

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN CBS**

**“Influencia del incremento de O₂ en la producción y calidad
de conidios de hongos entomopatógenos”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.F.B. JOSÉ FRANCISCO MIRANDA HERNÁNDEZ

Director

Dr. Octavio Loera Corral

México D.F. 21 de Julio 2010

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

El jurado designado por la división de ciencias biológicas y de la salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**Influencia del incremento de O₂ en la producción y calidad de hongos
entomopatógenos**

Que presentó

Q.F.B. José Francisco Miranda Hernández

Comité tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral **Universidad Autónoma Metropolitana**

Asesor: Dra. Raquel Alatorre Rosas **Colegio de Postgraduados**

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda **Universidad Autónoma Metropolitana**

Jurado:

Presidente



**DRA. LILIA ARELY DE JESÚS
PRADO BARRAGÁN**

Secretario



**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO
FLORIDO**

Vocal



**DRA. RAQUEL ALATORRE
ROSAS**

Vocal



**DRA. ASCENCIÓN RAMÍREZ
CORONEL**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que se empeña en no mostrarse y sin embargo intuirse.

A mi padre y madre que siempre creyeron en mí. Por haber visto antes que yo lo que me empeñaba en no ver: ese camino que caminaremos juntos, hasta el fin.

A mis hermanos, por fomentar en mí el amor por la vida, gracias por asumir esa labor tan ardua. A ti Toño, por tu mayor enseñanza: ese enorme concepto que es la hermandad. Por ser el guía de todos nosotros.

A los sobrinos: Beto, Estela, Sandy, Cris, Enrique, Mafer, Alejandra, Oscar, Pablo, Sofía, Alejandro. Crean siempre en ustedes y así disfrutarán más la vida, ese reto tan maravilloso.

A Julia, por tu paciencia y compañía, por ese gran regalo de la vida que es tu amistad.

A la Universidad Autónoma Metropolitana. Con el orgullo de ser "UAMero".

Al CONACyT por la beca otorgada (224792).

A mi director de tesis: Octavio, gracias por tu paciencia y disponibilidad. Esperando haber cumplido en algo tus expectativas. Gracias por siempre.

A mis asesores: Dra. Raquel Alatorre, mi admiración y compromiso. Gracias por sus comentarios siempre útiles y certeros. Al Dr. Gerardo Saucedo, por haber aceptado ser parte de esta investigación y generosamente creer en mí.

A la Dra. Arely Prado, a la Dra. Ascensión Ramírez, al Dr. Esteban Barranco porque con sus correcciones y comentarios enriquecieron mucho este escrito.

Al Dr. Gustavo Viniegra, porque su entusiasmo por conocer se contagia.

A mis maestros de la UAM Xochimilco (Aída, Laura, Alejandro, Jaime, Hugo), por ser las chispas que encendieron esta llama. A mis compañeros del W-104, ¿cuánto de esta tesis es gracias a ustedes? A todos los que generosamente han puesto su pieza en el rompecabezas que soy... cuyos nombres están en mí, **todos son mi constelación favorita.**

Resumen

En el año 2002, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (F.A.O.) enfatizó la amenaza, a corto y largo plazo, que representa el uso de plaguicidas químicos debido al riesgo que implica su uso para el consumidor y el medio ambiente, así como los casos de resistencia, cada vez más frecuentes, que han venido presentando los insectos plaga hacia éstos. Debido a ello, esta institución recomendó la reducción en su uso y, a su vez, ha venido incentivando el desarrollo y aplicación de programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que incluyen mecanismos de control natural de plagas y cuya parte central es el control biológico. Este último se ha definido como el uso de organismos vivos para el control de insectos plaga e involucra la participación del ser humano. Los organismos vivos que son utilizados en el control biológico se clasifican principalmente en: depredadores, parásitos y patógenos. Dentro de estos últimos se encuentran los hongos, de los cuales se han registrado hasta 750 que son patógenos a insectos (entomopatógenos). En su mayoría, los hongos entomopatógenos, pertenecen al orden de los Entomophthorales (Zygomycota) o son hifomicetos productores de conidios del orden Ascomycota. Las unidades infectivas de los hongos entomopatógenos son los conidios. A partir de las características de ellos y factores bióticos y abióticos propios del lugar de aplicación, reside el éxito de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.

En el presente estudio se evaluó el efecto de una atmósfera enriquecida en oxígeno (26%) para la producción de conidios de tres de las principales especies de hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y dos aislados de *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*). Además de la producción, se estudiaron algunas características que determinan la calidad de los conidios (termotolerancia, viabilidad, bioensayo) producidos en atmósfera normal (21% de O₂) y los obtenidos en atmósfera enriquecida con oxígeno (26% de O₂).

Para *M. anisopliae* y uno de los aislados de *I. fumosorosea*, el tratamiento con 26% de oxígeno propició una mayor producción de conidios respecto al tratamiento con atmósfera normal. En contraste, *B. bassiana* y el otro aislado de *I. fumosorosea* tuvieron rendimientos más bajos en el tratamiento con atmósfera enriquecida respecto a lo producido con atmósfera normal.

De acuerdo a los resultados en las pruebas de calidad de los conidios (termotolerancia y viabilidad), además de lo ya establecido en diversos artículos, puede postularse que para los dos aislados de *I. fumosorosea* y el aislado de *M. anisopliae*, una exposición previa a condiciones de estrés (oxidativo en el caso de esta investigación), les confiere a los conidios producidos en estas condiciones una protección cruzada (cross protection) respecto a otras condiciones de estrés (temperatura, radiación UV-B) e incrementa un importante factor de virulencia: la viabilidad. Por lo anterior, se puede establecer la posibilidad de incrementar algunas características deseables en los conidios de hongos entomopatógenos a partir de la sola exposición a estrés con la ventaja de no disminuir su virulencia como fue el caso de *M. anisopliae* en esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Control biológico	14
1.2. Hongos entomopatógenos	16
1.3. Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos	16
1.4 Aspectos a resaltar en México	18
1.5. Conidios: Importancia de sus características en el control biológico	19
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo General	23
5.2. Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Microorganismos	24
6.2. Cultivo Monospórico	24
6.3. Conservación de hongos en agua desionizada estéril	24
6.4. Identificación molecular de los dos aislados de <i>Isaria fumosorosea</i> (CNRCB y ARSEF 3302)	25
6.5. Evaluación de tres medios de cultivo para la producción de conidios	25
6.5.2. Inóculo	26
6.5.3. Cuantificación de la producción de conidios	26

6.6. Evaluación de la producción y calidad de conidios en atmósferas normal y 26% de oxígeno _____	26
6.6.1. Producción de conidios en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno_____	26
6.6.2. Bioensayo_____	27
6.6.3. Termotolerancia _____	28
6.6.4. Viabilidad _____	29
6.7. Análisis estadístico _____	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES _____	30
7.1 Cultivos monospóricos_____	30
7.2 Identificación molecular de los dos aislados de <i>Isaria fumosorosea</i> _____	32
7.3 Conservación de cepas a largo plazo _____	35
7.4 Evaluación de tres medios de cultivo para la producción de conidios _____	36
7.4.1 Medio agar papa dextrosa (PDA) _____	37
7.4.2 Medio harina de arroz _____	38
7.4.3 Medio harina de avena _____	39
7.5 Producción de conidios en medio harina de avena en atmósfera normal (21% de O ₂) y modificada con pulsos de 26% O ₂ _____	41
7.5.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX_____	41
7.5.2 <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 _____	43
7.5.3 <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302 _____	45
7.5.4 <i>Beauveria bassiana</i> 882.5 _____	46
7.6 Pruebas de calidad de conidios _____	48
7.6.1. Viabilidad _____	48

7.6.2 Bioensayo	49
7.6.3 Termotolerancia	50
7.6.2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	51
7.6.2.2. <i>Beauveria bassiana</i> 882.5	52
7.6.2.3. <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF 3302	54
8. RESUMEN DE RESULTADOS	60
9. CONCLUSIONES	63
10. RECOMENDACIONES	63
11. BIBLIOGRAFÍA	65
12. ANEXOS	70
12.1 Secuencias obtenidas de los aislados de <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1	70
12.2. Registros enviados a GenBank con los datos de los aislados de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF 3302	71
12.3 Gráficas bioensayo <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales ventajas y desventajas en el uso de control biológico para el combate de plagas.....	14
Tabla 1.2. Tres de los principales géneros de hongos entomopatógenos usados en la actualidad.....	16
Tabla 1.3. Micoinsecticidas comercializados en México.....	19
Tabla 7.1. Viabilidad de los hongos <i>M. anisopliae</i> CP-OAX, <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 y <i>B. bassiana</i> 882.5 conservados en agua desionizada estéril.....	36
Tabla 7.2. Viabilidad de los conidios producidos en atmósfera normal y atmósfera con 26% de O ₂ de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados en esta investigación.....	49
Tabla 7.3. Parámetros de virulencia de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX	50
Tabla 7.4. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la prueba de termotolerancia para <i>M. anisopliae</i> CP-OAX, <i>B. bassiana</i> 882.5, <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 e <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Enemigos naturales de insectos plaga: depredadores, parásitos y patógenos.....	15
Figura 1.2. Proceso de infección de los hongos entomopatógenos	17
Figura 7.1. Tres cultivos monospóricos de <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX creciendo en medio PDA.....	31
Figura 7.2. Cultivo monospórico VI de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 creciendo en medio PDA.....	31
Figura 7.3. Esquema de la región objetivo del ADN ribosomal para la amplificación y secuenciación para la identificación de los dos aislados de <i>Isaria fumosorosea</i> estudiados en esta investigación.....	32
Figura 7.4. Gel de electroforesis de los productos de PCR de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 e <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302.....	33
Figura 7.5. Gel de electroforesis de los productos de PCR de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 (carril 1) e <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302 (carril 3) con cebadores ITS1 e ITS4.....	34
Figura 7.6. Resultados del BLAST a partir de la secuencia obtenida del aislado <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1.	34
Figura 7.7 Resultados generados al ingresar la secuencia de las regiones intertranscripcionales (ITS) 1 y 2 de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF 3302 al BLAST.....	35
Figura 7.8. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio PDA por <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX, <i>Isaria</i>	

