas de hortalizas.	Colombia
<i>M. anisopliae</i>	RAXTER ® W.P.		plagas del arroz ( <i>Tagosodes sp.</i> , <i>Tibraca sp.</i> ), caña ( <i>Aeneolamia sp.</i> , <i>Mahanarva sp.</i> ) y plátano ( <i>Cosmopolites sp.</i> , <i>Metamasius sp.</i> ).	
<i>Isaria fumosorosea</i> , <i>Isaria lilacinus</i>	Paecilotrópico ® W.P.	Soluciones microbianas del Trópico	mosca blanca ( <i>Bemisia argentifolli</i> ).	Colombia
<i>M. anisopliae</i>	Metatrópico ® W.P.		broca del café, mosca blanca, mosca de la fruta, gusanos, cucarachas, áfidos, trips, pulgones, ácaros, picudos en plátano, cacao y maíz.	
<i>Beauveria bassiana</i>	Bovetrópico ® W.P.		mosca blanca, , mosca del café, ácaros de cítricos.	
<i>B. bassiana</i> cepa GHA	BotaniGard ES®, BotaniGard 22WP®, Mycontrol O®, Mycontrol®	Laverlam International	mosca blanca, trips, pulgones, cochinillas, escarabajos, chinches, gorgojos, etc.	Montana, USA
<i>Isaria</i>	Insect Biol 1	BIOAMIN, Agrobiotecnología	gusano del maíz, calabaza, oruga de la remolacha, mosca blanca, polillas, áfidos, mosca doméstica, mosquito común, trips, termitas, picudos.	México, Coahuila
<i>Beauveria bassiana</i>	Insect Biol 3		mosca blanca, broca del café, picudo de la palma y chile, gallina ciega, chinches	
<i>M. anisopliae</i>	Insect Biol 4		gusano del maíz, calabaza, mosca blanca, polillas, áfidos, aruga de la remolacha, trips	
<i>Beauveria bassiana</i>		Organismos benéficos para la Agricultura S.A. de C.V.	picudo del chile, mosquita blanca, picudo del algodón, broca del café, langosta, chapulín, gallina ciega	México, Guadalajara
<i>M. anisopliae</i>			picudo del chile, mosca pinta y barrenador de la caña.	
<i>Verticillium lecanii</i> cepa ABNVI 402			pulgones, mosquita blanca, trips	
<i>Metarhizium anisopliae</i>		Lab. de Reproducción de Organismos Benéficos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. (CESAVEG)	gallina ciega, chapulín, langosta.	México, Guanajuato
<i>Beauveria bassiana</i>			chinche del café, chinche lygus, mosquita blanca, chapulín, paratritoza.	
<i>Beauveria bassiana</i>	Bea-Met Plus	GAIA Asesoría Integral Ambiental	mosca blanca, barrenadores, picudos del chile y agaves, trips, pulgones y larvas de lepidópteros.	México, Michoacán
<i>Lecanicillium lecanii</i> , <i>I. fumosorosea</i> , <i>B. bassiana</i>	Ver-Pae		trips, mosca blanca, áfidos, pulgones y paratritoza.	
<i>Beauveria bassiana</i>	Bioveria ®	Agrhusa Agrobiológicos	mosca blanca, pulgones y picudos	México, Sinaloa
<i>M. anisopliae</i>	Riziumax ®		mosquita blanca	
<i>Isaria fumosorosea</i>	Pae-SIN®	Agrobionsa S.A. de C.V.	mosquita blanca.	México, Sinaloa
<i>Beauveria bassiana</i>	BEA-SIN®		mosquita blanca.	
<i>M. anisopliae</i>	META-SIN®		picudo del chile.	
<i>M. anisopliae</i>	Metarsil	Biotecnología Agroindustrial		México, Michoacán

Compilación de las siguientes fuentes: (EPA\*, 2014), (GAIA, 2014), (CBORGANIC, 2014), (IGLOBAL, 2014), (BIOAMIN, 2014), (OB, 2014), (AGRHUSA, 2014), (BIOCROP, 2014), (TRÓPICO, 2014), (AGROBIONSA, 2014), (BIOSCIENCE, 2014), (LAVERLAM, 2014), (CESAVEG, 2014) y (BIONNA, 2014). \*EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés.

#### 1.4. Hongos entomopatógenos y su ciclo infectivo

Los hongos son organismos multicelulares, que usualmente se componen de finos filamentos llamados hifas, las cuales forman una masa enredada llamada micelio, que crece dentro o a través del hospedero. La mayoría de hongos entomopatógenos producen esporas, por su tipo de reproducción asexual se denominan conidios (León-Martínez, 2007). El término entomopatógeno se define para aquellos microorganismos que son capaces de atacar y reducir las poblaciones de insectos plaga a niveles que no causan daño económico a los cultivos (Alatorre-Rosas, 2007), o bien un medio de control de poblaciones de insectos vectores de enfermedades (Travis, 2004).

Los HE se encuentran dentro del reino Fungi, Filum Ascomycota, clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, en diferentes familias: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae, Ophiocordycipitaceae, Plectosphaerellaceae. Dentro de los Ascomycota: Pyrenomycetos se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies, entre los que destacan: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Isaria*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Roberts, 1989; García-García *et al.*, 2004, Catalogue of life, 2016).

*Metarhizium* es uno de los hongos más utilizado como bioinsecticida en el mundo. Fue descubierto en 1878, el género se caracteriza por la disposición de las fiálides teniendo cadenas y columnas secas con conidios generalmente verdes, cilíndricos o ligeramente ovoides. Las columnas se forman por agregación de las cadenas de conidios, *M. anisopliae* se distingue por tener conidios cortos de 5-8  $\mu\text{m}$  de largo (Zimmermann, 2007), además es un saprobio del suelo, forma asociaciones con la rizósfera de plantas y es capaz de crecer en materia en descomposición (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015). Es un hongo patógeno facultativo, es decir, no requiere infectar insectos, ni interacciones con plantas para completar su ciclo de vida (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015) o que a partir de un conidio germinado se puede generar un nuevo conidio. Tiene la capacidad de infectar hasta siete ordenes de insectos coleópteros, dípteros, hemípteros, lepidópteros, ortópteros, isópteros y homópteros (Zimmermann,

2007) y es capaz de producir conidios de manera eficiente en una amplia gama de sustratos artificiales (Sahayaraj *et al.*, 2014). El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en las siguientes fases:

### **Adhesión, germinación del conidio sobre la cutícula del hospedero**

El proceso de adhesión ocurre con la adsorción del conidio a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto y está mediada por adhesinas, enzimas sintetizadas por el hongo. Se ha demostrado que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas promoviendo la adhesión de las unidades infectivas (Pedrini *et al.*, 2006; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

### **Penetración en el hemocele.**

La penetración es posible gracias a la acción combinada de mecanismos físicos (presión ejercida por el haustorio, que deforma la capa cuticular, rompiendo después la cutícula) y químicos (acción enzimática de proteasas, lipasas, quitinasas, que degradan el tejido en la zona de penetración), además de producción de metabolitos secundarios. Otro mecanismo es a través de la cavidad oral, espiráculos y otras aberturas externas del insecto (puede provocar muerte por toxicidad). Puesto que la humedad y nutrientes no son un problema en el tracto alimenticio, el conidio puede germinar rápidamente, aunque los fluidos digestivos pueden destruirlo o degradar las hifas (Alatorre-Rosas, 2007; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

### **Desarrollo del hongo y muerte del insecto.**

Después de llegar al hemocele el hongo sufre una transición dimórfica, de micelio a levadura, el cual ataca los mecanismos de respuesta del sistema inmune (modifica la producción de toxinas o la pared celular) y una vez evadido el sistema inmune del

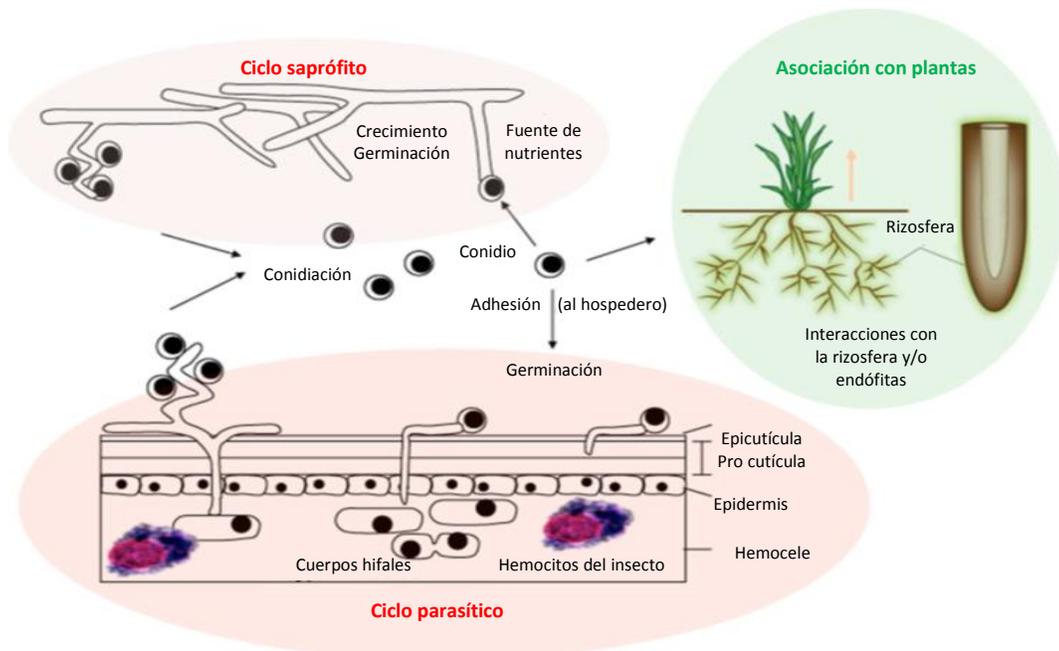
insecto, se produce una septicemia, donde el hongo toma los nutrientes requeridos. La micosis induce síntomas en el insecto como: falta de apetito, convulsiones, carencia de coordinación, comportamiento alterado y parálisis. La muerte sobreviene por el daño físico de los tejidos, deshidratación de las células (pérdida de fluido), desnutrición y producción de toxinas por el hongo (Téllez-Jurado *et al.*, 2009). Por último cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen al exterior del insecto (vivo o muerto), donde producen conidios. Cada conidio puede adherirse o pasar de un insecto a otro por contacto o contaminación de la superficie (Jaronski y Jackson, 2012). Algunos estudios histopatológicos muestran que *M. anisopliae* produce dextruinas del tipo A, B, D y E, que son capaces de iniciar la degeneración de los tejidos, afectar la estructura de la membrana, lo que conlleva a la deshidratación y muerte (Roberts, 1981; St. Leger *et al.*, 1986). Se muestra el ciclo de vida de HE (Figura 6).

### **Características endófitas**

El hongo *M. anisopliae*, tiene la capacidad de formar relaciones endófitas con diversas plantas, además de la llamada “rizósfera competente”, formando interacciones con raíces de las mismas (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015). Este hongo es capaz de movilizar nitrógeno a las plantas, obtenido posiblemente del insecto muerto (Behle y Birthisel, 2014). Diversos estudios enfocan la importancia de las relaciones complejas hongo-planta, además del poder entomopatógeno, de hecho el ser endófito pudo haber sido el primer paso de los hongos, antes de desarrollar su capacidad patogénica (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015).

### **Factores abióticos**

Los factores abióticos como la temperatura, luz UV, humedad, pH, composición del sustrato, oxígeno y CO<sub>2</sub>, o cualquier combinación de estos, pueden activar la germinación de conidios (Lacey *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015).

La persistencia de los hongos entomopatógenos requiere un equilibrio en la interacción entre el hongo, el huésped y el ambiente. Los conidios necesitan propagarse, por lo que hay muchas variaciones e incluso excepciones al ciclo de vida (Figura 6). Sin embargo, las condiciones del medio ambiente y en particular la temperatura son cruciales para la supervivencia y reproducción de los hongos. Para algunos hongos, como los hipocreales, la producción de conidios, germinación, penetración y conidiación requiere alta humedad, la temperatura óptima para lograr la infección generalmente se encuentra entre 20-30 °C, aunque depende de cada cepa. Esta condición es similar para los procesos de germinación, conidiación y propagación (Zimmermann, 2007).

Algunas especies son más dependientes de una alta humedad que otras. Las fluctuaciones de temperatura y humedad interrumpen la producción máxima de conidios en la mayoría de hongos. El suelo presenta una serie de factores bióticos y abióticos que influyen en el ciclo de vida de los hongos (Castrillo *et al.*, 2005). La humedad puede ser constante y más alta en el ambiente del suelo, que en las plantas, por lo que la propagación de conidios es mayor en este entorno. El nivel de materia orgánica y pH pueden ser importantes en los niveles de infección eventual,

así como en la supervivencia de los propágulos. Otras condiciones abióticas, que influyen en la infección, son el viento; el cuál puede favorecer la dispersión de conidios, sin embargo al disminuir la humedad y eliminar el agua libre, al igual que la luz del sol y los rayos UV; pueden perjudicar la persistencia y la infectividad de algunos hongos (Castrillo *et al.*, 2005). Las diferencias en la distribución geográfica de los hongos patógenos de insectos y ácaros pueden ser parcialmente explicadas por sus requerimientos de temperatura promedio. Algunos autores han encontrado que *M. anisopliae* es más prevalente en lugares fríos que en cálidos y se sugiere que la influencia de la temperatura sobre la actividad de este hongo está relacionada con la procedencia de las cepas. Existe variación intraespecífica a la tolerancia de temperatura entre aislamientos o cepas procedentes de la misma ubicación geográfica, sin embargo, en ocasiones algunas cepas procedentes de zonas cálidas superan a las de zonas frías (Zimmermann, 2007). También se sugiere que el tipo de hábitat regula los requerimientos de temperatura para un aislado o cepa. Bidochka *et al.* (2001) encontraron que los aislados fúngicos de zonas boscosas muestran una capacidad para crecer en frío (8°C), mientras que los aislados fúngicos de las áreas agrícolas mostraron capacidad para crecer a altas temperaturas (37°C). La temperatura también puede ser modificada por la cobertura del suelo, indicando que un aumento en la temperatura del suelo reduce la supervivencia de hongos entomopatógenos (Klingen-Ingerborg y Haukelang-Solveig, 2006).

Se requiere un nivel de humedad crítica para el crecimiento óptimo de hongos y su conidiación. En cuanto a la actividad de agua ( $a_w$ ), el nivel crítico para *Beauveria* es de 0.97-0.98 (Núñez-Gaona *et al.*, 2010). Existen diferencias en la tolerancia a diferentes  $a_w$  en los hongos, el  $a_w$  óptimo para *M. anisopliae* oscila entre 0.97-0.99 (Hallsworth y Magan, 1999). Se sabe que el agua libre puede afectar adversamente propágulos fúngicos, una explicación es que el agua saturada del suelo genera falta de oxígeno y por lo tanto la producción de dióxido de carbono que los daña. Otra es que las bacterias activas en altos contenidos de agua lisan a los conidios fúngicos y al contrario en ambientes más secos los conidios de hongos prevalecen esto también depende del tipo de suelo (Behle y Birthisel, 2014).

## **1.5. Conservación de enemigos naturales**

El objetivo de la conservación es mantener las cepas con las características genéticas y fenotípicas originales. Existen diferentes métodos de conservación a corto, mediano y largo plazo. A largo plazo se tiene la liofilización, conservación en nitrógeno líquido, conservación en suelo previamente esterilizado, o en gel de sílice (sin colorante) (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2003). También el aceite mineral es un método muy efectivo a mediano plazo y es comúnmente utilizado para hongos que no toleran la liofilización (Humber, 2012). La técnica de gel de sílice se considera una buena opción, por ser una técnica sencilla que no requiere de equipo específico y sobre todo preserva la viabilidad y pureza del aislado, además conserva sus características morfológicas, genéticas y de patogenicidad, por más de diez años (Smith y Onions, 1994; Mier *et al.*, 2005; Jaronski y Jackson, 2012; Berlanga-Padilla *et al.*, 2013; Montesinos-Matías *et al.*, 2015). El método más usado a corto plazo es la conservación en agua estéril (López-Lastra *et al.*, 2002).

## **1.6. Pruebas de calidad**

La calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto que lo hacen apto para satisfacer las necesidades de a quién va dirigido o está destinado. Un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos de control de calidad asegura su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de los productos basados en hongos, su funcionamiento no confiable, por falta de calidad, ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013). Una producción con un sistema de calidad establecido, tiene un control estricto sobre la salida de su producto, al poder analizar la calidad en cada punto crítico implicado en la elaboración de éste (Aceves-Michel *et al.*, 2000).

La viabilidad del hongo es un componente importante de la calidad del producto (Lacey *et al.*, 2001) y es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar y formar colonias, se expresa en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es de una viabilidad mayor del 80% (Jenkins y Grzywacz, 2000). La viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo, esto depende de las condiciones en las cuales son almacenados, esta prueba debe ser realizada al momento de la extracción y formulación del material, a diferentes intervalos de tiempo durante el periodo de almacenamiento y antes de ser utilizados (Jaronski y Jackson, 2012).

La germinación en HE generalmente se evalúa a las 24 horas de acuerdo con algunos autores, pero otros recomiendan evaluarla de 12-72 horas (Taylor *et al.*, 2013), puesto que esta variable se ve afectada por el medio utilizado durante la prueba, así como también por características fisiológicas del inóculo. La selección de cepas con una rápida germinación aumenta la probabilidad de éxito en campo; en cambio, las cepas con lenta germinación son más sensibles a las variaciones ambientales. Por lo tanto, la germinación es una de las determinantes de virulencia que más se evalúa (Taylor *et al.*, 2013).

Una de las principales desventajas que presentan los bioinsecticidas frente a los insecticidas químicos, es que requieren mayor tiempo para combatir la plaga (5-10 días), tiempo en el cuál el insecto puede causar serios daños a la cosecha (Alatorre-Rosas, 2007; Fan *et al.*, 2007). La capacidad de conidiación e infección del hongo sobre su hospedero es fundamental para diseminar la enfermedad en condiciones de campo, pues permite reinfecciones a partir de insectos muertos.

## 2. ANTECEDENTES

Las recientes investigaciones han beneficiado la aplicación de microorganismos con la capacidad de controlar o suprimir una población plaga (Hynes *et al.*, 2006). El uso inadecuado de insecticidas químicos generan efectos negativos en los seres vivos y en el ambiente, por esta razón algunos países europeos han adoptado diversas medidas entre las que figuran la reducción del uso de plaguicidas (50% en algunos países), prohibición de un determinado ingrediente activo, capacitación y licencias para personas que aplican estos productos, revisión de registros, reducción de dosis y una mejor programación de la aplicación de químicos para cubrir las necesidades de los cultivos, reducción de aspersiones preventivas, aprobación del equipo de aspersión, limitaciones en la aspersión aérea, gravámenes ambientales a los plaguicidas, promoción del uso de alternativas mecánicas y biológicas en sustitución de plaguicidas (FAO, 2014). Sin embargo en México no existen tales acciones, por lo que el CB resulta ser una opción (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013). La reducción de malezas y organismos fitopatógenos como son hongos, bacterias e insectos plaga, se puede lograr con la aplicación de altas dosis de bioinsecticidas, ya sea en suelos, semillas o sobre los cultivos.

Gran parte de la investigación de bioinsecticidas basadas en hongos entomopatógenos, está dirigida específicamente a un solo sistema patógeno-huésped. En el año 2006, se buscaron alternativas para controlar al pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* Stoetzel (Hemiptera: Aphididae) plaga que invadió el Sureste de México. Cuatro cepas de *B. bassiana*, *L. lecanii* e *I. fumosorosea*, se produjeron sobre arroz y se evaluó la mortalidad de la plaga, en vivero en el campo experimental Chiná del INIFAP, en Campeche y Tabasco; además se evaluaron diferentes vehículos de aplicación. Se encontró que *I. javanica* CHE-CNRCB303 (clave anterior AMBAS1) aplicada en emulsión mineral y en polvo humectable fue la más eficiente, tanto en vivero como en campo, obteniéndose 95-100% de mortalidad respectivamente (Hernández-Torres *et al.*, 2006).

La calidad en cuanto a virulencia y termotolerancia, son importantes para la efectividad en campo, un estudio sobre cepas de *M. anisopliae*, aislados de mosca

pinta, *Aeneolamia contigua* Walker (Hemiptera: Cercopidae), mostró que no todos presentan virulencia similar a diferente temperatura (25, 30, 35 y 40 °C). Los aislados con mayor virulencia fueron EH-481, EH-469/6, EH-474/&, EH-475/2, EH-473/4, con TL<sub>50</sub>, de 5.19, 5.76, 5.97, 6.04, 6.15 y 6.53 días, respectivamente. El crecimiento de los aislados a 35°C fue menor y a 40°C no hubo crecimiento (Toriello-Nájera *et al.*, 2008). Un trabajo con cepas de *B. bassiana* en tres diferentes preparaciones de arroz: precocido, lavado después del precocido y por último arroz sin vaporizar, en los cuales se evaluó la germinación en tres medios cada vez más secos; 0.987, 0.978 y 0.968 de actividad de agua ( $a_w$ ), el estudio mostró que la cepa IMI 389521 produjo 96% más conidios en arroz lavado y la mejor germinación después de 8 semanas de almacenamiento fue para la cepa IMI 386243 (Taylor *et al.*, 2013).

La producción de conidios sobre arroz, ha sido una de las más estudiadas. Ángel-Cuapio (2011) utilizó arroz y lirio acuático como texturizante, demostrando que usando lirio *I. fumosorosea* CNRCB1 produce 7.5% más conidios, comparada con *M. anisopliae* CP-OAX. Porcayo-Loza (2014), hizo la producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59 sobre arroz pre-tratado, en diferentes biorreactores: charola, matraces, tubulares y bolsas de poli papel, no encontró diferencia en el método de producción. Por lo que el método utilizado fue la producción en bolsas polipapel. Los conidios producidos fueron aplicados en un campo experimental en cultivo de limón en Tecomán, Colima.

De las delegaciones de la CDMX con actividad agrícola, Estefes-Chávez (2015) aisló HE, además realizó la identificación molecular por ITS (espacios transcritos internos) y un estudio de infectividad contra *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleóptera: Tenebrionidae), mostró mejores resultados de las cepas *M. anisopliae* Tac-3.1, *Metarhizium* sp. Cuj-2.1 y *Metarhizium* sp. Xoch-8.1, partiendo de estos resultados surge la necesidad de identificar las cepas mencionadas con el uso de genes como factor de elongación y beta tubulina, los cuales han sido adecuados para la identificación precisa de aislados de *Metarhizium* (Bischoff *et al.*, 2006, 2009), además de desarrollar bioinsecticidas eficaces para su aplicación en campo, con una producción en un soporte sólido y pruebas de calidad a nivel laboratorio.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los principales retos del sector agrícola en la capital del país, además de la escasez de agua, son la falta de apoyo a productores, el incremento en la producción y mejorar la calidad de la cosecha mediante capacitación, empleo de nuevas tecnologías y métodos de cultivo alternativos, tales como el CB. Esta alternativa se ha utilizado en los últimos años para abatir la contaminación causada por los insecticidas químicos residuales en los alimentos, que además favorece la certificación de productos orgánicos y disminuye peligros a la salud de seres vivos.

Por tal motivo algunos agricultores se han concentrado en la gestión del Manejo Integrado de Plagas (MIP), donde los HE juegan un papel muy importante como bioinsecticidas. En México en el CNRCB, en el período 1991-2013 se aislaron e identificaron HE para el control de diversas plagas en diferentes estados de la República, en el año 2015 se incluyeron algunos de la CDMX. Faltan investigaciones que atiendan los retos en la actividad agrícola de la CDMX, por ejemplo mediante nuevas formulaciones de bioinsecticidas basados en cepas endémicas de *Metarhizium* que estén aclimatadas y que no generen desequilibrio al microambiente de la región. Recientemente se identificó de manera preliminar a nivel de género a un grupo de cepas de HE aisladas de la CDMX, por lo cual en este trabajo se plantea la identificación precisa de tres de esas cepas, que permita establecer la especie, utilizando marcadores moleculares específicos como el factor de elongación y beta tubulina, que ya han sido utilizados anteriormente.

