

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN EN CAMPO DE CONIDIOS DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

JAVIER PORCAYO LOZA

INGENIERO BIOQUÍMICO INDUSTRIAL

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

DR. ROBERTO MONTESINOS MATÍAS

DIRECTOR

ASESOR

ASESOR

MÉXICO D.F. AGOSTO DE 2014

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados del CONACyT, en el nivel de Competencia Internacional, con la referencia 001465.

México, D.F., a 29 de Agosto de 2014

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

**PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN EN CAMPO DE CONIDIOS DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae***

que presentó:

I.B.I. Javier Porcayo Loza

Comité tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Roberto Montesinos Matías, Centro Nacional de Referencia de Control
Biológico

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres

Secretario: Dra. Laura Delia Ortega Arenas

Vocal: Dr. Roberto Montesinos Matías

Vocal: Dr. Paul Misael Garza López

Four horizontal lines with handwritten signatures written over them. The signatures are in black ink and appear to be cursive or stylized. The first signature is the most prominent and is written over the top two lines. The other three signatures are written over the bottom three lines.

Agradecimientos y dedicatorias

A mis padres, Alejandra Loza y Joel Porcayo, por todo su amor, apoyo y por creer en mí.

A mis hermanos Jazmín, Jaime y Juan por todo el amor y cariño brindado.

A mis abuelitos, Eustolia y Juan, por ser mis segundos papás.

Al Dr. Octavio Loera por darme la oportunidad de trabajar en su equipo.

Al Dr. Ernesto Favela por permitirme ser planto, por ser un guía, por todo el trabajo y apoyo.

Al Dr. Roberto Montesinos por sus consejos, por su amistad y por cobijarme en tierras lejanas a casa.

Al Dr. Paul M. Garza y la Dra. Laura D. Ortega por sus acertados comentarios.

Al sub-director del CNRCB M. en C. Hugo Arredondo, Ing. Marco Mellín, Jorge Naranjo y Carlos Rodríguez, por todas las facilidades para realizar este trabajo.

A Dulce, por el apoyo incondicional, por su cariño y por todos los momentos juntos.

A Kevin, por todos sus consejos, por ser mí amigo y hermano en todo momento.

A Ximena, por su apoyo, cariño y amistad.

A mis amigos de la UAM, Memo, Nohemí, Luis, Miguel, Liz, Carmen, Aurelio, Jorge, Luis V., Juan, Oswaldo, Cuapio, Miranda, Adrián, Gaby; porque sin ustedes la vida en la UAM hubiera sido aburrida.

A todos, gracias totales.

Resumen

Por más de 60 años los plaguicidas han sido la herramienta frecuente para el control de insectos, maleza y enfermedades de plantas. Sin embargo, en las últimas décadas la producción de conidios de hongos entomopatógenos para ser utilizados como agentes de control biológico ha tomado gran importancia.

El objetivo de este trabajo fue producir en cultivo en medio sólido lotes de conidios de *Metarhizium anisopliae*, realizar pruebas de calidad a los lotes producidos y comparar los resultados obtenidos en laboratorio con los resultados de infectividad obtenida en tres evaluaciones en campo.

Se establecieron las siguientes condiciones de crecimiento y producción de conidios de *M. anisopliae*; temperatura de incubación de 28°C, humedad inicial del sustrato de 45% y tasa de aireación de 0.1 VKgM. Para ello, se analizó la corriente gaseosa que atravesó biorreactores tubulares de vidrio en un metabolímetro; lo cual, permitió calcular parámetros asociados al crecimiento como el tiempo lag (t_{lag}), la tasa máxima de producción de CO₂ ($rCO_{2\ max}$), la mineralización del carbono (PCO₂) y diferentes tasas específicas de producción de CO₂ (μ) asociadas a diferentes etapas de crecimiento.

Además, se demostró que la germinación y la viabilidad (medida como UFC, unidades formadoras de colonia) de los conidios, son parámetros de calidad que deben de considerarse distintos; ya que, se pueden obtener valores para la germinación superiores al 80% y solo tener viabilidad del 40%.

Debido a que la geometría del biorreactor no afectó la producción de conidios, se optó por utilizar bolsas de polipapel para la producción de los lotes de conidios, los cuales se utilizaron en las pruebas de infectividad en condiciones controladas y de campo.

Se realizaron pruebas de infectividad en condiciones controladas bajo dos metodologías para la evaluación del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59 contra el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) (*Diaphorina citri*) vector del HLB.

Al utilizar la técnica de aspersión el 23.6% de las ninfas desarrollaron micosis; con la técnica de inmersión el 25% de las ninfas fueron susceptibles al hongo entomopatógeno.

Además, en tres evaluaciones en campo realizadas sobre arboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) infestados por *D. citri*, se obtuvo una infectividad máxima de 17.8 y 4.8 % para ninfas y adultos respectivamente, sin que los resultados fueran reproducibles en distintas fechas y predios utilizados.

La relación entre la infectividad obtenida en condiciones controladas y en campo se estableció en uno de diez casos posibles. Esto demuestra que en condiciones reales de campo existen factores bióticos y abióticos que son difíciles de predecir y controlar.

Índice

Resumen	IV
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	IX
Lista de abreviaturas	XI
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica.....	2
2.1.Control biológico	2
2.2.Hongos entomopatógenos	3
2.2.1.Proceso de infección	4
2.2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
2.3.Producción de Hongos Entomopatógenos.....	9
2.3.1.Cultivo en medio sólido	10
2.4.Pruebas de control de calidad	11
2.5.Ensayos en campo	14
2.6.Psílido Asiático de los Cítricos <i>Diaphorina citri</i>	16
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos	20
5.1.Objetivo general.....	20
5.2.Objetivos particulares	20
6. Materiales y Método.....	21
6.1.Microorganismo	21
6.2.Conservación de la cepa	21
6.3.Producción de lotes de conidios	22
6.3.1.Producción del inóculo	22
6.3.2.Uso de cloranfenicol y su efecto sobre la viabilidad	22

6.3.3. Producción de conidios en cultivo en medio sólido	23
6.3.4. Estimación de parámetros cinéticos	24
6.4. Pruebas de calidad de conidios	29
6.4.1. Germinación	30
6.4.2. Viabilidad	30
6.4.3. Pruebas de infectividad de <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas de <i>D. citri</i> en condiciones controladas	31
6.5. Evaluación de la efectividad de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en campo	33
6.6. Relación de la infectividad entre laboratorio y campo	38
6.7. Análisis estadístico	38
7. Resultados y Discusiones	40
7.1. Conservación por liofilización	40
7.2. Producción del inóculo	40
7.3. Efecto del cloranfenicol sobre la viabilidad	41
7.4. Producción de conidios en CMS	42
7.4.1. Temperatura	43
7.4.2. Humedad	45
7.4.3. Tasa de aireación	51
7.4.4. Producción de conidios en CMS en biorreactores con diferentes geometrías	55
7.5. Bioensayos	57
7.6. Efectividad de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en ninfas de <i>D. citri</i> en campo	60
7.7. Relación de la infectividad laboratorio-campo	65
8. Conclusiones	67
9. Perspectivas	68
10. Literatura citada	69
Glosario de términos	85

 Índice de tablas

Tabla 1. Hongos entomopatógenos utilizados como micoinsecticidas. Modificada de Deacon (2006) y Zimmermann (2007).	4
Tabla 2. Clasificación de metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. Modificada de Khachatourians (1996) y Téllez-Jurado <i>et al.</i> (2009).....	6
Tabla 3. Ejemplos de insectos plaga que han sido reportados por ser hospederos de <i>M. anisopliae</i>	9
Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de la eficacia de las pruebas biológicas en campo y condiciones de uso	15
Tabla 5. Composición de los dos medios de cultivo probados para la propagación de <i>M. anisopliae</i> Ma59	22
Tabla 6. Composición del medio ADS-D para medir la viabilidad (UFC) del hongo <i>M. anisopliae</i> Ma59	30
Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en CMS incubado a diferentes temperaturas.....	43
Tabla 8. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en CMS utilizando diferentes humedades en el sustrato.	46
Tabla 9. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>M. anisopliae</i> Ma59 incubado con dos tasas de aireación.).....	51
Tabla 10. Producción de conidios de <i>M. anisopliae</i> en diferentes biorreactores reportadas por distintos autores	57
Tabla 11. Resultados del bioensayo por aspersión utilizando plantas de <i>Murraya paniculata</i>	57
Tabla 12. Resultados del bioensayo por inmersión utilizando brotes de <i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	59
Tabla 13. Porcentaje de la población de <i>D. citri</i> micosada en las diferentes evaluaciones en campo	60
Tabla 14. Distribución de la población por brote en la 1era evaluación	62
Tabla 15. Distribución de la población por brote en la 2da evaluación.....	62
Tabla 16. Distribución de la población en la 3era evaluación en campo	63
Tabla 17. Datos del clima durante las tres evaluaciones de campo.	64
Tabla 18. Evaluaciones realizadas con la cepa de <i>M. anisopliae</i> Ma59 contra <i>D. citri</i> en diferentes localidades de la República Mexicana (SENASICA, 2013)	65

Índice de figuras

Fig. 1. Proceso de infección de insectos por hongos entomopatógenos. Modificada por Thomas y Read (2007) y Miranda (2010)	5
Fig. 2. Principales etapas en el ciclo de infección de <i>M. anisopliae</i> . A) Germinación del conidio y formación del apresorio, B) ataque al micelio por hemocitos posterior a la penetración de la cutícula, C) blastosporas producidas por el hongo para su dispersión en el hemocele del insecto, D) cadáver mostrando la emergencia de las hifas productoras de conidios E), CO: conidio, AP: apresorio. La barra indica un tamaño de 5 μm . Modificada de Gao et al. (2011).7	7
Fig. 3. A) Adulto del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), B) huevos y ninfas jóvenes del PAC, C) micrografía con epifluorescencia de un huevo del PAC, D) instares ninfales del PAC, E) ninfa, exuvia (Ex) y excreción, F) toma realizada con un microscopio de barrido de electrones que muestra la inserción del estilete (Sb) del PAC, G) micrografía con epifluorescencia del nervio medio de una hoja de cítrico mostrando la envoltura salival del PAC dentro del floema (Ph); Xy: xilema, H-K) microscopía confocal mostrando la bacteria <i>Candidatus Liberibacter</i> en el floema de una hoja infectada (H) y en diferentes tejidos de un PAC infectado (I-K), incluyendo a la cámara filtro (Fc), intestino medio (Md), glándulas salivales (Sg) y tejido graso (Ft). Modificada de Hall et al. (2012).	17
Fig. 4. Esquema general para el análisis en el metabolímetro de un CMS. Donde 1) compresor de aire, 2) regulador de presión, 3) pesera con agua a temperatura controlada, 4) biorreactores, 5) deshumidificadores, 6) válvulas solenoide, 7) medidor de flujo, 8) detector de CO ₂ infrarrojo, 9) venteo, 10) controlador lógico programable, 11) data logger M6+, 12) ordenador. Modificada de Torres (2013) y Solicitud de patente MX/a/2013/004638	25
Fig. 5. Perfil de la tasa de producción y de la producción acumulada de CO ₂ de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en un CMS utilizando arroz como sustrato	26
Fig. 6. Logaritmo natural de los datos de producción CO ₂ de <i>M. anisopliae</i> Ma59. Los puntos rojos muestran los datos utilizados para el cálculo del t_{lag}	27
Fig. 7. Ajuste de la etapa II de los datos de producción de CO ₂ de <i>M. anisopliae</i> Ma59 al modelo logístico	28
Fig. 8. Ajuste con un modelo lineal de las etapas III y IV de los datos de producción de CO ₂ de <i>M. anisopliae</i> Ma59	29
Fig. 9. Metodologías utilizadas en los bioensayos. A) Aspersión de una planta de <i>M. paniculata</i> ; B) brote de <i>C. aurantifolia</i> inoculado y colocado en cámara húmeda.....	32
Fig. 10. Segmentación de los predios utilizados. A) Primera evaluación; B) segunda evaluación y C) tercera evaluación en campo. Los óvalos gris claro significan árboles tratados y los óvalos gris oscuro fueron árboles buffer sin tratar.	34

Fig. 11. Etapas de la evaluación en campo A) marcaje de los brotes, B) preparación de la suspensión de conidios, C) aspersión de los conidios, D) caja de Petri en un árbol de limón para evaluar la germinación de la suspensión asperjada y E) corte del brote cinco días después de la aspersión.....	35
Fig. 12. Tratamiento de los brotes de los árboles de limón mexicano (<i>C. aurantifolia</i> Swingle) que fueron asperjados con una suspensión de conidios del hongo entomopatógeno <i>M. anisopliae</i> Ma59. Donde A) traslado de los brotes de campo a laboratorio en condiciones frías, B) clasificación de la población presente en cada brote con ayuda de un microscopio estereoscópico, C) ninfas muertas de <i>D. citri</i> en caja Petri, D) incubación a 28°C en condiciones de cámara húmeda de los brotes clasificados, E-F) ninfas y adultos de <i>D. citri</i> micosados con el hongo <i>M. anisopliae</i> Ma59	37
Fig. 13. Crecimiento de <i>M. anisopliae</i> Ma59 sobre medio ADS a los A) 3 d, B) 5 d y c) 7 d de incubación	41
Fig. 14. Viabilidad de la suspensión de <i>M. anisopliae</i> Ma59 con diferentes concentraciones de cloranfenicol	42
Fig. 15. Gráfico que presenta el comportamiento de la velocidad durante el secado de arroz	48
Fig.16. Isotherma de desorción del arroz. Los círculos negros corresponden a los datos experimentales y la línea continua al modelo de Henderson	49
Fig. 17. Perfil axial de la conidiación de <i>M. anisopliae</i> Ma59. Izquierda) biorreactor con una tasa de aireación de 0.1 VKgM; Derecha) biorreactor con una tasa de aireación de 0.8 VKgM	53
Fig. 18. Perfil axial de producción de conidios de <i>M. anisopliae</i> en los biorreactores con una tasa de aireación de 0.1 VKgM.....	54
Fig. 19. Producción de conidios de <i>M. anisopliae</i> Ma59 en diferentes geometrías de biorreactores. Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey: P < 0.05)	56
Fig. 20. Resumen de los datos de porcentaje de la población que desarrolló micosis en las diferentes evaluaciones.	66

Lista de abreviaturas

ADS: agar dextrosa Sabouraud

ADS-D: agar dextrosa Sabouraud más desoxicolato de sodio

ANDEVA: análisis de varianza

CB: control biológico

CHE-CNRCB: Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

cm: centímetros

CML: cultivo en medio líquido

CMS: cultivo en medio sólido

CNRCB: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

CO₂: dióxido de carbono

d: días

ec: ecuación

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en Ingles

g: gramo

gms: gramo de masa seca

h: horas

HaPcA: harina de avena, peptona de carne, agar

Hg: mercurio

HLB: huanglongbing

K: tasa específica de muerte

kg: kilogramo

l: litro

Ln: logaritmo natural

m: metro

MC: mortalidad corregida

Mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

O₂: oxígeno molecular

PC: población control

PCO₂: producción de CO₂

*PCO*₂: productividad de la producción de CO₂

PLC: controlador lógico programable, por sus siglas en ingles

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

ppm: partes por millón

PSI: libra-fuerza por pulgada cuadrada, por sus siglas en ingles

r_{CO_2} : tasa de producción de CO_2

$r_{CO_2_{max}}$: tasa máxima de producción de CO_2

T_0 : tiempo de inicio de muerte

TL_{50} : tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad

T_{lag} : tiempo lag

T_r : tiempo residual

UFC: unidad formadora de colonia

μ : tasa específica de producción de CO_2

μL : microlitro

μm : micrómetro

μm^2 : micrómetro cuadrado

USA: Estados Unidos de América, por sus siglas en ingles

UV: ultravioleta

Y: porcentaje de sobrevivencia de insectos al final del bioensayo

1. Introducción

Por más de 60 años los plaguicidas han sido la herramienta frecuente para el control de insectos, maleza y enfermedades de plantas. El interés en el control biológico (CB) se ha incrementado por el desarrollo de resistencia de las plagas a plaguicidas (Heckel, 2012), aunado a la preocupación pública del uso de productos químicos y su impacto generalizado en la salud humana, seguridad alimentaria y al medio ambiente (Moore y Prior, 1993; Auld y Morin, 1995; Henry *et al.*, 2012; Whitehorn *et al.*, 2012).

En el 2004 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) reportaron que todos los años se registran entre uno y cinco millones de casos de intoxicación por plaguicidas, con varios miles de muertos, entre ellos niños. Casi todos los casos de intoxicación se presentan en zonas rurales de países en desarrollo, donde la protección y el correcto manejo de estas sustancias suelen ser inadecuados o inexistentes. Aunque estos países utilizan sólo el 25% de la producción mundial de plaguicidas, es en ellos donde se da el 99% de las muertes por intoxicación con estas sustancias.

Frente a los riesgos para la salud y el medio ambiente que ocasiona el uso de agroquímicos, es necesario que el gobierno de México impulse de forma amplia y programada alternativas viables dirigidas a reducir y/o eliminar una dependencia de tales compuestos; que nos sitúan en una posición relevante como consumidores a nivel mundial (García y Mier, 2010).

En el presente trabajo se describe la estrategia para la producción masiva de conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59. Además, se hace énfasis en los parámetros de calidad que se deben de considerar en los lotes de producción. Como último, se explica la relación entre los parámetros de calidad obtenidos en laboratorio y la infectividad de los conidios contra el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) obtenida en tres evaluaciones en campo realizadas en el estado de Colima, México.

2. Revisión bibliográfica

En esta sección se da la definición de CB, el papel de los hongos entomopatógenos en el control de plagas y su proceso de infección. Además, se mencionan las metodologías más usadas en el control de calidad y la importancia de las evaluaciones en campo de los micoinsecticidas, haciendo énfasis en el control del PAC.

2.1. Control biológico

Se denomina CB al estudio, importación, conservación y aumento de organismos benéficos para la supresión de poblaciones plaga (Rodríguez-del-Bosque, 2012a). De acuerdo con el mismo autor el CB puede interpretarse de tres formas:

- A. Campo de estudio con diferentes áreas, tales como ecología de poblaciones, biosistemática, comportamiento, fisiología y genética.
- B. Fenómeno natural, debido a que la mayoría de las especies cuentan con enemigos naturales que regulan sus poblaciones.
- C. Estrategia de control de plagas a través de la utilización de parasitoides, depredadores y patógenos.

El CB como disciplina científica y como estrategia de combate de plagas ha tenido un avance significativo en nuestro país en la última década. En México, existen más de 60 organizaciones y empresas privadas que ofertan agentes de CB, incluyendo insectos, hongos, virus, bacterias y nemátodos (Rodríguez y Arredondo, 1999; García y Mier, 2010), lo que demuestra el gran interés que existe en los agricultores por utilizar este tipo de organismos.

En las últimas décadas, los bioplaguicidas incluyendo a los parasitoides, depredadores, agentes microbianos, extractos botánicos y polvos, han sido objeto de investigación y desarrollo.

La principal dificultad en el uso de bioplaguicidas microbianos es la expectativa que se tiene de estos productos; un bioplaguicida que reemplaza a un insecticida organosintético debe reemplazarlo en forma, función y aplicación. Esto es raro que ocurra, ya que es difícil similar el efecto “knock-down” que se logra con los insecticidas organosintéticos (Alatorre, 2006).

2.2. Hongos entomopatógenos

El primer intento de controlar una plaga con un agente fúngico se llevó a cabo en Rusia en 1888, con el hongo que ahora conocemos como *M. anisopliae* (Metschn) (Faria y Wraight, 2007). Actualmente, existen numerosos métodos para el uso de hongos entomopatógenos contra insectos plaga (Travis, 2003).

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos agrupados en 100 géneros, pero pocos son estudiados intensivamente. Este tipo de microorganismos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, como el agua, suelo y partes aéreas. Por su proceso característico de infección, los hongos entomopatógenos son los microorganismos más importantes que infectan insectos chupadores; como áfidos, mosquita blanca, escamas, chicharritas y chinches (Alatorre-Rosas, 2007).

La mayoría de los hongos Hyphomycetes producen grandes cantidades de conidios pequeños (<10 µm) que se aglutinan en masas densas. Los conidios aéreos poseen una pared hidrofóbica que les confiere estabilidad ambiental. Estas características contribuyen significativamente a la producción eficiente y a la estabilidad en la conservación; lo que ha hecho de los conidios aéreos los propágulos más usados en las formulaciones comerciales (Wraight *et al.*, 2001; Jaronski y Jackson, 2012).

Los hongos entomopatógenos que se enlistan en la Tabla 1 pueden producir grandes cantidades de conidios asexuales en cultivos a gran escala. Además, se considera que poseen baja toxicidad hacia mamíferos y se han reportado pocos casos de impacto sobre organismos no blanco (Travis, 2003; Konrad *et al.*, 2012).

Tabla 1. Hongos entomopatógenos utilizados como micoinsecticidas. Modificada de Deacon (2006) y Zimmermann (2007).

Hongo entomopatógeno	Hospedero	Ejemplos
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Lepidoptera, Coleoptera, Ortoptera, Hemiptera, Himenoptera	Lepidoptera: mariposas y polillas; Diptera: voladores; Homoptera cochinillas; Coleoptera
<i>Beauveria bassiana</i>	Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Ortoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, Embioptera.	escarabajos; Himenoptera: avispas y abejas; Ortoptera: saltamontes y langostas; Hemiptera: insectos chupadores;
<i>Isaria fumosorosea</i>	Lepidoptera, Diptera, Homeoptera, Himenoptera, Aracnida.	Aracnida: arañas y ácaros.

2.2.1. Proceso de infección

Una de las principales ventajas de los hongos entomopatógenos respecto a las bacterias y virus utilizados en el CB es que no requieren ser ingeridos por el insecto plaga para generar la infección (Kamp y Bidochka, 2002).

La adhesión del conidio a la cutícula del insecto se da mediante interacciones hidrofóbicas no específicas (Wösten, 2001). Se ha reportado que la hidrofobicidad de los conidios puede incrementarse por acción de lipasas, esto ocurre cuando la actividad lipolítica de la fosfolipasa C libera ácidos grasos libres presentes en la cutícula, favoreciendo la adhesión de los conidios al insecto (Santi *et al.*, 2010). Del mismo modo, la unión de los conidios puede lograrse mediante interacciones específicas debido a reconocimiento de moléculas como hemaglutininas, glucosa y N-acetilglucosamina (Hegedus y Khachatourians, 1995).

Los hongos penetran a los insectos hospederos (Fig. 1) a través del tegumento, especialmente a nivel de los pliegues intersegmentales; estos pliegues comprenden las uniones entre segmentos o alrededor de las piezas bucales. La penetración del insecto es un proceso mecánico favorecido por la producción de diversas enzimas, incluidas proteasas, quitinasas y lipasas (Zimmermann, 2007; Montesinos-Matías *et al.*, 2011a). Durante esta etapa y el comienzo de la invasión, el hospedero desarrolla

actividades de respuesta como la producción de fenoloxidasas, de hemocitos específicos y la melanización (Dubovskiy *et al.*, 2013).