<i>fumosorosea</i> ARSEF 3302, <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y <i>Beauveria bassiana</i> 882.5.	37
Figura 7.9. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio de cultivo harina de arroz por <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX, <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302, <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB-Colima y <i>Beauveria bassiana</i> 882.5.....	39
Figura 7.10. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio de cultivo harina de avena por <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX, <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302, <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y <i>Beauveria bassiana</i> 882.5.	40
Figura 7.11. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1, <i>M. anisopliae</i> CP-OAX y <i>B. bassiana</i> 882.5 en los medios de cultivo harina de arroz, harina de avena y PDA.....	41
Figura 7.12. Producción de conidios por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno.....	42
Figura 7.13. Producción de conidios por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en atmósfera normal, atmósfera con 26% de oxígeno modificada a las 60 horas y desde tiempo cero	43
Figura 7.14. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 cultivado en medio harina de avena en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	44
Figura 7.15. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero.....	44

Figura 7.16. Producción de conidios por <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302 en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	45
Figura 7.17. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero	46
Figura 7.18. Producción de conidios por <i>Beauveria bassiana</i> 882.5 en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	47
Figura 7.19. Producción de conidios por <i>Beauveria bassiana</i> 882.5 en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero	47
Figura 7.20. La micosis presente en larvas de <i>Tenebrio molitor</i> permite confirmar que su muerte fue causada por el hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX.....	50
Figura 7.21. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	52
Figura 7.22. Viabilidad a 45°C de los conidios producidos por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	52
Figura 7.23. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por <i>B. bassiana</i> 882.5 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno	54

Figura 7.24. Viabilidad a 45°C de los conidios producidos por <i>B. bassiana</i> 882.5 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno.	54
Figura 7.25. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno.....	55
Figura 7.26. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 en el tratamiento con atmósfera con 26% de O ₂	56
Figura 12.1. <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302. Secuencia de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S obtenida a partir del amplicón de 500pb encontrado con el uso de los cebadores ITS1 e ITS2.	70
Figura 12.2. <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1. Secuencia de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S obtenida a partir del amplicón de 500pb encontrado con el uso de los cebadores ITS1 e ITS2.	70
Figura 12.3. Cinética de mortalidad para larvas de <i>Tenebrio molitor</i> a partir de bioensayo con <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en atmósfera normal	73
Figura 12.4. Cinética de mortalidad para larvas de <i>Tenebrio molitor</i> a partir de bioensayo con <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en atmósfera con 26% de O ₂	73

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Control biológico

El concepto de control biológico comenzó a usarse en 1919 por H.S. Smith y significaba el uso de enemigos naturales (introducidos o locales) para el control de insectos plaga (Rodríguez del Bosque y Arredondo, 2007). Greathead y Waage (1983) lo definieron como el uso de microorganismos vivos como agentes para el control de plagas. Sin embargo, Eilenberg y col. (2001) consideran que no se deben incluir los metabolitos cuando se usan sin los organismos que los producen. Para Hoffmann y Frodsham (1993) el control biológico está definido como la reducción de la población de agentes causantes de plagas por enemigos naturales e involucra la participación del ser humano. Las principales ventajas y desventajas del control biológico se enlistan en la tabla 1.1 (Summy y French, 1988).

Tabla 1.1 Principales ventajas y desventajas en el uso de control biológico para el combate de plagas.

Control biológico	
Ventajas	Desventajas
Efectos colaterales nulos o mínimos	Ignorancia sobre los principios del método
Casos de resistencia esporádicos	Apoyo económico reducido
Control a largo plazo	Escasez de personal especializado
Eliminación total o parcial del uso de insecticidas químicos	Poca disponibilidad de insumos biológicos.
Favorable relación costo-beneficio	Agentes de control biológico susceptibles a plaguicidas
Evita plagas secundarias	Resultados no espectaculares (desconfianza de agricultores)
Constituye la parte central del manejo integrado de plagas (MIP)	Estudios detallados de la relación agente biológico-insecto y planta hospedera
No provoca intoxicaciones	

Las especies de insectos pueden ser eliminadas de manera natural por otros organismos y factores ambientales sin ninguna intervención humana, a esto se le conoce como control natural. Entre los enemigos naturales de los insectos plaga (figura 1.1), también conocidos como agentes de control biológico, se incluye a depredadores, parásitos y patógenos (Stehr, 1975, Van den Bosch; 1982; Greathead y Waage, 1983).

- Depredadores: especies de vida libre principalmente que consumen un gran número de presas durante su vida.
- Parásitos: especies que, en su etapa inmadura, se desarrollan sobre o dentro de un insecto huésped, ocasionando finalmente la muerte del mismo.

- Patógenos (entomopatógenos): organismos causantes de enfermedades dentro de los que se incluyen bacterias, hongos, virus y nemátodos. Ellos matan o debilitan a su huésped y son, relativamente, específicos para ciertos grupos de insectos.



Figura 1.1 Enemigos naturales de insectos plaga: depredadores, parásitos y patógenos.

En la actualidad se reconocen tres tipos de control biológico: por conservación, por introducción y por incremento (Rodríguez del Bosque y Arredondo, 2007).

- Por conservación: Se enfoca principalmente en la conservación de los enemigos naturales nativos de los organismos plaga. Desde luego requiere el conocimiento preciso del entorno que permita la selección adecuada del enemigo natural.
- Por introducción (clásico): Es una estrategia alternativa cuando el control biológico por conservación no es una opción. En el caso que no se encuentren enemigos naturales nativos de la plaga, existe la opción de introducir enemigos naturales externos. Este tipo de control biológico se aplica en muchos casos para el control de plagas exóticas.
- Por incremento: Este tipo de control biológico es el adecuado si existe la efectividad del agente de control biológico pero el control de la plaga no es el esperado. Su fundamento reside en aumentar el número de agentes de control biológico. De acuerdo a Greathead y Weege (1983), para que este tipo de control biológico sea una opción para los productores, debe ser económicamente competitivo con el control químico.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (F.A.O. 2002), expresó la amenaza a corto y largo plazo que representa el uso de plaguicidas químicos, en especial en las naciones en vías de desarrollo, por lo cual recomendó la reducción en el uso de éstos motivando el desarrollo y aplicación de programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), los cuales incluyen mecanismos de control natural de plagas.

1.2. Hongos entomopatógenos

En la historia de los hongos entomopatógenos es importante señalar algunos momentos históricos. Según Tanada y Kaya (1993) desde el siglo VII ya existían reportes en China de insectos infectados con hongos. En el primer tercio del siglo XIX, Agostino Bassi demostró que el gusano de la seda era susceptible a infecciones por un hongo entomopatógeno, posteriormente identificado como *Beauveria bassiana*. A Luis Pasteur se le acreditó ser el primero que propuso el uso de los hongos para el control de los insectos plaga. Finalmente, Elie Metchnikoff (Premio Nobel de Medicina, 1908) fue el primero en desarrollar trabajos con el hongo *Metarhizium anisopliae* buscando el control del escarabajo de los cereales *Anisoplia austriaca* (Glare, 2004).

Existe una gran variedad de especies de insectos, incluidos muchos de tipo plaga, que son particularmente susceptibles a infecciones por hongos. De acuerdo a Candas y Bulla (2003) existen aproximadamente 750 hongos entomopatógenos en 90 especies. La mayoría de ellos pertenecen ya sea al orden de los Entomophthorales (Zygomycota), o son hifomicetos productores de conidios del orden Ascomycota. Un factor a tomar en cuenta es que los hongos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, como el agua y el suelo; por su particular manera de infección, los hongos son los principales microorganismos que infectan insectos (Carruthers y Hural, 1990). En la tabla 1.2 se registran algunos de los hospederos naturales de los tres principales géneros de hongos entomopatógenos usados en la actualidad para el control de insectos plaga como son *Isaria* (antes conocido como *Paecilomyces*), *Beauveria* y *Metarhizium*.

Tabla 1.2. Tres de los principales géneros de hongos entomopatógenos usados en la actualidad. Se relacionan algunos órdenes de insectos que son sus hospederos naturales.

Hongos entomopatógenos	
Género	Principales hospederos
<i>Metarhizium sp</i>	Ortóptera, Coleóptera, Isóptera, Díptera, Hemíptera.
<i>Beauveria sp</i>	Homóptera, Lepidóptera, Coleóptera.
<i>Isaria sp</i>	Lepidóptera, Ortóptera, Coleóptera.