Por otra parte, se requiere realizar una comparación del desempeño de estas cepas endémicas con al menos una cepa aislada de otra región (cepa comercial), para evaluar su potencial a nivel laboratorio como primera etapa. Esto incluye la comparación de la producción de conidios por cultivo sólido de las cepas. Actualmente la producción por cultivo sólido de HE, utiliza principalmente arroz como soporte sólido con la adición de diferentes antibióticos, para disminuir el riesgo por contaminación bacteriana. En el presente trabajo se evalúa el uso de ácido oxálico como una alternativa en la producción de *Metarhizium*, que además evite el riesgo de los problemas generados por el uso de antibióticos en este campo.

## 4. HIPÓTESIS

Al menos una de las cepas aislada de la Ciudad de México presentará una producción de conidios con rendimientos y calidad similares en comparación con una cepa comercial.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Producir un bioinsecticida basado en conidios de *Metarhizium* aislado de la zona agrícola de la Ciudad de México y compararlo con al menos una cepa de un producto comercial.

### 5.2. Objetivos particulares

- Identificar por biología molecular las cepas estudiadas.
- Conservar tres cepas de *Metarhizium* provenientes de zonas agrícolas de la Ciudad de México y una comercial.
- Seleccionar al menos una cepa de la Ciudad de México con mejores resultados de calidad y producción de conidios.
- Utilizar ácido oxálico como una alternativa al uso de antibiótico en la producción de conidios.
- Producir por cultivo en medio sólido, conidios de la cepa *Metarhizium* seleccionada y una cepa comercial.
- Formular un bioinsecticida.
- Determinar vida de anaquel a la formulación propuesta.
- Comparar la calidad de la formulación en polvo humectable de una cepa endémica con una comercial con base a las características recomendadas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Cepas de estudio**

Las cepas de la CDMX fueron aisladas e identificadas parcialmente usando la región ITS por Estefes-Chávez (2015).

- Cepa aislada de la delegación Xochimilco (*Metarhizium* sp. Xoch-8.1)
- Cepa aislada de la delegación Cuajimalpa (*Metarhizium* sp. Cuj-2.1)
- Cepa aislada de la delegación Tláhuac (*M. anisopliae* Tac-3.1)

Para obtener la cepa del producto comercial, se homogeneizó el producto dentro del empaque, se tomó una muestra representativa de diferentes puntos (arriba, abajo, centro), para obtener muestras de conidios. Se homogeneizaron las muestras obtenidas y se tomó 1 g de producto, se agregó a 9 mL de una solución de Tween 80 al 0.05 %, se agitó en vórtex durante 60 s, después se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L y se sembró en medio SDA que contenía 0.01 % de antibiótico (gentamicina) en caja Petri (Cañedo y Ames, 2004; Lacey y Kaya, 2007; Meyling, 2007). Después de 72 h, se tomó una asada de una colonia que contenía conidios verdes, se observó al microscopio, corroborando que se trataba de *Metarhizium*, esta colonia se sembró por estría cruzada en medio SDA y se obtuvieron colonias aisladas, una de estas se sembró nuevamente por estría cruzada en caja Petri con medio SDA, hasta obtener un cultivo monoclonal, la cual fue utilizada para su propagación y conservación siguiendo la metodología descrita por Ángel-Cuapio (2011).

### **6.2. Identificación molecular**

#### **6.2.1. Extracción de ADN genómico**

En cajas Petri conteniendo SDA se inoculó cada cepa (CDMX y comercial) y CP-OAX (obtenida en el Colegio de Postgraduados, de Montecillo, Texcoco, Estado de México) como control positivo previamente identificada (Tecluilt-Beristain *et al.*, 2010). Después de 7 días de crecimiento a 28°C, con ayuda de un bisturí estéril, se raspó la superficie para tomar la biomasa, se depositó en un mortero de porcelana

estéril, se maceró tres veces agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 2 mL de CTAB nuclear (CTAB al 2%, EDTA 50 mM, Trisma base 200 mM, NaCl 2M y Polivinil pirrolidona 0.5%) y se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea. La suspensión se separó en 2 tubos de 2 mL. Se adicionaron 2  $\mu$ L de RNAasa ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 500  $\mu$ L de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se mezcló en vórtex, hasta que se formó una emulsión. Se centrifugó a 13, 000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El ADN se recuperó centrifugando a 13, 000 rpm durante 10 min. La pastilla que se formó al fondo, se lavó con etanol al 70% dos veces y se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar. El ADN se resuspendió en 30  $\mu$ L de solución de dietilpicrocarbonato (DEPC) y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Rodríguez-Tovar, 2004).

### **6.2.2. Reacción de PCR y análisis *in silico* del factor de elongación y $\beta$ -tubulina**

Se realizó un análisis *in silico* utilizando la base de datos del NCBI, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de las secuencias nucleotídicas que codifican para el factor de elongación 5'  $1\alpha$  y para  $\beta$ -tubulina, los cuales fueron utilizados como iniciadores para la identificación molecular de las diferentes especies de *Metarhizium* (Bischoff *et al.*, 2009). Posteriormente se realizó la amplificación de secuencias parciales de los genes mencionados, utilizando los iniciadores: 5' EF-1 $\alpha$  región intrón: EF1T (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') y EF2T (5' GGAAGTACCAGTGATCATGTT 3') (Bischoff *et al.*, 2006) y beta-tubulina (Bt): Bt1F (5' GGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCC 3'), Bt1R (5' CAGCCATCATGTTCTTAGGGTC 3') (Bischoff *et al.*, 2009). La PCR en punto final se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, de los cuales 25 fueron de PCR Master Mix (Thermo Scientific) utilizando para factor de elongación, 10 ng de ADN genómico y 5 pmoles iniciador y para beta tubulina 100 ng de ADN y 15 pmoles de iniciador. Las condiciones de la reacción

fueron: desnaturalización inicial a 94°C, 2 min, nueve ciclos (94°C, 30 s; 66°C, 30 s y 72°C, 1 min) disminuyendo la temperatura un grado centígrado hasta llegar a 56°C; seguido de 36 ciclos (94°C, 30 s; 56°C, 30 s y 72°C, 1 min), con una extensión final a 72°C, 10 min para factor de elongación 5' (Rehner y Buckley, 2005). Para beta tubulina: desnaturalización inicial a 95°C, 2 min; 35 ciclos (94°C, 1 min; 55.7°C, 1 min y 72°C, 1 min), con una extensión final a 72°C, 10 min (Bischoff *et al.*, 2009).

### **6.2.3. Purificación y secuenciación**

Para purificar los productos de PCR, se utilizó el kit DNA clean and concentrator™ 5. En el cual se adicionaron 200 µL de ADN binding buffer al producto a purificar. Posteriormente la mezcla se hizo pasar por una columna Zymo-Spin de 2 mL, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 1 min, se eliminó lo obtenido en el tubo colector y se adicionó 200 µL de buffer de lavado, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 1 min, dos veces. Finalmente la columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 20 µL de agua inyectable, se incubó a 37°C durante 10 min y se centrifugó a 13, 000 rpm durante 1 min. Se realizó electroforesis en gel de agarosa (1%). Posteriormente los productos de PCR para cada uno de los genes, se mandaron secuenciar. La secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados fue obtenida en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (se usó el secuenciador Applied Biosystems, modelo Abi Prism 3130 XL, marca Hitachi), las secuencias obtenidas se compararon con secuencias ya publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) haciendo un blast (n) (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Medina-Canales *et al.*, 2014).

### **6.2.4. Reconstrucción filogenética**

Para realizar el análisis filogenético, una vez secuenciados los productos de PCR de cada marcador molecular se utilizó un análisis *in silico*, descargando secuencias del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para comparar la similitud del gen

con los ya reportados. Además se obtuvieron secuencias de diferentes especies de *Metarhizium*, para realizar la filogenia (Anexo 1). Posteriormente se realizó el alineamiento de dichas secuencias con el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), una vez obtenidos, se utilizó el programa jModeltest para la obtención del modelo de sustitución nucleotídica. Posteriormente se realizó un análisis de máxima verosimilitud usando la plataforma ATGC: phymI (<http://www.atgc-montpellier.fr/phymI/>) (Guindon y Gascuel, 2003), para identificar las cepas y ver su relación filogenética con otras secuencias disponibles en el GenBank. Los árboles filogenéticos se editaron con el programa Fig Tree. El modelo de evolución nucleotídica y el cálculo de parámetros para el total de las secuencias fue determinado por el Criterio de Información de Akaike (AIC) con el programa jModeltest v.3.7 software (Posada y Crandall, 1998). Los nodos fueron soportados por un bootstrap de 1000 pseudo-réplicas. El modelo utilizado para EF 5' 1 $\alpha$  fue Hasegawa-Kishino-Yano + parámetro gamma (HKY+G) (AIC = 6492.7431, -lnL = 3135.3671, G = 0.4329), para  $\beta$ -tubulina fue General Time Reversible + parámetro gamma (GTR + G) (AIC = 2981.5213, -lnL = 1409.7607, G = 0.1683) y para el concatenado EF- $\beta$ tub fue General Time Reversible + parámetro gamma (GTR + G) (AIC = 8036.3854, -lnL = 3947.1927, G = 0.2322).

### **6.3. Reactivación y conservación de cepas**

Diez larvas del insecto modelo *T. molitor*, fueron sanitizadas en solución de hipoclorito de sodio al 1%, después lavadas con dos cambios de agua destilada estéril, posteriormente se sumergieron en 20 mL de una suspensión de  $2 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>, se secaron con papel y por último se colocaron en caja Petri de 9 cm de diámetro hasta su muerte. Se colocaron en cámara húmeda, hasta su conidiación, los conidios se inocularon en cajas Petri conteniendo SDA durante 7 días, para su posterior conservación (Butt y Goettel, 2000; Kawakami, 1960).

Se utilizó el método de conservación descrito por López-Lastra *et al.* (2002). Después de 10 días de crecimiento en medio SDA, en caja Petri, se cortaron cuadros

de agar de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup>, se colocaron seis cuadros por cada vial de vidrio de 3 mL previamente esterilizado conteniendo 2 mL de agua desionizada estéril, se almacenaron a 4°C y se evaluó la viabilidad del hongo a 0, 15, 30, 60 y 90 días. Se comparó la viabilidad mediante Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada tratamiento, con los valores al inicio de la conservación. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial:

$$S = S_0 e^{-kt}$$

Donde S es la viabilidad de los conidios en el tiempo t, S<sub>0</sub> es la viabilidad inicial (%), k es la tasa específica de decaimiento de viabilidad (d<sup>-1</sup>) y t es tiempo (d). Utilizando este modelo se realizó una estimación del parámetro TS<sub>50</sub>, que indica el tiempo (d) en el cual el 50% de los conidios aún están viables de acuerdo al proceso de conservación utilizado (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

#### **6.4. Producción sobre arroz**

De los viales conservados se tomó uno de cada cepa, se agitó en vórtex durante 60 s, se tomaron 100 µL de la suspensión de conidios y se inocularon en matraz Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de agar SDA, se incubaron a 28°C, con fotoperiodo 12:12 h (luz-oscuridad), durante 7 días (cultivo semilla), se extrajeron los conidios con 20 mL de Tween 80 al 0.05% mediante agitación a 300 rpm durante 10 min, transcurrido el tiempo, se filtró con gasa y embudo de plástico estériles, a un tubo Falcón. Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión obtenida y se contó en cámara de Neubauer, después se preparó una suspensión de 2×10<sup>7</sup> conidios mL<sup>-1</sup>. Para pruebas de calidad iniciales, se inoculó 1 mL de esta suspensión a 10 g de arroz precocido marca verde valle, en bolsas de polipapel de 20×30 cm, previamente esterilizado (121°C, 15 psi, 15 min) y hasta llegar a un contenido de humedad de 37.5%; se incubó a 28°C y 75% humedad relativa (HR), con fotoperiodo 12:12 h (luz-oscuridad) durante 10 días, para su conidiación.

Para la producción masiva se utilizaron diferentes tratamientos: arroz con 37% de humedad, arroz húmedo con ácido oxálico 0.075 M (pH = 5.4), arroz húmedo con

ácido oxálico 0.1 M (pH = 5.0) y arroz húmedo con 250 ppm de gentamicina como antibiótico, los tres últimos tratamientos se utilizaron para disminuir el riesgo de contaminación bacteriana en el sustrato. Se inocularon 5 mL de una suspensión de  $2 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  en 50 g de arroz precocido verde valle, utilizando bolsa de polipapel previamente esterilizado ( $121^\circ\text{C}$ , 15 psi, 25 min) con un contenido de humedad de 37.5%, las bolsas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y 75% de humedad relativa, con fotoperiodo 12:12 h (luz-oscuridad) durante 10 días, para su conidiación (Jaronski y Jackson, 2012; Porcayo-Loza, 2014).

### **6.5. Rendimiento**

Los conidios obtenidos en arroz, se extrajeron con 50 mL de Tween 80 al 0.05%, se filtró en embudo con gasa estéril, se transfirió el contenido a tubos Falcón, se realizó el conteo de conidios en cámara de Neubauer con el objetivo 40x, previa dilución 1:1000. La producción de conidios se reportó como conidios por gramo de sustrato seco inicial (conidios  $\text{gss}^{-1}$ ). Este mismo procedimiento se llevó a cabo para la producción de conidios en caja Petri (90 x 15 mm) con medio SDA, a los 10 días y el resultado se reportó como conidios por centímetro cuadrado (conidios  $\text{cm}^{-2}$ ) (Ángel-Cuapio, 2011).

### **6.6. Formulación en polvo humectable**

Después de 10 días de crecimiento del hongo sobre arroz, se colocaron las bolsas expuestas en una cámara cerrada herméticamente ( $1 \text{ m}^3$ ), donde se colocó un deshumificador, para disminuir el contenido de humedad del arroz, se monitoreo diariamente el contenido de humedad, hasta llegar a 5%. A continuación, se extrajeron los conidios con un agitador de tamices, haciendo pasar el arroz con conidios por la malla No. 60 y 100, los conidios extraídos se formularon con tierra de diatomeas Celite® 501 (tamaño de poro 9 micras), considerando que *Metarhizium* en promedio tiene  $5 \times 10^{10}$  conidios  $\text{g}^{-1}$  (Jaronski y Jackson, 2012), se logró obtener una concentración de  $5 \times 10^{12}$  conidios en 240 g (Kassa *et al.*, 2004; Etheimine *et al.*,

2013). Después de formular se empacaron 50 g en bolsa laminada sellada herméticamente, para después determinar la vida de anaquel con los siguientes criterios de calidad: humedad (%), contaminación (%), germinación (%), viabilidad (%) e infectividad en diferentes períodos de tiempo (Akbar *et. al*, 2004; Athanassiou y Steenberg, 2007; Faria y Wraight, 2007).

## **6.7. Pruebas de Calidad**

### **6.7.1. Viabilidad**

Se estandarizaron suspensiones a  $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  provenientes de cultivos de cajas Petri, viales de vidrio y arroz que fueron incubados durante 10 días o productos formulados, a partir de los cuales se inocularon 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión (aproximadamente 300 conidios) en medio SDA en caja Petri, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ , después de 56 h se contabilizaron UFC y se reportó como porcentaje de viabilidad (Aceves-Michel *et al.*, 2000; García-Ortiz *et al.*, 2015).

### **6.7.2. Termotolerancia**

Después de cosechados los conidios, las suspensiones se filtraron utilizando una gasa estéril y se estandarizaron a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . A continuación, se tomaron alícuotas de 1 mL de estas suspensiones, se colocaron en viales de vidrio de 8 mL con tapón de rosca. Después los tubos se colocaron en baño de agua a  $42^\circ\text{C}$ . Se determinó la viabilidad a los tiempos: 0 (control), 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. En cada toma de muestra, los tubos se agitaron con vórtex y 30  $\mu\text{L}$  de suspensión (aproximadamente 300 conidios) se inocularon en cajas de Petri con medio SDA, la prueba se realizó por triplicado. Estas placas se sellaron con PARAFILM® M y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ . Las UFC se contaron después de 96 h de incubación. Se comparó la viabilidad de cada tratamiento con respecto a la obtenida para el control. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial:

$$S = S_0 e^{-kt}$$

Donde  $S$  es la viabilidad de los conidios en el tiempo  $t$ ,  $S_0$  es la viabilidad inicial (%),  $k$  es la tasa específica de decaimiento de viabilidad ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es tiempo expresado en h. Utilizando este modelo se realizó una estimación del parámetro  $TS'_{50}$ , que indica el tiempo (h) al que el 50% de los conidios eran todavía viables a la temperatura de exposición ( $42^\circ$ ) y el tiempo de incubación (Miranda-Hernández *et al.*, 2014; García-Ortiz *et al.*, 2015).

### 6.7.3. Resistencia a estrés osmótico

Esta prueba se realizó en medio de cultivo SDA con la adición de diferentes concentraciones de NaCl: 0, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 M, se inocularon 30  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (por triplicado), para cada concentración molar y se incubó a  $28^\circ\text{C}$  durante 56 h, transcurrido el tiempo se contaron las UFC y el resultado se reportó como % de viabilidad respecto a la viabilidad obtenida para la concentración testigo (sin cloruro de sodio) (Miranda-Hernández *et al.*, 2014). Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial:

$$V = V_0 e^{-kM}$$

Donde  $V$  es la viabilidad de los conidios,  $V_0$  es la viabilidad inicial (%),  $k$  es la constante asociada al decaimiento de la viabilidad con respecto a la concentración de NaCl ( $\text{L mol}^{-1}$ ) y  $M$  es la concentración molar de NaCl ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Utilizando este modelo se realizó una estimación del parámetro  $M_{50}$ , que indica la concentración molar ( $\text{mol L}^{-1}$ ) a la que el 50 % de los conidios son todavía viables. Se midió  $a_w$  para cada concentración molar utilizando un AQUALAB Dew Point Water Activity Meter 4TE, los valores obtenidos son: SDA 0 M = 0.991, SDA 0.3 M = 0.979, SDA 0.5 M = 0.968, SDA 0.7 M = 0.962 y SDA 0.9 M = 0.957.

### 6.7.4. Infectividad

La infectividad se evaluó usando larvas de *T. molitor*. Se utilizaron cajas de Petri de 9 cm de diámetro, cada una con 10 larvas. Se prepararon 20 mL de suspensiones de  $2 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , a partir de los conidios producidos o formulados. Las larvas se

sumergieron durante 5 s en las suspensiones de conidios. El testigo consistió en sumergir las larvas en una solución de Tween 80 (0.05 %). Después de la infección las larvas se alimentaron con salvado de trigo estéril, dieta para evitar la muerte por inanición y se incubaron con fotoperiodo de 12:12 h (luz-oscuridad) a 28°C, en cámara húmeda. La mortalidad se registró cada 24 h durante 14 días, las larvas muertas se mantuvieron en cámara húmeda, para corroborar la micosis. Se reportó tiempo de retardo ( $t_0$ ), sobrevivencia (S) y se calculó el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ , tiempo en que se alcanza la mortalidad del 50%). Se utilizó el modelo descrito por Rodríguez-Gómez *et al.* (2009); el cual utiliza una ecuación de primer orden con la decadencia del tiempo de retardo indicado: 
$$S = (100 - S_f) e^{-k(t - t_0)} + S_f$$
 Donde S es la sobrevivencia (%) al momento t; k es la tasa de mortalidad específica ( $\text{día}^{-1}$ );  $t_0$  es el tiempo requerido para observar la primera muerte de las larvas (día) y  $S_f$  es el nivel de supervivencia estimada asintótica (%) (García-Ortiz *et al.*, 2015).

#### **6.7.5. Germinación**

Los conidios producidos sobre 50 g de arroz después de diez de cultivo o formulados, se extrajeron con Tween 80 al 0.05%, se realizaron diluciones y se contabilizó en cámara de Neubauer, después se estandarizaron suspensiones a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , se añadieron 30  $\mu\text{L}$  a cajas Petri de 90x15 mm (por triplicado) usando SDA. El inóculo se distribuyó uniformemente sobre la superficie utilizando una varilla de vidrio. Las cajas se sellaron con PARAFILM® M y se incubaron a 28°C. Después de 16 h se cortó un pedazo de agar y se colocó en un portaobjetos estéril, se contaron al menos 100 conidios usando un microscopio de luz, se consideraron germinados los que presentan un tamaño del tubo germinativo dos veces mayor al diámetro del conidio, se reportó como % de germinación (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

#### **6.7.6. Humedad**

Se tomó una muestra (arroz, conidios o polvo formulado), se colocó un gramo en una charola de aluminio previamente a peso constante, se colocó la muestra en una

termo balanza (Sartorius Moisture Analyzer, modelo MA35, marca Sartorius) con programación de tiempo automático a 130°C. El análisis se realizó por triplicado para cada muestra y se reportó como porcentaje de humedad.

#### **6.7.7. Contaminación del formulado**

De las cajas Petri inoculadas con 300 conidios utilizadas para prueba de viabilidad en formulados, se realizó el conteo después de 56 h, de UFC tanto de hongo como de bacteria (identificación morfológica de la colonia). Se determinó el porcentaje de contaminación considerando el número total de UFC encontradas y se reportó como % de contaminación (Jaronski y Jackson, 2012).

#### **6.8. Patogenicidad sobre plagas de importancia económica**

- **Picudo de nopal**

Se utilizaron picudos de nopal, recolectados en el mes de agosto, en parcelas de la delegación Milpa Alta. Para corroborar la salud de los insectos, se mantuvieron en una jaula plástica (30 x 50 x 15 cm), con malla en la tapa para ventilación durante 8 días a 25°C. Los insectos se alimentaron con nopal fresco durante ese tiempo y se utilizaron sólo los insectos que no presentaron ningún síntoma de enfermedad y sobrevivieron en condiciones de laboratorio. Transcurrido ese tiempo, los insectos se pesaron obteniendo  $0.3 \pm 0.08$  g en promedio. Las cepas evaluadas fueron: *M. robertsii* Xoch-8.1, *M. brunneum* ABNMa 201, *M. lepidiotae* CP-OAX y tratamiento control (solución de Tween 80 al 0.05%). Diez insectos (cinco hembras y cinco machos), fueron sumergidos en 30 mL de una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> durante 10 s, se secaron con papel absorbente y se colocaron en contenedores de plástico de 12 cm de diámetro por 15 cm de alto, la prueba se realizó por triplicado, condiciones propuestas por Orduño-Cruz *et al.* (2011). Los recipientes se incubaron a 28°C durante 20 días, diariamente se retiraron los cadáveres y se colocaron en cámara húmeda para corroborar la muerte por el hongo, mediante la observación de

micosis directamente sobre el insecto. Se cuantificó el porcentaje de mortalidad y micosis (Orduño-Cruz *et al.*, 2011).

- **Chapulín de la milpa**

Se utilizaron chapulines de la milpa de segundo y tercer instar, recolectados en los meses de julio y agosto, en cultivo de maíz, en el Estado de México. Para corroborar la salud de los insectos, se mantuvieron en una jaula plástica (30 × 50 × 15 cm), con ventilación durante 8 días a 25°C, los insectos se alimentaron con hojas de maíz fresco durante ese tiempo, en el experimento sólo se utilizaron los insectos que no presentaron ningún síntoma de enfermedad y sobrevivieron en condiciones de laboratorio. Se prepararon 20 mL de una suspensión  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>, preparados a partir de conidios de las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201, cosechados después de siete días de crecimiento en SDA. Cada insecto se inoculó con 1 µL de la suspensión bajo el pronoto. El tratamiento control consistió en inocular a los insectos con Tween 80 al 0.05%. Cada tratamiento consistió de 15 insectos y se realizaron tres réplicas, los contenedores fueron colocados en cámara húmeda a 28°C durante 20 días. Diariamente se retiraron los cadáveres y se colocaron en cámara húmeda para corroborar la muerte por el hongo, mediante la observación de micosis directamente sobre el insecto. Se reportó porcentaje de mortalidad y micosis (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

## **6.9. Prueba de aplicación**

La evaluación se realizó en un predio donde se siembra nopal, ubicado en la delegación Milpa Alta, en la colonia San Lorenzo Tlacoyucan latitud N 19.17508° y longitud 099.03481°, con las siguientes características: nopalera en operación de 0.3 ha aproximadamente, que presenta plaga de picudo del nopal. Se preparó una suspensión de  $6 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> utilizando formulados y Tween 80 al 0.05%, la suspensión se colocó en la mochila de aspersion y se asperjó con una presión de 200 lbf (Figura 7).