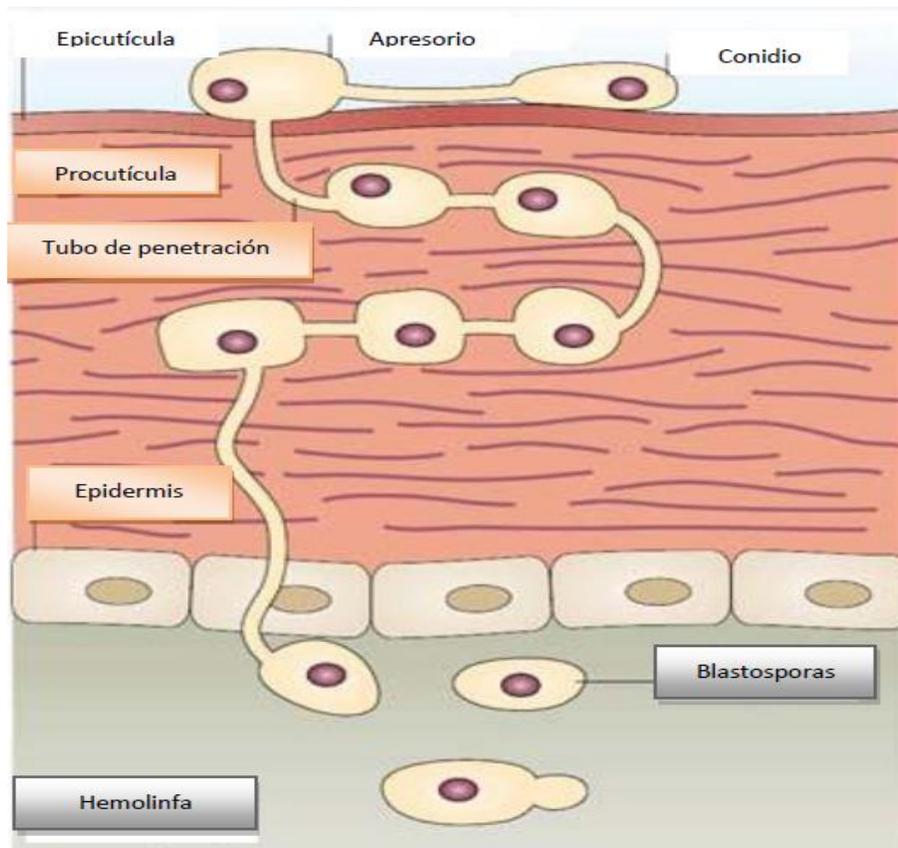


Fig. 1. Proceso de infección de insectos por hongos entomopatógenos. Modificada por Thomas y Read (2007) y Miranda (2010)

Después de una exitosa penetración del hongo al insecto, el invasor produce blastosporas o cuerpos hifales que son distribuidos a través de la hemolinfa, permitiendo la invasión de otros tejidos por la extensión del crecimiento vegetativo. Una vez en la hemolinfa, los hongos producen gran cantidad de metabolitos secundarios tóxicos; por ejemplo, destruxinas, beauvericina, péptidos cíclicos, ácido dipicolínico, ácido oxálico, entre otros (Tabla 2). Cuando el hongo invade todo el insecto, los nutrientes en la hemolinfa y las grasas del cuerpo se agotan, esto ocasiona la muerte del hospedero y el final del proceso patogénico.

La infección exitosa y el periodo total de incubación depende la susceptibilidad del hospedero, su estadio de desarrollo, virulencia de la cepa y factores ambientales como la temperatura y la humedad. Después de la muerte del insecto y en condiciones de humedad, el hongo comienza su etapa saprófita creciendo hacia el exterior del hospedero (Zimmermann, 2007).

Tabla 2. Clasificación de metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. Modificada de Khachatourians (1996) y Téllez-Jurado *et al.* (2009)

Clasificación	Metabolito secundario	Hongos
No peptídicas	Oospereína	<i>B. tenella</i>
	Tenellina	<i>B. bassiana</i>
	Bassianina	<i>B. bassiana</i>
	Ácido oxálico	<i>B. bassiana</i>
	Ácido dipicolínico	<i>B. bassiana, Lecanicillium spp.</i>
Péptidos lineales	Paecilomicinas	<i>Isaria tenuipes</i>
	Leucinostinas	<i>Isaria spp.</i>
	Efraeptinas	<i>B. geodes</i>
Peptídicas cíclicas	Beuvericina	<i>B. bassiana, I. fumosoroseus.</i>
	Destruxininas	<i>Metarhizium spp.</i>

2.2.2. *Metarhizium anisopliae*

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) es un patógeno facultativo de artrópodos ampliamente distribuido, además, es utilizado en la estrategia de CB contra diversas plagas agrícolas y de ganado bovino (Zimmerman, 2007; Arredondo-Bernal *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 2011; Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Este hongo juega un papel importante en la regulación de poblaciones en la naturaleza. Debido a sus características puede ser explotado con fines comerciales como agente de CB (Bidochka *et al.*, 2000; Kamp y Bidochka 2002).

La enfermedad de los insectos causada por este hongo entomopatógeno es comúnmente conocida como muscardina verde (Deacon, 2006).

La lista más completa de insectos hospederos de *M. anisopliae* fue presentada por Veen en 1968, en la que enumera 204 especies hospederas, la mayoría pertenecientes al orden Coleoptera; en especial, aquellas plagas que habitan en el suelo, incluidos más de 70 especies de escarabajos (Zimmermann, 2007).

El proceso de infección de *M. anisopliae* es similar al de otros hongos entomopatógenos (Fig. 2). La germinación de los conidios de *M. anisopliae* se lleva a cabo durante las primeras 20 h después del contacto con el insecto (Zimmermann, 2007). Sin embargo, germinación de los conidios puede verse influenciada por diversos factores. En el trabajo realizado por Lopes *et al.*, 2013 mencionan que hidratando los conidios en Tween 80 al 0.05% durante 24 h previas a su utilización, la germinación de los conidios puede ser hasta del 95%.

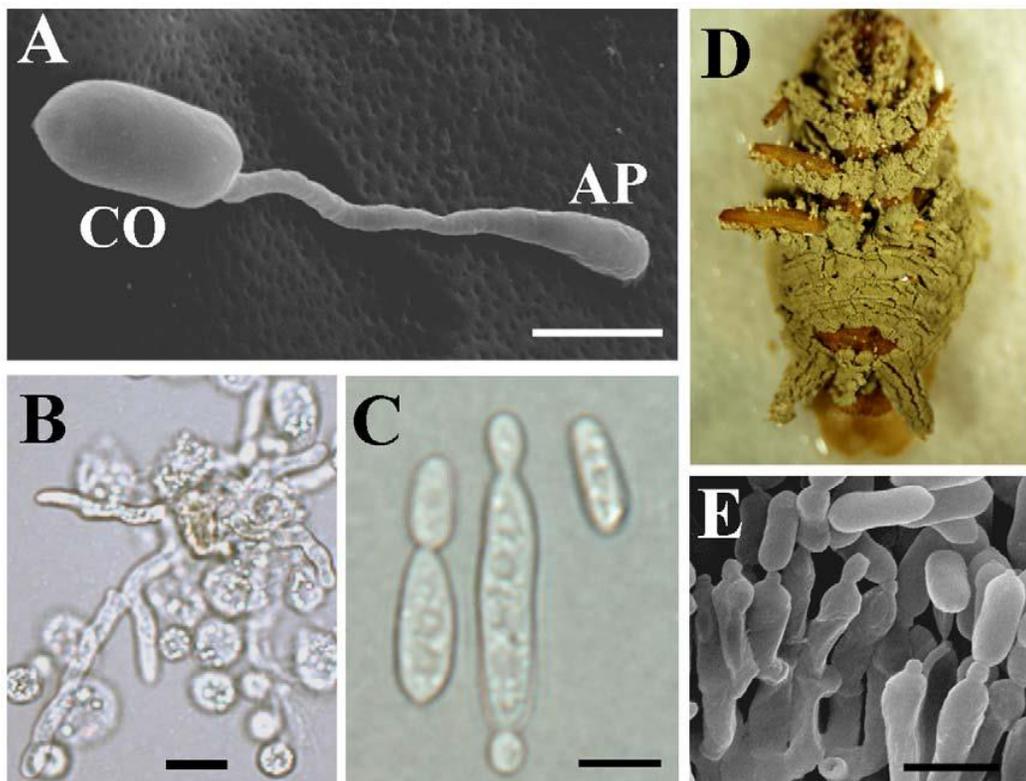


Fig. 2. Principales etapas en el ciclo de infección de *M. anisopliae*. A) Germinación del conidio y formación del apresorio, B) ataque al micelio por hemocitos posterior a la penetración de la cutícula, C) blastosporas producidas por el hongo para su dispersión en el hemocele del insecto, D) cadaver mostrando la emergencia de las hifas productoras de conidios E), CO: conidio, AP: apresorio. La barra indica un tamaño de 5 μm . Modificada de Gao *et al.* (2011).

Diversos autores mencionan que el uso de *Metarhizium* como agente de control se ha enfocado principalmente por su capacidad para matar insectos plaga, dando poca consideración a su asociación con la planta o con la ecología de la rizosfera (Vega *et al.*, 2009; Wyrebek *et al.*, 2011).

Metarhizium anisopliae puede crecer en un rango de temperaturas entre 5 a 40°C con un óptimo a 30°C (Hallsworth y Magan, 1999). Sin embargo, al igual que otros hongos entomopatógenos, la exposición a la luz UV es factor ambiental limitante para su efectividad en campo (Fang y St. Leger, 2012). La producción de conidios de *M. robertsii* en agar papa dextrosa y con una iluminación constante durante su incubación dio como resultado conidios con una tolerancia a la radiación UVB (medida como porcentaje de conidios germinados) dos veces mayor a la obtenida con conidios producidos sobre un medio mínimo (0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄ y 1.5% de agar-agar) e incubados en oscuridad (Rangel *et al.*, 2011).

Hay especies pertenecientes al género *Metarhizium* que son capaces de producir una variedad de metabolitos secundarios principalmente destruxinas, los cuales son depsipéptidos cíclicos que presentan una amplia variedad de efectos tóxicos, incluyendo la toxicidad sobre insectos (Krasnoff *et al.*, 2006). Estos metabolitos pueden producirse en cultivo en medio líquido (CML) durante las fases exponencial y estacionaria (Wang *et al.*, 2009).

Sin embargo, generalmente la producción en grandes cantidades de conidios de hongos entomopatógenos, particularmente de *M. anisopliae*, se llevan a cabo en cultivo en medio sólido (CMS). Los conidios elipsoides de *M. anisopliae* miden de 2 a 10 µm por 1 a 3.5 µm con área superficial de 14.4±3.8 µm² (Shan *et al.*, 2010).

Diversos autores han reportado el uso de conidios aéreos de *M. anisopliae* para el control de plagas agrícolas y de importancia médico veterinaria. En la Tabla 3 se enlistan ejemplos de plagas tratadas con *M. anisopliae* en condiciones de campo.

Tabla 3. Ejemplos de insectos plaga que han sido reportados por ser hospederos de *M. anisopliae*

Insecto	Estado biológico	Referencias
<i>Diaphorina citri</i> Psílido Asiático de los Cítricos	árboles de cítricos	Mellín <i>et al.</i> (2012)
<i>Pteroma pendula</i> gusano del saco	plantaciones de granos, frutas y árboles de paisaje	Yew <i>et al.</i> (2013)
<i>Dysdercus peruvianus</i> arrebiatado	bellotas del algodónero	Staats <i>et al.</i> (2013)
<i>Schistocerca piceifrons</i> langosta	plantaciones de granos, frutas, y pastos de praderas	Hernández-Velázquez <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhicepalus microplus</i> garrapata tropical	ganado bovino	Ángel-Sahagún <i>et al.</i> (2010)
<i>Ixodes ricinus</i> garrapata común	mamíferos	Hartelt <i>et al.</i> (2008)
<i>Aedes aegypti</i> mosquito de la fiebre amarilla	humanos	Butt <i>et al.</i> (2013)

2.3. Producción de Hongos Entomopatógenos

En el trabajo realizado por Faria y Wraight (2007) mencionan que de 171 productos micoinsecticidas estudiados, los más utilizados son con base en los hongos *B. bassiana* (33.9%), *M. anisopliae* (33.9%) e *I. fumosorosea* (5.8%) (Tabla 1), siendo las formulaciones más comunes los sustratos colonizados (26.3%), polvos humectables (20.5 %) y las dispersiones oleosas (15.2%).

Actualmente, las empresas que producen la mayor cantidad de productos utilizados como agentes de biocontrol en México son: Ultraquimia Agrícola, S.A. de C.V. ubicada en Morelos; Agrobiológicos del Noroeste, S.A. de C.V. en Sinaloa y Desarrollo Lácteo, S.P.R. de R.L. en Gómez Palacio, Durango (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013).

A pesar de las ventajas del CML y la posibilidad de producir conidios de diversos hongos deuteromicetos, los conidios producidos por cultivo sumergido son hidrofílicos, lo que impide que sean formulados en suspensiones oleosas para su aspersión en campo. Las blastosporas, también producidas en CML, son hidrofílicas; además, pierden viabilidad relativamente rápido durante su almacenamiento (Jenkins *et al.*, 1998).

Los conidios aéreos (esporas producidas por células conidiógenas) son propágulos de los hongos entomopatógenos responsables de la dispersión e infección de los insectos en condiciones naturales. Los conidios producidos en el CMS son las estructuras más parecidas a los producidos en la naturaleza. De manera silvestre, los conidios aéreos se producen en estructuras erguidas en contacto con la atmósfera; por ejemplo, en la superficie de los cadáveres de insectos.

2.3.1. Cultivo en medio sólido

El CMS puede definirse como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua (Viniegra, 1997).

El CMS también se puede definir como el crecimiento de microorganismos en sustratos en ausencia de agua libre. El agua libre se encuentra en forma compleja en el interior de la matriz sólida (Pandey, 1992).

Las principales ventajas del CMS son sus bajos requerimientos de energía, ausencia de maquinaria compleja y de control sofisticado del sistema (Torres, 2013). Además, el CMS utiliza materias primas no procesadas o fácilmente accesibles, produce bajas cantidades de agua de desecho y permite una alta recuperación de producto (Tunga *et al.*, 1998; Ruíz-Leza *et al.*, 2007).

Una limitación de este tipo de cultivo es la remoción del calor metabólico cuando se utilizan cantidades grandes de sustrato. El medio sólido se compacta y afecta la transferencia de calor y masa (Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández, 1990; Doelle *et al.*, 1992; Durand, 2003; Figueroa-Montero *et al.*, 2011).

Con el fin de disminuir los costos en la producción, algunos autores han reportado diversos sustratos sólidos para la producción de conidios de hongos entomopatógenos para ser utilizados en el control de plagas, obteniendo diversos rendimientos.

En el trabajo realizado por Bhanu *et al.* (2007) mostraron que la mayor producción de conidios de *M. anisopliae* se logró al utilizar arroz como sustrato (6.2×10^{10} conidios/gramo de sustrato); la cual, significó un aumento de 21% y 28% a la producción de conidios obtenida con cebada y sorgo respectivamente.

Por otro lado, Santa *et al.* (2005) reportaron que al utilizar una mezcla de residuos de papa y bagazo de caña de azúcar (60-40%) produjeron la mayor cantidad de conidios (9.8×10^9 conidios/gms) de *B. bassiana* después de 10 d de incubación en biorreactores tubulares utilizando 65% de humedad en el sustrato.

2.4. Pruebas de control de calidad

Un sistema de producción que no muestra un sistema de control de calidad genera un producto sin control y carencia de información para la retroalimentación, lo que puede conducir a lotes de producción con calidad variable. El criterio más usado para referirse a la calidad de un micoinsecticida es la cantidad de unidades infectivas, comúnmente expresado como propágulos por litro o gramo de producto, y su viabilidad (Jenkins y Grzywacz, 2000; Lopes *et al.*, 2013).

En todo proceso industrial es necesario mantener en un método de conservación adecuado las cepas que se utilizan. Ha sido ampliamente estudiado que la transferencia periódica en medio de cultivo de cepas fúngicas resulta en una pérdida de las características originales del aislado (Thomas y Smith, 1994; Jenkins y Grzywacz, 2000). La disponibilidad y el desarrollo de métodos de conservación son indispensables para estudios a largo plazo sobre la producción y el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.

Los objetivos que se persiguen de un método de conservación en términos de actividad metabólica son: (1) conservar la pureza, (2) viabilidad y (3) la preservación sin cambios genéticos (Horaczek y Viernstein, 2004; Jaronsky y Jackson, 2012).

La liofilización se considera la técnica más eficiente para el almacenamiento a largo plazo y la conservación de las características de la cepa. Una de las ventajas de

este método de conservación es que no requiere condiciones especiales de almacenamiento (Fisher y Garczynski, 2012).

Una medida de la calidad del producto antes, durante y después de su aplicación en campo es esencial. Las mediciones de calidad de los conidios deben hacerse en los conidios recién producidos, en el formulado y en el sitio de su aplicación, preferentemente recolectando el inóculo directamente de la boquilla de aspersion en diferentes intervalos durante la aplicación (Wraight *et al.*, 2007).

En ocasiones, las palabras germinación y viabilidad de conidios son empleadas indistintamente; sin embargo, en este trabajo se hace referencia a la germinación como el proceso en el cual un conidio es capaz de crear un tubo germinativo de un tamaño del doble del diámetro del conidio; y al término viabilidad como el proceso en el cual un conidio es capaz de llegar a formar una colonia (UFC). Es necesario considerar que la germinación de un conidio no asegura su viabilidad, por lo que ambas pruebas son complementarias (Ángel, 2011).

Otro factor que puede influir en la calidad de los conidios de hongos entomopatógenos es la edad del inóculo utilizado. Sin embargo, el impacto que tiene esta variable sobre la calidad de los conidios no es generalizable para todas las cepas (Grand y Cliquet, 2013). De acuerdo a lo reportado por Hall *et al.* (1994), los conidios de *M. anisopliae*, *I. fumosoroseus* y *Lecanicillium* spp. que fueron cosechados de cultivos jóvenes germinaron más rápido que los conidios obtenidos de cultivos viejos, mientras que los conidios de *B. bassiana* germinaron a la misma velocidad sin importar la edad del cultivo. Contrario a este trabajo, Grand y Cliquet (2013) reportaron que las cepas de *Lecanicillium lecani* CBS 122.175 y *B. bassiana* 1.01.093 presentaron un efecto negativo en el porcentaje de germinación ocasionado por la edad del inóculo. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de conidios germinados de la cepa de *M. anisopliae* LMSA 1.01.197 procedentes de diferentes edades del inóculo.

Además de la germinación y la viabilidad, los bioensayos pueden ser utilizados con distintos propósitos en la patología del insecto, incluyendo la evaluación de nuevos

aislados o formulaciones, el método de acción de una cepa, y como control de calidad de bioplaguicidas comerciales. Los bioensayos se utilizan para la selección de cepas eficaces en el control microbiano, incluyendo factores como el rango de hospederos, el tiempo letal y la actividad contra diferentes estadios del insecto. También son una herramienta esencial en el estudio sobre el desarrollo de resistencia de la plaga a los agentes entomopatógenos (O'Callaghan *et al.*, 2012).

El uso de *Diaphorina citri*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Rhipicephalus microplus*, *Schistocerca piceifrons*, *Tenebrio molitor* como insectos blanco en los bioensayos, utilizando conidios de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* ha sido reportado por diversos autores (Hernández-Velázquez *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2008; Ángel-Sahagún *et al.*, 2010; Porcayo-Loza *et al.*, 2012).

La metodología del bioensayo puede variar dependiendo del insecto blanco; sin embargo, existen generalidades de los procedimientos que se enlistan enseguida:

- Mantener la colonia de insectos blanco en condiciones de laboratorio al menos 10 d antes de ser sometida al tratamiento.
- Producir, cosechar y estandarizar una suspensión de conidios representativa del lote a estudiar.
- Poner en contacto una cantidad de conidios conocida con el insecto. El contacto se puede lograr sumergiendo el insecto en la suspensión de conidios, colocando una gota de la suspensión sobre la estructura externa del insecto por ejemplo sobre el pronotum, o inclusive inyectando directamente la suspensión de conidios.
- Mantener los insectos en condiciones de humedad y temperatura controladas para favorecer la micosis.
- Registrar los datos y ajustarlos a un modelo que permita calcular parámetros de infectividad.

El modelo de decaimiento propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.* (2009) permite obtener parámetros como el tiempo de inicio de muerte (t_0), el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad (TL₅₀), la tasa específica de muerte (k) y el porcentaje

de sobrevivencia a un tiempo t (Y). S representa el porcentaje de sobrevivientes al final del bioensayo.

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S; \quad \text{si } t > t_0$$

$$Y = 100; \quad \text{si } 0 \leq t \leq t_0$$

2.5. Ensayos en campo

En la mayoría de los insectos, la principal ruta de infección ocurre por contacto directo del insecto con el inoculo. El porcentaje de infección o mortalidad resultante está determinado por la susceptibilidad del huésped, el método de aplicación y por factores ambientales como temperatura, humedad, velocidad del viento y estructura de la vegetación. Una segunda ruta de infección, en el caso de los adultos, es por residuos o productos derivados de la aspersión y que permanece sobre la vegetación.

El método de aplicación, formulación y factores ambientales juegan un papel importante sobre la persistencia y distribución espacial de los propágulos del patógeno. Existe la posibilidad de una transmisión horizontal del patógeno producido en individuos infectados por cualquiera de las vías antes mencionadas (Alatorre-Rosas, 2007).

Los factores que influyen en la actividad de hongos entomopatógenos pueden dividirse en abióticos y bióticos. Entre los factores abióticos se encuentra la temperatura, la cual afecta directamente el progreso de la enfermedad y el desarrollo del huésped (Cross y Bidochka, 1999); la humedad, factor esencial para la germinación y diseminación de las esporas de la mayoría de los hongos; el viento; la precipitación pluvial que actúan como agente importante de diseminación; la iluminación, principalmente la luz solar, constituye el factor más detrimental. El efecto directo de la radiación solar, específicamente los rayos UV, causan alteraciones que pueden reducir la persistencia de los hongos.

También existen factores bióticos que influyen en la actividad de los hongos entomopatógenos; un ejemplo es la susceptibilidad entre el insecto huésped y su estado de desarrollo; esto es, la susceptibilidad de los insectos varía entre instares. Por lo que es necesario conocer la biología y distribución de los insectos huéspedes.

El comportamiento de los insectos puede influir en el desarrollo de epizootias y puede afectar la diseminación del entomopatógeno (Alatorre-Rosas, 2007). En el trabajo reportado por Konrad *et al.* (2012), demostraron que el acicalamiento es una estrategia de inmunización social presente en las hormigas (*Lasius neglectus*), y provocó una sofisticada defensa a nivel individual y colonia contra *M. anisopliae*.

En las evaluaciones en campo es normal que en el tratamiento control se presente mortalidad por causas naturales; por tanto, no se muestra micosis en los insectos. En estas situaciones, es necesario corregir la eficacia obtenida con base en la respuesta de un control. La eficacia corregida (%) en ensayos de insecticidas puede ser estimada utilizando las fórmulas de Abbott, Henderson-Tilton, Schneider-Orelli o Sun-Shepard. La selección de la fórmula apropiada depende de:

- 1) la condición del predio del ensayo (infestación o la estabilidad de la población, y la homogeneidad)
- 2) de los datos disponibles (individuos vivos o porcentaje de mortalidad)

En la Tabla 4 se enlistan los criterios que ayudan a seleccionar la fórmula correcta.

Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de la eficacia de las pruebas biológicas en campo y condiciones de uso

Datos disponibles	Población uniforme	Población no uniforme
Infestación o individuos vivos	Abbott	Henderson-Tilton
Mortalidad o individuos muertos	Schneider-Orelli	Sun-Shepard

2.6. Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri*

México es uno de los principales países productores de cítricos en el mundo, ocupa el quinto lugar en la producción con una superficie establecida de 550 mil hectáreas (SENASICA, 2012). Como parte del corredor biológico que conecta al norte con el sur del continente americano, la localización geográfica de México lo ubica en un lugar en riesgo de la invasión de plagas exóticas desde sus fronteras al norte y sur incluyendo las islas del Caribe (Williams *et al.*, 2013).

El Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) *D. citri* Kuwayama es considerado vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. causante de la enfermedad del huanglongbing (HLB) o enfermedad del dragón amarillo, actualmente considerada la enfermedad más devastadora de cítricos en el mundo (Grafton-Cardwell *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2012).

Hasta hace poco el continente americano estuvo libre de HLB. Los primeros síntomas se detectaron en marzo de 2004 y agosto de 2005 en el estado de Sao Paulo, Brasil y en Florida, E.U.A. respectivamente. Estas representan dos de las mayores regiones productoras de cítricos del mundo (Bové, 2006), lo que ha provocado que el HLB tenga efectos devastadores (Flores *et al.*, 2010).

Hasta la fecha la enfermedad del HLB ha sido reportada en E.U.A. en Carolina del Norte y Louisiana (2009), Cuba (2007), República Dominicana (2008), Belice (2009), México (2009), Honduras (2009), Guatemala (2010), y Nicaragua (2010) (SENASICA, 2010).

En México, se reportó por primera vez la presencia de *D. citri* en el estado de Campeche en el 2002 (López-Arroyo *et al.*, 2009), esparciéndose al sur del país desde la frontera norte de México (Williams *et al.*, 2013). En México *D. citri* se cataloga como plaga cuarentenaria reglamentada (SENASICA, 2014); lo que indica tiene potencial de afectar económicamente el área en peligro, aun cuando la plaga no está presente o, si está presente, no está extendida y se encuentra bajo el control oficial (FAO, 2006).