1.3. Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

La invasión del hongo en el insecto hospedero ocurre a través de la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad lo cual promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas (St.

Leger, 1993). Una de las características en el proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos es que las unidades infecciosas, los conidios, actúan por contacto adhiriéndose a la superficie de la cutícula del insecto a partir de fuerzas hidrofóbicas, lo anterior es posible debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas conocidas como hidrofobinas (Charnley, 1997). Para ejemplificar lo anterior se presenta el proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos (figura 1.2), que involucra etapas secuenciales. Primero los conidios se adhieren a la cutícula del hospedero para después germinar produciendo un tubo germinativo y un apresorio (estructura de penetración). La cutícula se rompe por la combinación de presión mecánica y la acción de enzimas degradadoras de cutícula. El hongo se desarrolla por crecimiento vegetativo en el hemocele para, finalmente, producirse conidios en la superficie del hospedero muerto.

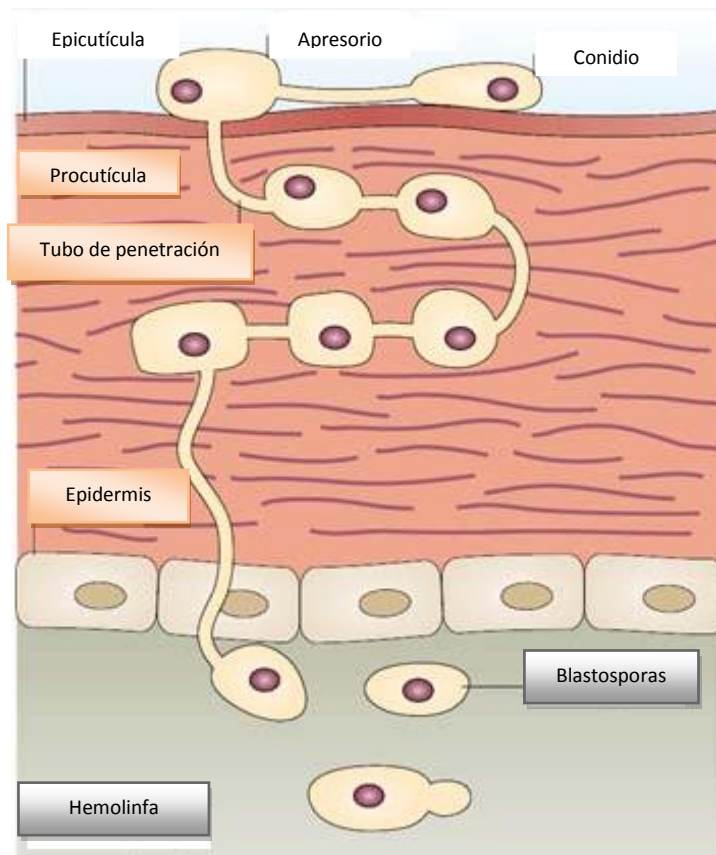


Figura 1.2. Proceso de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de: Thomas y Read, 2007).

La cutícula del hospedero es la primera línea de defensa contra la infección y juega un papel clave en la especificidad del hongo a utilizar. Para que la infección sea exitosa el hongo

debe, además de degradar la cutícula del hospedero, vencer la respuesta inmune del insecto, ésta es tanto de tipo humoral como celular. De acuerdo al estudio publicado por Schmid-Hempel (2005), la respuesta celular en los insectos está integrada principalmente por los hemocitos como son las células que liberan fenoloxidasas, plasmotocitos que fagocitan, lamelocitos que encapsulan y células cristal que se encargan de la melanización. La respuesta inmune de tipo humoral en los insectos está conformada principalmente por moléculas circulantes en la hemolinfa. En cuanto la cutícula del insecto se daña, se activa la respuesta inmune. Los hongos tienen dos estrategias principales para neutralizar la respuesta de protección del hospedero: 1) El desarrollo de formas de crecimiento críptico que se enmascaran de manera efectiva ante las respuestas inmunes del insecto y 2) Producción de sustancias inmunomodulantes que suprimen el sistema de defensa del hospedero (Thomas y Read, 2007).

1.4 Aspectos a resaltar en México

En la actualidad en nuestro país se han publicado Normas Oficiales que involucran el uso de hongos entomopatógenos para el control de diversas plagas. Ejemplo de ello es la Norma Oficial Mexicana NOM-70-FITO-1995, donde se establecen los lineamientos para el uso de agentes de control biológico para el control de organismos potencialmente dañinos. En la NOM-002-FITO-1995 se establece la campaña contra la broca de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) que involucra el uso del hongo *Beauveria bassiana*. Finalmente, aunque en el año 2006 fue cancelada, la NOM-049-FITO-1995 en su apartado de control biológico establecía el uso de *Paecilomyces* sp, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en el combate contra la langosta. Recientemente Hernández y col. (2007) evaluaron el uso de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium lecanii* contra el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) que es el vector del virus de la tristeza de los cítricos (VTC) que afecta regiones agrícolas del sur de México.

En otras regiones del mundo, ya existe una gran cantidad de micoinsecticidas comercializándose con gran éxito debido a su bajo o nulo impacto en el medio ambiente, así como en organismos no dañinos, además de ser una buena opción en estrategias de Manejo Integrado de Plagas (Lacey y Goettel, 1995). En nuestro país, es cada vez más amplia la comercialización y uso de bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos. En la tabla 1.3 se registran algunos ejemplos de ellos.

Tabla 1.3. Micoinsecticidas comercializados en México de acuerdo a Alatorre-Rosas (2007).

<i>Especie</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Huéspedes</i>	<i>Empresa/Región</i>
<i>B. bassiana</i>	BEA-SIN	Lepidópteros	Agrobionsa/Sinaloa
<i>B. bassiana</i>	BotaniGard	Plagas de invernaderos	Mycotech
<i>B. bassiana</i>	Mycotrol	Plagas agrícolas	Mycotech
<i>M. anisopliae</i>	FITOSAN	<i>Phyllophaga</i> spp.	CESAVEG
<i>M. anisopliae</i>	SALTGREEN	<i>Aneolamia</i> spp. <i>Prosapia</i>	COLPOS-Córdoba
<i>M. anisopliae</i>	Biofung	Chapulín	CESAVEG-Guanajuato
<i>M. anisopliae</i>	Meta-Sin	Plagas caseras	Agrobionsa-Sinaloa
<i>M. anisopliae</i>	Bio-Blast	Termitas-cucarachas	EcoScience
<i>P. fumosoroseus</i>	PAESIN	Mosquita blanca	Agrobionsa-Sinaloa
<i>L. lecanii</i>	APHIN	<i>Brevicorine brasicae</i>	México

1.5. Conidios: Importancia de sus características en el control biológico

En la sección 1.3 se ha mencionado que la unidad infectiva de los hongos entomopatógenos son los conidios. Por ello, ha sido primordial en este campo estudiar los mecanismos que influyen en la producción y calidad de éstos. De acuerdo a Morton (1961) y Marchant (1984) no existe un factor universal causante de la esporulación en los hongos. Sin embargo, se han propuesto e investigado diversos factores que pudieran impactar en la producción y calidad de los conidios producidos por hongos entomopatógenos. La influencia del medio de cultivo ha sido uno de los factores más estudiados (Kamp y Bidochka, 2002; Onofre y col. 2001; Tlecuitl-Beristáin y col. 2010; Rangel y col. 2006; etc); otros han sido la influencia de la luz en la producción de conidios (Sánchez-Murillo y col. 2004; Zhang y col. 2009).

Sin embargo, un factor que aún no se ha estudiado ampliamente es la influencia de un estado oxidante como la concentración de oxígeno en la producción y calidad de conidios obtenidos por hongos entomopatógenos. De acuerdo a la investigación hecha por Aguirre y col. (2005) las especies reactivas del oxígeno (ERO) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) más allá de sólo ser sub-productos dañinos del metabolismo aerobio, tienen una participación importante en procesos fisiológicos, entre los cuales los autores mencionan: a) Aumento de los ERO durante el

proceso de diferenciación celular; b) Enzimas que producen ERO, como las NADPH-oxidasas (NOX); c) El papel que tienen las NOX en procesos de desarrollo y d) La conservación de un mecanismo de transducción de señales sensibles a ERO. En la misma investigación se propone un modelo de regulación de la diferenciación celular basado en tres posibles respuestas ante un estado hiperoxidante (estado celular transitorio en el cual la generación de especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula) por el hongo ascomiceto *Neurospora crassa*: 1) La célula compensa el estado hiperoxidante con una fuente de poder reductor (nutrientes) regresando a un estado estable; 2) Diferenciación celular como una forma de aislamiento al oxígeno del entorno y 3) Muerte.

En la investigación hecha por Lledías y col. (1999) ya se establecía que el oxígeno singulete tomaba parte en la germinación de conidios por *N. crassa*. Una de las primeras investigaciones acerca de la influencia de la concentración de oxígeno en la producción de conidios por un hongo entomopatógeno fue hecha por Tlecuitl-Beristáin y col. (2010). En tal investigación se encontró que la producción de conidios producidos por *Metarhizium anisopliae* en atmósfera con 26% de oxígeno fue el doble (a las 156 horas) que los producidos por el mismo hongo en atmósfera normal, sin modificar su virulencia contra los adultos de *Tenebrio molitor* (escarabajo de la harina). Por lo anterior, el estudio de la influencia de la concentración de oxígeno en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos es un tema a seguir en el campo del control biológico.