**Figura 7.** Aplicación en campo. a) Rehidratación de conidios, b) Inspección del predio, c) Preparación de la suspensión de conidios y d) Aplicación con mochila de motobomba.

## 6.10. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza de un factor (ANDEVA), con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , en los casos que se observó diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar, 2012). Para determinar las variaciones en pruebas de calidad donde se aplican modelos matemáticos, se utilizó la herramienta Solver de Excel, con la cual se realizaron los ajustes a los modelos, después se aplicó un análisis de varianza para los valores medios y la desviación estándar con el programa Sigma-Plot 12.5, a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , para los casos con diferencias significativas se aplicó prueba de “t”, Tukey (datos normales, estadística paramétrica) y Student Neuman Keuls (para datos que no se ajustan a normalidad, estadística no paramétrica). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS y Sigma Plot 12.5 (Toriello-Nájera *et al.*, 2008).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

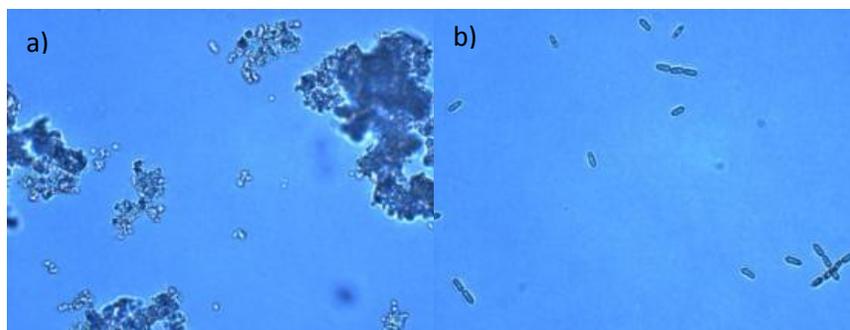
### 7.1. Caracterización de cepas comerciales

Entre los productos comerciales seleccionados se encuentra el producto en polvo humectable, Metarsil, con el que se iniciaron pruebas de crecimiento en SDA. Sin embargo después de diferentes intentos por evidenciar el crecimiento de *Metarhizium* en medio de cultivo no se obtuvo éxito. Es importante mencionar que además del crecimiento en SDA, se evaluó el crecimiento por estría cruzada con la adición de gentamicina para prevenir contaminación por bacterias (Figura 8), además se llevó a cabo la infección de larvas de *T. molitor* con el producto Metarsil (23 días); en ninguno de los casos se logró observar la presencia de *Metarhizium*.



**Figura 8.** Ausencia de crecimiento de *Metarhizium* a partir del producto Metarsil en SDA adicionado con gentamicina (0.01%).

Adicionalmente se observó al microscopio una suspensión 1:10 del producto y no se observaron conidios de *Metarhizium* (Figura 9), por lo que no fue posible aislar la cepa comercial de este producto.



**Figura 9.** Comparación de un producto comercial y conidios de *Metarhizium*. a) Micromorfología del producto Metarsil y b) conidios de *M. robertsii* Xoch-8.1, con objetivo 40X.

Por lo anterior, se decidió utilizar otro producto comercial para aislar la cepa de *Metarhizium*. Se seleccionó el producto comercial Metasin® de la empresa Agrobionsa, el cuál fue sometido a las mismas pruebas que el producto anterior. Los primeros resultados de crecimiento en medio de cultivo SDA permitieron observar la presencia de un hongo con la morfología y color característico de *Metarhizium* (Figura 10).



**Figura 10.** Crecimiento de *Metarhizium* del producto Metasin® en SDA.

Al corroborar la presencia de *Metarhizium* se tomó una muestra y se inoculó por estría cruzada en medio SDA adicionado con gentamicina al 0.01% (Figura 11) y se llevó a cabo el seguimiento determinando las características morfológicas (Figura 13).



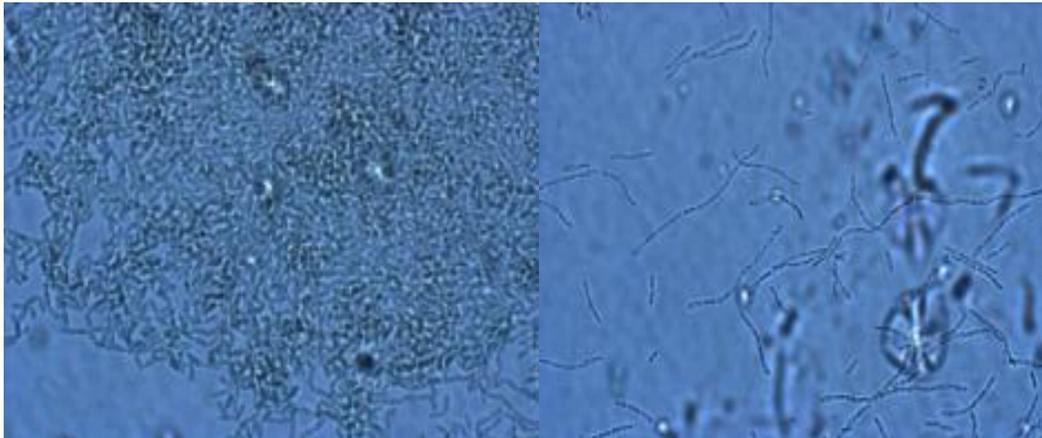
**Figura 11.** Crecimiento de Metasin® en SDA adicionado con gentamicina al 0.01%.

Con la cepa aislada se infectaron larvas de *T. molitor* alcanzando la muerte de éstas después de 6 días de incubación (Figura 12). Finalmente, del cultivo en estría del producto Metasin® se aisló exitosamente, la cepa de *Metarhizium anisopliae* ABN Ma

201 (dato de ficha técnica), que de acuerdo con información del proveedor no es proveniente de la CDMX.



**Figura 12.** Larvas de *T. molitor* infectadas con Metasin®.



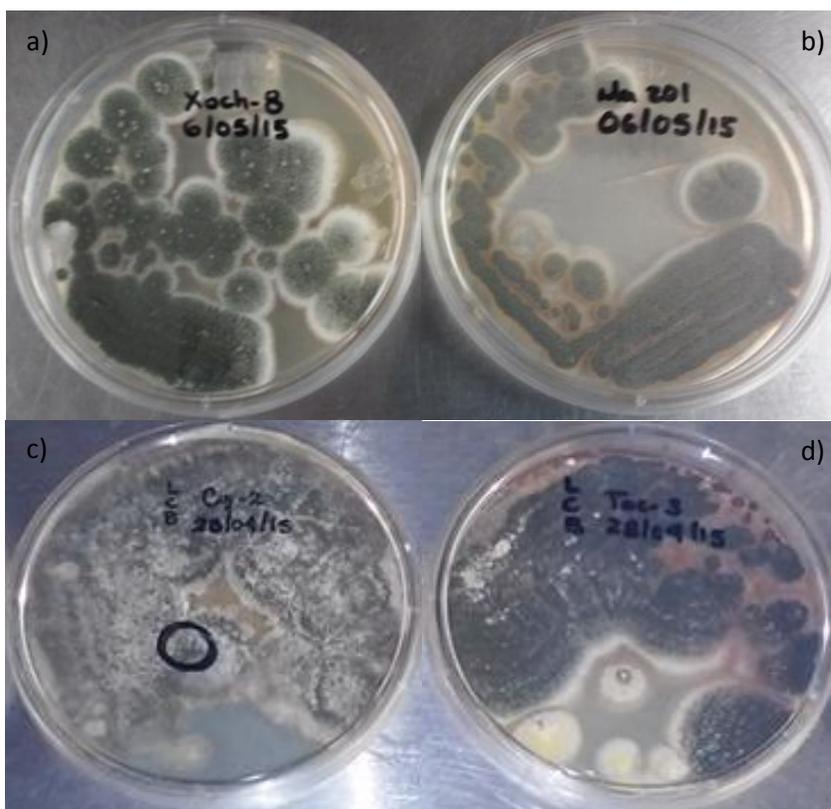
**Figura 13.** Micromorfología del producto Metasin® (objetivo 40X). a) Suspensión concentrada de conidios, b) dilución 1:10.

Conforme a los resultados anteriores, se puede decir que no todos los productos comerciales tienen las mismas características de calidad ni garantía de que el microorganismo que ofrecen está activo, lo que implica que no tengan la misma eficacia en campo para el control de plagas agrícolas, lo cual es de suma importancia en el ámbito de los bioinsecticidas.

## 7.2. Identificación morfológica

La identificación morfológica de las cepas aisladas del territorio de la Ciudad de México, fue realizada por Estefes-Chávez (2015). En la presente investigación se

realizó una revisión de las cepas, identificando diferencias entre las cepas de la CDMX y una obtenida de un producto comercial. Adicionalmente, se realizaron preparaciones microscópicas de conidios de las diferentes cepas. Se determinó la morfología (Figura 14) y dimensiones de los conidios (Tabla 2).



**Figura 14.** Morfología colonial en SDA de las cepas de la CDMX y comercial. a) *M. robertsii* Xoch-8.1, b) *M. brunneum* ABNMa 201, c) *M. robertsii* Cuj-2.1 y d) *M. robertsii* Tac-3.1.

**Tabla 2.** Medida de los conidios para las cepas de *Metarhizium*.

Cepa	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )
<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1	6.35 a $\pm$ 0.25	2.74 a $\pm$ 0.21
<i>M. robertsii</i> Cuj-2.1	6.57 a $\pm$ 0.23	2.65 a $\pm$ 0.24
<i>M. robertsii</i> Tac-3.1	6.49 a $\pm$ 0.16	2.30 a $\pm$ 0.25
<i>M. brunneum</i> ABNMa 201	7.31 b $\pm$ 0.29	2.63 a $\pm$ 0.27

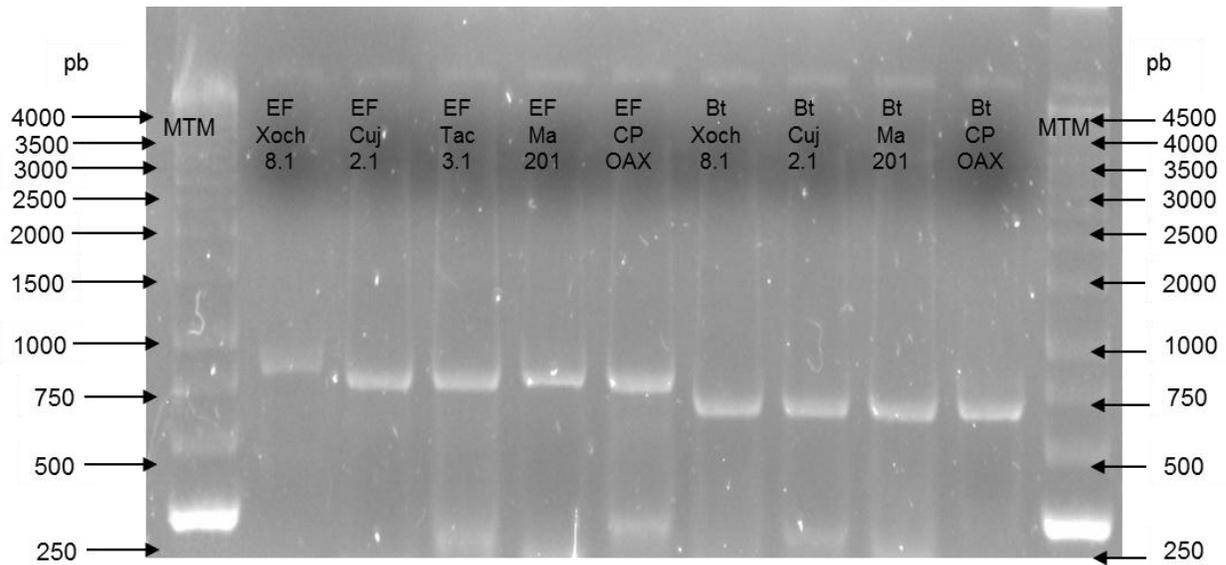
Letras distintas indican diferencia significativa entre las cepas con prueba de Tukey,  $P < 0.05$  para longitud y  $P > 0.05$  para diámetro.

Como se puede ver la cepa comercial tiene un conidio de mayor longitud con diferencias estadísticas (Tukey,  $P < 0.05$ ) comparado con las cepas de la CDMX (Tabla 2). En la revisión del género (Zimmermann, 2007) se indica que el color de la colonia es generalmente verde con un tamaño de conidios de 5-8 micras para la mayoría de los géneros, excepto para *M. majus* que va de 10-16 micras. Para el caso de las cepas de la CDMX tienen un color verde olivo, y para la cepa comercial la colonia es de color verde claro (Figura 14). La diferencia más relevante encontrada entre las cepas, es que la cepa de la delegación Cuajimalpa (*M. robertsii* Cuj-2.1) genera micelio blanco encima de los conidios, lo que podría indicar una posible re-germinación sobre los conidios formados, debida posiblemente a la abundancia de sustrato y humedad, además esta cepa y la cepa comercial presentan un pigmento difusible al medio, color rojo.

### **7.3. Identificación molecular y filogenia**

Se estandarizaron condiciones para la reacción de PCR, ya que con los datos y condiciones propuestos y reportados por Bischoff *et al.* (2006, 2009) se encontraban productos inespecíficos, por lo que se modificaron dichas condiciones siguiendo la metodología propuesta por Rehner y Buckley (2005). Además, se estandarizó la concentración de ADN y de iniciador, lo que permitió obtener un solo amplicón, mismo que fue purificado. Se muestra gel de agarosa al 1% (Figura 15) de los productos de PCR obtenidos y que fueron enviados a secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa.

De acuerdo con lo reportado por Bischoff *et al.* (2006, 2009) y otros autores (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Hernández-Domínguez *et al.*, 2016), los productos de PCR para cepas de *Metarhizium* sp. son de una talla de 700-1700 pares de bases (pb) para factor de elongación 5' y para beta tubulina son de 300-1400 pb. Los productos de PCR obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado por dichos autores, ya que los productos para factor de elongación se encuentran entre 750 y 1000 pares de bases y para beta tubulina están entre 500 y 750 pares de bases (Figura 15).



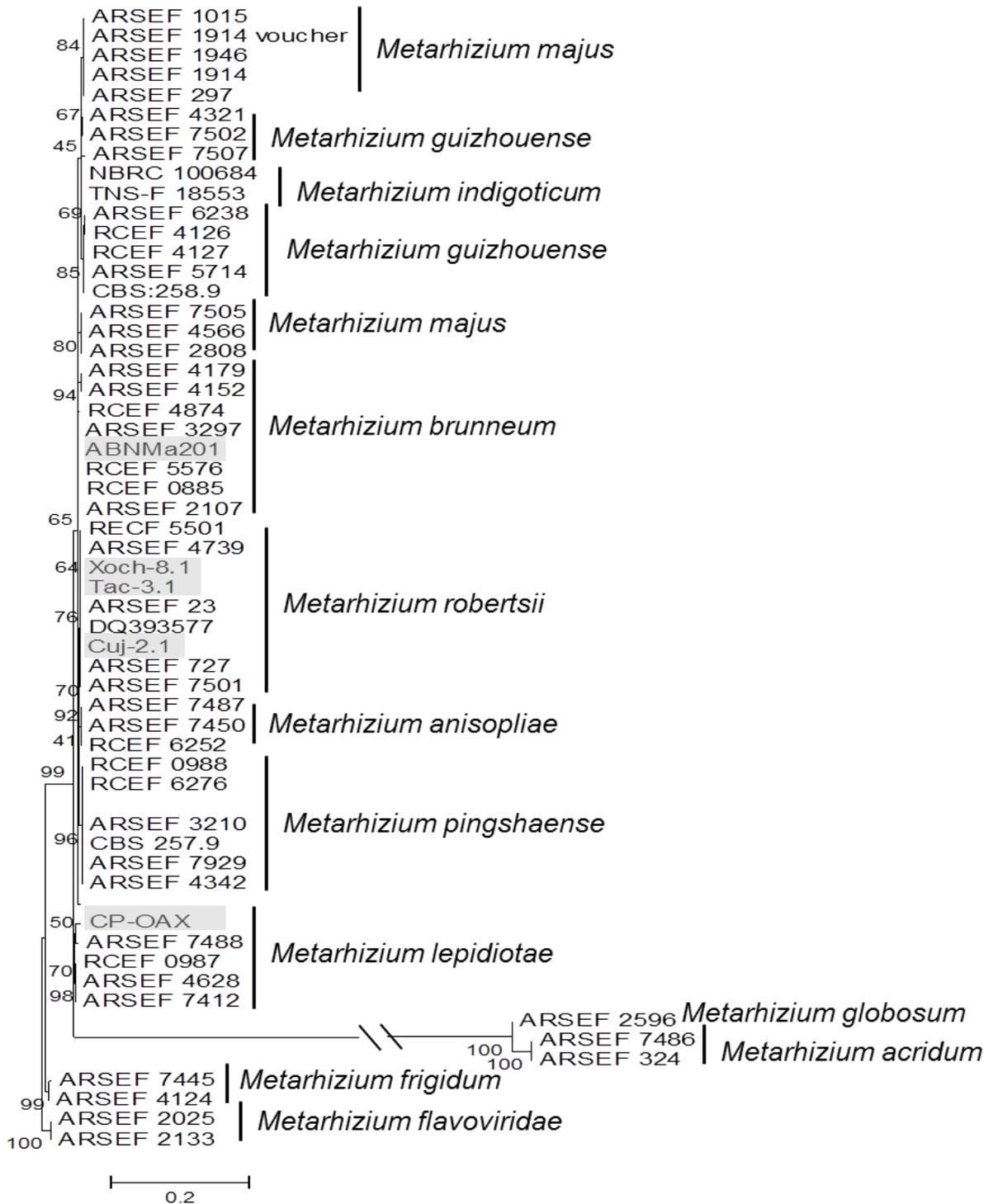
**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa (1%), para productos de PCR.

De izquierda a derecha: MTM (marcador de talla molecular 1 Kb), EF Xoch-8.1, EF Cuj-2.1, EF Tac-3.1, EF ABNMa 201, EF CP-OAX, Bt Xoch-8.1, Bt Cuj-2.1, Bt ABNMa 201, Bt CP-OAX, MTM 1 Kb. EF (factor de elongación), Bt (beta tubulina).

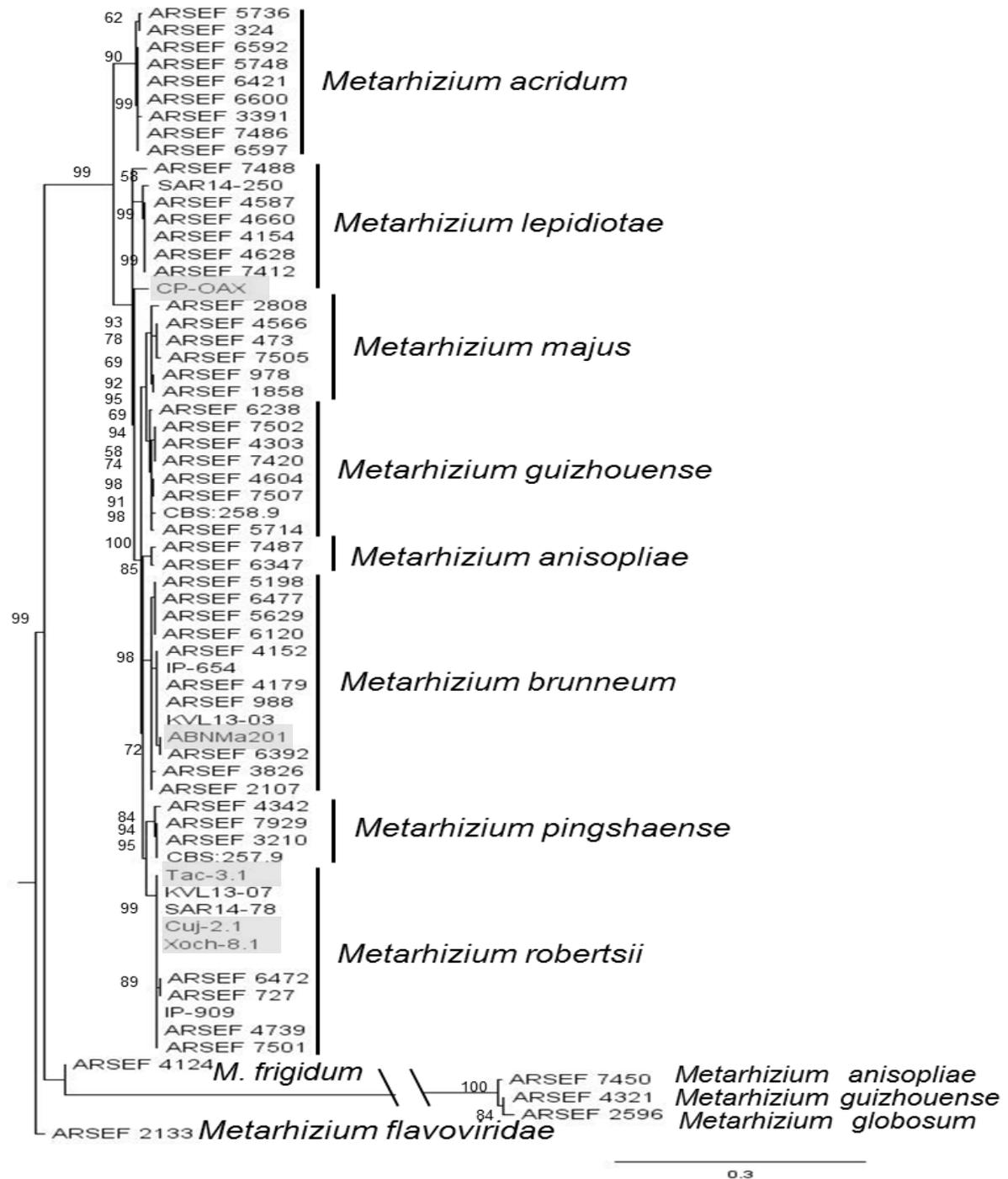
El análisis filogenético a partir de los amplicones obtenidos para el EF 5'  $1\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina y la unión de estos (concatenado) mostró que las tres cepas de la CDMX, se encuentran dentro del grupo de *M. robertsii*. Se muestra la reconstrucción filogenética con el uso de los dos genes parciales amplificados (concatenado) (Figura 18), donde es posible corroborar que la cepa utilizada como referencia en este estudio (CP-OAX), con número de acceso al Genbank FJ876298 (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010) se encuentra dentro del grupo de *M. lepidiotae*. Por otra parte la cepa comercial, identificada por proveedor (Agrobionsa ®), como *M. anisopliae* cepa ABNMa201, fue re-clasificada como *M. brunneum* (Figura 16, 17 y 18). Con respecto a esto, se puede decir que con los avances en tecnología y nuevos estudios en la identificación molecular de especies, se han realizado tanto nuevas identificaciones como actualizaciones en la base de datos, es por esta razón que para algunas cepas, que anteriormente fueron identificadas dentro del género como cierta especie, ahora puedan ser clasificadas como una nueva o dentro de otra especie. Por otro lado, para el caso de la cepa Tac-3.1, que se había identificado de manera preliminar

por ITS (Estefes-Chávez, 2015) y ahora se identificó como *M. robertsii*, se puede decir que el uso de genes específicos para el género *Metarhizium* como factor de elongación y beta tubulina resultan en una identificación hasta especie de las cepas, tal y como fue descrito por Bischoff *et al.* (2006, 2009).