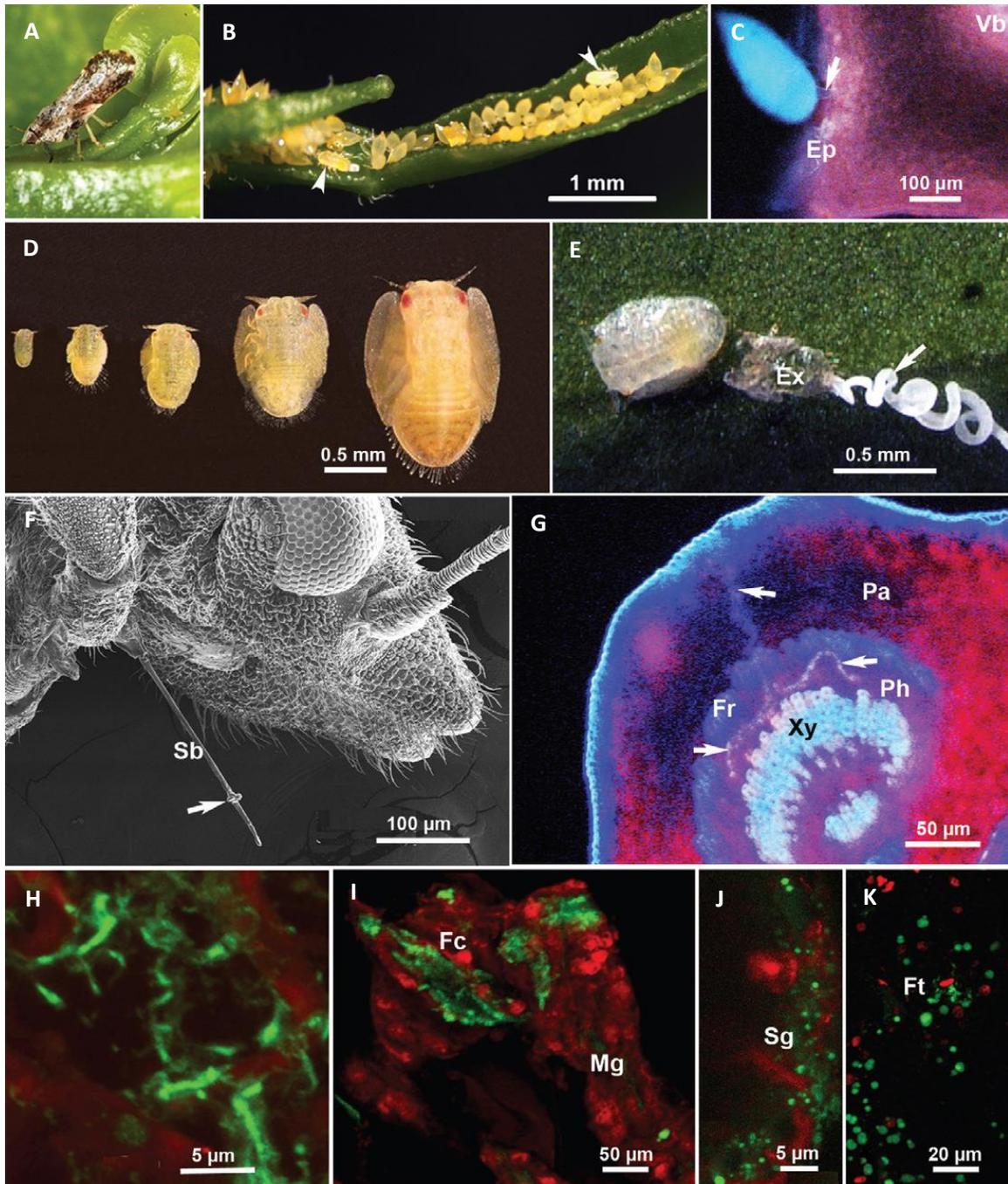


Fig. 3. A) Adulto del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), B) huevos y ninfas jóvenes del PAC, C) micrografía con epifluorescencia de un huevo del PAC, D) instares ninfales del PAC, E) ninfa, exuvia (Ex) y excreción, F) toma realizada con un microscopio de barrido de electrones que muestra la inserción del estilite (Sb) del PAC, G) micrografía con epifluorescencia del nervio medio de una hoja de cítrico mostrando la envoltura salival del PAC dentro del floema (Ph); Xy: xilema, H-K) microscopía confocal mostrando la bacteria *C. Liberibacter* en el floema de una hoja infectada (H) y en diferentes tejidos de un PAC infectado (I-K), incluyendo a la cámara filtro (Fc), intestino medio (Md), glándulas salivales (Sg) y tejido graso (Ft). Modificada de Hall *et al.* (2012).

Las hembras del PAC colocan sus huevos sobre hojas jóvenes. Una hembra durante su vida es capaz de poner entre 500-800 huevos con un máximo de 1900 en un periodo de dos meses. La cantidad de huevos depende de los umbrales de temperatura y humedad, con óptimos en los 29.6°C y una humedad relativa mayor al 40% (Hall *et al.*, 2012).

La etapa ninfal del PAC presenta cinco instares (Fig.3). Los instares tempranos son dóciles y solo se mueven si necesitan espacio o porque sean perturbados (Tsai y Liu, 2000). Los últimos instares ninfales y los adultos son más activos (Hall *et al.*, 2012). El insecto se alimenta por medio de un estilete, el cual es una pieza bucal que es capaz de perforar y succionar la savia del brote (Bonami *et al.*, 2010).

El promedio de desarrollo de un huevo hasta su etapa de adulto es de 14 d a 28°C y de 49 d a 15°C. Los machos adultos viven entre 21-25 d y las hembras viven en promedio 31 d a 24°C (Nava *et al.*, 2007).

En el trabajo realizado al sur de Florida E.U.A. por Tsai *et al.* (2002) reportaron que la población mensual de ninfas de *D. citri* en plantas de mirto (*Murraya paniculata*) presentó picos máximos de densidad poblacional que coincidieron con los registros de máxima precipitación pluvial del año, y con la presencia de nuevos brotes en la planta. Además, estos autores mencionan que la población disminuyó hasta en 80% entre los meses de enero a mayo en los cuales se presentó escasa o nula precipitación pluvial.

3. Justificación

El interés en el control biológico se ha incrementado por el desarrollo de resistencia de las plagas a plaguicidas convencionales (Heckel, 2012), aunado a la preocupación pública cada vez mayor del uso de plaguicidas y su impacto generalizado en la salud humana, seguridad alimentaria y medio ambiente (Moore y Prior, 1993; Auld y Morin, 1995; Henry *et al.*, 2012; Whitehorn *et al.*, 2012).

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* ha sido reportado por ser causante de la enfermedad muscardina verde en *D. citri*. Este insecto, vector del agente causal del HLB, está considerado como la plaga más importante de los cítricos en el mundo (Hall *et al.*, 2012). Diversos autores mencionan que las cepas de *I. fumosorosea* CHE-CNRCB 303 (Pf15), CHE-CNRCB 305 (Pf17), CHE-CNRCB 307 (Pf21) y *M. anisopliae* CHE-CNRCB 224 (Ma59) poseen potencial para contrarrestar la plaga en México (Arredondo-Bernal *et al.*, 2010; Mellín *et al.*, 2012). En el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) se desarrolla la tecnología para la producción en CMS de conidios de estas cepas; sin embargo, se desconocen aspectos importantes de su crecimiento utilizando arroz como sustrato.

Existen pocos trabajos que relacionen los parámetros de control de calidad que se obtienen en laboratorio con resultados de infectividad en evaluaciones de campo. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron los parámetros de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 al modificar distintas variables durante su cultivo en medio sólido. Además, se buscó relacionar los parámetros de control de calidad de los conidios obtenidos en el laboratorio con los resultados obtenidos en campo.

4. Hipótesis

A través de los parámetros de calidad (germinación, viabilidad e infectividad) de conidios de *M. anisopliae* Ma59 medidos en laboratorio, se puede inferir su infectividad sobre *Diaphorina citri* en campo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la relación entre los parámetros de calidad (germinación, viabilidad e infectividad) de conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59 y su infectividad sobre ninfas de *D. citri*.

5.2. Objetivos particulares

- Seleccionar un medio de cultivo para la producción del inóculo de *M. anisopliae* Ma59.
- Determinar las condiciones de operación para la producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59 en cultivo en medio sólido.
- Evaluar los parámetros de calidad (germinación, viabilidad y efectividad) de los lotes de conidios *M. anisopliae* Ma59 producidos.
- Determinar la efectividad de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 al aplicarlos en laboratorio y campo.

6. Materiales y Método

6.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *M. anisopliae* Ma59 (CHE-CNRCB 224) perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CHE-CNRCB). Diversos autores recomiendan el uso de esta cepa para el control de *D. citri* (Arredondo-Bernal *et al.*, 2010; Mellín *et al.*, 2012). El catálogo de la CHE-CNRCB menciona que esta cepa se aisló de *Aeneolamia* sp. (mosca pinta), la cual se recolectó en un cultivo de caña de azúcar, en el estado de Veracruz, México.

6.2. Conservación de la cepa

La cepa de *M. anisopliae* Ma59 se cultivó en matraces de 125 mL con 30 mL de medio ADS (Tabla 5) y se incubó a 28°C durante 10 d. Se esterilizó una suspensión de leche Svelty® al 10% a una presión de 10 PSI durante 10 min (Ertola *et al.*, 1994). Se utilizaron ampollitas de vidrio Wheaton® de 12 mL las cuales se lavaron con una solución de HCl al 2%, y se esterilizaron en un autoclave a 121°C durante 2 h.

En condiciones asépticas se cosecharon los conidios producidos en matraces de 125 mL con 20 mL de la suspensión de leche Svelty®. La suspensión se agitó durante 10 min. Posteriormente, se distribuyó en alícuotas de 1 mL por ampolleta. Cada muestra se congeló lentamente haciendo girar la ampolleta en una mezcla de acetona y hielo seco contenida en un recipiente de acero inoxidable. Las muestras congeladas se colocaron en un adaptador de un equipo FreeZone de LABCONCO® previamente estabilizado a -50°C y vacío de 10 micras de Hg, hasta alcanzar la eliminación total del agua y la pulverización de la muestra. Las ampollitas se sellaron con ayuda de un soplete a la altura del bisel. Para verificar las características morfológicas de la cepa se seleccionó una ampolleta al azar y su contenido se sembró en medio ADS.

6.3. Producción de lotes de conidios

En esta sección se describe la estrategia que se siguió para la producción de conidios en dos sistemas; biorreactores de vidrio y bolsas de polipapel.

6.3.1. Producción del inóculo

Se prepararon los medios de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS) y harina de avena, peptona de carne y agar (HaPcA) (Tabla 5). Por quintuplicado se vaciaron 30 mL de cada medio en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Se esterilizaron en una autoclave a 121°C durante 15 min. Los matraces se inocularon de forma aséptica con 500 µL de una suspensión de conidios de *M. anisopliae* Ma59 y se incubaron a 27±1°C durante 10 d en oscuridad.

Tabla 5. Composición de los dos medios de cultivo probados para la propagación de *M. anisopliae* Ma59

Componente/Medio	Medio ADS	Medio HaPcA
	Cantidad (g L ⁻¹)	
Agar dextrosa sabouraud	65	-
Harina de avena	-	33
Peptona de carne	-	10
Agar bacteriológico		15

6.3.2. Uso de cloranfenicol y su efecto sobre la viabilidad

Diversos autores reportan el uso de antibióticos como la tetraciclina o el cloranfenicol para evitar la contaminación bacteriana en la producción masiva de conidios de hongos entomopatógenos (Gómez y Mendoza, 2004; Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, estos autores no mencionan si el antibiótico tiene algún efecto sobre la viabilidad de los conidios, por lo que se decidió evaluar el efecto de la concentración de cloranfenicol sobre la viabilidad de *M. anisopliae*.

El contenido de una cápsula con 250 mg de cloranfenicol se vació en 25 mL de agua destilada estéril para obtener una suspensión madre de 10,000 ppm. A partir de la

solución madre se realizaron diluciones subsecuentes hasta obtener suspensiones de 1000, 750, 500 y 250 ppm.

Se obtuvo el inóculo de *M. anisopliae* Ma59 de matraces con medio ADS de 10 d de incubación y se cosecharon con Tween 80 al 0.05%. Posteriormente, se estandarizaron las suspensiones de cloranfenicol a una concentración de 1×10^4 conidios/mL y se evaluó su viabilidad como se describe en la sección 6.4.

6.3.3. Producción de conidios en cultivo en medio sólido

Para los estudios de producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59 en CMS se utilizó como sustrato arroz pretratado (Ye *et al.*, 2006; Jaronski y Jackson, 2012) de la marca Chedraui®. El tratamiento consistió en colocar el arroz en una tina para empapararlo con agua destilada (1 litro de agua/kg de arroz) durante un minuto y enseguida retirarle el exceso de agua; procedimiento que se repitió dos veces. Después el arroz se remojó en agua destilada durante 30 min e inmediatamente se dispuso en un cernidor durante 20 min. Posteriormente, en bolsas de polipapel se colocaron 350 g de arroz húmedo (250 gms) y se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

Los matraces de la cepa de *M. anisopliae* Ma59 propagada sobre medio ADS con 11 d incubación se cosecharon de manera aséptica con 50 mL de Tween 80 al 0.05% y se mezclaron con una agitador magnético durante 10 min. El conteo de conidios se realizó en una cámara de Neubauer.

Las bolsas con sustrato previamente esterilizado se inocularon con una suspensión de conidios y 500 ppm de cloranfenicol, para evitar el crecimiento bacteriano, de tal forma que se tuviera un inóculo final de 1×10^6 conidios/gms. Las bolsas se dejaron reposar durante una hora para que el sustrato absorbiera el inóculo. La viabilidad y la germinación de cada inóculo se evaluaron como se describe en la sección 6.4.

Para la estimación de los parámetros cinéticos (sección 6.3.3.), el CMS se realizó en biorreactores de vidrio de 2 y 4.5 cm de diámetro interno. En experimentos independientes se evaluaron distintas variables de crecimiento: cuatro temperaturas de incubación, tres humedades del sustrato y dos tasas de aireación. El análisis de flujo de aire, concentraciones de O₂ y CO₂ se realizó en un equipo similar al reportado por Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández (1994).

Para los conidios utilizados en los bioensayos y en las evaluaciones de campo, su producción se llevó a cabo en bolsas de polipapel, las cuales se incubaron durante 16 d a 28±1°C con una humedad superior al 60%. Durante la incubación, cada cuatro días las bolsas fueron agitadas manualmente con el fin de desagregar el crecimiento micelial. Posteriormente, las bolsas se abrieron y colocaron dentro de un cubo cerrado de plástico (1x1x1 m) y con ayuda de un equipo “MOBIL AIR” SISCO® se deshumidificó el contenido hasta obtener humedad ≤10%.

6.3.4. Estimación de parámetros cinéticos

El consumo de O₂ y la producción de CO₂ son el resultado de la respiración; proceso metabólico por el cual los microorganismos aerobios invierten gran parte de su energía para el crecimiento (Raimbault, 1998). La tasa de producción de CO₂ se ha utilizado como un método de estimación del metabolismo microbiano (Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández, 1994).

En el laboratorio de Fermentación en Medio Sólido (PP4) de la Universidad Autónoma Metropolitana se desarrolló un sistema de monitoreo y análisis automático de la composición de la corriente gaseosa que atraviesa los biorreactores denominado respirómetro (Fig. 4). Este equipo consta de un sistema de válvulas solenoides (ASCO, USA) controladas por un PLC (Controlador Lógico Programable, por sus siglas en inglés) que permite el análisis de una corriente gaseosa por válvula. El aire pasa a través de un medidor de flujo y un analizador de infrarrojo de CO₂ (United Phosphorous, LTD, USA).

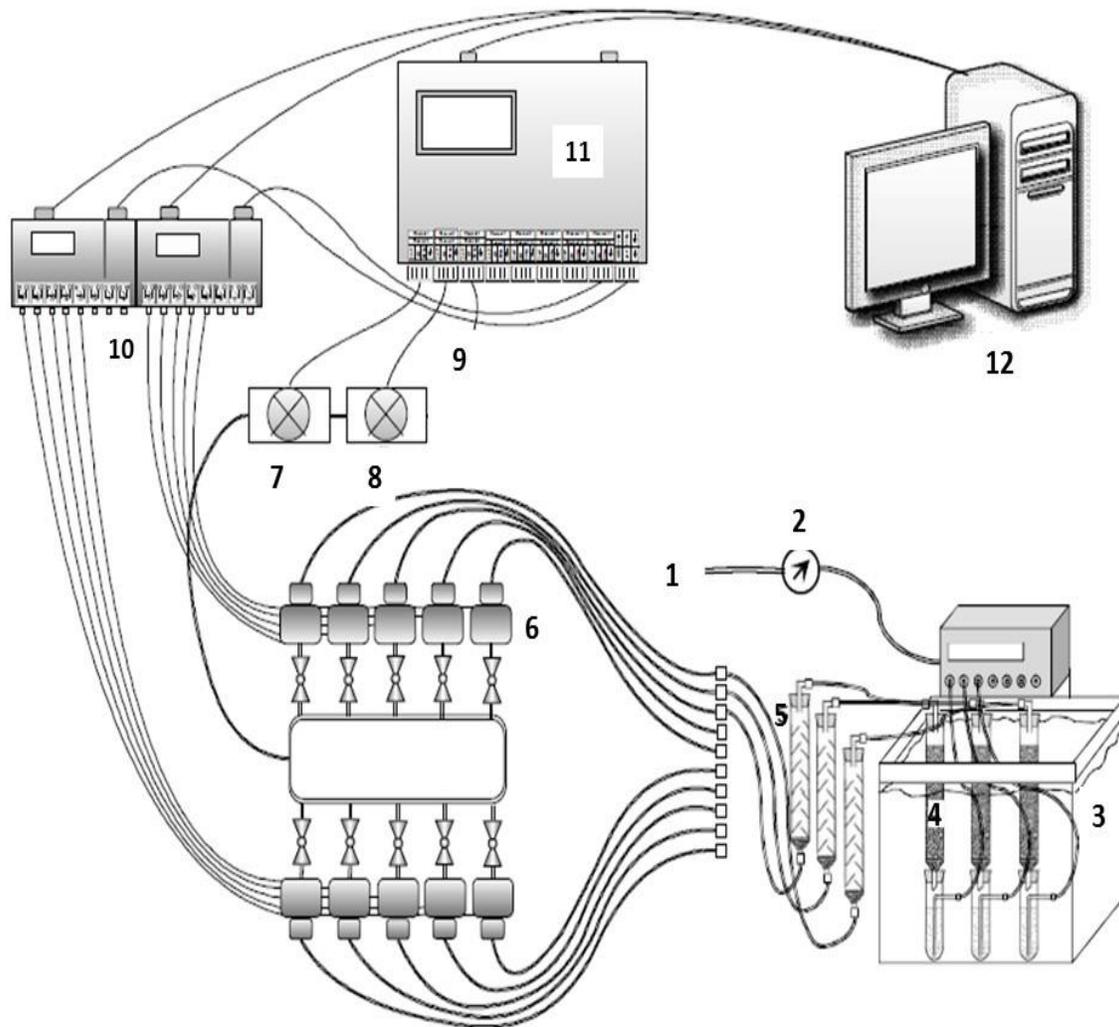


Fig. 4. Esquema general para el análisis en el metabolímetro de un CMS. Donde 1) compresor de aire, 2) regulador de presión, 3) pesera con agua a temperatura controlada, 4) biorreactores, 5) deshumidificadores, 6) válvulas solenoides, 7) medidor de flujo, 8) detector de CO₂ infrarrojo, 9) venteo, 10) controlador lógico programable, 11) data logger M6+, 12) ordenador. Modificada de Torres (2013) y Solicitud de patente MX/a/2013/004638

Los datos obtenidos son almacenados en un registrador automático (Data Logger) y procesados a través de un software analizador de datos (LabView 2009) que genera una hoja de Excel (Torres, 2013; Juárez, 2014). Los datos generados en la hoja de Excel muestran las lecturas de la composición volumétrica del CO₂ (mL/100mL de aire) en el sistema. Estos últimos se transforman con la ecuación de los gases ideales para obtener las tasas de producción CO₂ (mg/gms). Para poder aplicar la fórmula de gases ideales fue necesario realizar las siguientes

correcciones: restar la concentración del CO₂ presente en el aire, realizar un ajuste para la presión atmosférica en la ciudad de México y temperatura de incubación.

En la Fig. 5 se muestra un ejemplo del perfil de la tasa de producción de CO₂ ($r\text{CO}_2$) y de la producción acumulada de CO₂ de un CMS de *M. anisopliae* Ma59. La tasa de producción de CO₂ se modifica durante el periodo de incubación. En las primeras 22 h la $r\text{CO}_2$ presentó un valor cercano a cero. Posteriormente, la $r\text{CO}_2$ aumentó hasta alcanzar su valor máximo a las 40 h aproximadamente. Por último, la $r\text{CO}_2$ decayó hasta permanecer constante y cercana a cero a las 100 h de cultivo, aproximadamente.

Las tasas de producción se integraron utilizando el método numérico de la regla del trapecio para obtener la producción acumulada de CO₂ (mg/gms). En el perfil de la producción acumulada (Fig. 5) se distinguen cuatro zonas (señaladas con líneas punteadas).

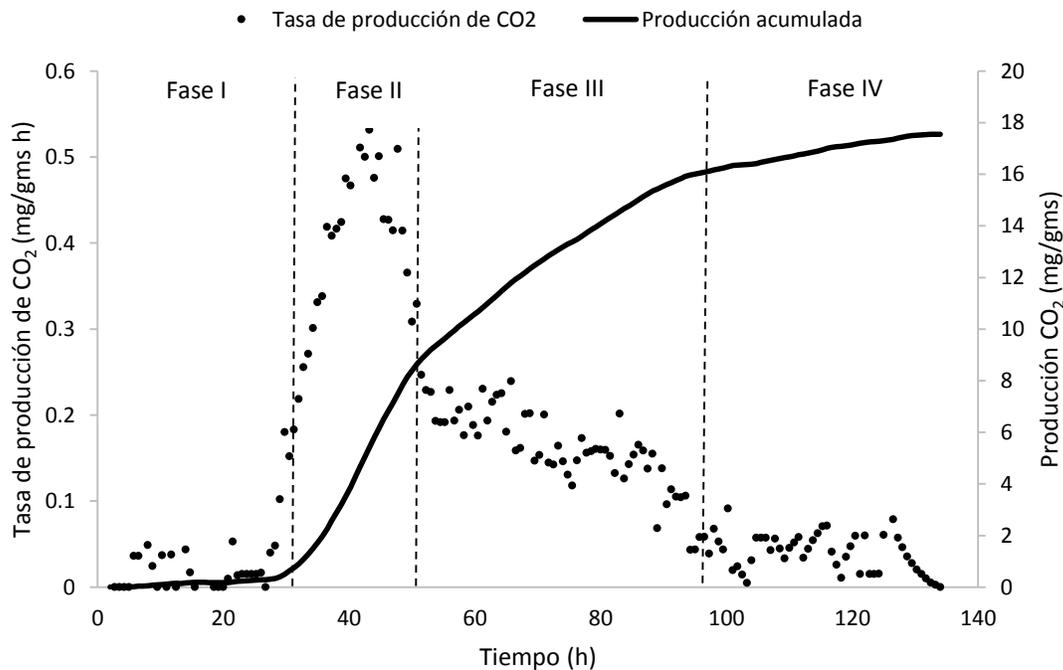


Fig. 5. Perfil de la tasa de producción y de la producción acumulada de CO₂ de *M. anisopliae* Ma59 en un CMS utilizando arroz como sustrato

La primera etapa (I) comprendió desde el inicio del cultivo hasta el tiempo que duró la fase lag (t_{lag}). El cálculo del t_{lag} se realizó con el método reportado por Pirt (1975) (Fig. 6). Se calculó y graficó el logaritmo natural (Ln) de los datos de producción de CO_2 , posteriormente, se marcó un intervalo de tiempo que comprendió desde que el valor del logaritmo es positivo hasta el tiempo donde la tasa de producción de CO_2 máxima (rCO_2_{max}). Se realizó una linealización de los datos dentro de este intervalo para obtener la ecuación de la recta. El t_{lag} se consideró el valor de x donde $y=0$.