2. ANTECEDENTES

En la búsqueda de mejorar la producción y calidad de los conidios de hongos entomopatógenos es importante tener en cuenta factores que influyen en lo anterior. La comparación de medios de cultivo en busca de establecer aquel donde se presente la mayor producción de conidios por hongos entomopatógenos, se ha reportado en distintos artículos (Kamp y Bidochka, 2002; Tlecuitl-Beristáin y col. 2010; Onofre y col. 2001; Rodríguez-Gómez y col. 2009; Rangel y col. 2006; etc.). Las numerosas publicaciones a este respecto permiten comprender que ésta es una de las vías más accesibles para conocer el comportamiento de los hongos entomopatógenos a partir de la variación en los sustratos donde se desarrollan y, sin duda, ha ofrecido valiosos datos para el conocimiento de los mismos.

El estudio de la influencia de una condición hiperoxidante (exposición a atmósferas con concentraciones de oxígeno mayores a 21%) como factor para la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos, no cuenta con más antecedentes que los trabajos realizados por Tecuítl-Beristáin y col. (2010) y lo reportado por Garza-López y col. (2008). A pesar de los aún escasos estudios a este respecto, los resultados reportados por el primero, indican que hay una influencia de la concentración de oxígeno para la producción de conidios por *M. anisopliae* y, aún más interesante, no modifica la calidad de los conidios respecto a su virulencia respecto al insecto plaga *Tenebrio molitor*. Según lo reportado por Garza-López y col. (2008) la mayor producción de conidios por *B. bassiana*, creciendo en granos de arroz, se dio bajo condiciones hiperoxidantes (26% de oxígeno) obteniéndose hasta un 48% más respecto a los conidios producidos en atmósfera normal (21% de O₂). Por tanto, de acuerdo a los resultados reportados en los dos trabajos citados, existió una influencia de la composición de la atmósfera en la cual se desarrollaban *M. anisopliae* y *B. bassiana* respecto a la producción de conidios. Sin embargo, se desconoce aún si esta respuesta es general para diversos hongos entomopatógenos o si existen respuestas diferenciales asociadas a los diversos aislados, incluida la respuesta particular del medio de cultivo empleado.

Por otro lado, debido a las evidentes limitaciones de las técnicas tradicionales de clasificación de los hongos entomopatógenos, es necesario establecer métodos de identificación más confiables. De acuerdo a Pace y col. (1986), el análisis comparativo de la secuencia genética del ADN ribosomal es una de las herramientas que ofrece la biología molecular para establecer las relaciones evolutivas entre un amplio rango taxonómico. Los genes de ADN ribosomal están conformados en regiones adyacentes que incluyen fragmentos codificantes con un grado elevado de conservación, así como regiones espaciadoras que se caracterizan por su divergencia. Las llamadas secuencias espaciadoras o intertranscripcionales (ITS) así como el ADN ribosomal fueron utilizadas por Inglis y Tigano (2006) para establecer las relaciones taxonómicas e identidad de algunos aislados de *Paecilomyces*.

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el rechazo al uso de plaguicidas químicos es cada vez más común. Sin embargo, en muchos casos, la falta de una alternativa confiable para el control de plagas ha permitido que los compuestos químicos continúen siendo, no la mejor, sino tal vez la única opción para los productores agrícolas. De acuerdo a Butt y col. (2001) el máximo potencial de los agentes de control biológico no se ha conseguido debido a: 1) La ausencia de incentivos para desarrollar esta tecnología; 2) Restricción en el uso de agentes exóticos de control biológico; 3) Carencia en su reproducibilidad y efecto a nivel campo; 4) Pocos productores agrícolas conocen acerca del uso de agentes de control biológico.

A pesar de lo anterior, las desventajas en el uso de plaguicidas químicos son cada vez más evidentes: se incrementa el costo de producción; las plagas adquieren resistencia a éstos con mayor frecuencia y la contaminación al medio ambiente que conlleva el uso de éstos (Alatorre-Rosas, 2007). Es por ello que el control biológico significa una de las opciones más viables para sustituir las prácticas de control de plagas basadas en sustancias químicas nocivas en muchos aspectos. El estudio de los hongos entomopatógenos, agentes de control biológico, toma parte en este esfuerzo por eliminar el uso de plaguicidas químicos. El conocimiento de éstos permitirá optar por las mejores alternativas para el control efectivo de plagas, el mantenimiento del entorno natural y el beneficio a los productores agrícolas.

4. HIPÓTESIS

Una concentración de oxígeno de 26% (estado oxidante) propiciará una mayor producción de conidios, sin disminución en la calidad, por *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar la variación en la producción y calidad de conidios debido al uso de pulsos con incremento de oxígeno atmosférico en tres hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*.

5.2. Objetivos Particulares

- Obtención de cultivos monospóricos de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Metarhizium anisopliae* CP-OAX.
- Identificación molecular de los aislados de *Isaria fumosorosea* provenientes del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) Colima, México y de la Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) en Ithaca, Nueva York, E.U.A.
- Propagar y conservar las cepas a largo plazo.
- Cuantificar el efecto del medio de cultivo en la producción de conidios para los tres hongos.
- Determinar el efecto en la producción de conidios por los cuatro hongos entomopatógenos en dos diferentes concentraciones de oxígeno (21% y 26%).
- Comparar la calidad de los conidios obtenidos en las dos condiciones de atmósferas de O₂.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

El aislado de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados (COLPOS) de Texcoco, México. *Beauveria bassiana* es una mutante por exposición a radiación ultravioleta obtenida en el laboratorio donde se realizó esta investigación y se clasificó con número 882.5. El aislado de *Isaria fumosorosea* CNRCB1, se obtuvo del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Colima, México; otro aislado de *Isaria fumosorosea* provino de Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) con número de registro 3302 en Ithaca, Nueva York, E.U.A.

6.2. Cultivo Monospórico

Este método se utilizó para la obtención de cultivos monospóricos tanto de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, como de *Isaria fumosorosea* CNRCB1. Se propagó el hongo en matraces de 250 ml con agar Dextrosa Saboraud (Bioxon). Transcurridas dos semanas, se estandarizó una suspensión de conidios con una concentración aproximada de 500 conidios/ml. Se colocaron dos gotas separadas de agarosa (Bio-Rad) al 0.8% sobre portaobjetos estériles y éstos se colocaron en cajas Petri estériles; se esperó a la solidificación de la agarosa para adicionar 50µL de la suspensión ya mencionada de conidios (aproximadamente 25 conidios) esparciendo con varilla de vidrio estéril. Se esperaron 15 minutos para permitir la absorción del inóculo en el agar. Posteriormente, se colocó papel filtro húmedo y estéril dentro de la caja Petri para favorecer la germinación de los conidios. Estas cajas se incubaron a una temperatura de 28°C durante 14 horas aproximadamente y una vez transcurrido este tiempo se localizaron conidios aislados y germinados con ayuda del microscopio. Una vez elegido el conidio germinado, se cortó la zona del agar donde se encontraba éste con un bisturí estéril colocándose el pedazo de agar cortado en una nueva caja Petri con medio Dextrosa-Saboraud (Bioxon) incubándose a 28°C hasta su esporulación (Cortés-Madrigal, 2003).

6.3. Conservación de hongos en agua desionizada estéril.

Para todos los hongos estudiados en esta investigación se siguió la misma metodología. Transcurridos 10 días de crecimiento en medio PDA se colocaron 5 trozos de agar de

aproximadamente 5 mm² en viales de 10 ml con agua desionizada estéril y éstos llevados a refrigeración a una temperatura de 4°C (López-Lastra y col., 2002).

6.4. Identificación molecular de los dos aislados de *Isaria fumosorosea* (CNRCB y ARSEF 3302).

La identificación de los dos aislados de *I. fumosorosea* estudiados en esta investigación se hizo con base en la amplificación de los genes de ADN ribosomal. De acuerdo a Inglis y Tigano (2006) el amplicón esperado para esta región del ADN en el caso del género *Paecilomyces* es de aproximadamente 500pb. A partir de un cultivo en medio líquido, el ADN fúngico se extrajo de acuerdo al protocolo del Kit de Purificación de ADN (Wizard® Genomic de Promega: num. cat. A1120). Se utilizaron 4 cebadores ITS1, ITS5, ITS4 e ITS4B (marca IDT) a partir de los cuales se hicieron 4 combinaciones de cebadores para determinar en cuál de éstas se lograba el amplicón esperado, las combinaciones fueron: ITS1-ITS4, ITS1-ITS4B, ITS5-ITS4 e ITS5-ITS4B. Las condiciones de PCR fueron (Saiki y col. 1985): Inicialización 94°C (1 minuto); Desnaturalización 94°C (45 segundos); Alineamiento 55°C (45 segundos); Elongación 72°C (1 minuto) y Elongación final 72°C (3 minutos). Los pasos de desnaturalización, alineamiento y elongación se repitieron 30 ciclos. La electroforesis se realizó según la metodología descrita por Sambrook y Rusell (2001). Las bandas obtenidas se purificaron de acuerdo a las especificaciones contenidas en el Wizard® PCR Preps DNA Purification System de PROMEGA. La secuenciación de las bandas purificadas se realizó en el laboratorio interdisciplinario de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. La identificación de las cepas se realizó ingresando las secuencias obtenidas al Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la página electrónica de la National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.5. Evaluación de tres medios de cultivo para la producción de conidios.