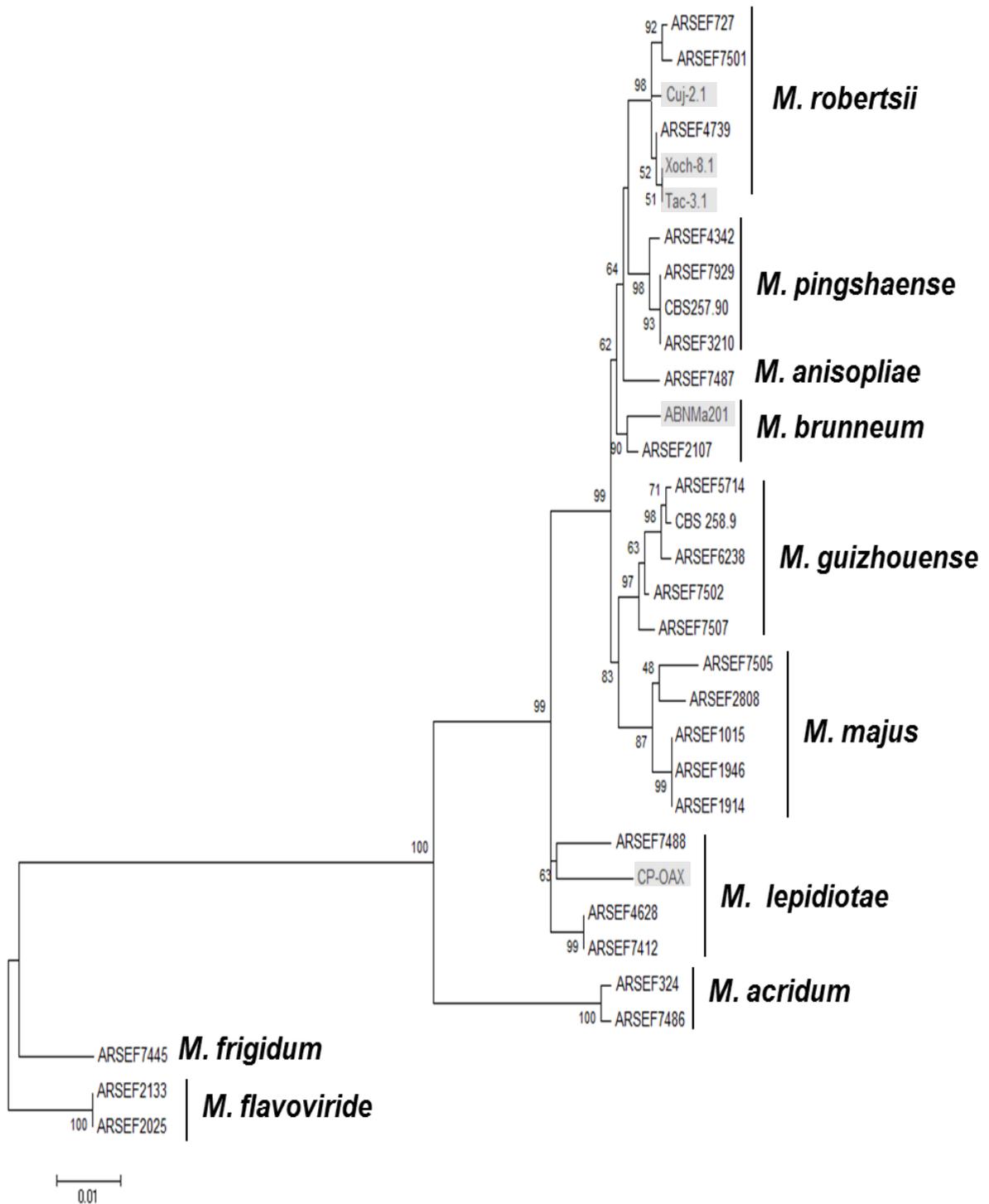
Desde otro punto de vista, la cepa CP-OAX y otras cepas de *Metarhizium* aisladas de otros estados de la República, por ejemplo Guanajuato (Carrillo- Benítez *et al.*, 2013), Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco (Hernández-Domínguez *et al.*, 2016), Michoacán (Pérez-Gonzales *et al.*, 2014), han sido identificadas por ITS, factor de elongación, beta tubulina y el uso de microsatélites, los cuales muestran que se requieren marcadores moleculares de alta resolución, con la capacidad de obtener una identificación adecuada de las cepas. Tal es el caso de CP-OAX, aislada del Estado de Oaxaca, que con el uso de ITS se logró la identificación hasta especie (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010), no así para el caso de la cepa aislada de la delegación Tláhuac en la Ciudad de México, que con sólo el uso de ITS, no fue posible la identificación hasta obtener la especie. En estudios previos se menciona que el uso del gen parcial para factor de elongación 5' resultó ser el más adecuado para la identificación de diferentes aislados de *Metarhizium* (Bischoff *et al.*, 2009; Kepler *et al.*, 2014, 2015). Anteriormente, al realizar la identificación molecular para el género, la clasificación se realizaba como variedades de *M. anisopliae* (Driver *et al.*, 2000). Posteriormente, esta clasificación se modificó, subiendo de rango a especies las diferentes variedades (Bischoff *et al.*, 2006, 2009); así por ejemplo *M. acridum* proviene de *M. anisopliae* var. *acridum*. Es por eso que en esta investigación se propone la modificación para la cepa obtenida del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo Texcoco, la CP-OAX, la cual con número de acceso FJ876298 ha sido identificada por ITS como *M. anisopliae* var. *lepidiotae*. Para efectos de la identificación molecular del presente estudio se definirá como *M. lepidiotae*.



**Figura 16.** Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de *Metarhizium* usando 617 pb del gen de  $\beta$ -tubulina con el modelo de sustitución GTR y usando como grupo externo a *Metarhizium flavoviridae*. En color gris las cepas identificadas.



**Figura 17.** Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de *Metarhizium* usando 730 pb del gen de factor de elongación con el modelo de sustitución HKY y usando como grupo externo a *Metarhizium flavoviridae*. En color gris las cepas identificadas.



**Figura 18.** Reconstrucción de máxima verosimilitud de especies de *Metarhizium* usando 1347 pb de los genes factor de elongación y  $\beta$ -tubulina con el modelo de sustitución GTR y usando como grupo externo a *Metarhizium flavoviridae*. En color gris las cepas identificadas.

#### 7.4. Viabilidad durante el proceso de conservación

Una vez identificadas las cepas se procedió a su conservación en agua desionizada estéril. Se determinó la viabilidad durante el tiempo de conservación durante 90 días, los datos se ajustaron al modelo de decaimiento descrito anteriormente (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros del proceso de conservación de las cepas de la CDMX y cepa comercial.

PARÁMETRO	<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1	<i>M. robertsii</i> Cuj-2.1	<i>M. robertsii</i> Tac-3.1	<i>M. brunneum</i> ABNMa 201
<b>So (%)*</b>	86.54 <sup>a</sup> ± 2.28	78.09 <sup>b</sup> ± 1.55	92.72 <sup>c</sup> ± 0.70	88.71 <sup>a</sup> ± 0.73
<b>k (d<sup>-1</sup>)*</b>	0.01 <sup>a</sup> ± 0.000	0.01 <sup>a</sup> ± 0.001	0.02 <sup>b</sup> ± 0.004	0.01 <sup>a</sup> ± 0.002
<b>TS<sub>50</sub> (d)*</b>	41.70 <sup>a</sup> ± 1.96	61.25 <sup>b</sup> ± 12.35	25.46 <sup>c</sup> ± 3.58	41.51 <sup>a</sup> ± 4.54
<b>R<sup>2</sup></b>	0.87	0.54	0.95	0.87

\*Obtenidos a partir del modelo  $S = S_0 e^{-kt}$ . Donde S es la sobrevivencia durante el tiempo,  $S_0$  es la sobrevivencia inicial y k es la tasa de decaimiento de la sobrevivencia y  $TS_{50}$  es el tiempo requerido para llegar al 50% de la sobrevivencia inicial. Las letras distintas indican diferencia significativa entre cepas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$  para  $S_0$  y para k y  $P > 0.05$  para  $TS_{50}$ ).

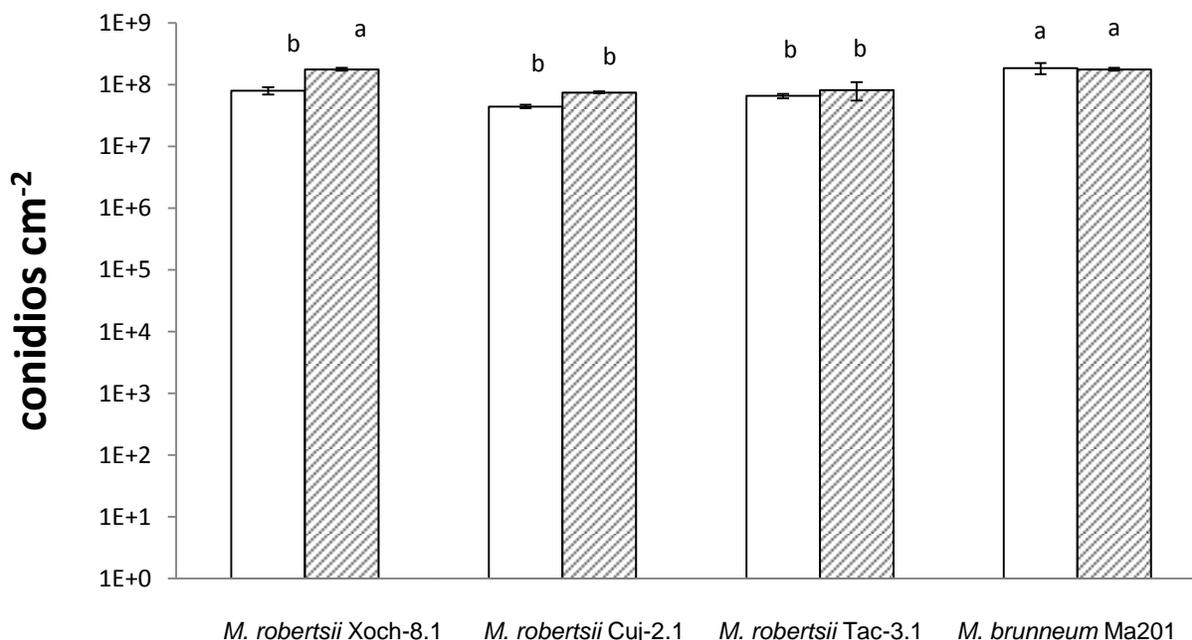
De las cuatro cepas evaluadas, la cepa *M. robertsii* Tac-3.1 presentó el menor valor de  $TS_{50}$ , con diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ). Para el parámetro de sobrevivencia inicial ( $S_0$ ), también se encontró diferencia significativa entre las cepas (Tukey,  $P < 0.05$ ). Como se puede observar en la tabla 3 con el método de conservación utilizado las cepas estudiadas se pueden mantener por no más de 60 días (Cuj-2.1), 41 días (Xoch-8.1, ABNMa 201) y 25 días (Tac-3.1). A diferencia de lo reportado para otras cepas, conforme a los descrito por López-Lastra *et al.* (2002), la mayoría de hongos entomopatógenos incluyendo al género *Metarhizium*, conservan su viabilidad por 18 meses en agua desionizada estéril, para el caso de las cepas de la CMX y la cepa comercial, se encontró que la viabilidad no se mantiene por más de dos meses, este hecho se puede deber a diferencias en el proceso de conservación, además de que la viabilidad se mide de una manera distinta, el autor utiliza % de germinación y en el presente estudio se calcula

viabilidad con conteo de UFC. Por lo general la viabilidad medida como germinación es mayor que cuando se realiza el conteo de UFC.

### 7.5. Producción y calidad de conidios sobre 10 g de arroz

Para determinar los niveles de producción de conidios de las cepas de la Ciudad de México y la cepa comercial, se realizaron cultivos en medio comercial SDA. Para ello se usaron cajas Petri de 9 cm de diámetro. Se calculó conidios  $\text{cm}^{-2}$ . Se observan diferencias estadísticas significativas en la producción de conidios por las diferentes cepas, los niveles de producción van de  $4.41 \times 10^7$  a  $1.77 \times 10^8$  conidios  $\text{cm}^{-2}$  (Figura 19).

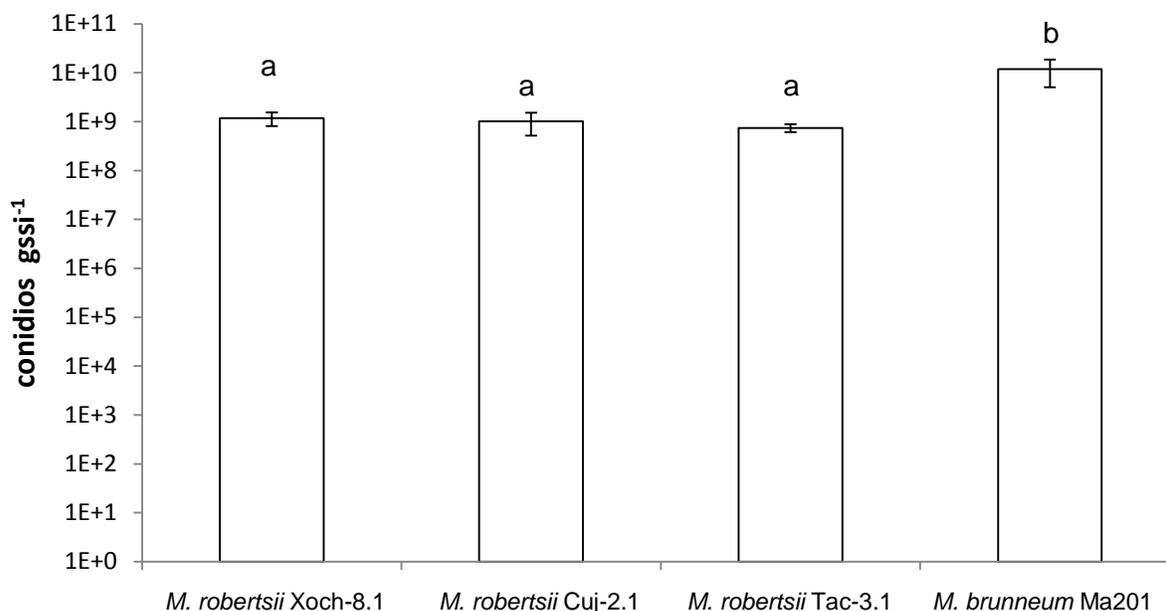
Las cepas con mayor producción de conidios son *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201.



**Figura 19.** Producción de conidios a los 10 días en SDA. □ Experimento 1 ▨ Experimento 2. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas, prueba de Tukey,  $P > 0.005$ .

Una vez evaluada la producción de conidios en medio SDA de cada cepa, se procedió a evaluar la misma en medio de cultivo sólido, con arroz como única fuente de nutrientes (Figura 20). La producción de conidios sobre arroz, presentó una mayor

cantidad de conidios por gramo de sustrato (en el orden de  $10^9$ ), comparada con la producción de conidios en SDA por  $\text{cm}^2$  (en el orden de  $10^8$ ) (Figura 19 y 20). La cepa comercial *M. brunneum* ABNMa 201 produjo 9 veces (89%) más conidios ( $1.1 \times 10^{10}$  conidios  $\text{gss}^{-1}$ ) que las cepas de la CDMX ( $1.2 \times 10^9$  conidios  $\text{gss}^{-1}$ ) y fue la que mostró diferencias estadísticas significativas entre las cuatro (Tukey,  $P < 0.01$ ).

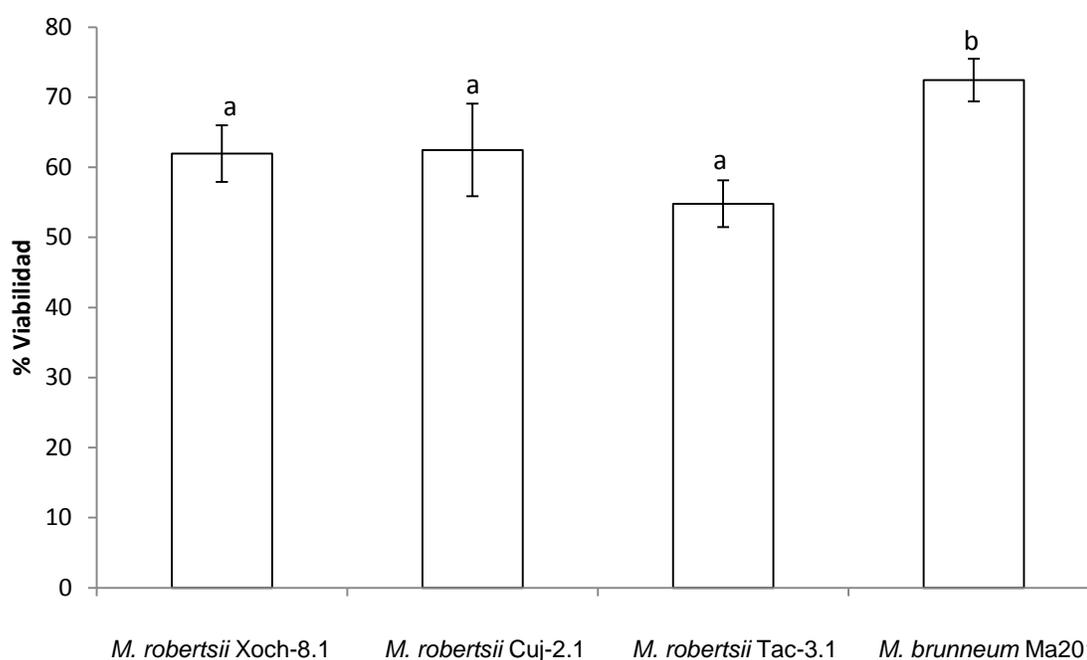


**Figura 20.** Rendimiento de conidios en 10 g de arroz a diez días (conidios  $\text{gss}^{-1}$ ). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre cepas con prueba de Tukey,  $P < 0.01$ .

Estos resultados coinciden con lo reportado por Estefes-Chávez (2015), quien en estudios preliminares encontró que la producción para las cepas de la CDMX fue  $1-2 \times 10^9$  conidios  $\text{gss}^{-1}$  (Figura 20). Por otra parte García-Ortiz *et al.* (2015) obtuvieron para *M. lepidiotae* CP-OAX  $5.43 \times 10^7$  conidios  $\text{cm}^{-2}$  y  $1.1-1.5 \times 10^8$  conidios  $\text{cm}^{-2}$  con atmósfera modificada, este último valor coincide con los resultados obtenidos (Figura 19). Las diferencias observadas entre los resultados se pueden deber a las diferentes cepas, al medio de cultivo y las condiciones durante la producción de conidios, aunque los rendimientos de conidios se encuentran en el mismo orden de magnitud.

### 7.5.1. Viabilidad

Las condiciones propicias para la germinación de hongos entomopatógenos son temperaturas entre 15-35 °C (Zimmermann, 2007) y una humedad relativa entre 92-100% (Taylor *et al.*, 2013). Pequeñas modificaciones en las condiciones ambientales, pueden generar la pérdida de viabilidad de los conidios (Hallsworth y Magan, 1999). Ciertos géneros de hongos son más susceptibles a estos cambios (Jaronski y Jackson, 2012) en las condiciones tanto a nivel laboratorio como en campo. En condiciones óptimas de crecimiento, la viabilidad se mide por la capacidad que tiene un conidio de germinar y a partir de la hifa formada generar un nuevo conidio (Porcayo-Loza, 2014). En condiciones de laboratorio, se determinó la viabilidad de conidios de las cepas estudiadas (Figura 21).



**Figura 21.** Viabilidad de conidios a los 10 días, obtenidos a partir de un lote crecido sobre 10 g de arroz. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre cepas (Tukey,  $P < 0.01$ ).

La viabilidad de los conidios de las cepas de la CDMX, para las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1, *M. robertsii* Cuj-2.1, *M. robertsii* Tac-3.1 y *M. brunneum* ABNMa 201 es de 62, 62, 55 y 72 % respectivamente, siendo la cepa comercial la única que presentó

diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ). Comparando estos resultados con los obtenidos con la cepa *M. anisopliae* CP-OAX, que presenta una viabilidad menor al 50%, García-Ortiz *et al.* (2015), se puede decir que las cepas de la CDMX, superan este porcentaje de viabilidad y que además alguna de ellos podría alcanzar resultados similares a una cepa comercial.

### 7.5.2. Termotolerancia a 42°C

La prueba de termotolerancia se llevó a cabo a 42°C, ya que existen reportes de que el género *Metarhizium* tolera esta temperatura sin afectar significativamente su viabilidad (Rangel *et al.*, 2005; Borisade y Magan, 2014; García-Ortiz *et al.*, 2015). Los resultados fueron ajustados a un modelo de decaimiento exponencial, siendo la cepa *M. robertsii* Cuj-2.1 (extrapolando datos  $12.9 \pm 4.32$  h) más termotolerante y la cepa *M. robertsii* Tac-3.1 ( $0.82 \pm 0.3$  h) la menos tolerante (Tukey,  $P < 0.05$ ). Las cepas *M. brunneum* ABNMa201 ( $2.16 \pm 0.4$  h) y *M. robertsii* Xoch-8.1 ( $4.64 \pm 1.4$  h) resultaron menos tolerantes que la cepa Cuj-2.1 y más tolerantes que la Tac-3.1, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas (Tukey,  $P > 0.05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Parámetros de termotolerancia obtenidos a 42°C, de las cepas evaluadas de *Metarhizium*.

PARÁMETRO	<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1	<i>M. robertsii</i> Cuj-2.1	<i>M. robertsii</i> Tac-3.1	<i>M. brunneum</i> ABNMa201
So (%)*	91.36 <sup>a</sup> ± 5.8	97.9 <sup>a</sup> ± 3.61	87.7 <sup>a</sup> ± 4.9	96.6 <sup>a</sup> ± 5.4
k (h <sup>-1</sup> )*	0.136 <sup>b</sup> ± 0.03	0.06 <sup>a</sup> ± 0.02	0.72 <sup>c</sup> ± 0.2	0.31 <sup>b</sup> ± 0.03
TS <sub>50</sub> (h)*	4.646 <sup>b</sup> ± 1.4	>5 <sup>a</sup> ± 4.32	0.82 <sup>c</sup> ± 0.3	2.16 <sup>b</sup> ± 0.4
R <sup>2</sup> *	0.59	0.37	0.80	0.90

\*Parámetros obtenidos a partir del modelo  $S = S_0 e^{-kt}$ . Donde S es la sobrevivencia durante el tiempo S<sub>0</sub> es la sobrevivencia inicial y k es la tasa de decaimiento de la sobrevivencia y TS<sub>50</sub> es el tiempo requerido para llegar al 50% de la sobrevivencia inicial. Las letras distintas indican diferencia significativa entre cepas.

En un estudio preliminar con estas cepas, se encontró que a 45°C, la cepa *M. robertsii* Cuj-2.1 mostró el menor valor de TS<sub>50</sub> en un tiempo menor a 0.5 h, mientras que las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. robertsii* Tac-3.1 entre 0.7 y 1 h, lo cual

indica que las cepas que más resistieron la temperatura de 45°C fueron estas últimas (Estefes-Chávez, 2015).

Para *Metarhizium anisopliae* la temperatura de crecimiento se encuentra entre 5-40°C, con un óptimo cercano a 30°C, considerando un  $a_w$  de 0.997 y su límite para el crecimiento del micelio está entre 37-40°C (Hallsworth y Magan, 1999), algo similar a lo obtenido en el presente trabajo. Aunque existen reportes de que puede tolerar temperaturas hasta de 50°C (Li y Feng, 2009) dependiendo de la cepa y el tiempo de exposición a altas temperaturas, por ejemplo la cepa *M. anisopliae* ARSEF 324 sobrevive a 49°C durante 2 h y a 51°C pierde su viabilidad completamente (Rangel *et al.*, 2005).

La temperatura de crecimiento es similar que la de germinación para hongos entomopatógenos. En la naturaleza, *Metarhizium* está expuesto a condiciones severas, como altas temperaturas, debido a que en la superficie del suelo se llega hasta 65°C, y en cultivos de maíz hasta de 50°C (Rangel *et al.*, 2005). También algunos insectos como la langosta migratoria, *Locusta migratoria* Linnaeus (Ortóptera: Acrididae) y otros ácridos, tienen la capacidad de inducir fiebre para inhibir el crecimiento del hongo (Ouedraogo *et al.*, 2003).