Para calcular el intervalo de la segunda etapa (II) se restó el tiempo donde se obtuvo la rCO_2_{max} menos el tiempo residual (t_r) (ec.1). El tiempo residual (t_r) se obtuvo de restar el tiempo lag (t_{lag}) al tiempo donde se alcanza la rCO_2_{max} (ec.2).

$$\text{tiempo para alcanzar la } rCO_2_{max} \pm t_r = \text{Intervalo fase II} \quad (\text{ec. 1})$$

Donde

$$t_r = \text{tiempo para alcanzar la } rCO_2_{max} - t_{lag} \quad (\text{ec. 2})$$

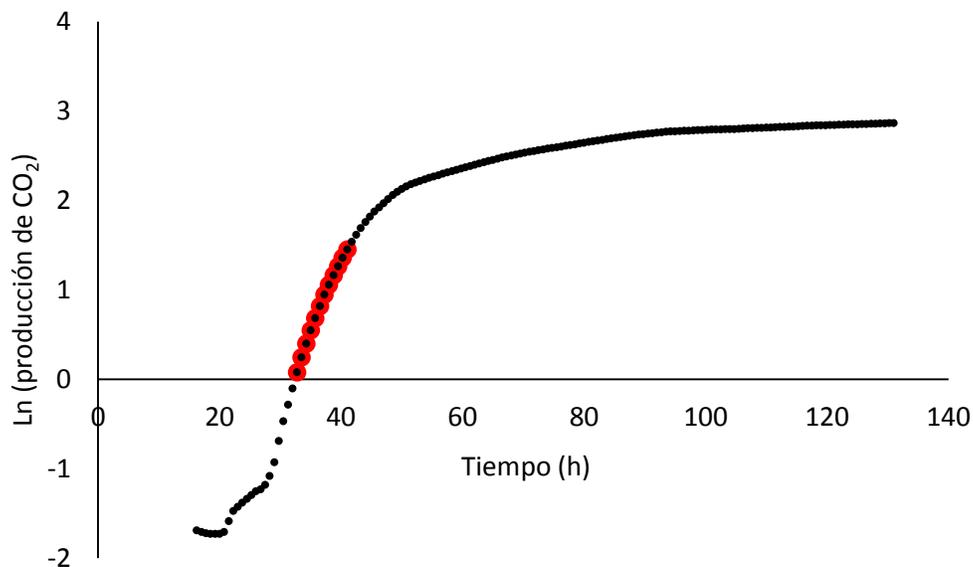


Fig. 6. Logaritmo natural de los datos de producción CO_2 de *M. anisopliae* Ma59. Los puntos rojos muestran los datos utilizados para el cálculo del t_{lag}

Los datos de producción de CO₂ comprendidos en la segunda etapa (II) se ajustaron con el modelo logístico (ec.3) utilizando la función Solver de Excel. La ecuación del modelo logístico en su forma integral se muestra en la ec.3 (Torres, 2012).

$$\frac{dCO_2}{dt} = rCO_2 = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left(1 - \frac{CO_2}{CO_{2max}}\right) \quad (\text{ec. 3})$$

Donde CO₂ es la producción de CO₂ (mg/gms) calculada al tiempo t; CO_{2 max} es la producción de CO₂ máxima (mg/gms) obtenida al final de cultivo y μ_{CO_2} es la tasa específica de producción de CO₂ (h⁻¹).

El modelo logístico es simétrico a un punto de inflexión. Por tanto, no puede describir la cinética completa de producción de CO₂. El ajuste al modelo logístico sin ningún criterio de simetría subestima la tasa específica de producción de CO₂ (μ) en un 20% aproximadamente (Juárez, 2014). En la Fig. 7 se muestran los datos de producción de CO₂ (etapa II) de *M. anisopliae* Ma59 y su ajuste al modelo logístico. Todos los datos en este intervalo presentaron un ajuste adecuado al modelo utilizado ($R^2 > 0.95$).

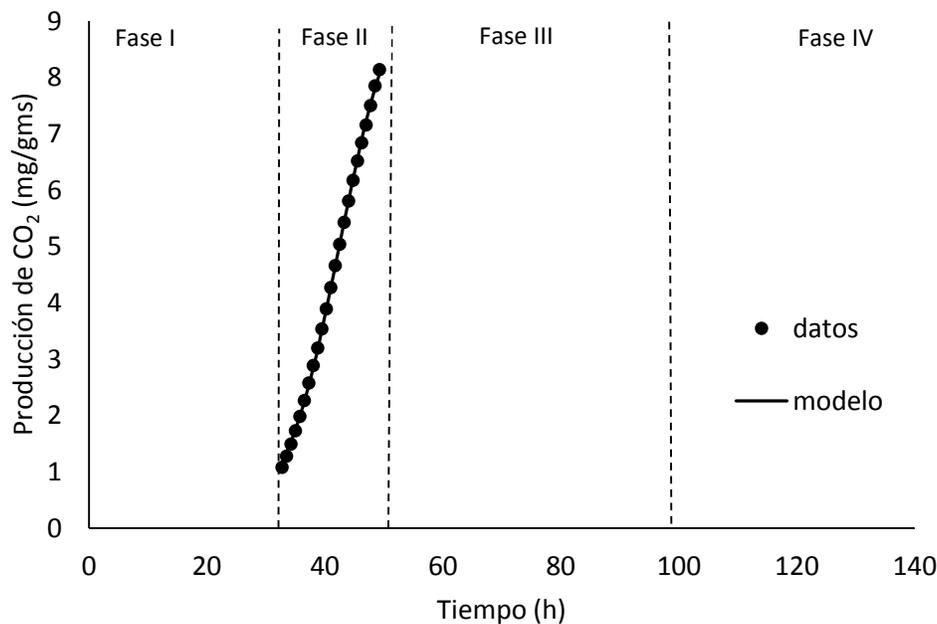


Fig. 7. Ajuste de la etapa II de los datos de producción de CO₂ de *M. anisopliae* Ma59 al modelo logístico

En las últimas dos etapas (III y IV) (Fig. 8) se observó una desaceleración en la producción de CO₂ (III) y otra etapa de estabilidad que se correlaciona con la energía de mantenimiento del metabolismo (IV), las cuales son descritas por modelos lineales ($R^2 > 0.95$). La tercera etapa (III) comprende del final de la etapa II hasta las 90 h y la última etapa (IV) que va desde las 90 h hasta el final del cultivo. La productividad del CO₂ (PCO_2) (mg/gms*d) se obtiene al dividir la producción acumulada del CO₂ entre el tiempo final del cultivo en días.

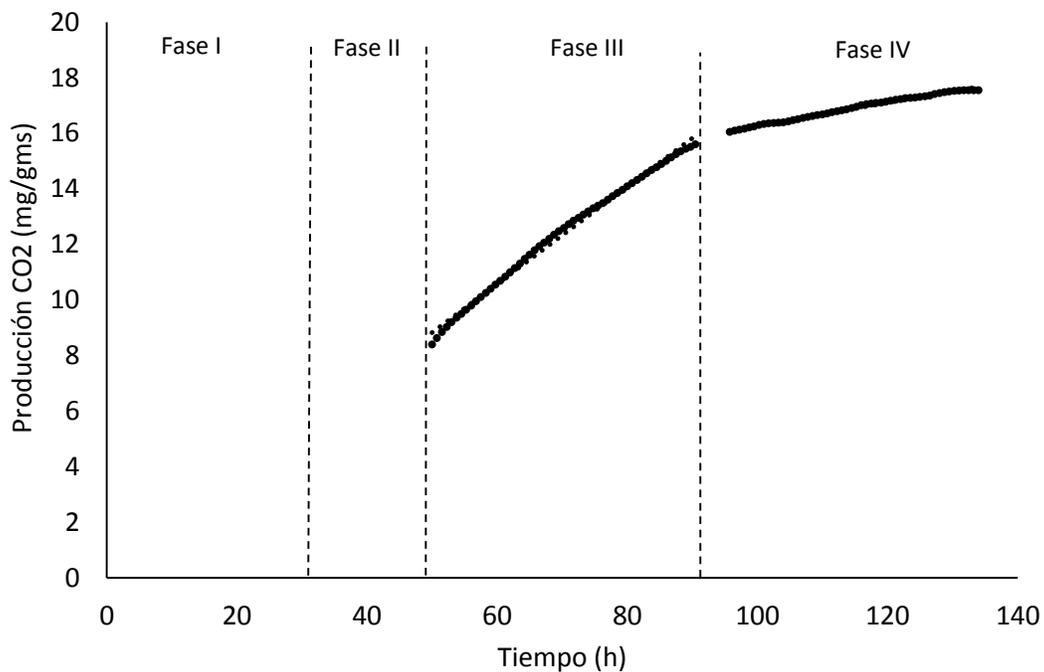


Fig. 8. Ajuste con un modelo lineal de las etapas III y IV de los datos de producción de CO₂ de *M. anisopliae* Ma59

6.4. Pruebas de calidad de conidios

En esta sección se describen las diferentes pruebas de calidad que se realizaron a los lotes de conidios producidos.

6.4.1. Germinación

La germinación se evaluó por triplicado al colocar 50 μL de una suspensión con concentración de 2×10^6 conidios/mL en una caja Petri de 100x15 mm con 20 mL de medio ADS (Tabla 5). La suspensión se esparció con ayuda de una varilla de vidrio y las cajas se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 h. Posteriormente, el medio de las cajas se seccionó en cuatro zonas y con ayuda de un microscopio óptico y un objetivo 40x, se registró el porcentaje de germinación considerando 100 conidios por zona seleccionados al azar. Se consideró conidio germinado aquel cuyo tubo germinativo era igual o mayor al ancho del conidio sin germinar (Safavi *et al.*, 2007).

6.4.2. Viabilidad

Para cuantificar la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 se utilizaron cajas Petri con 20 mL de medio agar dextrosa Sabouraud más desoxicolato de Sodio al 0.05% (ADS-D). La composición del medio ADS-D se muestra en la Tabla 6. Se colocaron, por quintuplicado, 30 μL de una suspensión de conidios estandarizada a 1×10^4 conidios/mL (300 conidios) esparciéndola con ayuda de una varilla de vidrio. Como control se utilizó Tween 80 al 0.05% estéril. Después de incubar las cajas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h se contaron las colonias y se reportó la viabilidad como unidades formadoras de colonias (UFC).

Tabla 6. Composición del medio ADS-D para medir la viabilidad (UFC) del hongo *M. anisopliae* Ma59

Compuesto	Cantidad (g L^{-1})
Desoxicolato de Sodio	0.5
Agar dextrosa Sabouraud	65

6.4.3. Pruebas de infectividad de *M. anisopliae* sobre ninfas de *D. citri* en condiciones controladas

Se siguieron dos metodologías para el bioensayo con ninfas de *D. citri*; aspersión e inmersión. Para ambos bioensayos se utilizaron cinco unidades experimentales para el tratamiento y cinco para el control.

Con un aspirador entomológico se recolectaron adultos de *D. citri* del pie de cría del CNRCB. La cría se realiza sobre plantas de mirto a una temperatura promedio de 30°C y humedad relativa mayor al 40%. Posteriormente, los adultos de *D. citri* se liberaron en plantas de mirto, y se mantuvieron aislados durante un ciclo de vida con la finalidad de asegurar que no presentaran parasitismo o alguna enfermedad causada por patógenos. Finalmente, se recolectaron ninfas del segundo al cuarto instar, las cuales serían utilizadas en los bioensayos.

El primer bioensayo (aspersión) se realizó con plantas de mirto (*Murraya paniculata*); las cuales fueron proporcionadas por personal del CNRCB. Las plantas de mirto, de un año edad; recibieron tres fertilizaciones; la primera se hizo con Agrofol® a los dos meses de siembra; en la segunda se utilizó fertilizante 20-20-20, dosificándolo mensualmente a partir del tercer mes después de la siembra; una tercera fertilización se hizo con nitrógeno al 26% cada mes o después de cada poda. Para eliminar la fumagina, patología causada por *Capnodium* sp., se aplicó agua con jabón líquido o en polvo al 5%. El riego de las plantas se realizó de forma manual con agua potable cada tercer día.

Previo a los bioensayos, cada planta se sometió a un tren de tratamiento antiséptico rociándola con cuatro soluciones: primero con cloro al 2%, seguido de Tween al 0.1%, posteriormente con alcohol al 70% y finalmente con Tween al 0.1%.

En cada planta se colocaron de forma manual 30 ninfas. Finalmente, cada planta se asperjó con 2.5 mL de suspensión estandarizada a 1×10^7 conidios/mL a una presión de 15 PSI utilizando un volumen de 2.5 mL (Fig. 9A). Cada unidad experimental se asperjó con un equipo diseñado por el personal del Departamento de Hongos Entomopatógenos del CNRCB; el cual consta de una torre de vidrio de

19 cm de diámetro por 50 cm de altura, la base es completamente abierta y en la parte superior tiene una válvula conectada a un compresor.

En el segundo bioensayo (inmersión) se utilizaron brotes de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) infestados con ninfas de *D. citri*, los cuales se obtuvieron de un predio ubicado en la comunidad de Cofradía de Morelos, Colima. Se cortaron 10 brotes que tuvieran en promedio entre 20-80 ninfas y se trasladaron en condiciones frías hasta el laboratorio. Los brotes se podaron hasta dejar solo las hojas más jóvenes y para evitar su marchitamiento se les colocó un algodón húmedo en el tallo. Cada brote con ninfas se sumergió durante cinco segundos en 30 mL de una suspensión estandarizada de conidios (1×10^7 conidios/mL). Posteriormente, se colocaron en papel secante para eliminar el exceso de agua (Fig. 9A). Finalmente, se mantuvieron en condiciones de cámara húmeda, esto se logró poniendo un papel filtro en una caja Petri y humedeciéndolo con agua estéril.

Para asegurar la calidad del inóculo, se le realizaron pruebas de germinación y viabilidad como se describe en la sección 6.4; como control se utilizó una solución de Tween 80 al 0.1%. Las plantas y los brotes inoculados se mantuvieron durante 5 d a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con una humedad relativa superior al 50% y fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h. Se realizó el conteo de insectos muertos cada 24 h y estos datos se ajustaron al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.* (2009) para obtener distintos parámetros de mortalidad.

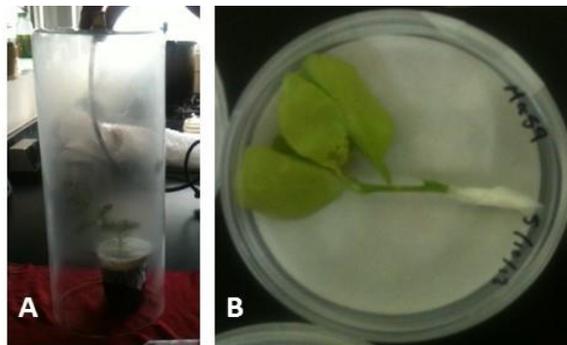


Fig. 9. Metodologías utilizadas en los bioensayos. A) Aspersión de una planta de *M. paniculata*; B) brote de *C. aurantifolia* inoculado y colocado en cámara húmeda

Los insectos muertos resultantes en el bioensayo se colocaron en condiciones de cámara húmeda durante cinco días para promover el desarrollo del hongo (micosis) y asegurar que la muerte del insecto fue debida al hongo entomopatógeno y no por otras causas (Tefera y Pringle, 2003).

6.5. Evaluación de la efectividad de *M. anisopliae* Ma59 en campo

El control biológico inoculativo o inundativo se refiere al aumento de enemigos naturales para el control de un insecto plaga. El control biológico por aumento de enemigos naturales representa una estrategia importante en el manejo integrado de plagas (González-Hernández y Pacheco-Sánchez, 2007).

Se realizaron tres evaluaciones independientes en campo entre julio del 2013 y marzo del 2014 en plantaciones de limón mexicano (*C. aurantifolia* Swingle) infestadas con el PAC.

Para la selección de los predios utilizados se consideró que A) la infestación por *D. citri* fuera de entre 20 y 80 ninfas por brote, y B) que en 15 d previos a la evaluación no se hubiera asperjado algún químico. La primera evaluación se realizó en agosto del 2013 en un predio de 2.5 ha ubicado en la comunidad de Cofradía de Morelos (18°51'28.64"N-103°50'9.58"O, 12 m altitud) municipio de Tecomán, Colima, México. La segunda evaluación se realizó en febrero del 2014 en un predio de 1.3 ha ubicado en Tecolapa (18°58'50"N-103°50'31"O, 80 m altitud) perteneciente al Municipio de Tecomán, Colima. La última evaluación se realizó en marzo del 2014 en un predio de 0.6 ha ubicado en Tecomán (18°55'53"N-103°51'50"O, 49 m altitud), Colima.

Los predios utilizados en las evaluaciones se seccionaron de acuerdo a las corrientes de aire existentes. Cada tratamiento se separó por dos surcos de árboles "buffer" que sirvieron como barrera física para evitar un efecto sinérgico entre tratamientos (Fig. 10). En la segunda y tercera evaluación los predios se seccionaron en tres partes: el testigo y dos tratamientos (Fig. 10 B-C). En el primer tratamiento (T1) se evaluó el efecto de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 de un

lote producido en la UAM-Iztapalapa; en el segundo tratamiento (T2) se evaluó el efecto de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 de un lote producido por el departamento de Hongos Entomopatógenos del CNRCB.

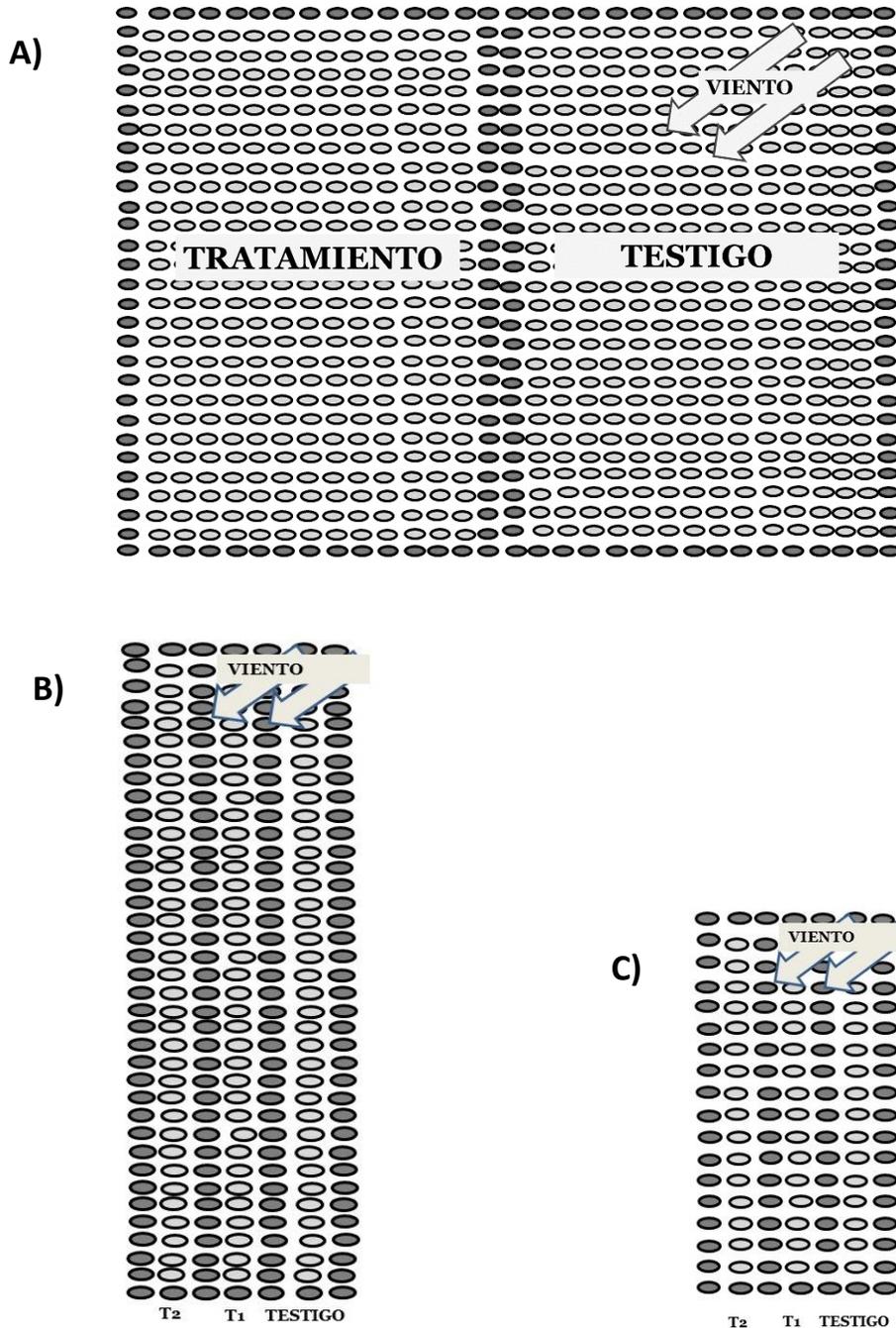


Fig. 10. Segmentación de los predios utilizados. A) Primera evaluación; B) segunda evaluación y C) tercera evaluación en campo. Los óvalos gris claro significan árboles tratados y los óvalos gris oscuro fueron árboles buffer sin tratar.



Fig. 11. Etapas de la evaluación en campo A) marcaje de los brotes, B) preparación de la suspensión de conidios, C) aspersión de los conidios, D) caja de Petri en un árbol de limón para evaluar la germinación de la suspensión asperjada y E) corte del brote cinco días después de la aspersión

Previo a la aplicación se seleccionaron y marcaron 30 brotes por tratamiento, y cada uno se consideró como una unidad experimental (Fig. 11A).

El transporte de los conidios hasta el lugar de la evaluación se realizó en condiciones frías para evitar la pérdida de viabilidad. En cada tratamientos se asperjó una suspensión de conidios con una concentración de 6×10^6 conidios viables/mL (Fig. 11B), y en el testigo se usó una solución de Inex al 0.1%. Se utilizaron motobombas Shindaiwa ES726 modificadas con un manómetro para obtener una presión de aspersion de 200 PSI. La aspersion de cada árbol se realizó hasta el punto de escurrimiento, lo que implicó un volumen promedio de dos litros por árbol (Fig. 11C). Las evaluaciones se hicieron a partir de las 16 h, ya que las condiciones ambientales favorables para las evaluaciones en campo de hongos entomopatógenos pueden ocurrir temprano por la mañana o durante la tarde (Alatorre, 2012).

Para evaluar la calidad de las suspensiones utilizadas en campo, se colocaron en tres árboles al azar cajas con medio ADS (Fig. 11D), se asperjaron los arboles e inmediatamente se incubaron las cajas durante 14 h a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. La cantidad de conidios germinados se evaluó como se describe en la sección 6.4.

Inmediatamente realizada la aplicación, los brotes previamente seleccionados y marcados se confinaron con una bolsa de organza, la cual evitó la entrada de insectos y salida de las ninfas (Fig. 11E).

Los brotes confinados se cortaron después de permanecer siete días en campo y se trasladaron al laboratorio para su análisis (Fig. 12A). Con ayuda de un microscopio estereoscopio se clasificó la población de *D. citri* presente en los brotes como: ninfas vivas, ninfas muertas, ninfas parasitadas, ninfas micosadas, adultos vivos, adultos muertos y adultos micosados (Fig. 12B). Toda la población se mantuvo durante siete días en condiciones de cámara húmeda para promover el desarrollo de micosis por el entomopatógeno (Fig. 12C-F).