6.5.1 Medios de cultivo.

Se evaluó la producción de conidios por parte de los cuatro aislados de hongos entomopatógenos estudiados a partir de tres medios de cultivo: Agar papa-dextrosa PDA (Bioxon); medio harina de arroz (Har) y medio harina de avena (Hav) cuya composición fue para PDA: 39g/L; para medio Har: harina de arroz (33.3 g/L), extracto de levadura (0.5 g/L) y agar bacteriológico (15 g/L); para medio Hav: harina de avena (33.3 g/L), peptona de carne

(10 g/L, Bioxon) y agar bacteriológico (15 g/L, Bioxon). El tamaño de partícula de las harinas de avena y de arroz fue no mayor a 0.25 mm.

6.5.2. Inóculo.

Se utilizaron botellas serológicas de 125 ml a las cuales se agregaron 10 ml de cada uno de los medios de cultivo mencionados, cubriéndose con tapones estériles de algodón. El inóculo en todos los casos tuvo una concentración de aproximadamente 1×10^7 con (5.76×10^5 con/cm²) de cada uno de los hongos entomopatógenos estudiados.

6.5.3. Cuantificación de la producción de conidios.

La metodología para conteo de conidios fue en todos los casos la misma. Se agregaron 20 ml de Tween 80 (0.05%) a cada una de las botellas y se agitaron con ayuda de magneto durante 10 minutos en parrilla de agitación. El conteo de conidios se realizó con cámara de Neubauer (Marienfeld) y microscopio (BOECO). La producción se reportó en conidios por cm² de superficie de agar.

6.6. Evaluación de la producción y calidad de conidios en atmósferas normal (21% de O₂) y con 26% de oxígeno.

6.6.1. Producción de conidios en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno.

Para este apartado, los cuatro aislados de hongos entomopatógenos fueron cultivados en medio harina de avena. Para ello, se utilizaron botellas serológicas con capacidad de 125 ml a las cuales les fueron agregados 10 ml del medio de cultivo mencionado. En cada periodo de muestreo tres réplicas fueron evaluadas por cada tratamiento (atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno). La mezcla gaseosa que contenía 26% de oxígeno fue fabricada por la compañía PRAXAIR-México. Para el tratamiento con atmósfera normal se utilizaron tapones de algodón para permitir el intercambio gaseoso. El segundo tratamiento inició igualmente con atmósfera normal cubriendo las botellas con tapones de algodón para cambiar la atmósfera a las 60 horas de crecimiento; esto se hizo sustituyendo los tapones de algodón por tapones de plástico hermético. Se renovó diariamente la atmósfera inyectando aire a cada botella (flujo de $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$) con 26% de oxígeno durante 1 minuto con ayuda de agujas estériles, una para permitir la salida del aire y otra inyectando nuevo proveniente del tanque contenedor. La razón por la cual la atmósfera fue modificada a las 60 horas se fundamentó con base en lo reportado por Braga y col. (1999), Sánchez-Murillo y col. (2004) y Tecuítl-Beristáin y col. (2010); es decir, a este tiempo la producción de conidios aún no se

inicia. Paralelamente se realizó un experimento modificando la atmósfera a 26% de O₂ desde el momento de inoculación de las botellas (que en lo subsecuente se conocerá como tiempo cero); para este experimento se tomaron sólo dos tiempos para el conteo de conidios (132 y 204 horas) debido a que el objetivo del mismo era puramente exploratorio. La metodología para el conteo de conidios en ambos tratamientos fue la misma que la referida en la sección 6.5.3.

6.6.2. Bioensayo

Cría de insectos. El insecto utilizado en esta prueba fue *Tenebrio molitor* (Coleóptero), conocido como gusano de la harina. Este insecto se caracteriza por ser una plaga en silos y molinos de grano (Montoya-Sansón y col., 2007). Los tres estadios característicos de este insecto (larva, pupa y adulto) fueron separados en cajas de plástico y mantenidos a temperatura ambiente. Se les alimentó con una mezcla de avena y salvado de trigo (1:1); se les suministró agua con algodones humedecidos (Robledo, 2004). Dos veces por semana se separaban los estadios que se formaban en cada caja y se les colocaba en la correcta. Lo anterior fue para evitar un posible canibalismo entre ellos.

Bioensayo. Se seleccionó el estadio de larva del insecto *T. molitor* para esta prueba. Los conidios obtenidos en ambos tratamientos (atmósfera normal y atmósfera con 26% de O₂) fueron cosechados transcurridas 156 horas con Tween 80 (0.05%) y se estandarizaron soluciones en ambos tratamientos a una concentración de 1×10^8 conidios/ml con ayuda una cámara Neubauer. Se seleccionaron larvas de aproximadamente 2 cm de longitud separándolas en grupos de 10 en cajas Petri (unidad experimental) teniendo 6 repeticiones por tratamiento además de 4 cajas con 10 larvas para el control negativo. Las larvas para tratamiento fueron sumergidas durante 15 segundos en 30ml de las suspensiones de conidios obtenidas (Eken y col., 2006); mientras que las larvas control se sumergieron en 30ml de Tween 80 (0.05%) en el mismo tiempo. A cada caja Petri se agregó alimento estéril (avena y salvado de trigo 1:1). Las cajas con larvas control y de ambos tratamientos se colocaron en una caja de plástico transparente con papel filtro húmedo y estéril (cámara húmeda) y se llevó a incubación a una temperatura de 28°C con fotoperiodos de luz:oscuridad de 12 horas. El conteo de larvas muertas se realizó diariamente durante 15 días. Las larvas muertas se separaron de las vivas y se colocaron en una nueva caja Petri con papel filtro húmedo y estéril. Estas cajas se mantuvieron a temperatura ambiente para promover el crecimiento del hongo entomopatógeno y poder así confirmar la muerte de las

larvas por el hongo (micosis) y no por otra causa ajena a la investigación (Tefera y Pringle, 2003). El parámetro TL_{50} (tiempo en el que se alcanza el 50% de larvas muertas) se calculó a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez y col. (2009):

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S, \text{ por lo que}$$

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

Donde :

Y: Porcentaje de sobrevivencia a un tiempo t

k : tasa específica de muerte (d^{-1})

t_0 : tiempo de retardo para que ocurra la primera muerte (d)

S: Sobrevivientes (%)

6.6.3. Termotolerancia

Esta prueba se realizó con modificaciones de acuerdo a lo reportado por Rangel y col. (2005). Se cosecharon conidios de ambos tratamientos (atmósfera normal y con 26% de O_2) transcurridas 156 horas con Tween 80 (0.01%); la suspensión obtenida se filtró con gasa estéril y se estandarizaron suspensiones a una concentración final de 1×10^4 con/ml. Un mililitro de ésta se colocó en tubos de vidrio de 25 ml los cuales se colocaron en gradillas y puestos en baño maría a temperaturas de 40 y 45°C (se hicieron duplicados por cada tiempo). En cada tiempo analizado, los tubos de la muestra correspondiente se agitaron en vortex y se tomaron 30 μ L de cada tubo (aproximadamente 300 conidios) propagándose en cajas Petri que contenían 20ml de medio Saboraud con 0.5 g/L de desoxicolato de sodio para obtener crecimientos compactos de las colonias. Las cajas se llevaron a incubación a una temperatura de 29°C y se realizó el conteo de cada caja transcurridas 72 horas. El modelo al cual se ajustaron los datos experimentales fue el siguiente:

$$S = S_0 \cdot e^{-(kt)}, \text{ donde:}$$

S: Viabilidad de los conidios a un tiempo t

S_0 : Viabilidad inicial (%)

k : Tasa específica de decaimiento en la viabilidad (h^{-1})

t : Tiempo (h)

A partir del modelo citado, es posible calcular el parámetro TS_{50} que indica el tiempo (h) en el cual el 50% de los conidios aún están viables.

6.6.4. Viabilidad

Se cosecharon conidios de tres botellas serológicas por separado para ambos tratamientos transcurridas 156 horas con Tween 80 (0.01%). Se estandarizaron suspensiones a una concentración de 1×10^4 con/ml y se agregaron 30 μ L (aproximadamente 300 conidios) de cada una a cajas Petri con medio Sabouraud y 0.5 g/L de desoxicolato de sodio. Las cajas se incubaron a una temperatura de 29°C y se realizó el conteo de colonias una vez transcurridas 72 horas.

6.7. Análisis estadístico

Para la prueba de producción de conidios en tres medios de cultivo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$); para la prueba de viabilidad de los conidios provenientes de ambos tratamientos se utilizó la prueba de t de Student para comparación de medias; esta misma prueba se utilizó para comparar los parámetros de virulencia en el bioensayo de *M. anisopliae* CP-OAX. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS para Windows versión 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

7. Resultados y discusiones

7.1 Cultivos monospóricos

Con anterioridad se ha reportado la variación genética encontrada en cultivos multiespóricos, lo cual conlleva riesgos en la reproducibilidad de resultados debido a la variación en las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Estrada y col. 1997). Para cultivos monospóricos y multiespóricos se han reportado resultados diversos. De acuerdo a Hall (1980) *Verticillium lecanii* mantuvo la misma virulencia en cultivos multiespóricos y monospóricos para *Macrosiphoniella sanborni*. Estrada-Valencia y col. (1999) determinaron la producción de conidios, germinación y virulencia de *Beauveria bassiana* comparando cultivos multiespóricos y monospóricos, sin hallar diferencias significativas entre uno y otro cultivo para el caso de virulencia sobre *Hypothenemus hampei*. A pesar que en los reportes anteriores se determinó que pueden no existir diferencias a considerar para parámetros de importancia en el estudio de hongos entomopatógenos (casos de *V. lecanii* y *B. bassiana*), será importante comenzar cualquier investigación con la certeza de trabajar con un aislado genéticamente homogéneo y no una diversidad que puede ofrecer resultados falaces.