*Metarhizium anisopliae* tiene una distribución mundial en insectos, así como en el suelo, en países como: Nepal, Nueva Zelanda, Nueva Caledonia, EE.UU., Canadá, Irlanda del Norte, Francia, Reino Unido, Italia, Turquía, Korea (Zimmermann, 2007; Steinwender *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2013), México (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2014; Torres-Barragán *et al.*, 2004; Hernández-Domínguez *et al.*, 2016), entre otros. En este estudio se prueba que diferentes especies de *Metarhizium* obtenidas de algunas delegaciones de la Ciudad de México y una cepa comercial de diferente especie, fueron capaces de tolerar una temperatura por encima del rango óptimo de crecimiento (Tabla 4), en condiciones de laboratorio.

### **7.5.3. Resistencia a estrés osmótico**

La importancia en la determinación de la respuesta al estrés osmótico radica en que *Metarhizium* mata insectos por penetración directa de la cutícula seguido de la

proliferación en la hemolinfa, esta última se caracteriza por presentar una alta presión osmótica (300-500 mOsmol/L), lo que genera un estrés para el hongo (Lovett y St. Leger, 2015). Para la mayoría de especies de *Metarhizium* la actividad de agua que toleran para su crecimiento se encuentra entre 0.93-0.99, con un óptimo entre 0.97-0.99 (Hallsworth y Magan, 1999). La resistencia a estrés osmótico se determinó utilizando cloruro de sodio (NaCl) para disminuir la actividad de agua ( $a_w$ ) del medio (SDA). Aunque otros autores utilizan glicerol, cloruro de potasio (KCl), polietilen glicol 600 (PEG 600) (Hallsworth y Magan, 1999; Barranco-Flrido *et al.*, 2002) o polietilenglicol 200 (PEG 200) (Taylor *et al.*, 2013). Debido a que en la mayoría de estudios se somete al hongo a diferentes actividades de agua y se determina el crecimiento mediante producción de biomasa (Barranco-Flrido *et al.*, 2002), germinación (Taylor *et al.*, 2013) o crecimiento radial (Hallsworth y Magan, 1999), en este estudio se propone un modelo con el cuál se pueda determinar la concentración molar de NaCl a agregar para poder llegar al 50% de la sobrevivencia inicial (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de la resistencia a estrés osmótico de cepas de la CDMX y cepa comercial.

PARÁMETRO	<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1		<i>M. robertsii</i> Cuj-2.1		<i>M. robertsii</i> Tac-3.1		<i>M. brunneum</i> ABNMa 201	
	promedio	error std.	promedio	error std.	promedio	error std.	promedio	error std.
<b>k(L/mol) *</b>	1.7 <sup>a</sup>	0.3	1.6 <sup>a</sup>	0.3	2.5 <sup>a</sup>	0.2	1.5 <sup>a</sup>	0.3
<b>M<sub>50</sub> (mol/L) *</b>	0.47 <sup>b</sup>		0.49 <sup>b</sup>		0.28 <sup>c</sup>		0.53 <sup>a</sup>	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.81		0.75		0.96		0.75	

\* Parámetros obtenidos con el modelo propuesto  $V=V_0 * e^{-kM}$ . Donde V es la viabilidad a una concentración molar de NaCl,  $V_0$  es la viabilidad inicial de las cepas, k es la constante de decaimiento de la viabilidad al aumentar la concentración molar y M es la concentración molar de NaCl. Letras distintas en los renglones indican diferencia significativa con prueba de Tukey (P < 0.05).

Para el resultado de resistencia a estrés osmótico se propone un modelo de decaimiento similar al de termotolerancia, en este caso se calcula  $M_{50}$ , que es el valor de concentración molar cuando se llega al 50% de la viabilidad con respecto a la inicial. Como se observa en la tabla 5, la cepa *M. robertsii* Tac-3.1 es la menos

resistente al estrés osmótico, con un valor de  $M_{50}$  de 0.28 ( $a_w = 0.979$ ) y la cepa más resistente a un aumento en la concentración salina es la cepa comercial *M. brunneum* con un  $M_{50} = 0.53$  ( $a_w = 0.968$ ). Esto es congruente con lo que se reporta a las concentraciones 0.3 y 0.5 M de NaCl, para las mismas cepas en un estudio realizado previamente por Estefes-Chávez (2015). Al aumentar la concentración de NaCl hasta 0.9 M ( $a_w = 0.957$ ) no se observó crecimiento para ninguna de las cepas, se llegó al límite de  $a_w$  que pueden soportar; aunque el límite de  $a_w$  a tolerar depende de la cepa, la temperatura y el soluto utilizado, por ejemplo algunas cepas de *Metarhizium* pueden crecer con una  $a_w$  hasta de 0.91 utilizando otros solutos como glicerol, KCl y PEG 600 (Hallsworth y Magan, 1999). Por lo anterior las cepas de *Metarhizium* aisladas de la CDMX, son más resistentes a bajas actividades de agua comparadas con cepas de *B. bassiana*, que a actividad de agua por debajo de 0.97 ya no presentan crecimiento (Núñez-Gaona *et al.*, 2010), y en algunos casos disminuye drásticamente su germinación hasta llegar al 30% (Taylor *et al.*, 2013) y son menos tolerantes que *L. lecanii* que tolera actividad de agua de 0.957 (Barranco-Florido *et al.*, 2002).

#### **7.5.4. Infectividad**

El hongo *Metarhizium* ha sido aislado de campos de maíz, plátano, pastizales, frijol, praderas, campos de trigo, sedimentos de ríos, manglares, lodos y raíces de fresa (Domsch *et al.*, 1980). Lo que confiere diversidad al entomopatógeno y adaptación a diferentes condiciones climáticas, además de su capacidad para infectar a insectos plaga de diferentes órdenes. En el presente estudio se determinó la infectividad que se define como la habilidad que tiene el hongo de penetrar al insecto y reproducirse dentro de él, causando la muerte (Thomas y Elkinton, 2004). La prueba se realizó utilizando larvas del insecto modelo *T. molitor*, para todas las cepas (CDMX y comercial). Se reportan los parámetros obtenidos con el modelo propuesto (Tabla 6).

**Tabla 6.** Parámetros de infectividad para cepas de *Metarhizium* usando larvas de *T. molitor*.

PARÁMETRO	<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1		<i>M. robertsii</i> Cuj-2.1		<i>M. robertsii</i> Tac-3.1		<i>M. brunneum</i> ABNMa 201	
	promedio	error std.	promedio	error std.	promedio	error std.	promedio	error std.
<b>S (%) *</b>	67.9	9.9	89.7	0.5	79.9	15.8	67.0	6.2
<b>k (d<sup>-1</sup>) *</b>	0.33	0.37	0.62	0.16	0.21	0.50	0.54	1.27
<b>to (d) *</b>	5.18	1.37	3.07	0.17	4.14	4.12	4.44	3.42
<b>TL<sub>10</sub> (d)</b>	6.31		8.92		7.41		5.11	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.98		0.99		0.99		0.96	

\* Parámetros obtenidos con el modelo propuesto  $S = (100 - S_f) * e^{-k(t-t_0)} + S_f$ . Donde  $S_f$  es la sobrevivencia final,  $S$  es la sobrevivencia al tiempo  $t$ ,  $k$  es la tasa de mortalidad específica y  $t_0$  es el tiempo requerido para lograr la primera muerte y  $TL_{10}$  es el tiempo requerido para llegar al 90% de la sobrevivencia. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las cepas con prueba de Tukey ( $P > 0.05$  para  $S$ ,  $k$  y para  $t_0$ ).

Conforme a los resultados que se muestran en la tabla 6 el menor valor de  $TL_{10}$  (valor calculado al no llegar al 50% de mortalidad de las larvas tratadas, y no poder calcular  $TL_{50}$ ) se tiene para la cepa *M. brunneum* ABNMA 201 (5.1 días), seguida de la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 (6.2 días), estas dos tardan un menor tiempo en matar al 10% de la población, comparado con las otras dos cepas (*M. robertsii* Cuj-2.1 y *M. robertsii* Tac-3.1) las cuales presentan un valor de  $TL_{10}$  mayor (8.9 y 7.4 días respectivamente), presentando un mayor porcentaje de sobrevivencia final, lo que indica que dejan mayor número de insectos vivos al final del tratamiento, aunque los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre las cepas (prueba de Tukey con  $P > 0.05$ ). Los resultados obtenidos comparan la efectividad de una cepa y pueden predecir su comportamiento en campo, ya que entre más tiempo se tarda en actuar el hongo entomopatógeno contra la plaga, menor será su efectividad. Además la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 siendo una de las más infectivas, también alcanzó los niveles mayores de conidiación en los cultivos sobre arroz, lo que le otorga una ventaja adicional con respecto a las demás cepas de la CDMX. Cabe mencionar que se realizaron dos experimentos aleatorios en diferente tiempo y no se encontró el mismo comportamiento en la respuesta de las cepas, ya que en el primer bioensayo realizado (datos no reportados), se superó el 50% de mortalidad de las

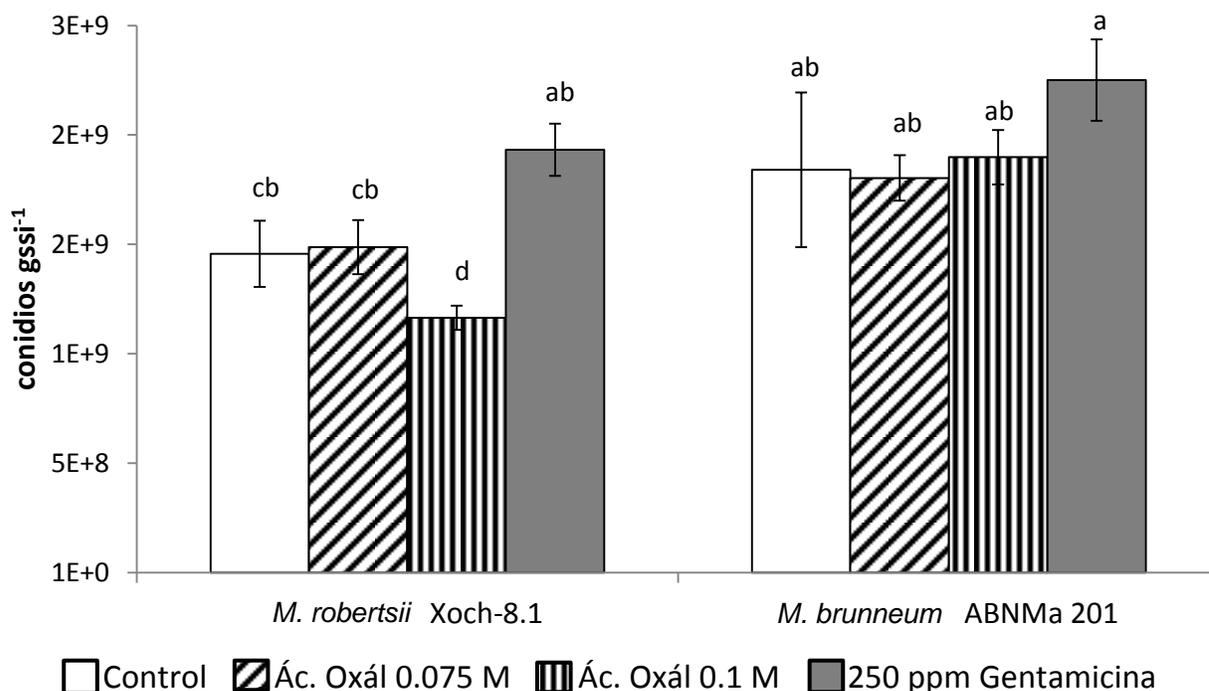
larvas por parte de las cepas. Existe una gran variedad de factores que pueden afectar los resultados de un bioensayo, tales como los inherentes al organismo de prueba como: edad y estado de desarrollo, sexo, variación natural y período de cautiverio. Además de los factores inherentes al experimento como: factores ambientales, alimentación, método de exposición (tópica o inmersión), tiempo de exposición y tamaño de la muestra. Se señala que en general, las larvas son más susceptibles que los adultos ya que presentan una mayor diversidad de enzimas metabólicas y en general las hembras son menos susceptibles que los machos (Silva-Aguayo *et al.*, 2003). También se sabe que dos bioensayos son comparables solamente si se trata de la misma especie, mismo bioinsecticida y mismo procedimiento del bioensayo, cualquier pequeña variación para alguno de estos factores, puede generar diferentes resultados (Silva-Aguayo, *et al.*, 2003), caso que pudo ocurrir para esta investigación, debido a que los dos experimentos se llevaron a cabo en diferente tiempo, con lotes de larvas distintos, además de pequeñas variaciones en la edad de los mismos, mayor tiempo de exposición o errores experimentales al momento de realizar la prueba.

Con base en los resultados anteriores se eligió a la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 como la adecuada para la producción masiva, ya que presenta producción de conidios e infectividad con valores similares a la cepa comercial (*M. brunneum* ABNMa201).

## **7.6. Efecto del ácido oxálico y gentamicina sobre la producción de conidios**

El interés comercial en el uso de *Metarhizium* para el control de insectos plaga ha resultado en la formulación a base de conidios aéreos, producidos en acarreador granular nutritivo o en sustratos sólidos con uso de antibióticos (Jaronski y Jackson, 2012). Con el objetivo de reducir la presencia de agentes dañinos a la salud, se evaluó la producción de conidios para las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201, utilizando concentraciones diferentes de ácido oxálico y antibiótico (Figura 22).

Para lograr una disminución de pH en el cultivo, se probó la adición de diferentes soluciones a base de ácido oxálico al arroz, obteniendo diferente pH para cada uno: arroz con agua pH 6.9; arroz con solución de ác. oxálico 0.01 M, pH 6.6; arroz con solución de ác. oxálico 0.05 M, pH 6.2; arroz con solución de ác. oxálico 0.075 M, pH 5.4 y arroz con solución de ác. oxálico 0.1 M, pH 5, como se puede observar la adición de bajas concentraciones de ácido oxálico disminuyen rápidamente el pH del sustrato. A partir de estos datos se decidió usar las concentraciones de ácido oxálico que disminuían el pH a 5.4 y 5.0. De acuerdo con la literatura *Metarhizium* crece en sustratos a un pH de 6.6-7.5, con una producción máxima en arroz de  $5.275 \times 10^{10}$  conidios  $g^{-1}$  a un pH de 7.01 (Prakash *et al.*, 2008), el cual supera la producción máxima de la cepa de la CDMX y la cepa comercial ( $1-2 \times 10^9$  conidios  $gss^{-1}$ ). Se puede observar (Figura 22) que el uso de gentamicina (250 ppm) aumenta la producción de conidios para ambas cepas comparado con el control, esto se puede atribuir a que el uso de gentamicina previene adecuadamente el crecimiento bacteriano, el cual puede afectar inhibiendo el crecimiento del hongo, lo que limita la producción de conidios de este último. En el tratamiento control al no tener antibiótico, puede estar ocurriendo un pequeño crecimiento bacteriano que no es notable, el cual puede afectar el rendimiento en la producción de conidios por parte del hongo, observación que se pudo confirmar durante los experimentos realizados. Por otra parte también puede ocurrir que la adición de gentamicina al medio de cultivo afecta al hongo, lo que le genera un estrés que provoque una mayor conidiación (Lovett y St. Leger, 2015). De acuerdo con Seniya *et al.* (2012), se requiere una concentración mínima inhibitoria de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  para afectar el crecimiento de hongos patógenos como *Rhizopus stolonifer* y *Microsporium gyseum* y en el estudio realizado por Porcayo-Loza (2014), se demostró que el uso de cloranfenicol afecta la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* Ma 59. El uso de ácido oxálico 0.1 M afecta a la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 comparada con la cepa comercial. La adición de ácido oxálico 0.075 M no afecta significativamente la producción de conidios con respecto al control para ambas cepas.



**Figura 22.** Producción (conidios gssi<sup>-1</sup>) en 50 g de arroz con ácido oxálico y antibiótico para dos cepas de *Metarhizium* a 10 días. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos. Tukey,  $P < 0.05$ .

Para tener las mismas condiciones de producción y evitar el uso de antibióticos, por la resistencia que se genera en los microorganismos, se sugiere el uso de ácido oxálico 0.075 M. En estudios previos se ha visto que el ácido oxálico es tóxico para ciertos ácaros y chinches, además se han identificado cristales de oxalato en cadáveres de insectos infectados por HE (Godoy *et al.*, 1990; Korth *et al.* 2006). En un estudio similar se mostró que en *M. anisopliae*, la producción de oxalato y la reducción resultante en el pH extracelular, están vinculadas a la producción de proteasas, que a su vez están relacionadas al proceso infectivo (St. Leger *et al.* 1999).

En un estudio realizado por Kirkland (2005), el oxalato resultó ser el principal compuesto orgánico secretado durante el cultivo de *B. bassiana*, un tratamiento con oxalato puro (pH = 4.0) resultó en 80% de mortalidad en adultos de *Amblyomma americanum* Linnaeus (Ixodida: Ixodidae) en 14 días, mientras que a un pH de 7.0

dio lugar solo al 10% de mortalidad en 28 días, además de que un cultivo mutante con producción de oxalato disminuido, mostró actividad acaricida más baja que la cepa silvestre, esto para *B. bassiana*. Algunos ácidos producidos por hongos, incluyendo oxalato, han sido implicados en la virulencia de *B. bassiana* hacia el saltamontes migratorio, *Melanoplus sanguinipes* Fabricius (Ortóptera: Acrididae) (Bidochka y Khachatourians, 1991). Estos datos indican que el oxalato es un importante factor de virulencia de hongos entomopatógenos, lo anterior sugiere que el ácido oxálico podrían beneficiar la producción de conidios de HE, al aumentar la virulencia de estos (datos no comprobados en este estudio).

Por otra parte en las investigaciones realizadas por Méndez-González (2014) y Porcayo-Loza (2014) se evaluó el efecto del uso de cloranfenicol como antibiótico en la viabilidad de conidios de *M. anisopliae* CP-OAX, en donde no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, sin uso de antibiótico o utilizando 250 y 500 ppm, comprobando así que los antibióticos disminuyen la viabilidad de los conidios para *M. anisopliae*. En cuanto a la producción de conidios no existe diferencia significativa, entre la producción en columna empacada y bolsa, para ambos autores, es por ello que se decidió utilizar solo bolsa de polipapel, para la producción en este trabajo.

Con respecto a la producción sin antibiótico y a la susceptibilidad de contaminación bacteriana del sustrato, Méndez-González (2014), en un tratamiento en que utilizó arroz lavado, esterilizado y conservado a 4°C, 48 h antes de su inoculación, no presentó diferencia significativa en la producción de conidios con respecto a un tratamiento en donde el arroz se mantuvo a temperatura ambiente después de la esterilización. Por esta razón en el presente estudio el arroz se mantuvo a 4°C después de la esterilización y tres horas antes de inocular, lo cual benefició la producción de conidios de *Metarhizium* sin uso de antibiótico, además del uso de ácido oxálico.

## 7.7. Producción sobre 50 g de arroz con 0.075 M de ácido oxálico

La producción de conidios se realizó sobre arroz adicionando ácido oxálico en una concentración 0.075 M, logrando obtener un pH del medio de 5.4 en promedio, ya que con esto se previene la contaminación por bacterias, a la cual está expuesto el medio de cultivo utilizado. Se logró producir la cantidad de seis lotes de las cepas estudiadas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201, se muestran resultados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Producción y calidad de conidios de 6 lotes producidos sobre 50 g de arroz a 10 días.

<i>M. robertsii</i> Xoch-8.1	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Promedio
<b>Producción (conidios gssi<sup>-1</sup>)</b>	1.08×10 <sup>9</sup>	1.11×10 <sup>9</sup>	1.38×10 <sup>9</sup>	8.40×10 <sup>8</sup>	6.36×10 <sup>8</sup>	1.33×10 <sup>9</sup>	1.06×10 <sup>9</sup> ± 2.86×10 <sup>8</sup>
<b>Viabilidad (%)</b>	80	60	84	76	61	42	67.2 ± 15.8
<b>Germinación (%)</b>	NR*	NR*	71	77	84	88	80.2 ± 7.8
<i>M. brunneum</i> ABNMa 201	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Promedio
<b>Producción (conidios gssi<sup>-1</sup>)</b>	1.57×10 <sup>9</sup>	1.16×10 <sup>9</sup>	1.80×10 <sup>9</sup>	9.52×10 <sup>8</sup>	8.62×10 <sup>8</sup>	1.63×10 <sup>9</sup>	1.33×10 <sup>9</sup> ± 3.89×10 <sup>8</sup>
<b>Viabilidad (%)</b>	61	59	47	99	49	46	59.9 ± 19.9
<b>Germinación (%)</b>	91	90	100	94	88	93	93.8 ± 4.6

\*NR=No registrado, la prueba de germinación para estos lotes se realizó con sólo agar-agua. No se encontró diferencia significativa utilizando prueba de comparación de medias de Tukey (P > 0.05).

La producción de conidios no mostró diferencia en los diferentes lotes (Tukey, P > 0.05), tampoco se muestra diferencia significativa entre la producción de conidios de la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 y la cepa comercial *M. brunneum* ABNMa 201, que es lo que se esperaba al realizar escalamiento de 10 a 50 g de arroz, para predecir que el proceso de producción se mantiene constante en cuanto a la producción de conidios y que la cepa de *Metarhizium* aislada de la Ciudad de México no muestra diferencia con la cepa comercial ante este parámetro, con producciones cercanas a 1×10<sup>9</sup> conidios gssi<sup>-1</sup>. Estos resultados coinciden con lo que reportó Estefes-Chávez (2015), ya que en su estudio encontró que la producción para las cepas de la CDMX fue del 1-2×10<sup>9</sup> conidios gssi<sup>-1</sup>, aunque para otros autores la producción máxima de

conidios es mayor, por ejemplo para Prakash *et al.* (2008), la producción fue de  $6.2 \times 10^{10}$  conidios gssi<sup>-1</sup> sobre el mismo sustrato.

Con lo que respecta a las pruebas de calidad de los conidios producidos, en la tabla 7 se muestran tanto porcentaje de viabilidad y germinación, para este último se encontró diferencia significativa del lote 1 y 2 con respecto de los demás lotes, esto pudo deberse a que se utilizó un medio de crecimiento diferente. Respecto a la viabilidad y germinación de conidios producidos sobre arroz, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre lotes ni entre cepas. Las variaciones en el resultado de producción de conidios y viabilidad se pueden deber a pequeñas variaciones durante el proceso de producción, tales como: humedad, temperatura y a que el método en sí presenta variabilidad por el tipo de prueba realizada, debida a pequeños errores experimentales que pueden surgir durante el conteo de UFC y en las diluciones.

El porcentaje de germinación para la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 mostró valores mínimos en los lotes 1 y 2 (6 y 5 % de germinación respectivamente) debido al uso de agar-agua como medio para la prueba, efecto que no se ve reflejado en la cepa comercial. El agar-agua, es sólo un soporte, en cambio el agar SDA es un medio más rico en nutrientes con una relación carbono nitrógeno ideal para el crecimiento de los hongos, por lo anterior se puede decir que la cepa comercial tolera condiciones nutricionales más pobres que la cepa de la CDMX.

La producción de estructuras infectivas para *Metarhizium* está asociada con la privación de fuente de nitrógeno o estrés nutricional. *Metarhizium* genera un cambio metabólico para adaptarse a diferentes nichos. Además algunos insectos contienen una mezcla compleja de fuentes de carbono como aminoácidos, ácidos carboxílicos, lactato y algunos ácidos grasos, consecuentemente *Metarhizium* debe asimilar estas fuentes de carbono alternativas para colonizar e invadir al insecto, usando rutas alternas como el ciclo del glioxalato (Lovett y St. Leger, 2015). En este caso la cepa comercial tiene una ventaja sobre la cepa de la CDMX, debido a que se adapta con mayor facilidad a otros medios de cultivo que pudieran generarle estrés. Como se puede observar en la tabla 7 no existe diferencia entre cepas utilizando el mismo

medio de crecimiento y para el caso de *M. brunneum* no se muestran diferencia estadísticamente significativas entre los lotes producidos. Por lo anterior se puede deducir que la cepa procedente de la Ciudad de México, es más susceptible a pequeños cambios en su producción, aunque en las mejores condiciones, presenta un comportamiento similar y en ocasiones con mejores resultados en comparación con la cepa comercial evaluada.