Fig. 12. Tratamiento de los brotes de los árboles de limón mexicano (*C. aurantifolia* Swingle) que fueron asperjados con una suspensión de conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59. Donde A) traslado de los brotes de campo a laboratorio en condiciones frías, B) clasificación de la población presente en cada brote con ayuda de un microscopio estereoscópico, C) ninfas muertas de *D. citri* en caja Petri, D) incubación a 28°C en condiciones de cámara húmeda de los brotes clasificados, E-F) ninfas y adultos de *D. citri* micados con el hongo *M. anisopliae* Ma59

Con los datos de mortalidad, obtenida en la población después de siete días en campo, se realizó el cálculo de mortalidad corregida (MC) utilizando la fórmula de Sun-Shepard (Püntener, 1981):

$$MC (\%) = \left(\frac{\text{mortalidad en el tratamiento } (\%) \pm \text{cambio en PC } (\%)}{100 \pm \text{cambio en PC } (\%)} \right) * 100 \quad (\text{ec.3})$$

Donde

$$\text{cambio en PC } (\%) = \left(\frac{\text{PC después de tratamiento} - \text{PC antes de tratamiento}}{\text{PC antes del tratamiento}} \right) * 100 \quad (\text{ec.4})$$

PC = población del control

Los registros del clima correspondientes a los días de cada evaluación en campo se obtuvieron del portal electrónico del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

6.6. Relación de la infectividad entre laboratorio y campo

Para demostrar la relación entre los resultados de la micosis obtenida en laboratorio y campo, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), por lo que esta sección no requirió trabajo en el laboratorio.

6.7. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en los experimentos de viabilidad y en los análisis respirométricos modificando la temperatura de incubación y la humedad del sustrato, y para la relación de la infectividad en laboratorio-campo, se realizó un ANDEVA utilizando la prueba de HSD de Tukey para comparaciones múltiples a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Para el análisis de los datos obtenidos en el análisis respirométrico comparando las tasas de aireación se realizó una prueba de T de Student a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Se utilizó el Software PASW Statistic Data Editor 18.0 en su versión para Windows en todos los análisis estadísticos.

7. Resultados y Discusiones

Este capítulo se divide en dos secciones; en la primera se exponen los resultados obtenidos en la producción en CMS de conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59. En la segunda sección, se muestran y discuten los resultados obtenidos las evaluaciones bajo condiciones controladas y campo.

7.1. Conservación por liofilización

Los liofilizados obtenidos en este trabajo se emplearon para producir el inóculo necesario en los lotes de producción. A pesar de que hubo carencia de pruebas cuantitativas para este experimento, se realizaron observaciones macro y microscópicas del crecimiento y producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59.

Todos los liofilizados al ser propagados sobre medio ADS, mostraron un crecimiento algodonoso; sin embargo, al realizar la primera resiembra en el mismo medio, el crecimiento y la esporulación presentaron el crecimiento característico de *M. anisopliae* Ma59.

En el trabajo realizado por García (2012) reportó una disminución en la germinación de la cepa de *M. anisopliae* CP-OAX del 21% después de someterla al proceso de liofilización; sin embargo, este parámetro se mantuvo durante dos meses posteriores al proceso de conservación.

7.2. Producción del inóculo

Después de 10 d de incubación, el crecimiento del hongo propagado en medio ADS provocó que el agar se agrietara, además la esporulación se presentó en forma de césped color verde militar (Fig. 13). Sin embargo, en las cajas con medio HaPcA el crecimiento fue algodonoso y la esporulación presentó un color verde-amarillo.

La diferencia de crecimiento y esporulación de *M. anisopliae* Ma59 puede estar asociada a la relación C/N de los medios utilizados. El medio ADS tiene una relación C/N= 35 (Shah *et al.*, 2005; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010), mientras que el medio HaPcA tiene una relación C/N=6 (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010).

Debido a las características de crecimiento y de esporulación del hongo, se decidió utilizar el medio ADS para propagar la cepa y obtener los inóculos necesarios para los experimentos posteriores.

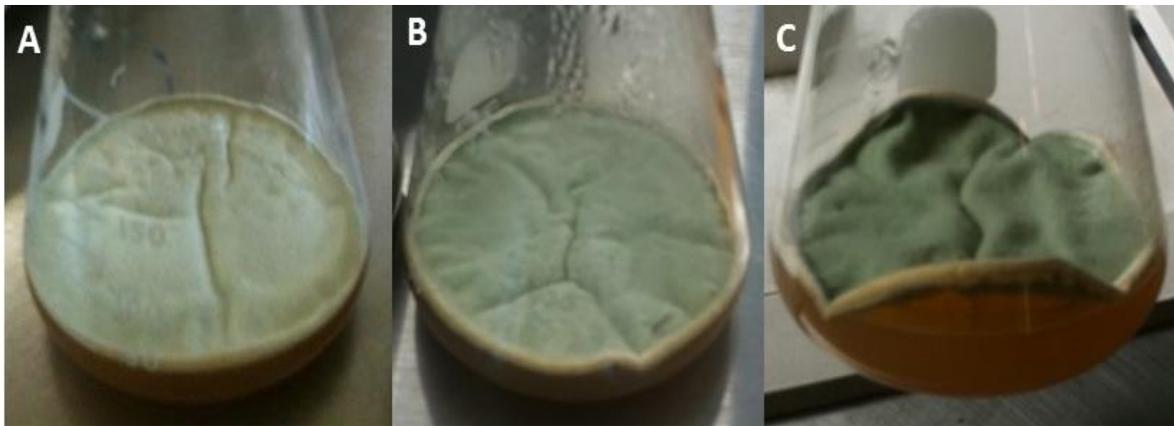


Fig. 13. Crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 sobre medio ADS a los A) 3 d, B) 5 d y c) 7 d de incubación

7.3. Efecto del cloranfenicol sobre la viabilidad

En la Fig. 14 se presenta la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* Ma59. La viabilidad de los conidios sin cloranfenicol fue del 57%. Para concentraciones de cloranfenicol de 250 a 750 ppm la viabilidad fue similar (42%). Aunque la viabilidad con 1000 ppm de cloranfenicol fue del 33%, la diferencia no fue significativa ($P < 0.05$) cuando se analizó con concentraciones de cloranfenicol de 200 a 750 ppm.

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que se une a la subunidad 50S bloqueando las funciones principales del ribosoma como la reacción de la peptidil transferasa asociada en la formación del enlace peptídico para la síntesis de proteínas (Katzung, 2010).

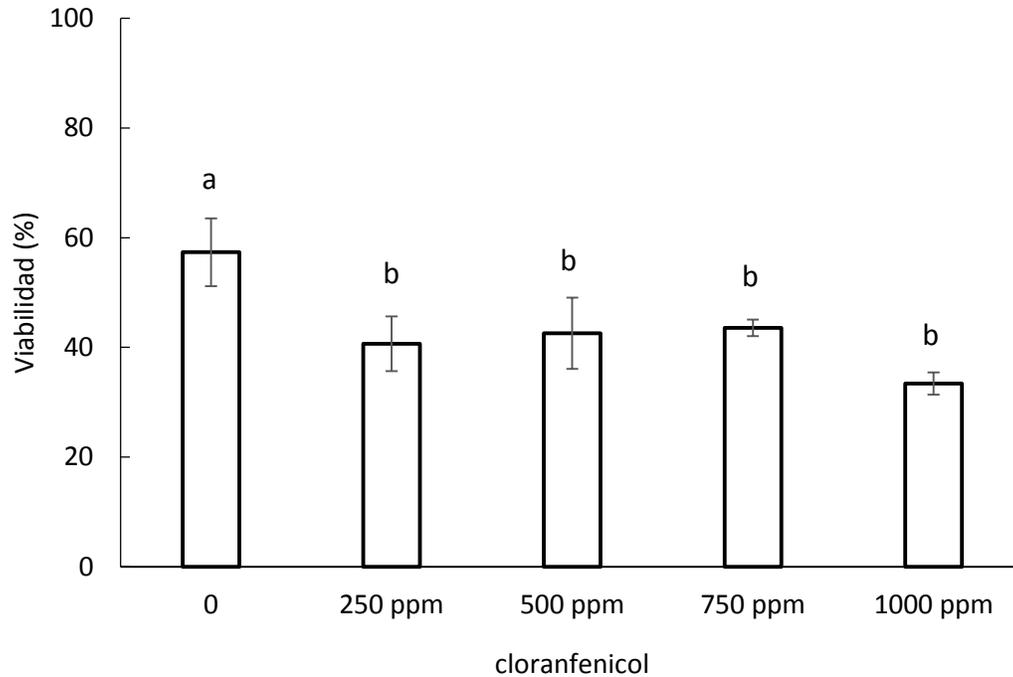


Fig. 14 Viabilidad de la suspensión de *M. anisopliae* Ma59 con diferentes concentraciones de clorfenicol

Debido a que no se encontraron diferencias entre la viabilidad de los conidios en concentraciones de clorfenicol de 250 a 1000 ppm, se optó por utilizar la concentración de 500 ppm en la producción de lotes de conidios de *M. anisopliae* Ma59 similar al trabajo reportado por Lezama-Gutiérrez *et al.* (2012).

7.4. Producción de conidios en CMS

En esta sección se presentan y discuten los parámetros cinéticos de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59; además, se discuten los resultados obtenidos con un metabolímetro al modificar la temperatura de incubación, la humedad en el sustrato y la tasa de aireación del CMS de *M. anisopliae* Ma59 en biorreactores tubulares.

7.4.1. Temperatura

Uno de los principales problemas en el cultivo en medio sólido es la acumulación de calor metabólico cuando se utilizan cantidades grandes de sustrato. El medio sólido se compacta y afecta la transferencia de calor y masa (Doelle *et al.*, 1992; Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández, 1994; Durand, 2003; Figueroa-Montero *et al.*, 2011).

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* es capaz de crecer en un rango de temperaturas entre 5 a 40°C con un óptimo a 30°C (Hallsworth y Magan, 1999). La temperatura tiene un efecto directo en el rendimiento de conidios en CMS, por eso frecuentemente se busca incubar cerca de las temperaturas óptimas de crecimiento (Jenkins y Grzywacz, 2000). Por tanto, para determinar la termotolerancia de la cepa se evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre los parámetros de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59. Se evaluaron cuatro temperaturas (26°, 28°, 30° y 32°C). El estudio se realizó en biorreactores tubulares de 2 cm de diámetro con una tasa de aireación de 0.8 VKgM.

En la Tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los perfiles de producción de CO₂ para el CMS de *M. anisopliae* Ma59. El tratamiento a 28°C mostró el menor valor (32.9 ±1.1 h) para el t_{lag}. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los valores de t_{lag} obtenidos con los tratamientos a 28° y 32°C. Un menor t_{lag} puede disminuir el riesgo de contaminación del proceso.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 en CMS incubado a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	t _{lag} (h)	rCO ₂ max (mg/gms-h)	PCO ₂ (mg/gms-d)	μ _{max} (h ⁻¹)	μ _{III y IV} (h ⁻¹)
26	37.4 ± 0.3 ^b	0.30 ± 0.04 ^a	1.59 ± 0.07 ^a	0.30 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
28	32.9 ± 1.1 ^a	0.37 ± 0.01 ^a	2.62 ± 0.75 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.04 ^a
30	36.8 ± 1.3 ^b	0.28 ± 0.06 ^a	1.63 ± 0.57 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.03 ^a
32	36.0 ± 0.6 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^a	0.89 ± 0.13 ^a	0.35 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.02 ^a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey: $P < 0.05$)

Los valores de la tasa máxima de producción de CO₂ (rCO_2_{max}) permanecieron entre un rango de 0.28 y 0.37 mg/gms·h sin que existiera diferencia significativa entre las temperaturas analizadas.

La productividad global de CO₂ (PCO_2) para el tratamiento a 28°C fue de 2.62 ± 0.75 mg/gms·d, mientras que en el tratamiento a 32°C fue tres veces menor (0.89 ± 0.13 mg/gms·d). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico ($P < 0.05$) no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

La tasa específica de producción de CO₂ máxima calculada con el método logístico (μ_{max}) se presentó entre un rango de 0.27 y 0.35 h⁻¹ sin que existiera diferencia significativa entre los tratamientos analizados ($P < 0.05$). En cambio, la μ calculada en las etapas de desaceleración (μ_{III} y μ_{IV}) presentó valores entre 0.02 y 0.11 h⁻¹.

Es prudente señalar que no existió correspondencia entre el menor valor del t_{lag} y el mayor valor de μ_{max} . Contrario a esto, se observa relación entre el menor t_{lag} con de los valores más altos de la rCO_2_{max} , la PCO_2 y la μ_{III} y μ_{IV} los cuales se obtuvieron con la temperatura de incubación de 28°C; sin embargo, la prueba Tukey no indica diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de estos parámetros obtenidos con las distintas temperaturas estudiadas.

La producción de conidios no se reporta debido a que el crecimiento del hongo en el biorreactor fue irregular, presentándose crecimiento solo en la zona más baja del biorreactor (entrada del aire húmedo); esto ocasionó que la producción de conidios fuera nula o heterogénea. Por tanto, los valores de los parámetros de la rCO_2_{max} , PCO_2 están subestimados, debido a que los parámetros se calculan con base en la masa del sustrato total.

El t_{lag} reportado en este trabajo es 30% menor que el reportado por Dorta *et al.* (1996); sin embargo, dichos autores cultivaron la cepa de *M. anisopliae* sobre una mezcla de cascara y salvado de arroz, y le realizaron un análisis respirométrico a una temperatura de 28°C. Ellos dividen la curva de producción de biomasa en tres secciones: I) la fase lag que dura 48 h, posteriormente observan un II) crecimiento vegetativo que dura aproximadamente 100 h y la última III) de esporulación que

dura de 90-100 h. Por otro lado, Ángel (2011) utilizando el mismo sustrato reporta valores de t_{lag} de 20.4 h para *I. fumosorosea* CNRCB1.

La rCO_2_{max} obtenida en este trabajo (0.37 mg/gms-h) representa el 40% del valor de la rCO_2_{max} reportada con *I. fumosorosea* (0.59 mg/gms-h) por Ángel (2011). Los parámetros cinéticos son particulares para cada microorganismo, los cuales varían de acuerdo a su capacidad de desarrollo en las condiciones utilizadas. En el trabajo reportado por Juárez (2014) obtienen un valor de rCO_2_{max} de 7.56 mg/gms-h al crecer al hongo *Aspergillus versicolor* a 37.5 °C sobre aserrín embebido con medio Czapec-Dox.

Por otro lado, la productividad global del CO₂ (PCO_2) presenta valores menores a los reportados en la literatura; posiblemente, ocasionado por el crecimiento heterogéneo en los biorreactores. En el 2011 Ángel reportó una PCO_2 de 8.3 mg/gms-d utilizando una cepa de *I. fumosorosea*. En el trabajo realizado por Porcayo-Loza *et al.* (2013) reportan una PCO_2 de 13 y 6.8 mg/gms-d utilizando una cepa de *M. anisopliae* incubada en biorreactores de 2 y 4.5 cm de diámetro interno respectivamente.

Los biorreactores incubados a 28°C presentaron el menor t_{lag} y mostraron una tendencia de tener los mayores valores de rCO_2_{max} , la PCO_2 y las μ_{III} y IV ; sin embargo, no existió diferencia significativa con las demás temperaturas analizadas. Además, en un proceso a mayor escala, utilizar una temperatura mayor generaría un gasto económico adicional. Debido a lo anterior, se escogió la temperatura de 28°C para la producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59 en CMS.

7.4.2. Humedad

Otro de los parámetros relevantes en los CMS es el contenido de humedad del medio de cultivo. Éste debe ajustarse para obtener la mejor respuesta de la variable deseada.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la humedad (35%, 40% y 45%) sobre los parámetros de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59. En la Tabla 8 se muestran los parámetros asociados al crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 utilizando diferentes humedades en el sustrato.

En la sección 7.4.1. se evidenció como el valor del t_{lag} se modificaba con la temperatura de incubación; sin embargo, al modificar la humedad inicial en el sustrato, los valores para el t_{lag} fueron de 32 y 34 h, sin que se presentara diferencia significativa ($P < 0.05$).

La rCO_{2max} presentó valores entre 0.24 y 0.58 mg/gms-h, aumentando conforme incrementó la humedad en el sustrato. La rCO_{2max} del cultivo con la humedad más baja representa el 40% de la rCO_{2max} del cultivo con la mayor humedad en el sustrato. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de la rCO_{2max} obtenidos con el 40 y 45% de humedad en el sustrato.

La mayor PCO_2 (4.41 ± 0.68) se obtuvo en los biorreactores con una humedad del 45% en el sustrato, siendo 5 y 1.5 veces mayor a la productividad obtenida en los biorreactores con una humedad de 35% y 40%, respectivamente.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 en CMS utilizando diferentes humedades en el sustrato.

Humedad (%)	t_{lag} (h)	rCO_{2max} (mg/gms-h)	PCO_2 (mg/gms-d)	μ_{max} (h^{-1})	μ_{III} (h^{-1})	μ_{IV} (h^{-1})
35	34.6 ± 2.0^a	0.24 ± 0.04^a	0.96 ± 0.18^a	0.28 ± 0.02 c	0.05 ± 0.01 a	0.01 ± 0.0^a
40	32.7 ± 2.3^a	0.45 ± 0.15^{ab}	2.88 ± 0.54^b	0.20 ± 0.01 b	0.17 ± 0.01 b	0.03 ± 0.01 a
45	33.2 ± 1.1^a	0.58 ± 0.03^b	4.41 ± 0.68^c	0.14 ± 0.00 a	0.26 ± 0.05 c	0.06 ± 0.05 a

Letras distintas indican diferencia significativa entre las medias (Tukey: $P < 0.05$)

En la Tabla 8 se reportan las tasas específicas de producción de CO₂ (μ) para cada etapa de crecimiento. El máximo valor para la μ_{max} se presentó en los biorreactores con el 35% de humedad en el sustrato. Sin embargo, en estos biorreactores fue donde se presentó la menor PCO_2 . Contrario a esto, el menor valor para la μ_{max} se presentó en los biorreactores con el 45% de humedad en el sustrato, donde además se presentó la mayor PCO_2 . Este fenómeno puede explicarse con las tasas específicas de producción de CO₂ (μ) de las etapas de desaceleración y mantenimiento. La μ_{III} obtenida en los biorreactores con una humedad del 45% presentó el máximo valor (0.26 ± 0.05), el cual es similar a μ_{max} de los biorreactores con 35% de humedad (0.28 ± 0.02); lo que indica que, la etapa III en los biorreactores con la mayor humedad en el sustrato no es de desaceleración; contrario a esto, los biorreactores con la menor humedad la etapa III sí es de desaceleración.

La producción de conidios no se reporta debido a que el crecimiento del hongo en el biorreactor fue irregular. Se presentó crecimiento únicamente en la zona más baja del biorreactor (entrada del aire húmedo), lo que ocasionó que el perfil axial de producción de conidios fuera heterogéneo. Por tanto, los valores de los parámetros de la rCO_2_{max} , PCO_2 están subestimados, debido a que los parámetros se calculan con base en la masa del sustrato total.

La humedad crítica es característica en donde ocurre un cambio en las condiciones de secado del material; el cual, pasa de una velocidad de secado constante a una velocidad de secado decreciente (Dávila, 2004). En los CMS, el agua puede presentarse dentro de la matriz sólida; o bien, como una capa delgada absorbida por la superficie de las partículas o enlazada débilmente en los espacios capilares de la matriz. En la Fig. 15 se presenta el comportamiento de la velocidad de secado en función del contenido de humedad del arroz.

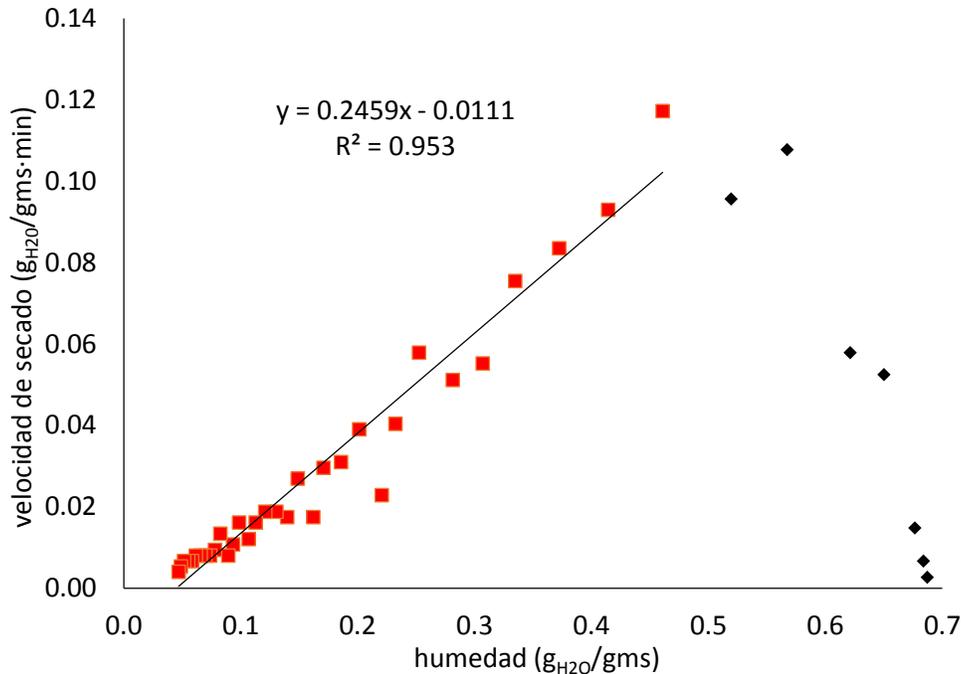


Fig. 15. Gráfico que presenta el comportamiento de la velocidad durante el secado de arroz

Al realizar la intersección del periodo de velocidad constante (puntos rojos) y el periodo de velocidad decreciente (puntos negros), se obtuvo el punto que representa, en el eje de las abscisas, la humedad crítica (g_{H_2O}/gms). La velocidad máxima de secado (V_{maxs}) del arroz fue calculada por duplicado. La V_{maxs} presentó un valor de 0.119 ± 0.002 (min^{-1}). Con lo anterior fue posible calcular la humedad crítica, mostrando un valor de 0.500 ± 0.016 g_{H_2O}/gms (33% de humedad). El agua libre en el CMS solo se presenta cuando se excede la capacidad de saturación del sustrato; el agua libre en el arroz se presenta después del 50% de humedad (Raimbault, 1998).

La isoterma de un producto, a una temperatura constante, relaciona gráficamente el contenido de humedad en equilibrio de un producto con la actividad termodinámica del agua del mismo, ya que en el equilibrio, este último parámetro es igual a la humedad relativa del aire que rodea al producto. Una isoterma puede obtenerse de dos diferentes formas (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002):

- I. Una isoterma de adsorción se obtiene colocando el material seco en diferentes atmósferas para que la humedad aumente y se registra la ganancia de peso debido al agua adsorbida.
- II. Una isoterma de desorción se realiza colocando un material húmedo bajo la misma condición de humedad y se registra la pérdida de peso.

Se construyó la isoterma de desorción (Fig.16) para el arroz al graficar la actividad de agua (A_w) contra la humedad (g_{H_2O}/gms). Los datos experimentales se ajustaron con ayuda de la herramienta Solver de Excel al modelo de Henderson ($R^2 > 0.95$) el cual se presenta a continuación:

$$X_w = A * \left[\frac{-\log(1-A_w)}{10^f} \right]^{\frac{1}{n}} = X_w = 0.01 * \left[\frac{-\log(1-A_w)}{10^{-0.878}} \right]^{\frac{1}{0.738}}$$

Donde X_w es el contenido de agua calculado, A_w la actividad de agua y los valores de A , f y n son parámetros del modelo de Henderson característicos para el arroz (Vega *et al.*, 2006; Juárez, 2014).