Debido a lo anterior, se consideró como una prioridad para el inicio de la presente investigación la obtención de cultivos monospóricos de las cepas de los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Metarhizium anisopliae* CP-OAX. Se determinó la obtención de cultivos monospóricos de estos hongos debido a que, a pesar de conocer su procedencia (Centro Nacional de Control Biológico-Colima y Colegio de Posgraduados, respectivamente) era necesario asegurar su pureza. En el caso del hongo *Metarhizium anisopliae* fue posible la obtención de 3 cultivos monospóricos (Figura 7.1) de los cuales el que se utilizó durante la presente investigación fue el cultivo monospórico denominado como 5 (CM5). Los cultivos monospóricos están a disposición para otros trabajos de investigación.



Figura 7.1. Tres cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX creciendo en medio PDA. Se observa también el control de esterilidad (superior izquierda).

En el caso de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 se obtuvieron 5 cultivos monospóricos, utilizándose el denominado como VI para esta investigación (figura 7.2).



Figura 7.2. Cultivo monospórico VI de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 creciendo en medio PDA.

Para las dos cepas restantes involucradas en esta investigación no fue necesaria la obtención de cultivos monospóricos debido a que, en el caso de *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 ya contaba con un registro de catálogo de esta institución y los resultados que se encontraran se reportarían como derivados de este cultivo; para el caso de *Beauveria bassiana* 882.5 ya se había hecho el cultivo monospórico de este aislado en un trabajo previo (Montesinos-Matías, 2008).

7.2 Identificación molecular de los dos aislados de *Isaria fumosorosea*

El género *Paecilomyces* fue clasificado primeramente por Samson (1974) el cual reconoció 31 especies y los dividió en dos grupos principalmente. Dentro del primero, descrito como *Paecilomyces*, Samson agrupó miembros en su mayoría termófilos. En el segundo, llamado *Isarioidea*, incluyó mesófilos entre los cuales se encontraban especies entomopatógenicas como el anteriormente conocido *Paecilomyces fumosoroseus* (en la actualidad llamado *Isaria fumosorosea*). Tal clasificación hecha por Samson, se basó en características morfológicas las cuales pueden ser subjetivas ya que dichas diferencias morfológicas en muchos casos se deben a mutaciones, efectos del medio de cultivo o condiciones de cultivo (Inglis y Tigano, 2006).

La amplificación del ADN ribosomal es en la actualidad uno de los métodos más utilizados para la identificación de diversos organismos. En la figura 7.3 se observa la región a secuenciar con el método ya mencionado, así como los cebadores (primers) que pueden ser utilizados para amplificar dichas regiones.

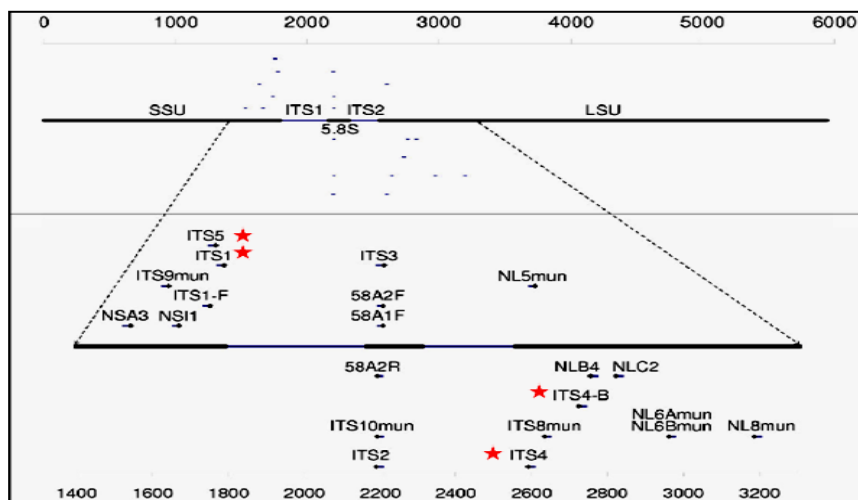


Figura 7.3. Esquema de la región objetivo del ADN ribosomal para la amplificación y secuenciación para la identificación de los dos aislados de *Isaria fumosorosea* estudiados en esta investigación. Los cebadores marcados con una estrella fueron usados para este fin. (fuente: www.biomedcentral.com).

La figura 7.4 muestra el gel de PCR donde se incluyeron 4 combinaciones de los cebadores mencionados (1-4, 1-4B, 5-4 y 5-4B) para establecer con cuál de ellas se obtenía el amplicón de aproximadamente 500 pb ya reportado en la investigación de Inglis y Tigano (2006).

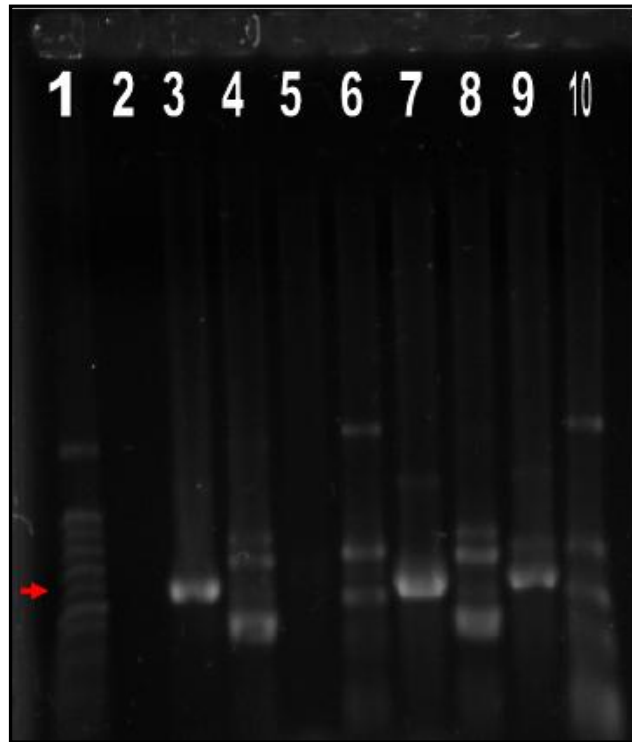


Figura 7.4. Gel de electroforesis de los productos de PCR de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 e *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302. La distribución de los carriles es como sigue (carril:muestra-cebadores): 1:MPM/ 2:CN/ 3:CNRCB 1-4/ 4:CNRCB 1-4B/ 5:CNRCB 5-4/ 6:CNRCB 5-4B/ 7:ARSEF 1-4/ 8:ARSEF:1-4B/ 9:ARSEF 5-4/ 10:ARSEF 5-4B. (MPM: Marcador de peso molecular; CN: Control negativo). La flecha indica el tamaño esperado del amplicón (500 pb).

Se seleccionaron los cebadores ITS1-ITS4 ya que con ellos se obtuvo una sola banda con el tamaño esperado (500pb) en ambos aislados de *Isaria fumosorosea* (carriles 3 y 7, figura 7.4). Una vez elegidos los cebadores adecuados para la obtención del amplicón deseado, se volvió a realizar el PCR sólo con los cebadores elegidos (figura 7.5.) y así purificar la banda obtenida para obtener las respectivas secuencias.

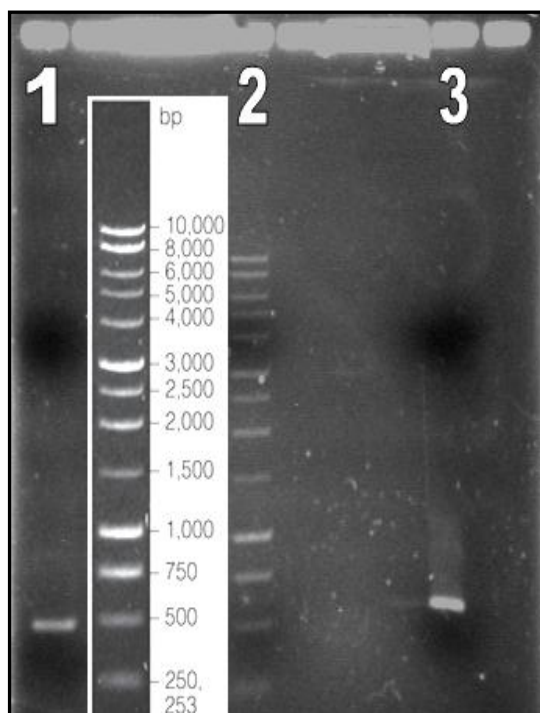


Figura 7.5. Gel de electroforesis de los productos de PCR de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 (carril 1) e *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 (carril 3) con cebadores ITS1 e ITS4. En el carril 2 se observa el marcador de peso molecular g5711 de 1Kb de PROMEGA®. Se obtuvieron amplicones en ambos aislados de *Isaria fumosorosea* de aproximadamente 500pb.