### **7.8. Calidad del formulado y vida de anaquel**

Se evaluaron distintas condiciones de almacenamiento de la formulación propuesta (polvo humectable que es la más común), la cual se elaboró con conidios de las cepas estudiadas (*M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201) y con tierra de diatomeas Celite® 501 como soporte inerte. Los resultados se muestran en la tabla 8, de las formulaciones a 25°C con y sin aire, a 4°C con aire y como referencia a “espora libre” 25°C sin aire y 4°C con aire. Conforme a los resultados obtenidos (Tabla 8), se puede observar que el porcentaje de humedad en general muestra un incremento conforme transcurre el tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos, aunque para los conidios sin formular que comúnmente se denomina “espora libre”, este parámetro incrementa en mayor proporción (de 5-6% inicial y llega hasta 10-14%) con respecto a los conidios en formulación (2% inicial hasta 6% máximo). Debido a las condiciones no herméticas en que se almacenaron los formulados, era de esperarse dicho incremento en el porcentaje de humedad.

Para el caso de la contaminación presente en los formulados, se observó diferencia significativa entre cepas y entre tratamientos al transcurrir el tiempo ( $P < 0.05$ ), esto se debe a que durante el proceso de formulación, los conidios se encuentran expuestos a diferentes condiciones adversas en donde se pueden contaminar, es por esta razón que algunos autores proponen que este porcentaje de contaminación sea menor al 5% en productos comerciales al momento del empacado (Garza-Urbina y Montes-Torres, 2000), lo cual se cumple en las cepas analizadas. Lo anterior nos

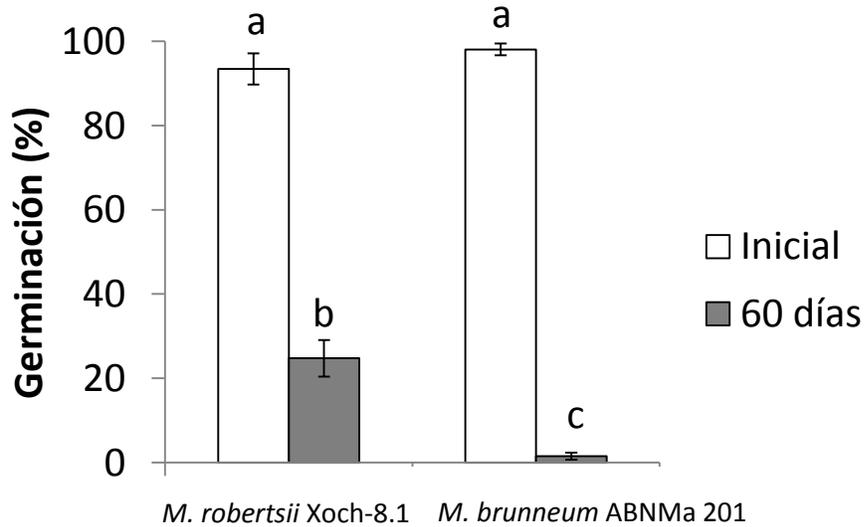
indica que los microorganismos ajenos presentes también pierden viabilidad durante el tiempo al igual que los conidios en la formulación.

Con respecto a la viabilidad, se muestra en algunos casos que disminuyó conforme se aumentó el tiempo de almacenamiento, aunque no es una tendencia general en todos los tratamientos, ya que en otros se mantuvo, lo que indica que el método de conservación a 4°C puede ser un método adecuado, comparado con aquellos en los que la viabilidad disminuye considerablemente y en algunos casos llega a cero (condición a 25°C sin aire). Datos similares se muestran en la prueba de germinación, que para efectos de reproducibilidad (menor error experimental), es la prueba que fue considerada para la comparación de tratamientos. Cabe mencionar que el parámetro evaluado como porcentaje de viabilidad no se ha reportado hasta el momento, como parte de la calidad de productos comerciales o formulados.

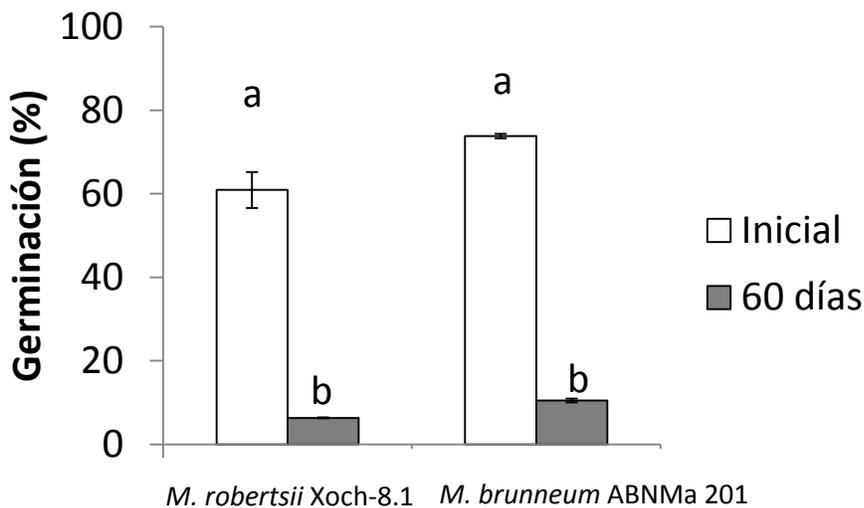
Como se puede observar en la tabla 8, el porcentaje de germinación no presenta variaciones debidas a errores experimentales tanto como la viabilidad. En este contexto, se puede decir que el porcentaje de germinación en general disminuye conforme pasa el tiempo de almacenamiento de los conidios mantenidos ya sea a 25°C con o sin aire y espora libre o en formulación (Figura 23 y 24), este hecho es significativo en los resultados, ya que el mayor efecto en las pruebas de calidad para determinar la vida de anaquel, para este estudio, no es la cantidad de aire en el empaque, sino el efecto de la temperatura, ya que tanto los conidios libres como formulados a 4°C mantienen su viabilidad durante el tiempo, hasta por 120 días (Figura 25 y 26). Esta temperatura es cercana a la propuesta por Arzumanov *et al.* (2005), quienes mencionan almacenar los conidios a 5°C para mantenerlos por seis semanas.

En un estudio similar, se comprobó que existe un efecto negativo por parte del oxígeno en los conidios en almacenamiento (Arzumanov *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2010), hecho que no es comprobable en este estudio. Para la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1, en la condición a 25°C con aire, los conidios presentan una disminución de la germinación durante el tiempo del 73.5%, mientras que a 25°C sin aire la disminución de la germinación es considerablemente mayor (98.5%), lo que indica que con

oxígeno la disminución es menor. Para el caso de la cepa comercial *M. brunneum* ABNMa201, no existió diferencia significativa en el porcentaje de disminución de la germinación durante el tiempo con aire y sin aire (89.7% y 85.8% respectivamente) (Figura 23 y 24).



**Figura 23.** Resultado de porcentaje de germinación de espора libre almacenada a 25°C con aire para *Metarhizium* de la CDMX y cepa comercial. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (prueba de "t", P < 0.05).

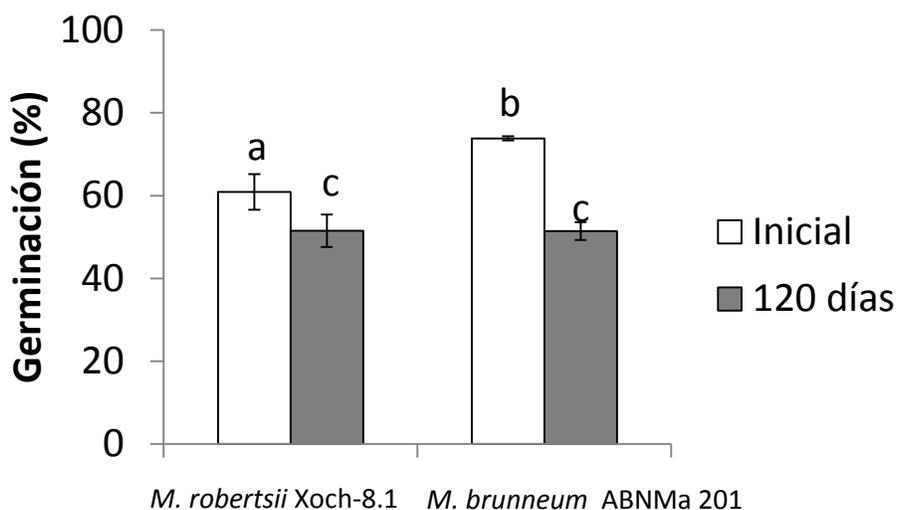


**Figura 24.** Resultado de porcentaje de germinación de formulado almacenado a 25°C con aire para *Metarhizium* de la CDMX y cepa comercial. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (prueba de "t", P < 0.05 para Xoch-8.1 y para ABNMa 201).

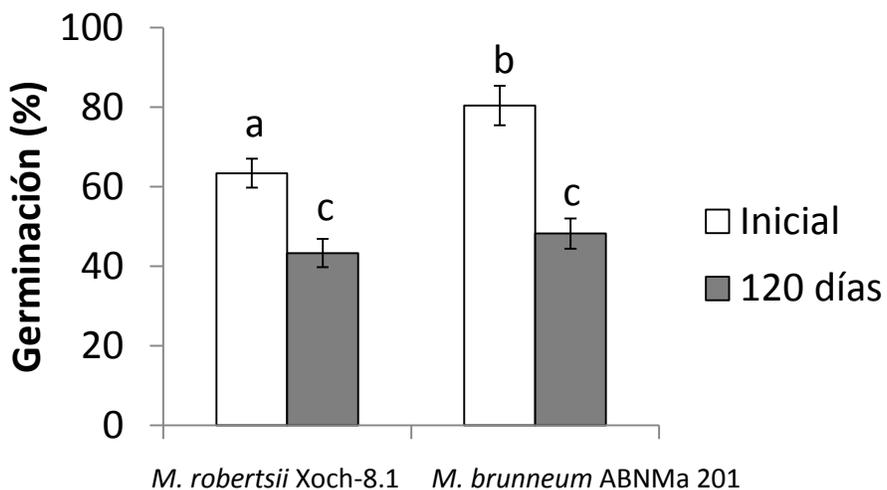
**Tabla 8.** Pruebas de calidad evaluadas durante el tiempo de almacenamiento de la formulación para *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201.

Prueba	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1 espora libre 25°C sin aire					<i>M. brunneum</i> ABNMa 201 espora libre 25°C sin aire				
	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días
Humedad (%)	6.17 ± 0.72	7.57 ± 0.39	10.95 ± 0.97	ND	ND	5.22 ± 0.59	6.84 ± 0.07	12.35 ± 0.92	ND	ND
Germinación (%)	63.40 ± 3.65	24.40 ± 5.00	0.67 ± 0.58	ND	ND	80.40 ± 4.95	43.70 ± 2.70	33.50 ± 0.50	ND	ND
Viabilidad (%)	30.87 ± 5.68	17.67 ± 11.38	0.13 ± 0.20	ND	ND	26.27 ± 6.67	6.13 ± 0.87	5.20 ± 1.54	ND	ND
Contaminación (%)	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.00 ± 0.00	ND	ND	0.94 ± 0.06	0.94 ± 0.06	2.77 ± 0.25	ND	ND
Prueba	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1 formulado 25°C con aire					<i>M. brunneum</i> ABNMa formulado 25°C con aire				
	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días
Humedad (%)	2.95 ± 0.54	3.03 ± 1.02	4.06 ± 0.62	ND	ND	3.10 ± 0.71	3.11 ± 0.67	3.50 ± 0.26	ND	ND
Germinación (%)	93.47 ± 3.70	49.09 ± 15.36	24.73 ± 4.32	ND	ND	98.07 ± 1.40	58.74 ± 4.36	1.49 ± 0.85	ND	ND
Viabilidad (%)	74.92 ± 6.10	29.83 ± 8.83	11.89 ± 1.58	ND	ND	56.33 ± 5.13	28.61 ± 4.90	0.67 ± 0.33	ND	ND
Contaminación (%)	3.66 ± 0.17	0.34 ± 0.10	0.77 ± 0.06	ND	ND	1.69 ± 0.43	2.70 ± 1.44	0.90 ± 0.35	ND	ND
Prueba	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1 formulado 25°C sin aire					<i>M. brunneum</i> ABNMa formulado 25°C sin aire				
	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días
Humedad (%)	2.17 ± 0.39	2.83 ± 0.21	3.20 ± 0.55	2.72 ± 0.46	ND	1.95 ± 0.17	2.89 ± 0.41	2.85 ± 0.01	3.48 ± 0.24	ND
Germinación (%)	60.90 ± 4.30	42.50 ± 2.09	6.33 ± 0.13	0.33 ± 0.58	ND	73.80 ± 0.50	53.59 ± 1.14	10.50 ± 0.44	0.00 ± 0.00	ND
Viabilidad (%)	32.53 ± 6.67	26.60 ± 8.31	2.27 ± 1.01	0.53 ± 0.20	ND	36.67 ± 9.46	20.07 ± 2.03	3.40 ± 0.69	0.30 ± 0.20	ND
Contaminación (%)	1.17 ± 0.15	0.17 ± 0.15	0.00 ± 0.00	30.43 ± 2.68	ND	1.64 ± 0.06	1.60 ± 0.36	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	ND
Prueba	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1 espora libre 4°C con aire					<i>M. brunneum</i> ABNMa 201 espora libre 4°C con aire				
	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días
Humedad (%)	6.17 ± 0.72	8.88 ± 0.27	13.68 ± 1.05	13.91 ± 3.26	14.82 ± 2.40	5.22 ± 0.59	7.36 ± 0.32	11.49 ± 0.99	9.34 ± 0.31	10.30 ± 0.22
Germinación (%)	63.40 ± 3.65	64.35 ± 5.76	65.00 ± 3.08	56.26 ± 3.25	43.33 ± 3.57	80.40 ± 4.95	65.97 ± 6.93	68.92 ± 1.33	61.60 ± 0.53	48.23 ± 3.80
Viabilidad (%)	30.87 ± 5.68	37.87 ± 6.69	30.40 ± 3.01	61.73 ± 9.12	35.60 ± 2.08	26.27 ± 6.67	42.27 ± 7.92	26.93 ± 5.18	44.00 ± 2.00	36.67 ± 5.00
Contaminación (%)	0.83 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.17 ± 0.15	1.47 ± 1.10	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.06	0.23 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Prueba	<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1 formulado 4°C con aire					<i>M. brunneum</i> ABNMa 201 formulado 4°C con aire				
	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días	inicial	30 días	60 días	80 días	120 días
Humedad (%)	2.17 ± 0.39	2.78 ± 0.41	3.50 ± 0.30	3.51 ± 0.39	5.91 ± 0.16	1.95 ± 0.17	2.70 ± 0.48	3.30 ± 0.89	3.15 ± 0.58	3.66 ± 0.54
Germinación (%)	60.90 ± 4.30	64.17 ± 2.65	65.90 ± 0.85	61.95 ± 1.94	51.53 ± 3.91	73.80 ± 0.50	74.77 ± 0.32	74.47 ± 3.08	62.95 ± 0.40	51.43 ± 2.14
Viabilidad (%)	32.53 ± 6.67	52.47 ± 7.45	70.13 ± 20.84	51.87 ± 3.21	45.20 ± 8.61	36.67 ± 9.46	37.60 ± 2.68	38.00 ± 2.65	42.67 ± 5.22	32.00 ± 0.80
Contaminación (%)	1.17 ± 0.15	0.60 ± 0.10	0.40 ± 0.69	1.07 ± 0.47	0.00 ± 0.00	1.64 ± 0.06	1.64 ± 0.06	0.00 ± 0.00	1.03 ± 0.23	0.00 ± 0.00

\*ND: No Determinado. Se muestran resultados de calidad de conidios sin formular y para la formulación propuesta a distintas condiciones de almacenamiento temperatura 4 y 25°C, para esta última con aire y sin aire en las bolsas.



**Figura 25.** Resultado de porcentaje de germinación de formulado almacenado a 4°C con aire para *Metarhizium* de la CDMX y cepa comercial. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (prueba de "t",  $P < 0.05$ ).



**Figura 26.** Resultado de porcentaje de germinación de espora libre almacenada a 4°C con aire para *Metarhizium* de la CDMX y cepa comercial. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (prueba de "t",  $P < 0.05$ ).

Con respecto a los resultados de porcentaje de germinación a través del tiempo, se puede decir que el efecto negativo, no es generalizado para todas las cepas de

*Metarhizium* ni para todos los géneros de hongos entomopatógenos, algunos autores reportan (Miranda-Hernández *et al.*, 2014; García-Ortiz *et al.*, 2015) que al trabajar con géneros diferentes, encuentran efectos distintos en el uso de pulsos oxidantes, algo similar podría ocurrir en el almacenamiento de los conidios con o sin adición de aire, sin considerar el consumo de oxígeno (Faria *et al.*, 2010)

Conforme a los resultados anteriores, se puede decir que para las dos cepas estudiadas, la mejor condición para el almacenamiento fue el formulado a 4°C con aire, ya que se mantiene la germinación y viabilidad de conidios hasta por 120 días y el porcentaje de humedad de la formulación no incrementa significativamente comparada con la espora libre en la misma condición (Tabla 8). Se sabe que el contenido de humedad inicial y la temperatura de almacenamiento de los conidios son los principales factores que influyen en la vida de anaquel (Etheimine *et al.*, 2013), ya que el hecho que el porcentaje de humedad aumente, podría generar que los conidios comiencen a germinar y con el paso del tiempo pierdan drásticamente viabilidad. Moore *et al.* (1995) demostraron que a 8°C, se pueden mantener conidios de *M. flavoviridae* en formulación seca (conidios secos o en silica gel). Por otra parte, a temperatura ambiente (25-35°C), la formulación con aceite no resultó adecuada para el almacenamiento de conidios de la misma cepa (Stathers *et al.*, 1993).

Para el caso en la condición a 4°C, se estima que el tiempo de vida de anaquel del formulado será de 120 días, ya que en este punto se ha llegado al 50% de la germinación, después de este tiempo ya no es recomendable el uso de este tipo de productos en el mercado (datos de la ficha técnica de Metarsil®). En contraste, cuando el almacenamiento es a 25°C la vida de anaquel será 30 días como máximo. Lo ideal para el almacenamiento de formulaciones de HE sería mantener su viabilidad por más de 18 meses (Etheimine *et al.*, 2013). Etheimine *et al.* (2013), evaluaron formulaciones basadas en aceite, pasta y polvo para *M. acridum* (Green Muscle®) y encontraron que se mantiene la germinación de los conidios (66-72 %) durante seis meses de almacenamiento a temperatura entre 23-38°C, independientemente de la formulación; después de 10 meses únicamente permanecen viables los conidios formulados en polvo a la misma temperatura. Sin embargo, a temperatura de -1.2 a 15°C no se mostró

pérdida significativa de la germinación durante 30 meses, además de la permanencia de la virulencia del hongo contra *Schistocerca gregaria* Forskal (Ortóptera: Acrididae).

Otro estudio realizado por Alves *et al.* (1996) mostró que *B. bassiana* perdió viabilidad en menos de cinco meses, bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente independientemente del tipo de formulación, en contraparte los conidios en formulaciones y mantenidos en refrigeración (6°C), o en congelación de -10 a -7°C, presentaron 100% de germinación después de siete años, cabe mencionar que las formulaciones incluían talco y silica gel.

Los tiempos de almacenamiento en estudios anteriores para otras cepas de *Metarhizium* son mayores comparado con lo obtenido para las dos cepas de estudio, aunque la mayoría muestra que todas las formulaciones tienen alta estabilidad cuando se almacenan a temperaturas bajas y no existe fluctuación ni cambios de temperatura. A continuación se muestran los resultados de las pruebas de infectividad realizadas a los conidios en formulación en las diferentes condiciones de almacenamiento (Tabla 9 y 10).

La última prueba de calidad del formulado, se trata de la infectividad, en la cual al inicio de la formulación (Tabla 9), no se encontró diferencias estadísticas significativas entre las cepas con respecto a la infectividad sobre el insecto modelo *T. molitor*, cabe resaltar que el tratamiento con tierra de diatomeas no causó mortalidad en el insecto, lo que indica que el uso de este soporte inerte no genera ningún efecto en la mortalidad del insecto (en realidad se está utilizando un soporte inerte que no interviene en la formulación).

Para el final del período de almacenamiento (80 días) tampoco se encontraron diferencias significativas entre cepas, aunque como se puede ver el porcentaje de mortalidad no fue mayor al 20%, con excepción de la cepa comercial que llegó al 49% de mortalidad (Tabla 10).

Como se puede observar sólo se tiene el resultado de infectividad para las cepas en formulado y espora libre almacenadas a 4°C, debido a que en la condición a 25°C con y sin aire, antes del período final de almacenamiento, ambas cepas no provocaron mortalidad al cabo de 14 días.

**Tabla 9.** Parámetros de infectividad de formulado y espora libre al inicio de la formulación. “e” espora libre y “f” formulado.

PARÁMETRO	Xoch-8.1 e		Xoch-8.1 f		ABNMa 201 e		ABNMa 201 f		Diatomeas
<b>S (%)</b>	71.02	± 17.54	23.3	± 11.6	32.33	± 23.76	22	± 7.64	ND
<b>k (d<sup>-1</sup>)</b>	0.54	± 0.18	0.16	± 0.14	0.34	± 0.19	0.20	± 0.04	ND
<b>to (d)</b>	6.67	± 1.03	3.58	± 2.58	5.65	± 0.57	4.29	± 1.08	ND
<b>TL<sub>50</sub> (d)</b>	9.71 *	± 0.87	9.77	± 1.89	11.12	± 3.74	9.57	± 0.88	ND
<b>R<sup>2</sup></b>	0.94		0.98		0.98		0.96		ND

Parámetros obtenidos con el modelo propuesto  $S = (100 - S_f) * e^{-k(t-t_0)} + S_f$ . Donde  $S_f$  es la sobrevivencia final,  $S$  es la sobrevivencia al tiempo  $t$ ,  $k$  es la tasa de mortalidad específica y  $t_0$  es el tiempo requerido para lograr la primera muerte y  $TL_{10}$  es el tiempo requerido para llegar al 90% de la sobrevivencia.

**Tabla 10.** Parámetros de infectividad de la formulación y espora libre almacenadas a 4°C con aire después de 80 días de almacenamiento. “e” espora libre y “f” formulado.