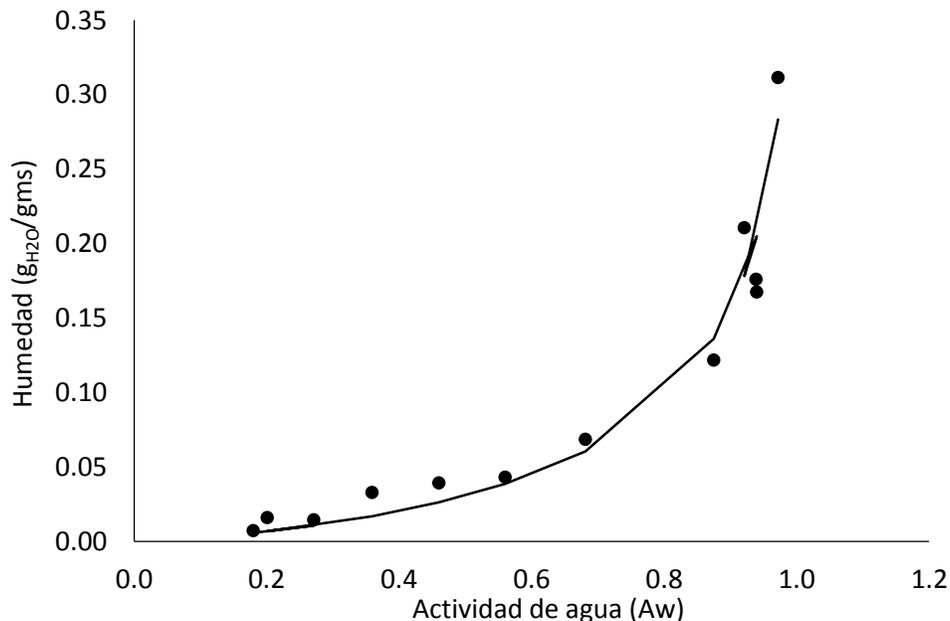


Fig. 16. Isotherma de desorción del arroz. Los círculos negros corresponden a los datos experimentales y la línea continua al modelo de Henderson

Entre los valores de actividad de 0.2 y 0.6 el contenido de agua aumentó lentamente de 0.01 a 0.05 g_{H₂O}/gms. Esto se debe a que el agua retenida en el soporte se encontraba formando una multicapa de moléculas alrededor de las partículas del sólido; esta agua, disponible para disolver algunos solutos de bajo peso molecular y algunas reacciones bioquímicas, no es disponible para el crecimiento microbiano (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002).

Una vez superado el valor de 0.7 en la A_w , el contenido de agua comienza a incrementar exponencialmente, hasta superar el 0.95 de A_w con una humedad de 0.25 g_{H₂O}/gms; esta agua se encuentra en macrocapilares y es disponible para su aprovechamiento en el crecimiento microbiano (Al-Muhtaseb *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Bhanu *et al.* (2007) demuestran que la mayor producción de conidios de *M. anisopliae* se obtiene con un contenido de humedad inicial en el arroz como sustrato de 22.4%. Por otro lado, en el trabajo realizado por Núñez-Gaona *et al.* (2010), obtienen la mayor producción de conidios de *B. bassiana* en CMS utilizando como sustrato al salvado de trigo con una humedad inicial de 66%. Esta diferencia en los valores de humedad entre el arroz y el salvado de trigo se debe principalmente a la diferencia en la capacidad de retención de agua de ambos sustratos. De la misma forma, la capacidad de retención de agua del arroz depende del tipo de arroz y del pretratamiento del arroz (reducción de tamaño, precocción, condiciones de esterilización, entre otros).

El valor más grande para μ se presentó hasta la tercera etapa de crecimiento ($\mu_{III} = 0.26 \pm 0.05$) utilizando una humedad en el arroz del 45%. En estas condiciones de humedad se obtuvo la mayor PCO_2 . Además, el valor del T_{lag} (33 h) no presentó diferencias significativas entre los valores obtenidos en los biorreactores con distintas humedades. Por tanto, se eligió la humedad del 45% al utilizar arroz como sustrato para la producción de conidios en CMS.

7.4.3. Tasa de aireación

El calor metabólico es una de las principales limitantes en el escalamiento de biorreactores para el CMS (Figuroa-Montero *et al.*, 2011) y en consecuencia, la productividad. Entre las principales funciones de la aireación está el suministrar O₂, remover CO₂, calor metabólico y productos volátiles del cultivo (Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández, 1994; Raimbault, 1998; Torres, 2012). Estudios recientes han demostrado que la modificación de la atmósfera gaseosa influye en el nivel de conidiación de *M. anisopliae* (Tlecuil-Beristain, 2010; García, 2012).

Por ello, en el presente trabajo se estudió el efecto de la tasa de aireación (0.1 y 0.8 VKgM) sobre los parámetros de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59. El estudio se realizó en biorreactores tubulares de 4.5 cm de diámetro interno incubados a 28°C utilizando una humedad del 45% en el sustrato. En la Tabla 9 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59 incubado con dos distintas tasas de aireación.

Los biorreactores con una tasa de aireación pequeña (0.1 VKgM) presentaron una disminución del 13% en el t_{lag} comparado con los biorreactores aireados con una tasa de 0.8 VKgM. Este valor del t_{lag} es menor al que se había obtenido en las secciones 7.4.1. y 7.4.2.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de crecimiento de *M. anisopliae* Ma59 incubado con dos tasas de aireación.)

Tasa de aireación (VKgM)	t_{lag} (h)	$rCO_2 max$ (mg/gms·h)	PCO_2 (mg/gms·d)	μ_{max} (h ⁻¹)	μ_{III} (h ⁻¹)	μ_{IV} (h ⁻¹)
0.1	29.1 ± 0.4 a	1.48 ± 0.09 b	22.33 ± 1.35 b	0.14 ± 0.0 a	1.29 ± 0.09 b	1.29 ± 0.09 b
0.8	33.2 ± 1.1 b	0.58 ± 0.03 a	4.41 ± 0.68 a	0.14 ± 0.0 a	0.26 ± 0.05 a	0.06 ± 0.05 a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (T de Student: P < 0.05)

El parámetro de la r_{CO_2} obtenido en los biorreactores con una tasa de aireación de 0.1 VKgM fue 2.5 veces mayor al obtenido con una tasa de aireación de 0.8 VKgM.

La productividad del CO_2 (PCO_2) obtenida en los biorreactores con una tasa de aireación pequeña (0.1 VKgM) fue cinco veces mayor a la obtenida con una tasa de aireación alta (0.8 VKgM). Este aumento en la productividad se dio a pesar de que la tasa específica de producción de CO_2 calculada con el modelo logístico (μ_{max}) no presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos analizados.

El aumento en la productividad puede ser explicado con las tasas específicas de producción de CO_2 obtenidas en la III y IV (μ_{III} y μ_{IV}) zona de crecimiento (véase Fig.5). La μ_{III} obtenida con una tasa de aireación menor (0.1 VKgM) es cinco veces mayor a la obtenida con la tasa de aireación mayor (0.8 VKgM), lo que indica que la etapa tres no es de desaceleración, debido a que en ambos casos la μ_{III} es mayor a la calculada con el modelo logístico y reportada en este trabajo como μ_{max} .

La tasa óptima de aireación de un CMS estará determinada por la naturaleza del microorganismo empleado, los requerimientos particulares de oxígeno para el crecimiento y la síntesis de producto sobre los nutrientes dados, la cantidad de calor metabólico que debe ser disipada, el grado al cual el CO_2 y otros metabolitos volátiles que son eliminados, el espesor del sustrato y su densidad de empaque (inversamente relacionada con el volumen de espacio poroso) y el contenido de humedad (Lonsane *et al.*, 1985).

A diferencia de los biorreactores donde se evaluaron diferentes temperaturas y humedades (secciones 7.4.1. y 7.4.2.), los biorreactores con la tasa de aireación de 0.1 VKgM a partir del quinto día de incubación comenzaron a presentar el color verde pasto característico de la esporulación de *M. anisopliae* Ma59. Después de 16 d de incubación cada biorreactor se seccionó en cuatro zonas para realizar conteo de conidios.

En la Fig.17 se muestra el perfil axial de la producción de conidios en biorreactores tubulares de *M. anisopliae* Ma59.

La conidiación aparente en las diferentes zonas de los biorreactores con la tasa de aireación pequeña fue homogénea, a diferencia de los biorreactores aireados con una tasa de aireación de 0.8 VKgM (Fig. 17). La producción promedio de conidios de las diferentes zonas fue de 2×10^8 conidios/gms sin que se encontraran diferencias significativas entre zonas (Fig. 18).

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Arzumanov *et al.* (2005) quienes realizaron un CMS de *M. anisopliae* var. *acridum* utilizando una mezcla de arroz/bagazo de caña como sustrato. Estos autores mencionan que los rendimientos de conidios obtenidos al utilizar aireación forzada disminuyen, por lo que sugieren el uso de flujos bajos o bien no suministrar aireación forzada para asegurar los niveles de conidiación.

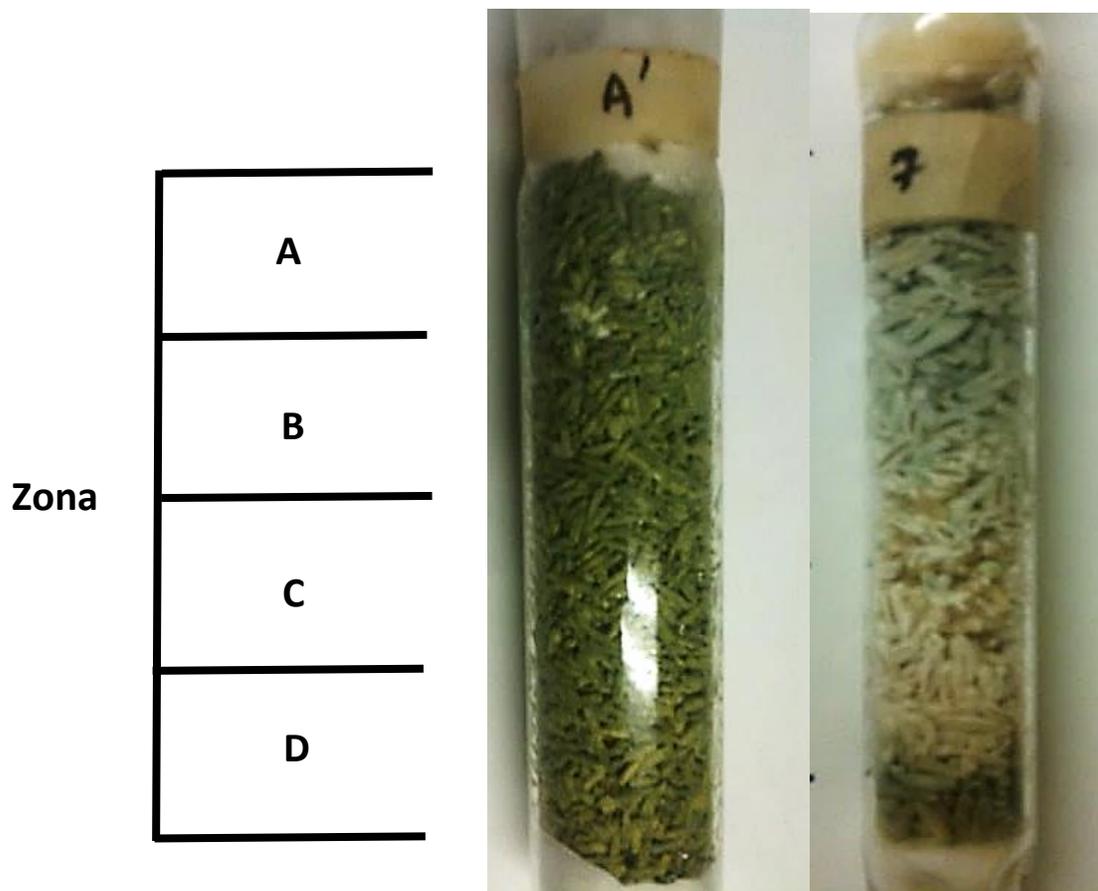


Fig. 17. Perfil axial de la conidiación de *M. anisopliae* Ma59. Izquierda) biorreactor con una tasa de aireación de 0.1 VKgM; Derecha) biorreactor con una tasa de aireación de 0.8 VKgM

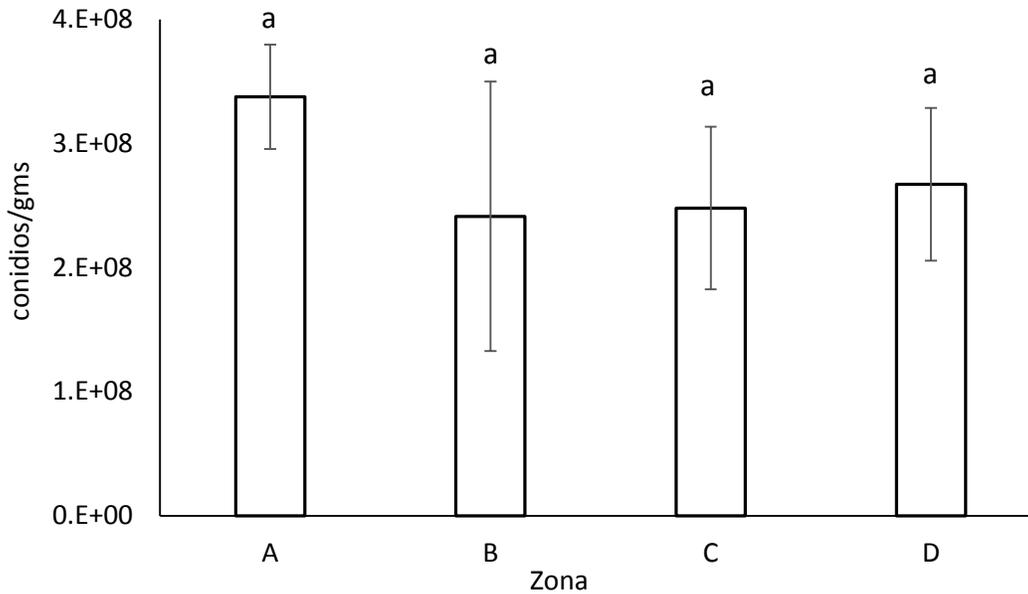


Fig. 18. Perfil axial de producción de conidios de *M. anisopliae* en los biorreactores con una tasa de aireación de 0.1 VKgM

En el trabajo reportado por Ángel-Cuapio (2011) se señala que al cultivar el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 en CMS utilizando arroz como sustrato y bajo condiciones de aireación forzada constante se obtiene un rendimiento de conidios menor (7.1×10^8 conidios/gms) al alcanzado sin aireación forzada (3.3×10^9 conidios/gms). El mismo patrón obtuvo con el hongo *M. anisopliae* CP-OAX, al utilizar arroz como sustrato y aireación forzada alcanzó un rendimiento menor (1.2×10^8 conidios/gms) comparado al obtenido sin aireación forzada (3.3×10^8 conidios/gms).

Existen mejores condiciones para el crecimiento en CMS de *M. anisopliae* Ma59 cuando se utiliza una tasa de aireación pequeña (0.1 VKgM) comparado con el crecimiento cuando se utiliza una tasa de aireación alta. La aseveración deriva del comparar los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos con una tasa de aireación de 0.1 y 0.8 VKgM, se presentó una disminución del 13 % del t_{lag} , la rCO_{2max} fue 2.5 veces mayor y la PCO_2 fue cinco veces mayor. Con base en lo anterior, se eligió la tasa de aireación pequeña (0.1 VKgM) para ser utilizada en las posteriores producciones de conidios en CMS.

7.4.4. Producción de conidios en CMS en biorreactores con diferentes geometrías

Después de evaluar la respuesta de crecimiento en biorreactores tubulares de *M. anisopliae* Ma59 modificando distintas condiciones de cultivo, se decidió comparar la conidiación de este hongo al modificar la geometría del biorreactor; para esto, se decidió utilizar las mejores condiciones de cultivo mostradas en los biorreactores tubulares, las cuales fueron una incubación a 28°C, una humedad en el sustrato del 45% y una tasa pequeña o sin aireación.

En la Fig. 19 se muestra la producción de conidios (conidios/gms) obtenida después de 16 d de incubación en cuatro distintas geometrías de biorreactor (charola de aluminio, matraces, tubulares de vidrio y bolsas de polipapel).

En las charolas de aluminio fue donde se presentó la menor producción de conidios (1.7×10^8 conidios/gms); sin embargo, no mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) con la producción obtenida con los biorreactores tubulares (2.8×10^8 conidios/gms). En el caso de los matraces y de las bolsas de polipapel el promedio en la producción fue de 3.5 y 3.2×10^8 conidios/gms.

La mayoría de datos de producción de conidios reportados a la fecha han sido obtenidos en matraces Erlenmeyer o en pequeños frascos con una cama delgada de sustrato; sin embargo, grandes versiones de estos quizás no sean las más apropiadas para la producción a gran escala (Mitchell *et al.*, 2006). En la Tabla 10 se compara la producción de los conidios obtenidos en este trabajo utilizando como biorreactor la bolsa de polipapel con las producciones reportadas para *M. anisopliae* por diversos autores.

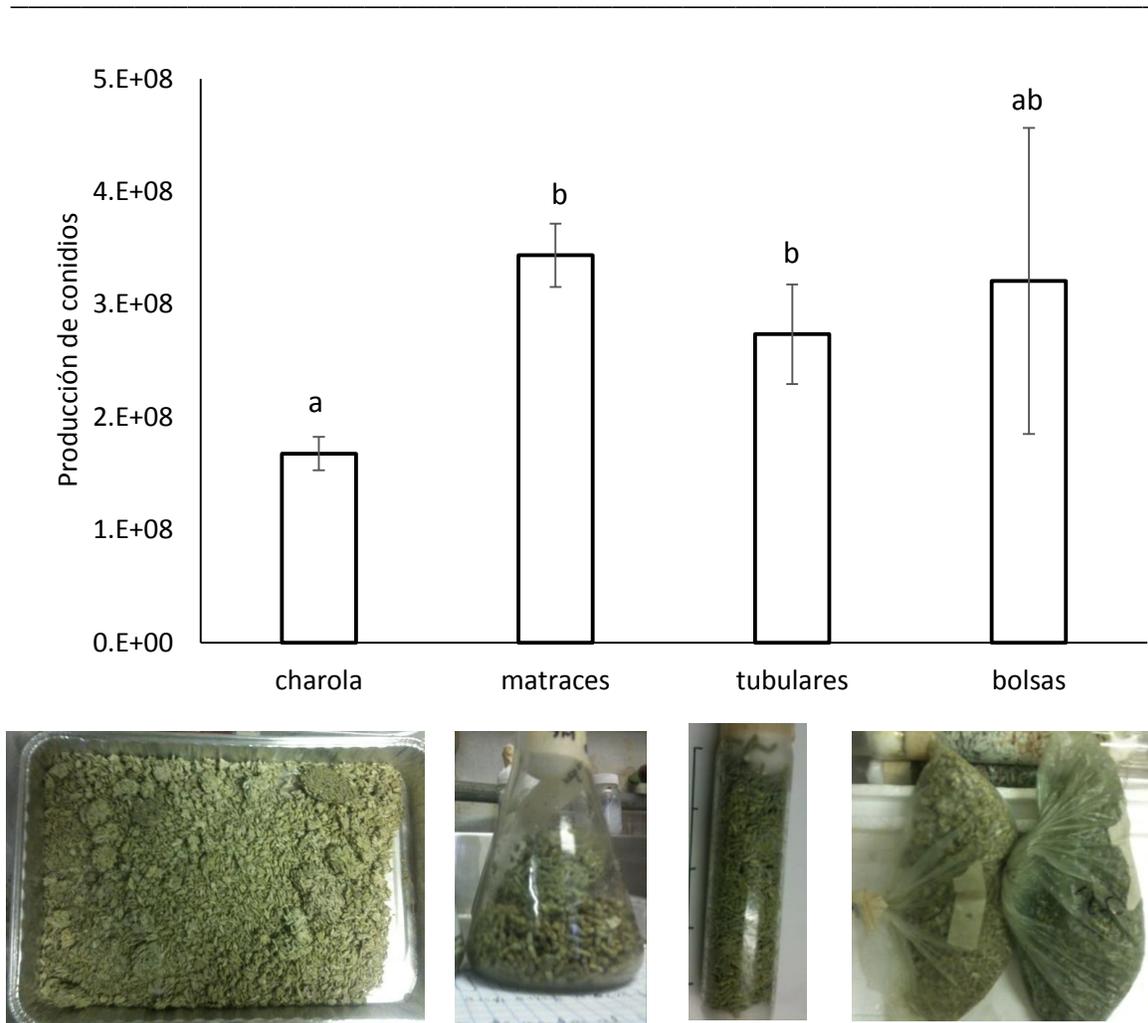


Fig. 19. Producción de conidios de *M. anisopliae* Ma59 en diferentes geometrías de biorreactores. Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey; $P < 0.05$)

A pesar de que la producción de conidios es menor a la reportada por distintos autores, se decidió utilizar la bolsa de polipapel como sistema para la producción de los conidios, los cuales se utilizarían en las evaluaciones en campo y en las distintas pruebas de calidad, debido a que no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la producción de conidios obtenida y a que una bolsa de polipapel permite tener una mayor cantidad de sustrato en el sistema; además, no necesita una corriente de aire como los biorreactores tubulares, lo que se traduce en una menor inversión para el laboratorio.

Tabla 10. Producción de conidios de *M. anisopliae* en diferentes biorreactores reportadas por distintos autores

Autor	Sustrato	Biorreactor	Cosecha (d)	Producción (conidios/gms)
Este trabajo	Arroz	Bolsas de polipapel	16	3.2 x10 ⁸
Ángel-Cuapio (2011)	Arroz	Frascos Gerber®	6	3.9 x10 ⁸
Porcayo-Loza <i>et al.</i> (2013)	Arroz	Biorreactores tubulares	10	1.5 x10 ⁹
Dorta y Arcas (1998)	Arroz-cascara de arroz	Biorreactores tubulares	14	8 x10 ⁹
Bhanu <i>et al.</i> (2007)	Arroz	Bolsas de polipropileno	15	5.3x10 ¹⁰

7.5. Bioensayos

Los bioensayos son utilizados para medir parámetros clave en la selección de cepas eficaces en el control microbiano (O'Callaghan *et al.*, 2012). Como se muestra en este trabajo, las técnicas utilizadas en los bioensayos pueden variar a pesar de utilizar el mismo insecto plaga como modelo de estudio. A continuación se presentan los resultados de dos bioensayos utilizando técnicas diferentes.

En el primer bioensayo, que se hizo asperjando plantas de *M. paniculata*, se observó un porcentaje de mortalidad de las ninfas de 34.6% y 39.8% para el control y el tratamiento con *M. anisopliae* Ma59 respectivamente (Tabla 11), pero las medias de los tratamientos no presentaron significativa ($P < 0.05$).

Tabla 11. Resultados del bioensayo por aspersión utilizando plantas de *M. paniculata*

Tratamiento	Mortalidad (%)	Micosis (%)	Germinación (%)	Viabilidad (%)
Control	34.6±8.4 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
<i>M. anisopliae</i> Ma59	39.8±11.2 ^a	23.6±7.9 ^b	91.3±3.5 ^b	56±8 ^b

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (T de Student: $P < 0.05$)

A pesar de que el porcentaje de mortalidad del control fue alto, no se desarrolló micosis en los insectos muertos. En el caso de las ninfas asperjadas con *M. anisopliae* Ma59, el $23.6 \pm 7.9\%$ desarrollaron micosis.

La suspensión de conidios de *M. anisopliae* Ma59 utilizada presentó 91% de germinación, pero solo el 56% de los conidios fueron viables. Esto evidenció que no todos los conidios utilizados tenían la capacidad de invadir al insecto y por consecuencia no desarrollaron micosis. Debido a que la germinación y la viabilidad son parámetros de calidad utilizados en productos comerciales, no deben confundirse estos términos. La diferencia entre estos parámetros puede explicarse debido a que el conidio es capaz de germinar en condiciones de humedad adecuada utilizando a los solutos compatibles (trehalosa y manitol) como carbohidratos de reserva. Una vez que los carbohidratos se agotan, requiere tomar nutrientes del medio, lo que llevaría a considerarlo como un conidio viable capaz de formar una UFC.

En el trabajo reportado por Leeuwen *et al.* (2012) al analizar el transcriptoma de *Aspergillus niger* durante las primeras ocho horas de germinación, encontraron que el nivel de transcritos de los genes involucrados para la síntesis de trehalosa y manitol disminuyó considerablemente en las primeras dos horas del proceso de germinación y después aumentó gradualmente. En complemento, el nivel de transcritos de los genes que codifican para las enzimas trehalasa y manitol-deshidrogenasa aumentan durante las primeras dos horas del proceso de germinación.

En el segundo bioensayo, que se hizo sumergiendo brotes de *C. aurantifolia* Swingle infestados con ninfas de *D. citri*, se observó un porcentaje de mortalidad mayor a 92% en el control y en el tratamiento con el hongo entomopatógeno; sin embargo, las ninfas muertas provenientes del control no desarrollaron micosis. En cambio, el $25.0 \pm 12.2\%$ de la población de ninfas asperjadas con *M. anisopliae* Ma59 desarrollaron micosis (Tabla 12). Similar al bioensayo por aspersión, se registró un porcentaje bajo en la viabilidad de los conidios (40%), lo cual indudablemente influyó en el porcentaje de micosis.