Una vez obtenida la secuencia de los amplicones de ambos aislados de *Isaria* (sección de anexos), ésta se introdujo en el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para ambas secuencias de los aislados de *Isaria* se obtuvo 99% de identidad máxima para *Paecilomyces fumosoroseus* (actualmente llamada *Isaria fumosorosea*) como puede observarse en la figura 7.6.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB263744.1	Paecilomyces javanicus genes for 18S rRNA, putative homing endo	1033	1033	99%	0.0	99%	
AF461748.1	Paecilomyces fumosoroseus strain ARSEF 4484 18S ribosomal RNA	1033	1033	99%	0.0	99%	
AF461747.1	Paecilomyces fumosoroseus strain ARSEF 4501 18S ribosomal RNA	1033	1033	99%	0.0	99%	
EF990131.1	Isaria javanica strain CM1 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	1011	1011	96%	0.0	99%	

Figura 7.6. Resultados del BLAST a partir de la secuencia obtenida del aislado *Isaria fumosorosea* CNRCB1.

Debido a que se encontró similitud también con un aislado de *Paecilomyces javanicus*, se ingresaron al BLAST sólo las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 de ambos aislados de *I. fumosorosea* encontrándose en ambos casos 99% y 100% de identidad para *Isaria*

fumosorosea lo cual permitió incluir los aislamientos estudiados dentro de esta especie (figura 7.7).

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ750877.1	Isaria sp. Lo 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr:	322	322	100%	4e-85	99%	
EU553335.1	Isaria fumosorosea strain CG 684 18S ribosomal RNA gene, partial	322	322	100%	4e-85	99%	
EU553321.1	Isaria fumosorosea strain CG 170 18S ribosomal RNA gene, partial	322	322	100%	4e-85	99%	
EU553312.1	Isaria fumosorosea strain CG 197 18S ribosomal RNA gene, partial	322	322	100%	4e-85	99%	
EU553310.1	Isaria fumosorosea strain CG 123 18S ribosomal RNA gene, partial	322	322	100%	4e-85	99%	

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ750877.1	Isaria sp. Lo 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr:	298	298	100%	6e-78	100%	
EU553321.1	Isaria fumosorosea strain CG 170 18S ribosomal RNA gene, partial	298	298	100%	6e-78	100%	
EU553312.1	Isaria fumosorosea strain CG 197 18S ribosomal RNA gene, partial	298	298	100%	6e-78	100%	
EU553310.1	Isaria fumosorosea strain CG 123 18S ribosomal RNA gene, partial	298	298	100%	6e-78	100%	
EU553304.1	Isaria fumosorosea strain CG 637 18S ribosomal RNA gene, partial	298	298	100%	6e-78	100%	
EU553301.1	Isaria fumosorosea strain CG 499 18S ribosomal RNA gene, partial	298	298	100%	6e-78	100%	

Figura 7.7. Resultados generados al ingresar la secuencia de las regiones intertranscripcionales (ITS) 1 y 2 (superior e inferior respectivamente) de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF 3302 al BLAST.

Ambas secuencias se registraron en los archivos del GenBank de la página electrónica del NCBI (National Center for Biotechnology Information), las cuales se encuentran disponibles en este banco de datos con números de acceso HM209049 para el aislado de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y HM209050 para el aislado de *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 (anexo 12.2).

7.3 Conservación de cepas a largo plazo

Los resultados del método de conservación (tabla 7.1) indican que el uso de viales con agua desionizada estéril mantenidos a 4°C resultó adecuado para *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* 882.5. Respecto al aislado *I. fumosorosea* ARSEF 3302 se sugiere otro método de conservación (liofilización, glicerol) debido que, a partir de los cuatro meses de conservación, presentó crecimiento pobre, anormal durante la propagación de los conservados.

Tabla 7.1. Viabilidad de los hongos *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* 882.5 conservados en agua desionizada estéril a 4°C. Para el aislado *I. fumosorosea* ARSEF 3302 no se presentan datos ya que su propagación a partir de los trozos de agar conservados en viales no resultó adecuada.

Hongo entomopatógeno	Tiempo de evaluación	Viabilidad
<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	6 meses	50%
<i>Beauveria bassiana</i> 882.5	6 meses	48%
<i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1	2 meses	70%

7.4 Evaluación de tres medios de cultivo para la producción de conidios

Comprendiendo el mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos se deduce la importancia de las unidades infectivas de éstos conocidas como conidios. Se han identificado varios factores que influyen en la producción de conidios por hongos entomopatógenos. Sánchez-Murillo y col. (2004) determinaron el requerimiento de luz para la producción de conidios por *Isaria fumosorosea*, encontrando que no había producción de éstos en cultivos que crecían en completa oscuridad; en la investigación de Zhang y col. (2009) observaron que *Beauveria bassiana*, también presentaba un efecto positivo de la luz para la producción de conidios. Otro estudio que también determinó el efecto de la luz para *Metarhizium flavoviride*, fue el que realizó Onofre y col. (2001). Otra variable que influye en la producción de conidios es la proporción carbono:nitrógeno. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Vega y col. (2003) que estudiaron la producción de conidios en medio líquido por aislados de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (ahora *Isaria fumosorosea*).

Pero principalmente, el medio de cultivo es uno de los factores que ha sido más estudiado; casos diversos de éste se pueden citar, por ejemplo la evaluación hecha por Kamp y Bidochka (2002) con tres hongos entomopatógenos (*M. anisopliae*, *B. bassiana* y *V. lecanii*) y el efecto de seis diferentes medios de cultivo comerciales para la producción de conidios. Dalla Santa y col. (2004) estudiaron la producción de conidios por *B. bassiana* utilizando residuos agro-industriales.

Debido a lo anterior, uno de los primeros objetivos en la evaluación de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados en esta investigación fue partir de tres medios de cultivo seleccionando aquel en que la producción de conidios fuera favorecida comparativamente con los otros dos.

7.4.1 Medio agar papa dextrosa (PDA)

En la figura 7.8 se observa la diferencia en la producción máxima de conidios que se presentó en el caso de los dos aislados de *Isaria fumosorosea* en este medio. Mientras el aislado *I. fumosorosea* ARSEF 3302 presentó una producción máxima de 3.43×10^8 con/cm², el aislado de *I. fumosorosea* CNRCB1 tuvo una producción de 1.18×10^9 con/cm², lo que significa más de tres veces lo producido por el aislado ARSEF 3302. Respecto a *Beauveria bassiana* la mayor producción de conidios en este medio se alcanzó en el día 14 de crecimiento (2.89×10^8 con/cm²). En medio PDA, Kamp y Bidochka (2002) encontraron que *Beauveria bassiana* produjo más conidios comparativamente con otros cinco medios de cultivo comerciales incluidos en su estudio. Estos investigadores reportan que la mayor producción de conidios por *B. bassiana* en este medio fue de 2.18×10^8 con/cm²; en la presente investigación los valores encontrados fueron similares a lo reportado por estos autores.

Para *Metarhizium anisopliae*, la mayor producción de conidios en este medio se alcanzó en el día 7 (9.94×10^7 con/cm²). Al igual que *B. bassiana*, en la investigación de Kamp y Bidochka (2002), *M. anisopliae* produjo la mayor cantidad de conidios en este medio teniendo un máximo en uno de los aislados de hasta 1.53×10^8 con/cm².

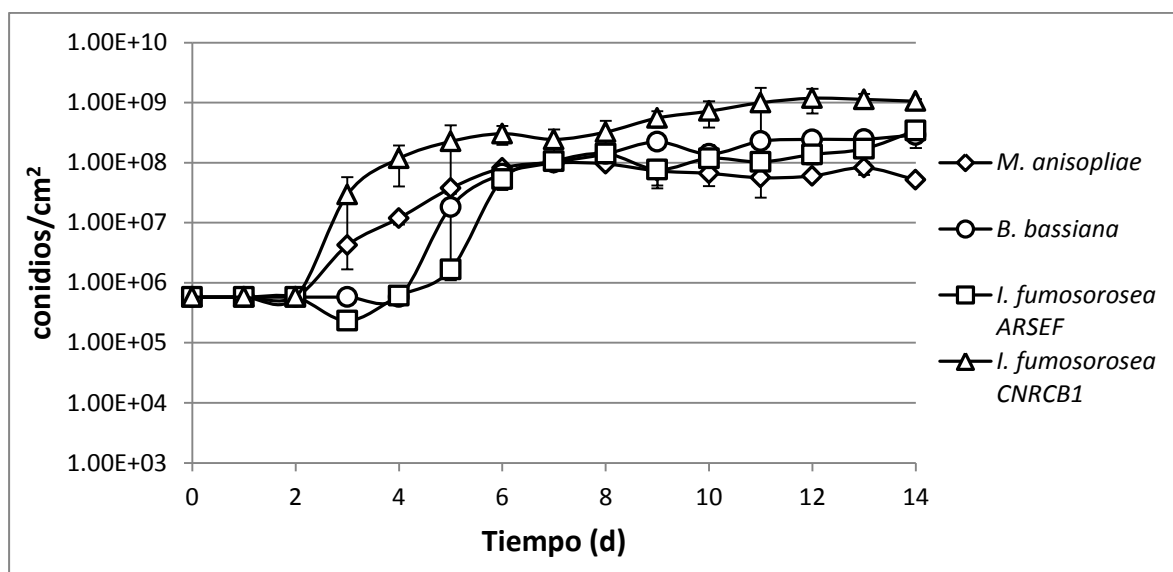


Figura 7.8. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio de cultivo Agar-papa-dextrosa (PDA) por *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Beauveria bassiana* 882.5.