PARÁMETRO	Xoch-8.1 e		Xoch-8.1 f		ABNMa201 e		ABNmA201 f	
<b>S (%)</b>	78.66	± 11.90	72.86	± 4.87	86.66	± 5.78	83.33	± 5.78
<b>k (d<sup>-1</sup>)</b>	3.10	± 4.47	0.17	± 0.18	9.25	± 3.94	4.32	± 4.04
<b>to (d)</b>	5.50	± 3.14	4.11	± 2.43	5.63	± 3.70	2.97	± 0.89
<b>TL<sub>10</sub> (d)</b>	6.61	± 3.12	10.74	± 5.08	6.44	± 3.11	4.56	± 0.06
<b>R<sup>2</sup></b>	0.98		0.91		0.99		0.97	

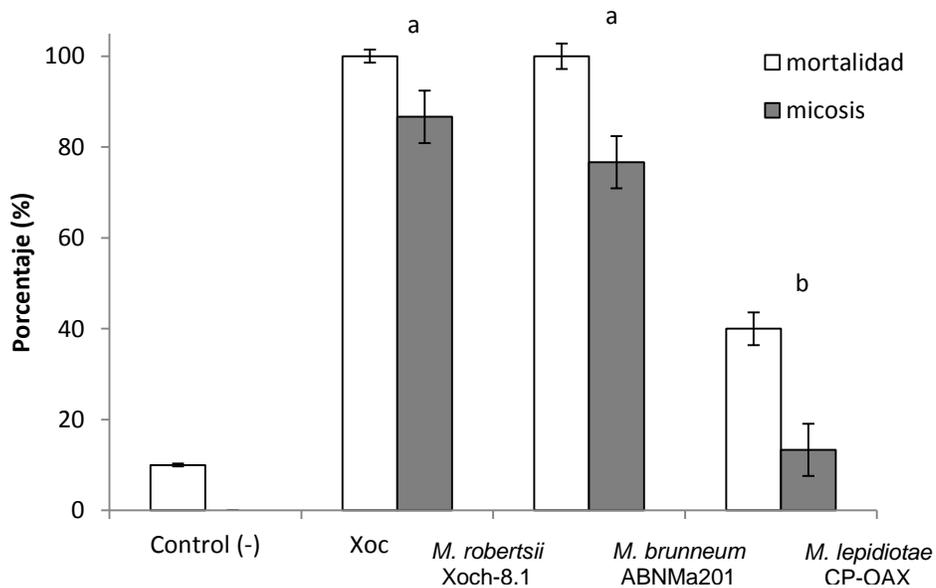
Parámetros obtenidos con el modelo propuesto  $S = (100 - S_f) * e^{-k(t-t_0)} + S_f$ . Donde  $S_f$  es la sobrevivencia final,  $S$  es la sobrevivencia al tiempo  $t$ ,  $k$  es la tasa de mortalidad específica y  $t_0$  es el tiempo requerido para lograr la primera muerte y  $TL_{10}$  es el tiempo requerido para llegar al 90% de la sobrevivencia.

Con base en los resultados anteriores se puede corroborar que la mejor condición de almacenamiento es 4°C, aunque la infectividad de las cepas es mínima al cabo de 80 días y con respecto al almacenamiento a 25°C, se tiene una vida de anaquel  $\leq 30$  días. Un problema común que se presenta en la producción masiva de HE, son cambios genéticos (degeneración). Butt *et al.* (2006), expresan que los HE sufren degeneración cuando se cultivan continuamente en medios ricos en nutrientes, tales como el arroz, lo que puede generar modificaciones que afectan algunos determinantes de virulencia, cambios en color de la colonia, morfología o disminución en la producción de metabolitos. Las pruebas de infectividad realizadas muestran en algunas ocasiones

mayor infectividad y en otras menos porcentaje de mortalidad en el mismo tipo de insecto (*T. molitor*), que tal vez sea inherente a una disminución de la virulencia de las cepas, debida por constantes resiembras de los hongos o por variaciones mínimas en las pruebas que generan cambios importantes en la respuesta de los hongos.

### 7.9. Patogenicidad sobre plagas de importancia económica: Picudo del nopal y chapulín de la milpa.

Se muestran los resultados de la prueba de patogenicidad sobre picudo de nopal de las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201 (Figura 27).



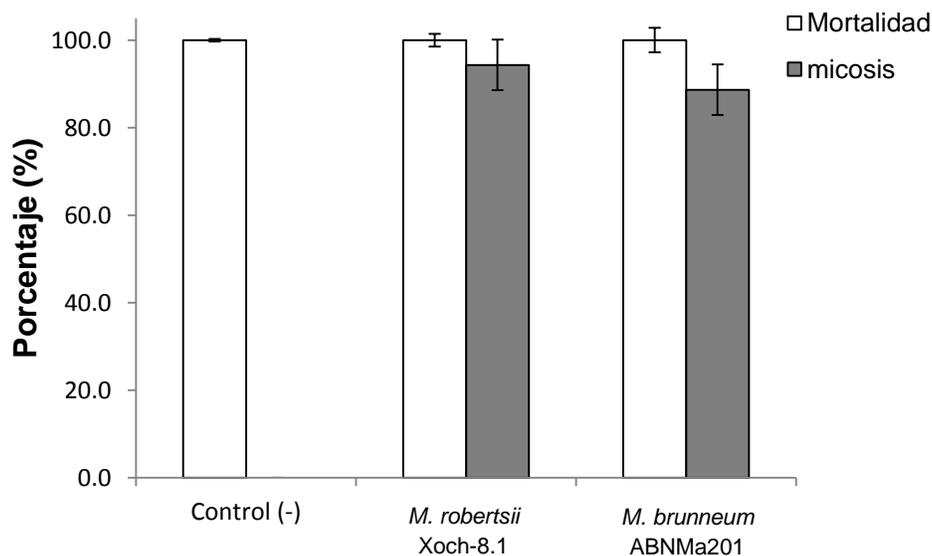
**Figura 27.** Porcentaje de mortalidad y micosis sobre picudo del nopal a 20 días. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).



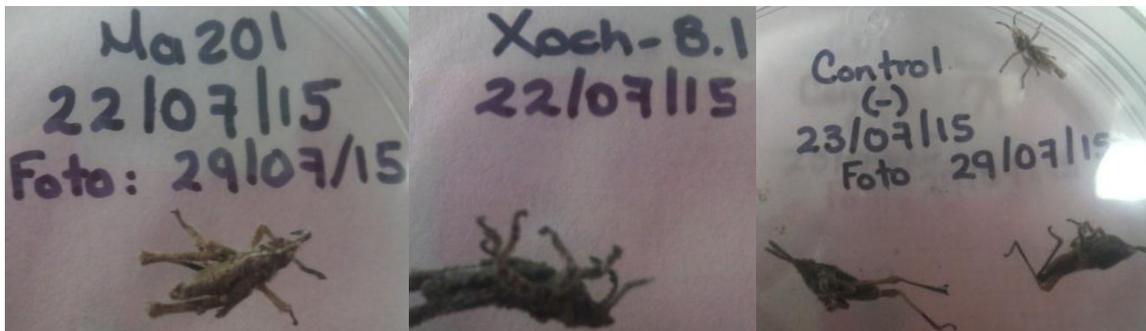
**Figura 28.** Muestra de insectos micosados (*C. spinolae*), para corroborar la muerte por el hongo.

De acuerdo con lo que se muestra las tres cepas de *Metarhizium* utilizadas en el bioensayo contra el picudo de nopal son capaces de infectar y matar a esta plaga (Figura 27), mostrando diferencias durante el proceso de infección, en el tiempo y en el porcentaje de mortalidad. Las cepas más virulentas en contra del picudo de nopal a nivel laboratorio fueron *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201 con un 100% de mortalidad a los 7 y 9 días respectivamente, la cepa *M. lepidiotae* CP-OAX mostró comparativamente menor infección con un 40% de mortalidad a los 16 días posteriores a la inoculación (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Por otra parte el chapulín y la langosta voladora, son ortópteros de importancia agrícola en México, ya que se presentan como plaga de cultivos como el maíz. En México se han implementado campañas de sanidad vegetal en Chihuahua, Guanajuato, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Yucatán, Campeche y Tabasco usando a *M. anisopliae* var. *acridum* como control biológico (García-Gutierrez y González-Maldonado, 2013). Se muestran los resultados de la prueba de patogenicidad sobre chapulín de la milpa de las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201 (Figura 29).



**Figura 29.** Porcentaje de mortalidad y miosis sobre chapulín de la milpa, sin diferencias estadísticas (Tukey,  $P > 0.05$ ).



**Figura 30.** Muestra de insectos micosados (*S. purpurascens*) para corroborar la muerte por el hongo.

Con respecto a los resultados obtenidos de la prueba de patogenicidad de las cepas contra el chapulín de la milpa, se puede observar (Figura 29) que los insectos sometidos al tratamiento control presentaron igual mortalidad que los insectos tratados con ambas cepas, esto pudo deberse a que dependiendo del instar del insecto plaga se determina la susceptibilidad del mismo a las condiciones abióticas, por ejemplo Rodríguez-del Bosque (2007), menciona que etapas iniciales de los insectos (huevos o larvas pequeñas) son susceptibles a factores abióticos, los que provocan una alta mortalidad. En este estudio se utilizaron insectos de segundo y tercer instar lo que pudo influir en que sólo al mantener a los insectos en cautiverio haya provocado la mortalidad de los mismos, aunque también la mortalidad observada en el control se presentó después de que se encontraron las primeras larvas infectadas por los hongos, además de que en el control no se encontraron insectos micosados, lo que indica que la muerte fue ocasionada por otras causas y no por micosis. Cabe mencionar que de acuerdo con lo observado en la experimentación los chapulines son más sensibles a condiciones de cautiverio que los picudos del nopal. Otro punto importante a mencionar es que los insectos fueron mantenidos en cuarentena antes de los tratamientos, por lo que se disminuye el riesgo de que los insectos tuvieran alguna predisposición de mortalidad. De acuerdo con lo que se observa en Figura 28 y Figura 30, ambas cepas (*M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa 201), fueron patógenas para los dos insectos tratados,

este hecho le confiere a ambas cepas beneficios, ya que por un lado el uso de una cepa endémica es de relevancia, al estar aclimatada a las condiciones de la región (Xoch-8.1). Por otro lado, el hecho de que una cepa que fue extraída de un cierto hospedero (picudo de chile), en este caso la cepa comercial puede tener un mayor número de hospederos, como es el caso de picudo del nopal y chapulín. En México se ha mostrado la conveniencia de aislar cepas de HE adaptadas a las condiciones climáticas de cada zona geográfica, ya que en cada región existen microclimas, los cuales definen la efectividad del hongo en campo (De la Rosa *et al.*, 2000; Montesinos-Matías *et al.*, 2011), es por ello que el CB por conservación utiliza cepas endémicas para el control de plagas (Barrera-Gaytán, 2007). Actualmente *Metarhizium* sp. es uno de los HE más importante y es usado para diferentes tipos de insectos plaga como: termitas, langosta, saltamontes, cucaracha, mosca pinta, mariposa nocturna, escarabajos, gorgojos o picudos, mosca blanca, trips, mosquitos y garrapatas. Estos incluyen a un gran número de órdenes de insectos: Ortóptera, Hemíptera, Lepidóptera, Díptera, Coleóptera (Zimmermann, 2007), es por ello que posiblemente las cepas de estudio presentan la capacidad de infectar a los insectos tratados.

Aunque algunos HE suelen ser específicos para cierto tipo de insecto, como *M. acridum* que ha sido ampliamente utilizado para el control de Ortópteros, como: *S. purpurascens* (Guerrero-Guerra *et al.*, 2013) en México; en Australia el producto comercial Green Guard® resulta eficaz para *Chortoicetes terminifera* Walker (Ortóptera: Acrididae), *L. migratoria* y otras especies (Hunter *et al.*, 2005), mientras que el producto Green Muscle® resulta eficaz para el control de *S. gregaria* (Etheimine *et al.*, 2013). También existen productos comerciales que se utilizan contra especies de insectos distintas a la recomendada en ficha técnica, tal es el caso de Metarril® SP Organic, el cual resultó ser patógeno contra *Rhipicephalus microplus* Canestrini (Ixodida: Ixodidae), cuando la ficha técnica indica que el producto se basa en conidios de *M. anisopliae* útil para el control de *Mahanarva fimbriolata* Stal (Hemíptera: Cercopidae) (Camargo-Guedes *et al.*, 2014). Otro caso similar fue presentado por Albuquerque *et al.* (2005) donde *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. anisopliae* var. *acridum* resultaron con potencial para el control de la plaga *Nasutitermes coxipoensis* Holmgren (Isóptera: Termitidae), es por

esta razón que las cepas estudiadas que son de diferente especie pueden presentar potencial para el control del picudo de nopal y chapulín de la milpa.

### **7.10. Prueba de aplicación con mochila**

La aplicación en campo de HE para el control de plagas de importancia económica ha sido ampliamente estudiada. Diferentes autores han propuesto condiciones para la evaluación en campo, tanto de insecticidas químicos como de bioplaguicidas (Torres-Barragán *et al.*, 2004; Hernández-Torres *et al.*, 2006; Mellín-Rosas *et al.*, 2012). En este estudio, se realizó una prueba de aplicación utilizando equipo convencional, para corroborar que la formulación propuesta y los conidios producidos no generaban problemas técnicos de aplicación.

Un punto importante para este trabajo, es que la formulación que se está proponiendo, cuenta con la capacidad de ser aplicable, ya que otros autores (Arnaud *et al.*, 2005; CNRCB, 2011; Luz *et al.*, 2012; ; Sabbour *et al.*, 2012; Camargo-Guedes *et al.*, 2014) proponen usar otras marcas de tierra de diatomeas (tamaño de partícula de 5-8  $\mu\text{m}$ ); mientras que algunas empresas utilizan tierra de diatomeas Celite® 289 (tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ), para formulaciones en polvo humectable para *Metarhizium*. En este estudio se utilizó tierra de diatomeas Celite® 501, la cual maneja un tamaño de partícula mayor a la propuesta (9  $\mu\text{m}$ ), con resultados favorables al momento de la aplicación con mochila de motobomba. El uso de tierra de diatomeas Celite® 501 con tamaño de partícula mayor a la reportada, muestra que es posible aumentar la versatilidad de los productos usados para formular, incluyendo materiales de mayor disponibilidad en el mercado.

## 8. RESÚMEN DE RESULTADOS

- La identificación molecular con beta tubulina y factor de elongación permiten separar con claridad las especies de *Metarhizium*.
- Existe diferencia entre las cepas aisladas de la CDMX. La cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 produjo conidios con rendimientos y calidad similares a la cepa comercial. Esta cepa endémica fue más susceptible al uso de aditivos que disminuyen el riesgo de contaminación bacteriana, como el ácido oxálico.
- El uso de ácido oxálico a una concentración 0.075 M, no modificó la producción de conidios de HE, por lo que se sugiere como alternativa al uso de antibiótico sin afectar significativamente el rendimiento.
- Los conidios de las cepas *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201, tienen la capacidad de infectar a plagas como el picudo de nopal y chapulín de la milpa. Además que la aplicación de la formulación propuesta con tierra de diatomeas Celite 501® es factible con equipo convencional.

## 9. CONCLUSIONES

La cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 produce conidios con rendimientos similares a la cepa comercial METASIN® de Agrobionsa® (*M. brunneum* ABNMa201), sin embargo resultó más susceptible a la presencia de ácido oxálico como inhibidor de crecimiento bacteriano, aunque sus conidios fueron de calidad similar a los conidios producidos por la cepa comercial.

En ensayos de patogenicidad hacia plagas de importancia económica, *C. spinolae* y *S. purpurascens*, la cepa de *M. robertsii* Xoch-8.1 causó niveles de mortalidad semejantes a los de una cepa comercial (*M. brunneum* ABNMa201).

## 10. PERSPECTIVAS

- Corroborar que los resultados obtenidos, son una base para predecir lo que sucedería en campo, con una evaluación cuantitativa en invernadero o en campo, considerando: ciclo de vida de la plaga, hábitos del insecto, condiciones climáticas y migratorias, período de aplicación, entre otros, para verificar si existe diferencia en la efectividad entre la cepa *M. robertsii* Xoch-8.1 y *M. brunneum* ABNMa201.
- Estudiar el efecto del uso de ácido oxálico en la producción de conidios, sobre la virulencia de los HE.

## 11. GLOSARIO

**Actividad de agua ( $a_w$ ):** Se define como la variación entre la presión de vapor de agua en un sustrato (P) y la presión de vapor del agua pura ( $P_0$ ) a la misma temperatura y presión.  $a_w = P/P_0$ .

**Bioensayo:** Desde el punto de vista agronómico es una metodología utilizada para determinar la respuesta de un insecto plaga u organismo benéfico a los insectos. Se compone de dos variables, el estímulo (variable independiente o insecticida) y la respuesta que es el efecto que produce la aplicación del estímulo.

**Blastoespora:** Estado prolifero de algunos hongos que puede ser producido en fermentación líquida.

**Conidio:** es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena. Aparecen en hongos: Zygomycetes, Ascomycetes y algunos Basidiomycetes.

**Espaciador transcrito interno (ITS):** Regiones no codificantes que separan los componentes individuales de las unidades de ADN ribosómico que muestran mayor polimorfismo de secuencias que las propias regiones génicas y por tanto son útiles como fuente de marcadores genéticos para el *locus* del ADN ribosómico.

**Germinación:** Proceso en el cual un conidio es capaz de crear un tubo germinativo de un tamaño del doble del diámetro del conidio, esto no asegura su viabilidad.

**Hifa:** Elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de hongos que conforma su estructura vegetativa.

**Hemocele:** Cavidad general secundaria de los artrópodos que constituye un sistema lleno de líquido hemático (aparato circulatorio).

**Hemolinfa:** Líquido interno de los invertebrados, generalmente incoloro, que contiene nutrientes y escasos de oxígeno.

**Infectividad:** incluye dos componentes, la habilidad para entrar al hospedero y la capacidad para reproducirse dentro de él, se determina el tiempo en que el microorganismo infecta al hospedero ( $TL_{50}$ ).

**In silico:** Expresión que significa “hecho por computadora” o vía simulación computacional.

**Manejo integrado de plagas (MIP):** Combinación de métodos de control incluyendo el biológico, cultural, mecánico, físico, legal y químico para reducir los niveles de daño de una plaga por debajo de un umbral económico, con bajos efectos dañinos al ambiente y organismos que no sean objetivo de éste.

**Ooteca:** Es el depósito de huevos que forman algunos moluscos e insectos.

**Patogenicidad:** Es la habilidad innata de un organismo para infectar un hospedero y causar enfermedad o la agresividad en la capacidad del patógeno de invadir y establecerse dentro del huésped, no considerando el tiempo ni la concentración utilizada (% mortalidad).

**Plaguicida:** Insumo fitosanitario destinado a prevenir, repeler, combatir y destruir a los organismos biológicos nocivos a los vegetales tales como: insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, molusquicidas, nematocidas y rodenticidas.

**Rizosfera:** Es la parte del suelo inmediata a las raíces vivas, en donde se da una interacción única y dinámica entre las raíces de plantas y microorganismo del suelo.

**Sapróbio:** hongo que crece sobre materia en descomposición

**Viabilidad:** Proceso en el cual un conidio es capaz de germinar y llegar a formar una colonia (UFC).

**Virulencia:** Es la severidad de la enfermedad en la infección del hospedero, que se determina con la medida de dosis respuesta ( $CL_{50}$  o  $DL_{50}$ ).

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves-Michel, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R. y Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum rifai* en diferentes sustratos orgánicos. Revista Chapingo. Serie horticultura, 14(2): 185-191.
- Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, J. R. y Howard, R. W. (2004). Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. Journal of Economic Entomology, 97(2): 273-280.
- Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos entomopatógenos, pp. 132-140. En: Rodríguez del-Bosque, L. A. y Arredondo-Bernal, H. C. (eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Albuquerque, C. A., Pereira, C. A. K., Cunha, M. F., Veiga F. S. L., Athayde, C. R. A. y Lima, A. L. A. E. (2005). Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Neotropical entomology, 34(4): 585-591.
- Alves, S. B., Pereira, R. M., Stimac, J. L. y Vieira, S. A. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. Biocontrol Science and Technology, 6(4): 575-582.
- Ángel-Cuapio, A. (2011). Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. Pp. 24-51.
- Arnaud, L., Lan, H. T. T., Brostaux, Y., y Haubruge, E. (2005). Efficacy of diatomaceous earth formulations admixed with grain against populations of *Tribolium castaneum*. Journal of Stored Products Research, 41(2): 121-130.
- Arzumanov, T., Jenkins, N. y Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochemistry, 40(3): 1037-1042.
- Ash, G. J. (2010). The science, art and business of successful bioherbicides. Biological Control, 52(3): 230-236.
- Athanassiou, C. G. y Steenberg, T. (2007). Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). Biological control, 40(3): 411-416.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Serna-Domínguez, M. G., Arredondo-Bernal, H. C. y Montesinos-Matías, R. (2015). Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. Biocontrol Science and Technology, 25(10): 1192-1207.
- Barranco-Flrido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-González, G. y Saucedo-Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme and Microbial Technology, 30(7): 910-915.

- Barrera-Gaytán, J. F. (2007). Introducción, filosofía y alcance del control biológico, pp. 9-15. En: Rodríguez-del-Bosque, L. A. y Arredondo-Bernal, H. C. (eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Behle, R., y Birthisel, T. (2014). Formulations of entomopathogens as bioinsecticides. In: Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens. Academic Press, San Diego, pp. 483-517.
- Berlanga-Padilla, A., Hernández-Velázquez, V. (2003). Ficha técnica CB-23. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Senasica. SAGARPA.
- Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. 58(1): 106-117.
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., y De Croos, J. A. (2001). Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. Applied and Environmental Microbiology, 67(3): 1335-1342.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., y Humber, R. A. (2006). *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia, 98(5): 737-745.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., y Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia, 101(4): 512-530.
- Butt, T. M. y M. Goettel. (2000). Bioassays of entomopathogenic fungi. In: Navon, A. y K. R. S., Ascher (Eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International. Wallingford, Oxon, U. K. Chapter 4. Pp. 141-195.
- Butt, T.M., Wang, C., F. A., Shah y R., Hall. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. pp. 213-226. In: J. Eilenberg y H.M.T. Hokkanen (eds). Progress in biological control. Vol. 2. An ecological and societal approach to biological control. Amsterdam: Springer Netherlands. 322 Pp.
- Camargo-Guedes, M., Marciano, A. F., Sá, F. A., Perinotto, W. M., Quinelato, S., Gôlo, P. S. y Bittencourt, V. R. (2014). Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. Veterinary parasitology, 205(1): 271-276.
- Cañedo, Verónica y Ames, Teresa (2004). Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos, Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). ISBN 92-9060-288-4. Pp. 20-27.
- Carrero-Fernández, J. M. (1996). Lucha Biológica en "Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales". Ediciones Mundi-Prensa. Pp. 43-139.
- Carrillo-Benítez, M.G., Guzmán-Franco, A.W., Alatorre-Rosas, R. y Enríquez-Vara, N.J. 2013. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. Microbial Ecology. 65 (2): 437-449.
- Casals-Bustos, P. (2003). Evaluación de insecticidas en laboratorio. En: Silva-Aguayo, G. y Hepp-Gallo, R. (Eds.) Bases para el manejo racional de insecticidas. TRAMA impresores S.A. de C.V. ISBN. FIA. Chillán, Chile. Pp. 177-195.

- Castrillo, L. A., Roberts, D. W., y Vandenberg, J. D. (2005). The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. *Journal of invertebrate pathology*, 89(1): 46-56.
- Cortés-Miranda H. 2013. Primer Informe de Actividades. Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC). Octubre 2013. Pp. 15-23.
- CNRCB. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. 2011. Resumen gráfico de los eventos y logros de la institución especializada en el control biológico de plagas agrícolas en México en los últimos 20 años. Editores Arredondo, Bernal H., *et al.* Cd. de México. Pp. 21-60.
- De la Rosa, W., Alatorre-Rosas, R., Barrera-Gaytán, J. F. y Toriello-Nájera, C. (2000). Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera:Scolytidae) under field conditions. *Journal Economy Entomology*, 90(9): 1409-1414.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. London, UK: Academic Press. pp 413-415.
- Driver, F., Milner, R. J. y Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(02): 134-150.
- Estefes-Chávez, A. (2015). Evaluación de la producción y calidad de hongos entomopatógenos aislados de cinco delegaciones agrícolas del Distrito Federal. Tesis de especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp. 1-80.
- Etheimine, M. O., Kane, C. M. H., Ely, S. O., Barry, A., Babah, M. A. O. y Benchekroun, M. (2013). Storability of five new formulations of Green Muscle® (*Metarhizium acridum*) under ambient and low temperatures: evaluation of conidial viability and virulence against desert locust nymphs. *International Journal of Tropical Insect Science*, 33(03): 195-201.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Bidochka, M. J., St. Leger, R. J. y Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1): 295-302.
- Faria, M. R., y Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237-256.
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E. y Wraight, S. P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *Journal of invertebrate pathology*, 105(1): 74-83.
- Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E., Foster, R. N. y Roberts, D. W. (2010). CTC medium: A novel iodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological Control*, 54(3): 197-205.
- Fraqueza-Joao, M. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 212: 76-88.