Tabla 12. Resultados del bioensayo por inmersión utilizando brotes de *C. aurantifolia* Swingle

Tratamiento	Mortalidad (%)	Micosis (%)	Germinación (%)	Viabilidad (%)
Control	≥92.1 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
<i>M. anisopliae</i> Ma59	≥96.7 ^a	25.0±12.2 ^b	87.8±3.0 ^b	40±4

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (T de Student: $P < 0.05$)

La mortalidad de las ninfas en ambos tratamientos pudo ser causada por inanición; la ninfa de *D. citri* se alimenta de la savia del árbol (Hall *et al.*, 2012), la cual deja de circular por el brote pocas horas después de haber sido arrancado del árbol.

Los datos de mortalidad obtenidos en ambos bioensayos (aspersión e inmersión) se ajustaron al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.* (2009) obteniéndose en todos los casos un coeficiente de correlación (R^2) menor a 0.8. También se calculó la mortalidad corregida (MC) con la fórmula de Sun-Shepard. La MC obtenida en el bioensayo por aspersión fue de 11.4%, subestimando los datos observados. En el caso del bioensayo con brotes de limón mexicano la MC fue del 100 %, en este caso, sobrestimando lo observado.

Contrario a lo reportado en este trabajo, Arredondo-Bernal *et al.* (2010) mencionan que en condiciones de laboratorio utilizando la misma cepa de *M. anisopliae* obtienen 90% y 56% de micosis en ninfas y adultos de *D. citri* respectivamente. Sin embargo, en el trabajo reportado por estos autores no mencionan la concentración de conidios utilizada, lo que podría provocar la diferencia en el porcentaje de micosis.

Los porcentajes de micosis entre los bioensayos no mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$). Debido a lo anterior y al porcentaje de mortalidad mostrado en cada bioensayo, se recomienda realizar futuras evaluaciones utilizando la técnica por aspersión de plantas de *M. paniculata*. Sin embargo, es necesario mejorar la metodología de evaluación, con la finalidad de evitar altos porcentajes de mortalidad.

7.6. Efectividad de *M. anisopliae* Ma59 en ninfas de *D. citri* en campo

En el presente trabajo se realizaron tres evaluaciones en campo para determinar el efecto de los conidios del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* Ma59 sobre el PAC, vector del HLB. La metodología para la evaluación se desarrolló en colaboración con personal del Departamento de Hongos Entomopatógenos (DHE) del CNRCB ubicado en Tecomán, Colima.

Se comparó el porcentaje de conidios germinados antes y después de asperjarse en cada evaluación (datos no mostrados) y no se encontró diferencia significativa (T Student: $P < 0.05$) entre las medias. Esto indica que la manipulación de los conidios desde su traslado del laboratorio hasta su aplicación, no afectó su calidad.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en las tres evaluaciones en campo realizadas entre el mes de agosto de 2013 y marzo de 2014, las condiciones climáticas y las particularidades de cada caso.

Tabla 13. Porcentaje de la población de *D. citri* micosada en las diferentes evaluaciones en campo

Evaluación	Tratamiento	Micosis	
		Ninfas (%)	Adultos (%)
1	Control	0±0 ^a	0±0 ^a
	<i>M. anisopliae</i> Ma59 (UAM)	17.8±12.6 ^b	4.8±5.4 ^a
2	Control	0±0 ^a	0±0 ^a
	<i>M. anisopliae</i> Ma59 (UAM)	2.3±2.3 ^a	1.3±2.1 ^a
	<i>M. anisopliae</i> Ma59 (CNRCB)	1.7±1.6 ^a	2.0±2.4 ^a
3	Control	0±0 ^a	0±0 ^a
	<i>M. anisopliae</i> Ma59 (UAM)	0.3±1.1 ^a	0±0 ^a
	<i>M. anisopliae</i> Ma59 (CNRCB)	1.6±2.7 ^a	0.6±1.3 ^a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey: $P < 0.05$)

En la Tabla 13 se presentan los porcentajes de la población que desarrolló micosis cuando se evaluó el control, un lote de conidios de *M. anisopliae* Ma59 producido en la UAM y un lote de conidios de *M. anisopliae* Ma59 producido por el DHE-CNRCB.

En la primera evaluación se obtuvo el mayor porcentaje de ninfas (17.8%) y adultos (4.8%) micosados con el tratamiento del hongo entomopatógeno. La población del control no presentó micosis.

En la segunda evaluación 3.6% de la población asperjada con el lote de *M. anisopliae* Ma59 UAM desarrolló micosis; de la cual 2.3% se encontraba en estadio ninfal y 1.3% en estadio adulto. Con el lote producido por el DHE-CNRCB se observó que 3.7% de la población desarrolló micosis. Al realizar la prueba estadística correspondiente, no se encontró diferencia significativa entre la micosis obtenida en la población asperjada con ambos tratamientos.

En la tercera evaluación 0.3% de las ninfas asperjadas con el lote de conidios producido en la UAM desarrolló micosis. En cambio, los adultos no presentaron invasión por el hongo. Con el lote producido por el DHE-CNRCB se obtuvo que 2.2% de la población desarrolló micosis; de la cual 1.6% se encontraba en estadio ninfal y 0.6% en estadio adulto. Al realizar la prueba estadística correspondiente, no se encontró diferencia significativa entre la micosis obtenida en la población asperjada con ambos tratamientos.

En seguida se describen las condiciones climáticas y las particularidades de cada evaluación. En la Tabla 14 se muestra la distribución de la población de *D. citri* presente en la primera evaluación; estos datos se obtuvieron inmediatamente después de recolectar los brotes de campo. A pesar de mostrar desviaciones estándar grandes, la tendencia indica que el mayor porcentaje de la población (83%) se encontraba en estadio ninfal, presentando mayoría las ninfas vivas. El parasitismo en las ninfas en esta evaluación fue de 11%, mayor al observado en la segunda y tercera evaluación.

Tabla 14. Distribución de la población por brote en la 1era evaluación

Tratamiento	ninfas			adultos	
	vivas (%)	muertas (%)	parasitadas (%)	vivos (%)	muertos (%)
Control	75±27 ^a	8±15 ^a	0.6±0.9 ^a	12±20 ^a	3±11 ^a
<i>M. anisopliae</i>	64±32 ^a	6±8 ^a	11±21 ^a	16±20 ^a	2±3 ^a
Ma59					

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (T de Student: P < 0.05)

En la Tabla 15 se muestra la distribución de la población de *D. citri* presente en la segunda evaluación. A pesar de las desviaciones estándar, la tendencia indica que el mayor porcentaje de la población (82%) se encontró en estadio ninfal. El control presentó mayor porcentaje de ninfas vivas en la población; en cambio, en los tratamientos el mayor porcentaje fue de ninfas muertas.

Tabla 15. Distribución de la población por brote en la 2da evaluación

Tratamiento	ninfas			adultos	
	vivas (%)	muertas (%)	parasitadas(%)	vivos (%)	muertos (%)
Control	70±32 ^b	20±33 ^a	1±4 ^a	7±9 ^a	0.3±1.3 ^a
UAM	19±24 ^a	59±34 ^a	3±7 ^a	15±14 ^a	4±5 ^a
CNRCB	8±13 ^a	59±30 ^a	5±12 ^a	11±13 ^a	16±22 ^a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (T de Student: P < 0.05)

En la Tabla 16 se muestra la distribución de la población de *D. citri* presente en la tercera evaluación. A pesar de las desviaciones estándar, la tendencia indica que el mayor porcentaje de la población se encontró en estadio ninfal (91%). En el control y en el tratamiento de conidios con el lote producido por el DHE-CNRCB el mayor porcentaje de la población fueron ninfas vivas.

A pesar de que en la segunda y tercera evaluación el mayor porcentaje de la población fue conformada por ninfas muertas, no fue determinante para que estas ninfas desarrollaran micosis. Fue en la primera evaluación donde se presentó el mayor porcentaje de ninfas vivas y también de ninfas micosadas.

Tabla 16. Distribución de la población en la 3era evaluación en campo

Tratamiento	ninfas			adultos	
	vivas (%)	muertas (%)	parasitadas(%)	vivos (%)	muertos (%)
Control	89±10 ^b	6±6 ^a	0±0 ^a	3±5 ^a	2±2 ^a
UAM	40±33 ^a	50±38 ^b	0.3±0.8 ^a	7±10 ^a	2±5 ^a
CNRCB	67±29 ^{ab}	21±21 ^a	0±0 ^a	9±13 ^a	1±3 ^a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey: $P < 0.05$)

Como se ha mencionado en diferentes secciones de este escrito, la infectividad causada por los hongos entomopatógenos es un proceso multifactorial. De acuerdo con la bibliografía consultada y con la experiencia adquirida, se enlistan las posibles causas de mortalidad de las ninfas de *D. citri*:

- I. Natural. El insecto se alimenta a través de un estilete por el cual succiona la savia; si por el brote deja de circular la savia, el insecto muere por inanición (Bonami *et al.*, 2010). El insecto puede completar su ciclo biológico en 14 d a una temperatura de 28°C (Nava *et al.*, 2007)
- II. Parasitismo. El insecto *Tamarixia radiata* es el principal parasitoide del PAC. Esta avispa de un milímetro de longitud es capaz de alimentarse y de parasitar las ninfas de *D. citri* (Mellín *et al.*, 2012).
- III. Hongos entomopatógenos. La concentración y la viabilidad del patógeno influye en la infección en campo (Alatorre, 2012).
- IV. Factores ambientales. El desarrollo de *D. citri* se ve altamente afectado por los factores ambientales, en especial la temperatura, humedad y precipitación (Hall *et al.*, 2012; Nava *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2002)
- V. Otros. En este punto se pueden incluir aquellos factores que no están comúnmente contemplados en los bioensayos, como la presencia de plaguicidas, depredadores, entre otros.

Los puntos I, II y III de la lista hacen referencia a cuestiones biológicas, en cambio los puntos IV y V involucran cuestiones del entorno en el cual se desarrolla el insecto.

En la Tabla 17 se muestra el resumen de los datos climáticos registrados por estaciones de clima del INIFAP en Colima en las fechas correspondientes para cada evaluación.

Tabla 17. Datos del clima durante las tres evaluaciones de campo.

Evaluación	Temperatura promedio (°C)	Humedad relativa promedio (%)	Radiación Solar máxima (W/m ²)
1	28	85	880
2	25	80	810
3	22	75	850

De acuerdo con lo reportado por Crecy *et al.* (2009), las cepas de *M. anisopliae* no son capaces de crecer en temperaturas mayores a 35°C. Sin embargo, en este trabajo se presentó el mayor porcentaje de micosis de ninfas y adultos en la primera evaluación, donde la temperatura máxima registrada fue de 35°C (datos no mostrados). Durante la primera evaluación, donde se obtuvo el mayor porcentaje de micosis, la temperatura promedio fue de 28°C. Esto podría estar relacionado con lo reportado en este trabajo (véase sección 7.4.1.), donde se demostró que el T_{lag} fue menor cuando esta cepa era incubada a 28°C.

La humedad relativa promedio registrada durante las tres evaluaciones presentó valores aceptables para el desarrollo del hongo. De acuerdo con lo reportado por Hernández-Ramírez *et al.* (2007), se presentó un aumento del 44% en la mortalidad de los adultos de *Periplaneta americana* cuando realizaron los bioensayos con humedad relativa de 85%, comparados con los bioensayos realizados con 50 % de humedad relativa.

Otro factor importante de la eficacia de una cepa en campo es su resistencia a la luz UV (Alatorre-Rosas, 2007; Braga *et al.*, 2001), la cual está relacionada con su pigmentación. En el trabajo realizado por Braga *et al.* (2006) reportaron que una cepa de *M. anisopliae* con una pigmentación verde oscura presentó 60% de mayor

tolerancia (medida como UFC) comparada con una cepa con una pigmentación amarilla después de una exposición de cuatro horas a radiación UV-A (320-400 nm).

En la Tabla 18 se hace un resumen de las evaluaciones reportadas por el SENASICA (2013), donde mencionan que la cepa de *M. anisopliae* Ma59 ha sido evaluada en diferentes localidades de la República Mexicana. Es relevante resaltar que los mayores porcentajes de micosis se obtuvieron en lugares cercanos al Golfo de México; como el caso de Huejutla, Hidalgo en donde se reportó que 79% de la población en los brotes presentó micosis. Caso contrario a lo que obtuvieron en los estados colindantes con el océano Pacífico; por ejemplo, en Michoacán 3% de la población desarrolló micosis, en Colima 9% y en Oaxaca 35%. La cepa de *M. anisopliae* Ma59 fue aislada en el estado de Veracruz, lo que hace suponer que el porcentaje de infectividad en campo puede estar relacionado con la procedencia del aislado. Además, las condiciones geográficas y climáticas del Golfo de México y el océano Pacífico son distintas (Lanza *et. al.*, 2013).

Tabla 18. Evaluaciones realizadas con la cepa de *M. anisopliae* Ma59 contra *D. citri* en diferentes localidades de la República Mexicana (SENASICA, 2013)

Municipio	Estado	Población con micosis (%)	Temperatura promedio (°C)	Humedad relativa promedio (%)
Huejutla	Hidalgo	79	28	84
Tomatlán	Michoacán	3	22	60
Hidalgo	Tamaulipas	72	26	81
Tututepec	Oaxaca	35	29	82
Tecomán	Colima	9	24	85

7.7. Relación de la infectividad laboratorio-campo

En la Fig. 20 se presenta la micosis obtenida en las diferentes evaluaciones realizadas en este trabajo. Para explicar la relación entre los datos de la micosis obtenida en laboratorio con la obtenida en campo se realizó un ANDEVA.

En ningún caso se obtuvo 50% de micosis en la población evaluada. No existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la micosis obtenida en las evaluaciones realizadas bajo condiciones controladas, y estos porcentajes solo se relacionan con la micosis obtenida con el estadio ninfal de la primera evaluación en campo.

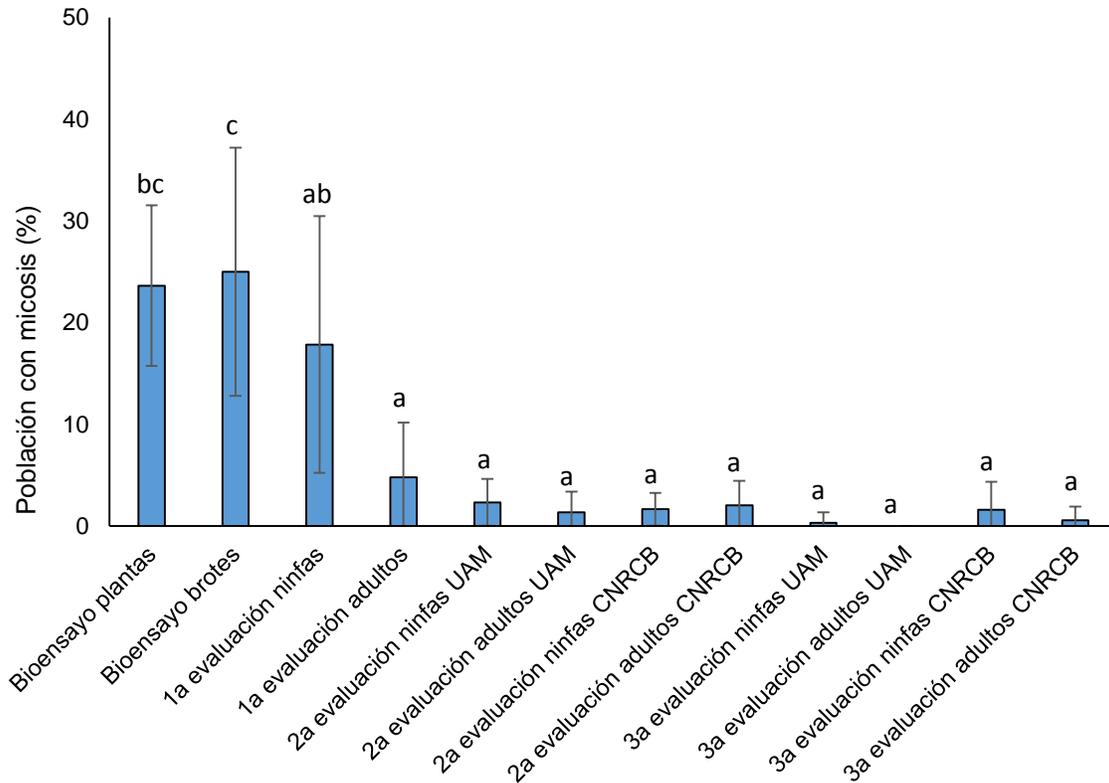


Fig. 20. Resumen de los datos de porcentaje de la población que desarrolló micosis en las diferentes evaluaciones. Letras distintas indican que existe diferencia significativa entre las medias (Tukey: $P < 0.05$)

Todo científico al realizar pruebas en laboratorio intenta crear un ambiente reproducible; sin embargo, en condiciones reales existen muchos factores que no pueden ser controlados. Los bioensayos son una herramienta útil para demostrar la calidad de un lote de conidios producido, pero no pueden predecir cómo se comporta el hongo bajo condiciones reales de campo.

8. Conclusiones

- ❖ La viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 se afectó por el uso de cloranfenicol.
- ❖ La modificación de la temperatura de incubación, humedad en el sustrato y tasa de aireación durante el CMS de *M. anisopliae* Ma59 presentó efecto sobre los parámetros de crecimiento tiempo lag (t_{lag}), tasa máxima de producción de CO_2 (rCO_2), productividad de la mineralización del CO_2 (PCO_2) y en las tasas específicas de crecimiento (μ).
- ❖ El uso de una tasa de aireación pequeña (0.1 VKgM) durante el CMS de *M. anisopliae* Ma59 en biorreactores tubulares promovió un menor t_{lag} y una mayor PCO_2 ; además provocó un crecimiento y una esporulación homogéneos.
- ❖ Las producciones de conidios de *M. anisopliae* Ma59 en CMS en diferentes geometrías de biorreactor fueron estadísticamente iguales.
- ❖ La mortalidad de las ninfas durante los bioensayos fue menor cuando se asperjaron plantas de *M. paniculata* comparada a la mortalidad obtenida al sumergir brotes de *C. aurantifolia*. Sin embargo, la infectividad de los conidios de *M. anisopliae* Ma59 sobre ninfas de *D. citri* fue similar en los dos bioensayos.
- ❖ La infectividad de un hongo entomopatógeno bajo condiciones de campo depende de factores bióticos y abióticos que difícilmente se pueden controlar, lo que provocó que la infectividad de *M. anisopliae* Ma59 sobre *D. citri* mostrara patrones distintos en cada evaluación realizada en campo.
- ❖ La infectividad de *M. anisopliae* Ma59 sobre *D. citri* evaluada bajo condiciones controladas y de campo, fue estadísticamente similar con la primera evaluación en campo, probablemente por la interacción de los factores abióticos específicos.

9. Perspectivas

- ❖ Obtener un conservado de mediano plazo de la cepa de *M. anisopliae* Ma59, por ejemplo utilizando la técnica de conservación en agua desionizada, aceite mineral, sílica gel, entre otros.
- ❖ Reactivar constantemente la cepa de *M. anisopliae* Ma59 utilizando la técnica de pase por insecto.
- ❖ Realizar cinéticas de producción de conidios utilizando diferentes biorreactores.
- ❖ Diseñar o adquirir un equipo extractor de esporas para el arroz colonizado por hongos entomopatógenos, con el fin de poder almacenar las esporas sin que se pierda la viabilidad de las mismas rápidamente.
- ❖ Mejorar la técnica del bioensayo asperjando plantas de *M. paniculata*, con la finalidad de disminuir el porcentaje de mortalidad de las ninfas.
- ❖ Realizar evaluaciones atacando plagas distintas a *D. citri* para verificar si el la infectividad que se obtiene en evaluaciones en campo es similar entre con distintas plagas.
- ❖ Realizar pruebas complementarias para evaluar la calidad de los conidios de *M. anisopliae*; por ejemplo, evaluar la producción de proteína Pr1, termotolerancia, resistencia a rayos UV, compatibilidad con insecticidas, entre otros.

10. Literatura citada

- Ángel-Cuapio, R.A. (2011). *Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Ángel-Sahagún, C.A., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S.R. *et al.* (2010). Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 170 (3-4):278-86.
- Alatorre, R.R. (2006). Insecticidas microbianos en el manejo de insectos plaga. *In: Taller de Hongos Entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): control de calidad*. p. 1. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México.
- Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos Entomopatógenos. *In: Rodríguez-del-Bosque La y Arredondo-Bernal HC. Teoría y Aplicación del Control Biológico*. pp. 128,132-133. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México.
- Alatorre, R.R. (2012). Hongos entomopatógenos, alternativa en el manejo de insectos plaga. pp. 145-166. Memorias del XXIII Curso Nacional de Control Biológico, Noviembre 2012, Puebla, México.
- Al-Muhtaseb, A.H., McMin, W.A.M. y Magee, T.R.A. (2002). Moisture sorption isotherm characteristics of foods products: a review. *Food and Bioproducts Processing*, 80:118-128
- Arredondo-Bernal, H., Sánchez-González, J.A. y Mellín-Rosas, M.A. (2010). Avances en el control biológico del psílido asiático de los cítricos en México, pp. 121-132. VI Simposio Internacional Citrícola, Noviembre 2010, Colima, México.

-
- Arzumanov, T., Jenkins, N. y Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*, 40:1037–1042.
- Auld, B.A. y Morin, L. (1995). Constraints in the development of bioherbicides. *Weed Technology*, 9: 638–652.
- Bhanu, P.G.V.S., Padmaja, V. y Siva Kiran, R.R. (2007). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99: 1530-1537
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M. y Croos, J.N.A. (2000). Insect pathogenic fungi: from genes to populations. In: *Fungal Pathology* ed. Kronstad, J.W. pp. 171–193. Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Bonani, J.P., Fereres, A., Garzo, E., Miranda, M.P., Appezzato Da Gloria, B. y Lopes, J.R.S. (2010) Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134: 35–49.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88 (1) 7-37
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J. y Roberts, D.W. (2001). Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability and Delay Germination in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74 (5): 734-739
- Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Flint, S.D, Anderson, A.J. y Roberts D.W. (2001). Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 418-422

-
- Butt, T.M., Greenfield, B.P.J., Greig, C., Maffei, T.G.G., Taylor, J.W.D., *et al.* (2013) *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. *PLoS ONE*, 8(12): e81686. doi:10.1371/journal.pone.0081686
- Crecy, E., Jaronski, S., Lyons, B., Lyons, T.J. y Keyhani, N.O. (2009). Direct evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnology*. 9 (74). doi:10.1186/1472-6750-9-74
- Cross, J.N.A. y Bidochka, M.J. (1999). Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.*, 45: 1055-1061
- Dávila, N.J.R. (2004). *Estudio experimental del efecto de la porosidad de partículas sobre el proceso de secado de un lecho fluidizado a vacío empleando aire*. Tesis de licenciatura, Universidad de las Américas Puebla, Puebla, México.
- Deacon, J.W. (2006). *Fungal Biology*. (4a. ed.). pp. 309-310. United Kingdom: Blackwell publishing
- Doelle, H.W., Mitchell, D.A. y Rolz, C.E. (Eds.) (1992). *Solid Substrate Cultivation*. pp. 3-35. New York: Elsevier Applied Science
- Dorta, B., Ertola, R.J. y Arcas, J. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6):434-9
- Dorta, B. y Arcas, J. (1998). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 23:501-505
- Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Yaroslavtseva, O.N., Greig, C., Kryukov, V.Y., *et al.* (2013) Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE* 8(4): e60248. doi:10.1371/journal.pone.0060248

-
- Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering*, 13:113-125
- Ertola, R., Yantorno, O. y Mignone, C. (1994). Microbiología Industrial. Secretaría General de la Organización de los estados Americanos. Washington, D.C. 3:17
- FAO (2006). Normas internacionales para medidas fitosanitarias. Plagas no cuarentenarias reglamentadas: concepto y aplicación. Publicación N° 16 Marzo de Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Fang, W. y St. Leger, R.J. (2012). Enhanced UV resistance and improved killing of Malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *PLoS ONE* 7(8): e43069. doi:10.1371/journal.pone.0043069
- 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):237-56.
- Fernández, R.M., Berlanga, P.A.M., Cruz, V.C. y Hernández, V.V.M. (2010) Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Entomotropica*, 25(3): 109-115.
- Figueroa-Montero, A., Esparza-Isunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M. y Favela-Torres, E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *J Chem Technol Biotechnol.*, 86: 1321–1331
- Fisher y Garczynski (2012) Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli. In: Lawrence AL. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. (2a. ed.). p. 75. United Kingdom: Academic press.

-
- Flores, V.R., Robles, G.M.M., Velázquez, M.J.J. y Manzanilla, R.M.A. (2010). Situación actual del huanglongbing (HLB) en limón mexicano bajo las condiciones agroecológicas de Colima. VI Simposio Internacional Citrícola, Noviembre, Colima, México.
- Gao, Q.A., Jin, K., Ying, S.H., Zhang, Y.J., Xiao, G.H. *et al.* (2011). Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PloS Genetics*, 7,18. doi:10.1371/journal.pgen.1001264
- García, L.S. y Mier, T. (2010). Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 10(20): 37-63
- García-Gutiérrez, C. y González-Maldonado, M.B. (2013). Síntesis sobre el Uso de Bioinsecticidas y otros Agentes de Control Biológico de Plagas en México. *Vedalia*, 14(1):35-42
- García, O.N. (2012). *Producción de conidios de Metarhizium anisopliae var lepidiotum en atmósferas oxidantes*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
- Gómez, P.P. y Mendoza, M.J. (2004). Publicación técnica No. 5 Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. p.5. Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador. Ecuador
- González-Hernández, H. y Pacheco-Sánchez, C. (2007). Métodos de evaluación de enemigos naturales. *In: Rodríguez-del-Bosque La y Arredondo-Bernal HC. Teoría y Aplicación del Control Biológico*. pp. 48-60. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México.
- Grafton-Cardwell, E.E., Godfrey, K.E., Rogers, M.E., Childers, C.C. y Stansly, P.A. (2006). Asian citrus psyllid. Publication 8205 ANR, University of California Division of Agriculture and Natural Resources, U.S.A.

-
- Grand, M. y Criquet, S. (2013). Impact of culture age on conidial germination, desiccation and UV tolerance of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 23:7,847-859
- Hall, R.A., Peterkin, D.D., Ali, B. y López, V. (1994). Influence of culture age on rate of conidiospore germination in four deuteromycetous entomogenous fungi. *Mycological Research*, 98,763-768
- Hall, D.G., Richardson, M.L., Ammar, E.D. y Halbert, S.E. (2012). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146:207–223
- Hallsworth, J.E. 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):261-6
- Hartelt, K., Wurst, E., Collatz, J., Zimmerman, G., Kleespies, R.G., et al. (2008). Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: preliminary results from laboratory experiments. *International Journal of Medical Microbiology*, 298:314-320
- Heckel, D.G. (2012). Insecticide resistance after silent spring. *Science*, 337,1612-1614.
- Hegedus, D.D. y Khachatourians, G.G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 13: 455-490.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., et al. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336:348-350
- Hernández-Ramírez, G., Hernández-Rosas, F., Sánchez-Arroyo, H. y Alatorre-Rosas, R. (2007). Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium*

- anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Entomotropica* 22(1): 27-36.
- Hernández-Velázquez, V., Hunter, D.H., Barrientos-Lozano, L., Lezama-Gutiérrez, R. y Reyes-Villanueva, F. (2003). Suceptibility of *Schistocer piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Desuteromycotina: Hyphomycetes): laboratory and field trials. *Orthopterists Society*, 12(1):89-92
- Horaczek, A. y Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 31: 65-71
- Hussein, K.A., Abdel Rahman, M.A.A., Abdel Mallek, A.Y., El Maraghy, S.S. y Joo, J.H. (2011). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. *Phytoparasitica*. doi: 10.1007/s12600-011-0204-2
- Jaronsky, S.T. y Jackson, M.A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lawrence, A.L. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. (2a. ed.). p. 255. United Kingdom: Academic press.
- Jenkins, N.E. y Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents - Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10:753-777
- Jenkins, N.E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A.J. y Lomer, C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19(1): 21-31
- Juárez, L.G. (2014). *Efecto de la agitación sobre la producción de CO₂ por hongos septados (Aspergillus versicolor) y no septados (Rhizopus microsporus) en cultivo en medio sólido*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, México.

-
- Kamp, A.M. y Bidochka, M.J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 74-77
- Katzung, B.G., Masters, S.B. y Trevor, A.J. (2010). Farmacología de los antimicrobianos. *In: Farmacología básica y clínica* (11a. ed.). p. 3. Madrid: McGraw Hill.
- Khachatourians, G.G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. *In: Howard y Miller (Eds.), The Mycota VI. Human and Animal Relationships*. pp 331-364. Berlin: Springer-Verlag.
- Konrad, M., Vyleta, M.L., Theis, F.J., Stock, M., Tragust, S., *et al.* (2012) Social Transfer of Pathogenic Fungus Promotes Active Immunisation in Ant Colonies. *PLoS Biol* 10(4): e1001300. doi:10.1371/journal.pbio.1001300
- Krasnoff, S.B., Sommers, C.H., Yong Sun, M., Donzelli, B.G.G., Vandeberg, J.D., Churchill, A.C.L., *et al.* (2006). Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *J Agric Food Chem.*, 54: 7083-7088
- Lanza, E.G., Ortiz, P.M.A. y Carbajal, P.J.L. (2013). Diferenciación hidrogeomorfológica de los ambientes costeros del Pacífico, del Golfo de México y del Mar Caribe. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*. 81: 33-50.
- Leeuwen, M.R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., *et al.* (2012). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in mycology*, 74: 59-70
- Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chávez-Flores, O., Ángel-Sahagún, A., Skoda, S.R., *et al.* (2012). Use of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumososoreia* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1:39-44

-
- Lonsane, B.K., Guildyal, N.P., Budiartman, S. y Ramakrishna, S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7: 258-265.
- Lopes, R.B., Martins, I., Souza, D.A. y Faria, M. (2013). Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112: 236-242
- López-Arroyo, J.I., Jasso, J., Reyes, M.A., Loera-Gallardo, J., Cortez-Mondaca, E. y Miranda, M.A. (2009). Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in México. In: Gottwald TR and Graham JH. *Proc. Intl. Res. Conf. Huanglongbing*. pp. 329-330. Diciembre. 2008. Orlando Florida.
- Mellín, R.M.A., Sánchez, G.J., Naranjo, L.J. y Vizcarra, V.N.I. (2012). Uso del parasitoide *Tamarixia radiata* y hongos entomopatógenos para el control del psílido asiático de los cítricos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha técnica CB-28. p.4. Colima, México.
- Miranda, H.J.F. (2010). *Influencia en el incremento de O₂ en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
- Mitchell, D.A., Krieger, N. y Berovic, M. (2006). *Solid state fermentation bioreactors, fundamentals of design and operation*. p.9. Germany: Springer
- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas R., Gallardo-Escamilla, F. y Loera, O. (2011a). Virulence and growth phenotypes variation in mutant strains of *Beauveria bassiana* (Bats.) Vuill. resistant to 2-deoxy-d-glucose. *Agrociencia*, 45(8)
- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera, O. (2011b). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27(9).

-
- Moore, D. y Prior, C. (1993). The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*, 14:31–40
- Nava, D.E., Torres, M.L.G., Rodrigues, M.D.L., Bento, J.M.S. y Parra, J.R.P. (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 131: 709–715.
- Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera, O. (2010). Effect of Moisture Content and Inoculum on the Growth and Conidia Production by *Beauveria bassiana* on Wheat Bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4).
- O'Callaghan, M., Glare, T.R. y Lacey, L.A. (2012). Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae. In: Lacey AL. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. (2a. ed.). p. 101. Gran Bretaña: Academic press.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. y Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu.*, 2(2):177-192
- Pandey, A. (1992). Recent process developments in Solid-State fermentation in *Biotechnology: Fundamentals in application*. New Delhi: Asiatech Publisher, Inc.
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. pp. 10-14. Inglaterra: Blackwell Scientific Publications.
- Porcayo-Loza, J., Montesinos-Matías, R. y Loera-Corral, O. (2012). Calidad de Conidios de *Beauveria bassiana* producidos sobre arroz y rastrojo de maíz como texturizante. XXXV Congreso Nacional de Control Biológico. Puebla, México.
- Porcayo-Loza, J, Favela-Torres, E., Montesinos-Matías, R. y Loera-Corral, O. (2013). Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en cultivo

- en medio sólido: estudio respirométrico. XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Oaxaca, México.
- Püntener, W. (1981). *Manual for field trials in plant protection*. (2a. ed.). Agricultural division. Ciba-Geigy Limited
- Rangel, D.E.N., Fernandes, E.K.K., Braga, G.U.L. y Roberts, D.W. (2011). Visible light during mycelia growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. *FEMS Microbiol Lett.*, 315:81–86.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3): 1-15
- Rodríguez, B.L.A. y Arredondo, B.H.C. (1999). Quién es Quién en Control Biológico en México. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Río Bravo. pp.105-118. Folleto Técnico Núm. 23. Tamaulipas, México.
- Rodríguez-del-bosque, L.A. (2012a) Bases ecológicas del Control Biológico. XXIII Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre 2012. Puebla, México.
- Rodríguez-del-bosque, L.A. (2012b). Glosario sobre Control Biológico. XXIII Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre 2012. Puebla, México.
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, 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 & Biotechnology*, 25(3).
- Ruíz-Leza, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J.C. y Aguilar, C.N. (2007). Diseño de reactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6: 33-40
- Safavi, S., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Reza, R.G., Bandani, A.R. y Butt, T.M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116-23.

-
- Santa, H.S.D., Santa, O.R.D., Brand, D., Vandenbergue, L.P. de S. y Soccol, C.R. (2005). Spore Production of *Beauveria bassiana* From Agroindustrial Residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 51-60
- Santi, L., Beys, S.W.O., Berger, M., Guimarães, J.A., Schrank, A. y Vainstein, M.H. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon.*, 55:874-880
- Saucedo-Castañeda, G. y Trejo-Hernández, M.R. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.*, 29: 13-24
- SENASICA (2010). Avances en el diagnóstico de HLB en México. 2º Taller Internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida Yucatán, México. Consultada el 24 de mayo del 2014. Recuperado de <http://www.senasica.gob.mx/?doc=18380>
- SENASICA (2012). México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial. Consultada el 18 de mayo del 2014. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BO L1301112.aspx>
- SENASICA (2013). Control Biológico: componente de las áreas regionales de control del PAC. Consultada el 15 de Agosto del 2014. Recuperado de www.senasica.gob.mx/Fincludes/asp/download.asp?IdDocumento%3D25436%26IdUrl%3D60699&ei=6Hf2U8XUCKfW8AHG9oCYBg&usg=AFQjCNF-dc7G8avljc6tMpbxSmID52jeQ&sig2=Kvm1bT5dUzw7kwlbOO2a8w&bvm=bv.73373277,d.b2U
- SENASICA (2014). Plagas reglamentadas de los cítricos. Consultada el 1 de junio del 2014. Recuperado de <http://www.senasica.gob.mx/?id=4513>

-
- Shah, F.A., Wang, C.S. y Butt, T.M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology letters*, 251:259-266
- Shan, L.T., Wang, Z.L., Ying, S.H. y Feng, M.G. (2010). Hydrophobicity-Related Protein Contents and Surface Areas of Aerial Conidia are Useful Traits for Formulation Design of Fungal Biocontrol Agents. *Mycopathologia*, 169(6):483-94
- Shapiro Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W. y Kaya, H.K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88:1-7
- Shi, W.B., Zhang, L. y Feng, M.G. (2008). Time-concentration-mortality responses of carmine spider mite (Acari: Tetranychidae) females to three hypocrealean fungi as biocontrol agents. *Biological Control*, 46:495-501
- Solicitud de patente MX/a/2013/004638 (2013). *Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO₂ y oxígeno y flujo de los gases de salida en procesos biológicos*. Cuyos inventores son Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Torres-Mancera, M.T., Figueroa-Montero, A.A. y Rosales-Zamora, G.
- Tefera, T. y Pringle, K.L. (2003). Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 84:90-95.
- Téllez-Jurado, A., Cruz, R.M.G., Mercado, F.Y., Asaff, T.A. y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 73-80
- Thomas, M.B. y Read, A.F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Microbiology Reviews*, 5: 377-383

- Thomas, V. y Smith, D. (1994). Cryogenic light microscopy and the development of long-term cryopreservation techniques for fungi. *Outlook on Agriculture*, 23: 163-167.
- Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Diaz-Godinez, G. y Loera, O. (2010). Medium, Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum Conidial Production and Quality. *Mycopathologia*, 169(5).
- Torres, M.M.T. (2013). *Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Travis, R.G. (2003). Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi. In: Dilip, K.A., Bridge, P.D. y Deepak, B. (Ed.s) *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. CRC Press. New Zealand.
- Tsai, J.H. y Liu, Y.H. (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, 93:1721–1725.
- Tsai, J.H., Wang, J.J. y Liu, Y.H. (2002). Seasonal abundance of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. *Florida entomologist*, 85(3):446-451
- Tunga, R., Banerjee, R. y Bhattacharyya, B.C. (1998). Optimizing some factors affecting proteases production under solid state fermentation. *Biopr. Eng.*, 19: 187.190.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., et al. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol*, 2:149–159.
- Vega, G.A., Lara, A.E. y Lemus, M.R. (2006). Isotermas de adsorción en harina de maíz (*Zea mays* L.). *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 26(4): 821-827

- Viniegra-González, G. (1997). Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. *In: Roussos, S.; Lonsane, B.K.; Raimbault, M. and Viniegra-González, G. (Eds.). Advances in Solid State Fermentation.* pp. 5-22. Netherlands: Kluwer Acad. Publ.
- Wang, H., Hutwimmer, S., Strasser, H. y Burgstaller, W. (2009). Destruxin production of *Metarhizium anisopliae* under carbon and nitrogen exhaustion. *Journal of Basic Microbiology.* 49(4):404-11
- Whitehorn, P.R., O`Connor, S., Wackers, F.L. y Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science.* 336:351-352.
- Williams, T., Arredondo-Bernal, H.C. y Rodríguez-del-Bosque, L.A. (2013). Biological Pest Control in México. *Annu. Rev. Entomol.*, 58:1 19-40
- Wösten, H.A.B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology.* 55: 625-646.
- Wraight, S.P., Inglis, G.D. y Goettel, M.S. (2007). Fungi. *In: Lacey, L.A. & Kaya, H.K. (Eds.) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (2a. ed.).* p. 232. Netherlands: Springer.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A. y de Kock, S.L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal bioagents. *In: Butt T, Jackson C, Magan N (Eds.) Fungal Biocontrol Agents- progress, problems and potential.* pp. 253-287. United Kingdom CAB International, Wallingford.
- Wu, J., Ali, S., Huang, Z., Ren, S. y Cai, S. (2010). Media composition influence growth, enzyme activity and virulence of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Pakistan J. Zoo.*, 42 (4):451-459
- Wyrebek, M., Huber, C., Kaur Sasan, R. y Bidochka, M.J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157: 2904-2911.

- Ye, S.D., Ying, S.H., Chen, C. y Feng, M.G. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, 28(11):799-804.
- Yew, L.C., Said, S.A., Mohd, N.H., Omar, D. y Abood, F. (2013). Effects of UV-B and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). *J. Entomol.*, 10(2): 53-65
- Zimmerman, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9): 879:920

Glosario de términos

Abiótico: que no tiene vida.

Agente de control biológico: parasitoide, depredador o patógeno (virus, bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios, protistas, riketsias) que se utiliza para el control de un organismo nocivo. Para el caso de maleza, un fitófago es un agente de control biológico.

Agricultura orgánica: sistema de cultivo que no utiliza agroquímicos y privilegia el control biológico y cultural.

Antagonismo: tipo de simbiosis en la que la asociación de dos especies es perjudicial para ambas.

Bacteria: microorganismo unicelular procarionte (sin núcleo ni organelos membranosos) de diversas formas; entre ellas alargada (bacilos), espiral (espirilos), o esférica (cocos). La asociación con insectos puede ser saprófita, simbiótica o patogénica.

Beauvericina: toxina producida por los hongos *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecani*.

Bioensayo: cualquier método que mida alguna propiedad de un estímulo físico, químico, biológico o fisiológico, en términos de respuesta biológica de un organismo de prueba.

Bioinsecticida: insecticida cuyo ingrediente activo es un microorganismo patógeno o su parte activa responsable de la acción tóxica. También se utiliza para referirse a productos de origen vegetal con propiedades insecticidas.

Biótico: característico de los seres vivos.

Cepa: aislamiento de una especie de microorganismo de características conocidas que se conserva cultivado en el laboratorio para determinados ensayos.

Concentración letal media, CL_{50} : estimador estadístico obtenido a partir del análisis Probit, que representa la concentración de un factor causante del 50% de la mortalidad en un bioensayo.

Control biológico: *definición ecológica o funcional:* “La acción de parasitoides, depredadores y patógenos para mantener la densidad de otros organismos (huéspedes o presas) a un nivel más bajo del que ocurriría en su ausencia”.
Definición disciplinaria: “Estudio, importación conservación y aumento de organismos benéficos para la supresión de poblaciones de plagas”. Tradicionalmente, se reconocen tres tipos de control biológico: clásico, aumento y conservación.

Control químico: control de plagas mediante el uso de sustancias tóxicas orgánicas (naturales o sintéticas) o inorgánicas.

Cutícula: cubierta externa de los insectos de tipo no celular secretada principalmente por la epidermis. La cutícula está formada por dos capas diferentes, una externa y delgada llamada epicutícula, y otra interna y más gruesa denominada procutícula.

Densidad: número de individuos de la misma especie por unidad de superficie.

Dosis letal: cantidad de una sustancia tóxica requerida para matar un organismo. Se refiere por lo general a la cantidad de sustancia tóxica requerida para matar el 50% (DL_{50}) o el 90% (DL_{90}) de la población del organismo.

Destruixinas: hexadepsipéptidos cíclicos producidos por hongo entomopatógenos como *M. anisopliae*. Están constituidas por cinco aminoácidos y un ácido hidroxílico unidos por enlaces ester y peptídicos. Se sugiere que tienen implicaciones en la patogenicidad del hongo sobre los insectos.

Entomopatógeno: microorganismo parasítico (virus, bacterias, hongos, protozoarios, protistas, riketsias, nemátodos) que frecuentemente matan a los insectos.

Epicutícula: representa solo un 5% de la cutícula; está compuesta por ceras y lipoproteínas (en especial cuticulina). Carece de quitina. Dado que es impermeable, su función es evitar la pérdida de agua por transpiración. En general consta de cinco capas: epicutícula interna, epicutícula externa, capa de polifenoles, capa de ceras y capa de cemento.

Espora: estructura reproductiva en ciertas bacterias, hongos y protistas, resistente a condiciones adversas del medio ambiente, la cual se activa bajo condiciones favorables.

Fungitóxico. Sustancia tóxica para hongos impidiendo que estos parasiten otro organismo **Hongo:** organismo heterotrófico con núcleo que se reproduce por esporas; carece de clorofila; se reproduce sexualmente o asexualmente y tiene estructuras somáticas filamentosas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas.

Hospedero: organismo que alberga a otro como parásito o agente infeccioso. Aunque algunos consideran este concepto como sinónimo de huésped, otros consideran que “hospedero(a)” debe utilizarse al referirse a plantas y “huésped” a animales.

In vitro: palabra del latín que significa “en vidrio”. Proceso biológico que se desarrolla en sistemas artificiales (tubos de ensayo, matraces, dieta artificial).

In vivo: palabra del latín que significa “en vivo”. Proceso biológico que se desarrolla dentro de organismos vivos.

Infección: entrada de un organismo patógeno a un huésped susceptible.

Ingeniería genética: rama de la biotecnología en la que se aplican técnicas y herramientas para modificar genéticamente un organismo para que adquiera nuevas funciones.

Insecto: artrópodo de la clase Insecta; el estado adulto se caracteriza por tener tres pares de patas, cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, y la mayoría de las

especies con dos pares de alas. Numerosas especies de insectos son parasitoides o depredadores de otros insectos.

Manejo integrado de plagas (MIP): conjunto de estrategias sustentables para el manejo de plagas en las que se integran las herramientas biológicas, culturales, físicas y químicas para minimizar los riesgos económicos, ambientales y de salud humana.

Medio de cultivo: composición nutritiva empleada para el crecimiento y multiplicación de microorganismos.

Micelio: masa de filamentos que forman la parte vegetativa de un hongo.

Micoinsecticida: hongo formulado que se utiliza para el control de insectos.

Micosis: enfermedad causada por hongos.

Micotoxina: sustancia tóxica producida por un hongo.

Mortalidad aparente: mortalidad que ocurre en una edad específica (estado, estadio). Se calcula al dividir el número de individuos que mueren durante una clase de edad determinada (dx) sobre el número de individuos que habían entrado en esa clase de edad (I_x).

Mortalidad compensatoria: suma de la mortalidad de un huésped (presa) por la acción de dos o más parasitoides (depredadores) en un mismo hábitat.

Mortalidad indispensable o irremplazable: parte de la mortalidad generacional que no habrían ocurrido si algún factor de mortalidad determinado hubiera sido removido y después haber permitido la acción de factores de mortalidad subsecuentes. Es decir es la mortalidad “pura” causada por un factor en una edad específica sin el efecto de “dilución” que ocasiona otros factores de mortalidad en edades subsecuentes.

Mortalidad real: mortalidad que ocurre en una edad específica (estado, estadio) en relación al número inicial de individuos de la clase de edad (dx) sobre el número de individuos que iniciaron la generación.

Muscardina blanca: enfermedad causada por el hongo *Beauveria bassiana*

Muscardina verde: enfermedad causada por el hongo *Metarhizium anisopliae*

Ninfa: fases juveniles de desarrollo un insecto, presente en grupos en los que existe una metamorfosis completa. Se considera una metamorfosis sencilla.

Organismo genéticamente modificado (OGM): organismo cuyo material genético ha sido alterado por el hombre con algún objeto en particular.

Patógeno: microorganismo capaz de causar una enfermedad a otro organismo.

Patogenicidad: habilidad cualitativa del patógeno para causar enfermedad.

Plaga: organismo que interfiere con las actividades y propósitos del hombre.

Plaguicida: sustancia química utilizada para eliminar un organismo nocivo y puede ser insecticida (insectos), fungicida (hongos), bactericida (bacterias), herbicida (maleza), rodenticida (roedores), nematocida (nemátodos) o acaricida (ácaros).

Población: organismos de una misma especie que ocupan un área suficiente para reproducirse y mantener continuidad en el tiempo y que muestran algunas características como crecimiento, dispersión, fluctuación, distribución y variabilidad genética.

Procutícula: forma el 95% del espesor de la cutícula y es la responsable de su rigidez. Está compuesta por quitina y diversas proteínas (escleroproteínas). La quitina es un polisacárido fibrilar, flexible, elástico y permeable, derivado de la N-acetil-glucosamina. Las escleroproteínas, entre las que destacan la artropodina, la esclerotina y la resilina, otorgan rigidez a la cutícula. Además, la rigidez puede incrementarse por depósitos de sales minerales, básicamente carbonato cálcico y fosfato cálcico, que pueden ser muy abundantes en crustáceos

Resistencia a los insecticidas: facultad de algunas razas o biotipos de insectos para soportar dosis de insecticidas normalmente letales. Dicha facultad resulta de la selección de individuos tolerantes de una población por la exposición a los insecticidas durante varias generaciones.

Resistencia ambiental: suma de todos los factores de mortalidad (abióticos y bióticos) en el medio ambiente que limitan a un organismo expresar su máxima capacidad de reproducirse.

Resurgencia de plagas: resurgimiento rápido de una plaga después de una aplicación de insecticida, que destruyó también los enemigos naturales que regulan la plaga.

Taxonomía: teoría y práctica de nombrar y describir a los organismos vivos y proveer de sistemas de clasificación y claves. Algunos la consideran sinónimo de sistemática y otros como parte de esta.

Transcriptoma: conjunto de genes que se expresan en un momento dado en una célula.

Virulencia: capacidad relativa de un microorganismo para causar daño al huésped o alguno de sus órganos o tejidos.

Virus: microorganismos infeccioso constituido de ácidos nucleicos (ADN o ARN) y proteínas, capaces de crecer y multiplicarse solamente en células vivas y causantes de enfermedades en plantas y animales.