- García-García, M. A., Capello-García, S., Leshner-Gordillo, J. M., Molina-Martínez, R. F. (2004). Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. KUXULKAB, 15(27). Pp. 25-27.
- García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B. (2013). Monografía: síntesis sobre el uso de bioinsecticidas y otros agentes de control biológico de plagas en México. *Vedalia* 14 (1): 35-42.
- García-Ortiz, N., Tlecuitl-Beristain, S., Favela-Torres, E. y Loera-Corral, Octavio. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (6): 2783-2791.
- Garza-Urbina, E. y Montes-Torres, M. (2000). Evaluación de Bioplaguicidas para el Control de la “Langosta” *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker (Orthoptera: Acrididae) en la Planicie Huasteca. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Guanajuato, Guanajuato. Pp. 152-155.
- Gastelum, L. (2010). Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades. Programa de Desarrollo Agropecuario y Rural en la Ciudad de México. Gaceta Oficial del Distrito Federal, 10 de febrero de 2010.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B. y Dam, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37(3): 179-191.
- Guerrero-Guerra, C., del Roció Reyes-Montes, M., Toriello-Nájera, C., Hernández-Velázquez, V., Santiago-López, I., Mora-Palomino, L. y Calderón-Ezquerro, C. (2013). Study of the persistence and viability of *Metarhizium acridum* in Mexico's agricultural area. *Aerobiologia*, 29(2): 249-261.
- Guindon, S. y Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52(2): 696-704.
- Gutiérrez-Pulido, H. y De la Vara-Salazar, R. (2012). Experimentos con un solo factor (Análisis de Varianza) En: análisis y diseño de experimentos. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V. 3a edición. Pp. 52-69.
- Hallsworth, E.J. y Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74(3): 261-266.
- Haug, M. C., Tanner, S. A., Lacroix, C., Stevens, M. J. y Meile, L. (2011). Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. *FEMS microbiology ecology*. 78(2): 210-219.
- Hernández-Domínguez, C., Guzmán-Franco, A. W., Carrillo-Benítez, M. G., Alatorre-Rosas, R., Rodríguez-Leiva, E. y Villanueva-Jiménez, J. A. (2016). Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. *Neotropical Entomology*. 45(1): 80-87.
- Hernández-Torres, I., López-Arroyo, I. J., Berlanga-Padilla, A., Loera-Gallardo J. y Acosta-Díaz, E. (2006). Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homóptera: Aphididae). *Vedalia*, 13(1): 17-26.

- Haug, M. C., Tanner, S. A., Lacroix, C., Stevens, M. J. y Meile, L. (2011). Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. *FEMS microbiology ecology*. 78(2): 210-219.
- Humber, R. A. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures, pp. 317-318 In: Lacey, L. A. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- Hunter, D. M., Milner, R. J. y 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(2): 93-99.
- Hynes, R. K. y Boyetchko, S. M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4): 845-849.
- Ibrahim, L., Butt, T.M., Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106(6): 705-715.
- Iskandarov, U. S., Guzalova, A. G. y Davranov, K. D. (2006). Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(1): 72-76.
- Jaronski, S. y Jackson, M. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales in *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier. pp. 256-271.
- Jarosz-Wilkolazka, A. y Gadd . G. M. (2003). Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere*. 52(3): 541-547.
- Jenkins, N. E. y Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6): 753-777
- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S. y Zimmermann, G. (2004). Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* submerge spores and aerial conidia for the control of locust and grasshoppers. *Biocontrol*. 49(1): 63-81.
- Kawakami, K. (1960). On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. *Bulletin Sericultural Experiment Station*. Japan. 16: 83-99.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. y Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*. 106(4): 811-829.
- Kepler, R. M., Ugine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A. y Rehner, S. A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental microbiology*. 17(8): 2791-2804.
- Kirkland, H.B., Eisa, A., Keyhani, O.N. (2005). Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor. *Journal of Medical Entomology*. 42(3): 346-351.

- Klingen, I. y Haukeland, S. (2006). The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In An ecological and societal approach to biological control. Springer Netherlands. pp. 168-170.
- Korth, K. L., Doege, S. J., Park, S. H., Goggin, F. L., Wang, Q., Gomez, S. K. y Nakata, P. A. (2006). *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology*, 141(1): 188-195.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. y Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological Control*. 21(3): 230-248.
- Lacey, A. y Kaya K. (2007). Application and evaluation of entomopathogens for control of pest insects in mint In *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Second edition. Ed Springer. Pp. 569-603.
- Lee, S.J., Kim, S., Yu, J.S., Kim, J.C., Nai, Y.S. y Kim, J.S. (2015). Biological control of Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) using *Metarhizium anisopliae* JEF-003 millet grain. *Journal of Asia Pacific Entomology*. 18(2): 217-221.
- León-Martínez, G. A. (2007). MIP y enfermedades en maíz y sorgo En "Control de plagas y enfermedades en los cultivos". Grupo latino editores. 21 ed. Bogotá. Pp. 432-475.
- Li, J. y Feng, G.M. (2009). Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits or summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research*. 113(1): 93-99.
- Lopes, B., Martins, I., Souza, A. y Faria, M. (2013). Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112(3): 237-239.
- López-Lastra, C. C., Hajek, A. E. y Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80(10): 1126-1130.
- Lovett, B. y St. Leger, J. R. (2015). Stress is the rule than the exception for *Metarhizium*. *Current Genetic*. 61(3): 253-261.
- Luz, C. W., Rodrigues, J. y Rocha, L. F. (2012). Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. *Acta tropica*. 122(1): 29-35.
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C. y Meile, L. (2012). Identification of *staphylococci* and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food microbiology*. 29(2): 157-166.
- McConn, M. M. y Nakata, P. A. (2002). Calcium oxalate crystal morphology mutants from *Medicago truncatula*. *Planta*. 215(3): 380-386.
- Medina-Canales, Ma. G., Rodríguez-Tovar, A., Manzanilla-López, R. H., Zúñiga, G. y Tovar-Soto, A. (2014). Identification and molecular characterization of new Mexican isolates of *Pochonia chlamydospora* for the management of *Meloidogyne* spp. *Biocontrol Science and Technology*. 24(1): 1-21.

- Mellín-Rosas, M. A., Hernández-Betancourt, I. y Arredondo-Bernal, H.C. (2012). Metodología para la evaluar hongos entomopatógenos contra el Psílido asiático de los cítricos. Colima: Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Méndez-González, J. F. (2014). Selección de un tipo de biorreactor de fermentación en medio sólido para la producción de conidios de *M. anisopliae*. Tesis de especialización en Biotecnología. UAM- Iztapalapa. México, D.F. pp. 10-37.
- Meyling, N. V. (2007). Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual. Pp 3-27.
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera-Corral, O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. Pest Management Science. 70(1): 661-663.
- Moino Jr., A., Alves, S. B., Lopes, R. B., Neves, P. M. O. J., Pereira, R. M. y Vieira, S. A. (2002). External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. Scientia agrícola, 59(2): 267-273.
- Montesinos-Matías, R., Ayala-Zermeño, M. A. y Berlanga-Padilla, A. M. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos, Primera edición. Diseño editorial SENASICA. México. Pp.11-30.
- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Gallardo-Escamilla, F. y Loera-Corral, O. (2011). Variación de fenotipos de crecimiento y de virulencia en cepas mutantes de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. resistentes a 2-desoxi.d.glucosa. Agrociencia. 45(8): 929-942.
- Moore, D., Bateman, R. P., Carey, M. y Prior, C. (1995). Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology, 5(2): 193-200.
- Munir, E., Yoon, J. J., Tokimatsu, T., Hattori, T. y Shimada, M. (2001). A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98(20): 11126-11130.
- Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera-Corral, O. (2010). Effect moisture content and inoculum level over growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. Brazilian Archives of Biology and Technology. 53(4): 771-777.
- Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., López-Collado, J., Valdés-Carrasco, J. M. y Mora-Aguilera, G. (2011). Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. Journal of Applied Microbiology. 111(4): 939-948.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z. y Keyhani, O. N. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. Applied Microbiology and Biotechnology. 9(3): 1057-1068.
- Ouedraogo, R. M., Cusson, M., Goettel, M. S. y Brodeur, J. (2003). Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus

- Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Journal of Invertebrate Pathology 82(2): 103-109.
- Pedrini, N., Crespo, R. y Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 146(1): 125-128.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G. y Baverstock, J. (2014). Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. Journal of invertebrate pathology, 119(1): 54-61.
- Porcayo-Loza, J. (2014). Producción y aplicación en campo de conidios del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México, D.F. Pp. 9-51.
- Posada, D., Crandall y A. K. (1998). ModelTest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. 14:817-818.
- Prakash, B. G., Padmaja, V. y Kiran, S. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technology, 99(6): 1530-1537.
- Rangel-Drauzio, E., Braga, G., Anderson, A. y Roberts, D. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. Journal of Invertebrate Pathology, 88(2): 116-119.
- Rehner, A. S. y Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps telemorphs*. Mycologia. 97(1): 84-98.
- Roberts, D. W. (1981). Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges HD, editor. Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. London: Academic Press. Pp. 441-464.
- Roberts, W. D. (1989). World Picture of Biological Control of Insects by fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 84. Supl. III 89-100
- Rodríguez-del Bosque, L. A. (2007). Fundamentos ecológicos del control biológico, pp. 27-30. En: Rodríguez-del-Bosque, L.A. y Arredondo-Bernal, H. C. (eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Rodríguez-Tovar, A. V. (2004). Transformación genética estable del basidiomiceto ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. pp.
- Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas, R., Viniegra-González, G. y Loera-Corral, O. (2009). Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strain based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. Journal of Invertebrate Pathology. 101(3): 222-227.
- Rodríguez-Gómez, D., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G. y Viniegra-González G., 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 421(25): 513-518.

- Sabbour, M., Abd-El-Aziz, S. y Sherief, M. (2012). Efficacy of three entomopathogenic fungi alone or in combination with diatomaceous earth modifications for the control of three pyralid moths in stored grains. *Journal of Plant Protection Research*. 52(3): 359-363.
- Sahayaraj, K., Borgio, J. F. y Lucini, L. (2014). Route of infection and hematological effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on *Dysdercus cingulatus* (Fab.) adult. *Journal of Basic Microbiology*. 54(1): 6-17.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2009). Programa de trabajo de la campaña: Manejo fitosanitario de maíz, a operar con recursos del componente sanidad e inocuidad del programa de soporte. 2009. Pp. 2-7.
- Seniya, C., Verma, S. K., Trivedia, S. S., Verma<sup>1</sup>, R., Vijayarti<sup>1</sup>, H. S., & Vyas<sup>1</sup>, S. (2012). Metal stress and antibiotic susceptibility profile of some bacterial and fungal strains. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 6(4): 1727-1734.
- Shin, Y. T., Lee, W. W., Ko, H. S, Choi, B. J., Bae, M. S., Choi, Y. J., Lee, S. K., Je, H. Y., Jin, B. R. y Woo, D. S. (2013). Distribution and characterization of entomopathogenic fungi from Korean soils. *Biocontrol Science and Technology*. 23(3): 288-304.
- Silva-Aguayo, G., Rodríguez-M., J. C. y Pizarro-D., D. (2003). Evaluación de insecticidas en laboratorio. En Silva-Aguayo, G. y Hepp-Gallo, R. (Eds.) Bases para el manejo racional de insecticidas. TRAMA impresores S.A. de C.V. ISBN. FIA. Chillán, Chile. pp. 159-168.
- Smith, D., Onions A. H. S. (1994). The preservation and maintenance of living fungi. Second edition. International Mycological Institute. CAB International, UK. 122 p. Wallingford, Oxon, UK. Pp. 20-100.
- Stathers, T. E., Moore, D. y Prior, C. (1993). The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(2): 111-115.
- Steinwender, M. B., Enkerli, J., Widmer, F., Eileberg, J., Kristensen, T. K. y Meyling V. N. (2014). Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology*. 123(1): 6-12.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. y Cooper R.M. (1986). Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanism of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47(1):295-302.
- St. Leger, R. J., Nelson, J. O. y Screen, S. E. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*, 145(10): 2691-2699.
- Takahashi, G., Kalns, L. y Bernal, S. (2012). Plant defense against fall armyworm in micro-sympatric maize (*Zea mays* ssp. *mays*) and balsas teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Entomology Experimentalis et Applicata*. 1(1):145-192.
- Tamez-Guerra, P., Galán-Wong, L. J., Medrano-Roldán, H., García-Gutiérrez, C., Rodríguez-Padilla, C., Gómez-Flores, R. A. y Tamez-Guerra, R. S. (2001).

- Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 4(2): 143-152.
- Taylor, B., Edgington, S., Luke, B. y Moore, D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Stored Products Research*. 53(1): 23-25.
- Tlecuitl-Beristain, S., Viniestra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera-Corral, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169(5): 387-394.
- Teale, C. J. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. *Journal of applied microbiology*. 92(1): 85-89.
- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M., Mercado-Flores, Y., Asaff-Torres, A. y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30(1): 73-80.
- Thomas, R. S. y Elkinton, S. J. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85(3): 146-151.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 2: 4876-4882.
- Torres-Barragán, A., Anaya-Luisa, A., Alatorre-Rosas, R., Toriello-Nájera, C. (2004). Entomopathogenic fungi from “El Eden” Ecological Reserve, Quintana Roo, México. *Mycopathologia* 158(1): 61-65.
- Toriello-Nájera, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V. y Mier, T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Mexicana de Micología*, 28(1): 57-66.
- Toriello-Nájera, C., Pérez-Torres, A., Burciaga-Diaz, A., Navarro-Barranco, H., Perez-Mejia, A., Lorenzana-Jimenez, M. y Mier, T. (2006). Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(2): 278-287.
- Travis, R. G. (2004). Biotechnological potential of entomopathogenic fungi in fungal biotechnology In agricultural food and environmental applications. Ed Marcel Dekker. Pp. 1-5.
- Zimmermann, G., (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 17(9): 879–920.

## Páginas de internet consultadas

- AGRHUSA.<http://www.agrhusa.com.mx/publico/productos/detalle.aspx?SecID=270&ID=5996&m=2>. Fecha de consulta: 13 de Febrero de 2014.
- AGROBIONSA. <http://www.agrobionsa.com/portfolio-view/pae-sin/> fecha de consulta: 14 de febrero de 2014.
- BIOAMIN.<http://www.bioamin.com/servicios-y-productos/bio-insecticidas/insect-biol-4.html>/fecha de consulta: 13 de febrero de 2014.
- BIOCROP. <http://www.bio-crop.com/> fecha de consulta: 13 de febrero de 2014.
- BIONNA.<http://www.bionna.org/company/23/AGROBIOLOGICOS-DEL-NOROESTE-SA-DE-CV>. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014.
- BIOSCIENCE. <http://futurecobioscience.com/es/la-hoja/biopesticidas/> fecha de consulta: 19 de febrero de 2014.
- Catalogue of life. <http://www.catalogueoflife.org/col/search/all>. Fecha de consulta: 22 de marzo de 2016.
- CBORGANIC. <http://www.cborganic.cl/tienda/>fecha de consulta: 13 de febrero de 2014
- CESVDF. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal. 2004. Plagas y Enfermedades de la región de Milpa Alta. Folleto del nopal. <http://api.ning.com/files/folletonopal.pdf>. Fecha de consulta: 5 de Enero de 2014.
- CESAPEG. <http://www.cesaveg.org.mx/2012/> plagas del maíz. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2014.
- EPA. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/index.htm>/fecha de consulta: 7 de febrero de 2014
- FAO. <http://www.fao.org/docrep/>Fecha de consulta: 13 de Enero de 2014.
- GAIA. <http://www.gaiaorganicos.com/hongos.html>/fecha de consulta: 7 de febrero de 2014
- IGLOBAL.<http://www.iglobal.co/méxico/tuxtla-guti-rrez/agrobiotec-insumos-agricolas.html>/fecha de consulta: 13 de febrero de 2014.
- INEGI. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/> fecha de consulta: 5 de Noviembre de 2013.
- INFOLEG.<http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/145000149999/149846/norma.htm>. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2014.
- JOURNALMEX.<https://journalmex.wordpress.com/2013/11/17/desarrollan-bioinsecticida-microencapsulado-para-reducir-perdida-de-cosechas-de-nopal/>. Fecha de consulta: 02 de diciembre de 2015.
- LAVERLAM. <http://www.laverlamintl.com/> fecha de consulta: 14 de febrero de 2014.
- OB. <http://www.organismosbeneficos.com/>fecha de consulta: 12 de febrero de 2014.
- PAOT.<http://www.paot.org.mx/centro/programas/suelo-corena/> fecha de consulta: 1 de diciembre de 2013.

- SAGARPA. [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Estado Distrito Federal/](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Estado_Distrito_Federal/) Fecha de consulta: 5 de Noviembre de 2013.
- SEMARNAP. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/70/plagas.html> plagas del nopal, fecha de consulta: 18 de febrero de 2014.
- TRÓPICO. <http://www.smdeltropico.com/index.php/es/productos/bovetropico>. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014.
- NOTICDMX. [www.noticiasdetuciudad.df.gob.mx](http://www.noticiasdetuciudad.df.gob.mx). Fecha de consulta: 21 de octubre de 2015
- SIAFEG. <http://siafeg.org.mx/boletinplagas?idproblema=1>. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2015.

## ANEXO 1

### Información de especies utilizadas como referencia para análisis filogenético

Colección	Identificación	Origen	Aislado	Número de acceso al GenBank	
				EF 5' 1 $\alpha$	Beta-tub
ARSEF 324	<i>Metarhizium acridum</i>	Australia	Ortóptera	EU248844	EU248812
ARSEF 3391	<i>Metarhizium acridum</i>	Tanzania	Ortóptera	EU248873	
ARSEF 5736	<i>Metarhizium acridum</i>	Madagascar	Ortóptera	EU248878	
ARSEF 5748	<i>Metarhizium acridum</i>	México	Ortóptera	EU248879	
ARSEF 6421	<i>Metarhizium acridum</i>	Senegal	Ortóptera	EU248883	
ARSEF 6592	<i>Metarhizium acridum</i>	Benín	Termita	EU248886	
ARSEF 6597	<i>Metarhizium acridum</i>	Benín	suelo	EU248887	
ARSEF 6600	<i>Metarhizium acridum</i>	Benín		EU248888	
ARSEF 7486	<i>Metarhizium acridum</i>	Nigeria	Ortóptera	EU248845	EU248813
ARSEF 6347	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Colombia	Hemíptera	EU248881	
ARSEF 7450	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Australia	Coleóptera	EU248852	EU248823
ARSEF 7487	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Etiopía	Ortóptera	DQ463996	EU248822
RCEF 6252	<i>Metarhizium anisopliae</i>	China	suelo	KM504951	KM527875
ARSEF 988	<i>Metarhizium brunneum</i>	Japón	Lepidóptera	EU248890	
ARSEF 2107	<i>Metarhizium brunneum</i>	USA	Coleóptera	EU248855	EU248826
ARSEF 3826	<i>Metarhizium brunneum</i>	USA	Díptera	EU248874	
ARSEF 4152	<i>Metarhizium brunneum</i>	Australia	suelo	EU248853	EU248824
ARSEF 4179	<i>Metarhizium brunneum</i>	Australia	suelo	EU248854	EU248825
ARSEF 5198	<i>Metarhizium brunneum</i>	Germania	suelo	EU248876	
ARSEF 5625	<i>Metarhizium brunneum</i>	Finlandia	Coleóptera	EU248877	
ARSEF 6120	<i>Metarhizium brunneum</i>	Argentina	Coleóptera	EU248880	
ARSEF 6392	<i>Metarhizium brunneum</i>	USA	Coleóptera	EU248882	
ARSEF 6477	<i>Metarhizium brunneum</i>	Noruega	Coleóptera	EU248885	
ARSEF 3297	<i>Metarhizium brunneum</i>	China	suelo	XM_014686196	XM_014691600
RCEF 5576	<i>Metarhizium brunneum</i>			KM510159	KM497187
RCEF 0885	<i>Metarhizium brunneum</i>			KM510183	KM527876
RCEF 4874	<i>Metarhizium brunneum</i>			KM510187	KM527880
ARSEF 2133	<i>Metarhizium flavoviridae</i>	Rep. Checa	Coleóptera	DQ463988	EU248827
ARSEF 2025	<i>Metarhizium flavoviridae</i>			KJ398804	KJ398575
ARSEF 4124	<i>Metarhizium frigidum</i>	Australia	Coleóptera	DQ463978	EU248828
ARSEF 7445	<i>Metarhizium frigidum</i>			KJ398818	KJ398590
ARSEF 2596	<i>Metarhizium globosum</i>	India	Lepidóptera	EU248846	EU248814
ARSEF 4303	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Australia	suelo	EU248859	
ARSEF 4321	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Australia	suelo	EU248860	EU248832
ARSEF 4604	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Guinea	Coleóptera	EU248894	
ARSEF 5714	<i>Metarhizium guizhouense</i>			EU248856	EU248829
ARSEF 6238	<i>Metarhizium guizhouense</i>	China	Lepidóptera	EU248857	EU248830
ARSEF 7420	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Australia	Díptera	EU248892	
ARSEF 7502	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Australia		EU248861	EU248833

Colección	Identificación	Origen	Aislado	Número de acceso al GenBank	
				EF 5' 1 $\alpha$	Beta-tub
ARSEF 7507	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Kiribati	suelo	EU248858	EU248831
CBS 258.90	<i>Metarhizium guizhouense</i>	China	Lepidóptera	EU248862	EU248834
RCEF 4126	<i>Metarhizium guizhouense</i>			KM527842	KM527886
RCEF 4127	<i>Metarhizium guizhouense</i>			KM510186	KM527879
ARSEF 4154	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Australia	suelo	EU248891	
ARSEF 4587	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Guinea	Coleóptera	EU248893	
ARSEF 4628	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Australia	suelo	EU248863	EU248835
ARSEF 4660	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Guinea	Coleóptera	EU248895	
ARSEF 7412	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Australia	Coleóptera	EU248864	EU248836
ARSEF 7488	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	Australia	Coleóptera	EU248865	EU248837
RCEF 0987	<i>Metarhizium lepidiotae</i>			KM510181	KM527872
ARSEF 473	<i>Metarhizium majus</i>	Australia	suelo	EU248875	
ARSEF 1015	<i>Metarhizium majus</i>	Japón	Lepidóptera	EU248866	EU248838
ARSEF 1914	<i>Metarhizium majus</i>	Filipinas	Coleóptera	EU248868	EU248840
ARSEF 1946	<i>Metarhizium majus</i>	Filipinas	Coleóptera	EU248867	EU248839
ARSEF 2808	<i>Metarhizium majus</i>	Filipinas	Coleóptera	EU248871	EU248843
ARSEF 4566	<i>Metarhizium majus</i>	Australia	Coleóptera	EU248869	EU248841
ARSEF 7505	<i>Metarhizium majus</i>	Australia	Coleóptera	EU248870	EU248842
ARSEF 297	<i>Metarhizium majus</i>	China	suelo	XM_014723632	XM_014727234
ARSEF 3210	<i>Metarhizium pingshaense</i>	India	Coleóptera	DQ463995	EU248819
ARSEF 4342	<i>Metarhizium pingshaense</i>	Islas Solomon	Coleóptera	EU248851	EU248821
ARSEF 7929	<i>Metarhizium pingshaense</i>	Australia	Isóptera	EU248847	EU248815
CBS 257.90	<i>Metarhizium pingshaense</i>	China	Coleóptera	EU248850	EU248820
RCEF 6276	<i>Metarhizium pingshaense</i>			KP012553	KP032212
RCEF 0988	<i>Metarhizium pingshaense</i>			KM510185	KM527881
ARSEF 23	<i>Metarhizium robertsii</i>	China		XM_007821795	XM_007820079
ARSEF 727	<i>Metarhizium robertsii</i>	Brasil	Ortóptera	DQ463994	EU248816
ARSEF 4739	<i>Metarhizium robertsii</i>	Australia	suelo	EU248848	EU248817
ARSEF 6472	<i>Metarhizium robertsii</i>	USA	Coleóptera	EU248884	
ARSEF 7501	<i>Metarhizium robertsii</i>	Australia		EU248849	EU248818
RCEF 5501	<i>Metarhizium robertsii</i>			KM510179	KM497186
TNS-F 18553	<i>Metarhizium indigoticum</i>			JF416010	KJ398569
NBRC100684	<i>Metarhizium indigoticum</i>			KJ398784	KJ398544