7.4.2 Medio harina de arroz

El arroz ha sido un sustrato comúnmente utilizado en la producción de conidios de hongos entomopatógenos. Grimm (2001) menciona un proceso de producción de conidios en Costa Rica por los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en tres pasos, utilizando en dos de ellos granos de arroz. Los rendimientos reportados por Grimm en ese estudio fueron, para *B. bassiana* de 5×10^9 con/gssi y para *M. anisopliae* de 8×10^8 con/gssi, donde gssi refiere gramos de sustrato seco inicial. Otro ejemplo del uso de granos de arroz para la producción de conidios son los estudios realizados por Neves y Alves (2000) los cuales utilizaron dicho sustrato para la selección de aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que produjeran gran cantidad de conidios. Garza-López y col. (2008) también utilizaron como sustrato granos de arroz y determinaron la influencia de la concentración de O_2 y CO_2 para la producción de conidios por *B. bassiana*.

Por lo que respecta a esta investigación, se usó medio basado en harina de arroz en cultivo superficial. Con excepción de *B. bassiana*, en este medio se obtuvieron los menores rendimientos en producción de conidios por los hongos entomopatógenos estudiados, comparando la producción de cada uno de ellos en los otros medios estudiados. En la figura 7.9 se observan los conidios producidos en este medio hasta el día catorce de incubación. Comparando la producción de conidios en este medio entre los cuatro hongos entomopatógenos se destacan *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Beauveria bassiana* 882.5 con 2.69×10^8 y 2.93×10^8 conidios/cm² respectivamente. Por el contrario, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 y *Metarhizium anisopliae* CP-OAX fueron los que menor cantidad de conidios produjeron con 5.86×10^7 y 2.80×10^7 conidios/cm² respectivamente.

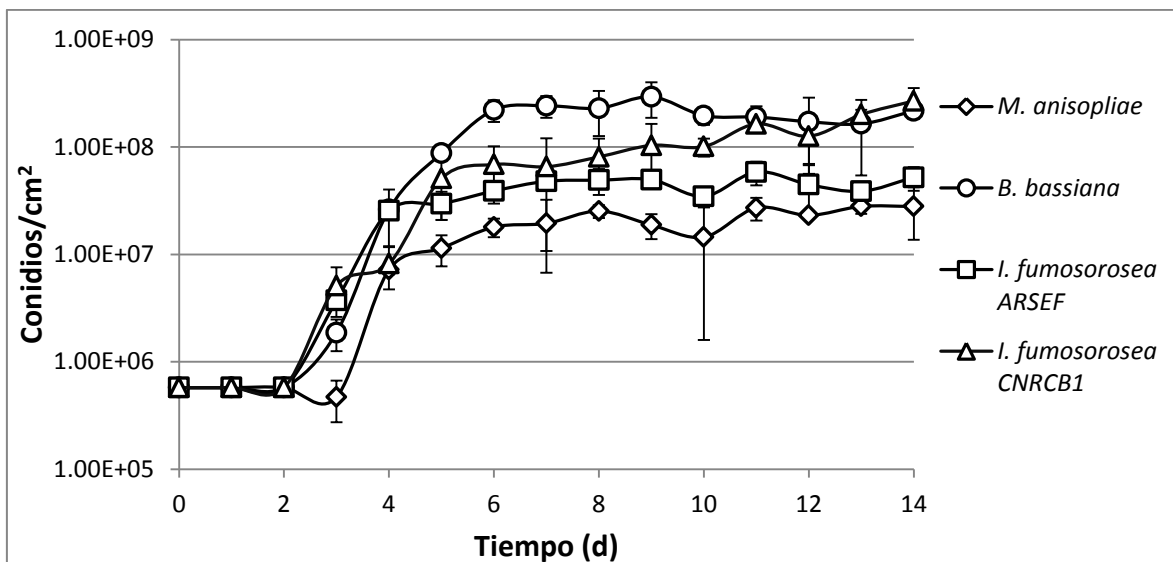


Figura 7.9. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio de cultivo harina de arroz por *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, *Isaria fumosorosea* CNRCB-Colima y *Beauveria bassiana* 882.5.

7.4.3 Medio harina de avena

Este medio de cultivo fue evaluado en un estudio anterior por Tlecuitl-Beristáin y col. (2010). En la citada investigación, se encontró que la mayor producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX (mayor a 2.6×10^7 con/cm²) se dio en medio harina de avena, enriquecido con peptona de carne, incrementando hasta un 56% la producción de conidios comparado con el medio que contenía sólo harina de avena. Por lo anterior y debido a que el aislado de *M. anisopliae* es el mismo en la presente investigación como en la referida, fue elegido este medio para ser evaluado en la producción de conidios.

Para *M. anisopliae* CP-OAX el medio harina de avena fue donde se encontró la mayor producción de conidios en comparación con los otros dos estudiados en esta investigación (1.87×10^8 con/cm²) (figura 7.10); lo mismo ocurrió para *I. fumosorosea* CNRCB1 (3.53×10^9 con/cm²) y *B. bassiana* 882.5 (9.52×10^8 con/cm²). La excepción fue *I. fumosorosea* ARSEF ya que la mayor producción de conidios en este medio fue sólo de 8.68×10^7 con/cm².

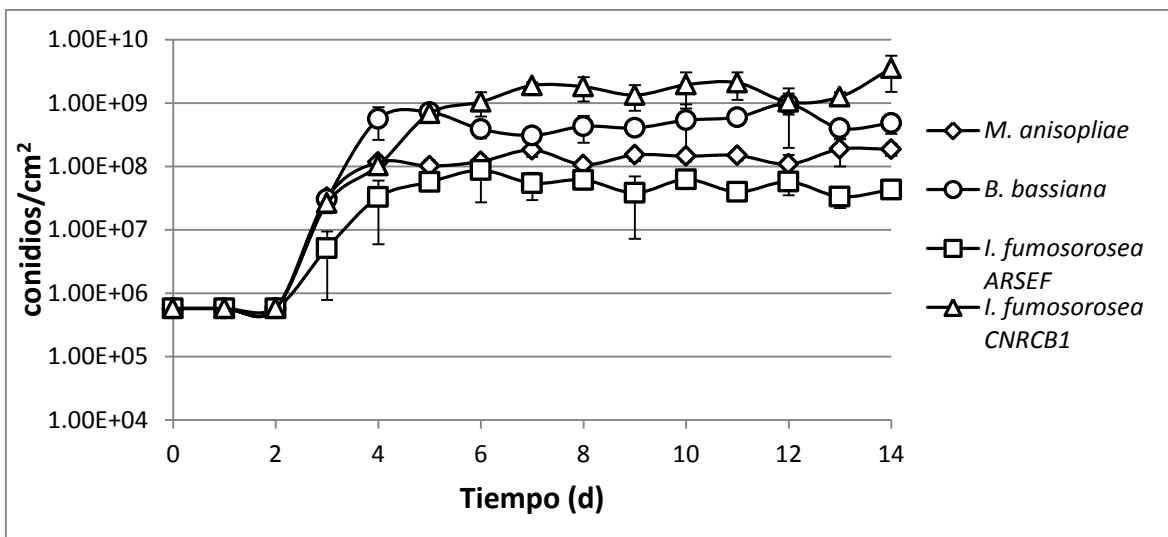


Figura 7.10. Producción de conidios por centímetro cuadrado en medio de cultivo harina de avena por *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Beauveria bassiana* 882.5.

7.4.4 Selección del medio de cultivo

Para la elección del medio de cultivo se consideró la producción de conidios en los medios de cultivo PDA, harina de arroz y harina de avena por todos los hongos entomopatógenos estudiados. A partir del análisis estadístico, el medio harina de avena fue elegido para la siguiente etapa en la investigación ya que, aunque no se encontraron diferencias significativas respecto al medio PDA (Tukey $\alpha = 0.05$) en *I. fumosorosea* CNRCB1, *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5, fue en el medio harina de avena donde numéricamente se observó la mayor producción de conidios (figura 7.11) por los hongos entomopatógenos estudiados con excepción del aislado *I. fumosorosea* ARSEF 3302, en el cual se encontró que el mejor medio respecto a la producción de conidios fue PDA (Tukey $\alpha = 0.05$). De acuerdo a lo reportado por Vega y col. (2003), la mayor producción de conidios en *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* se observó en medios donde la relación C:N fue de 10 (la menor estudiada en esa investigación); de manera similar, Shaukat y col. (2009) reportaron que *I. fumosorosea* tuvo una mayor producción de conidios en un medio con relación C:N de 10. En esta investigación, el medio harina de avena, donde numéricamente se encontró la mayor producción de conidios en tres de los cuatro hongos estudiados, tiene una relación C:N de 5.73 (Tlecuítl-Beristáin y col. 2010) y el medio PDA (el segundo medio en producción de conidios en esta investigación) tiene una relación C:N de 10. A partir de lo

anterior se puede establecer que la producción de conidios por *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* se ve favorecida cuando las relaciones C:N son bajas (≤ 10).

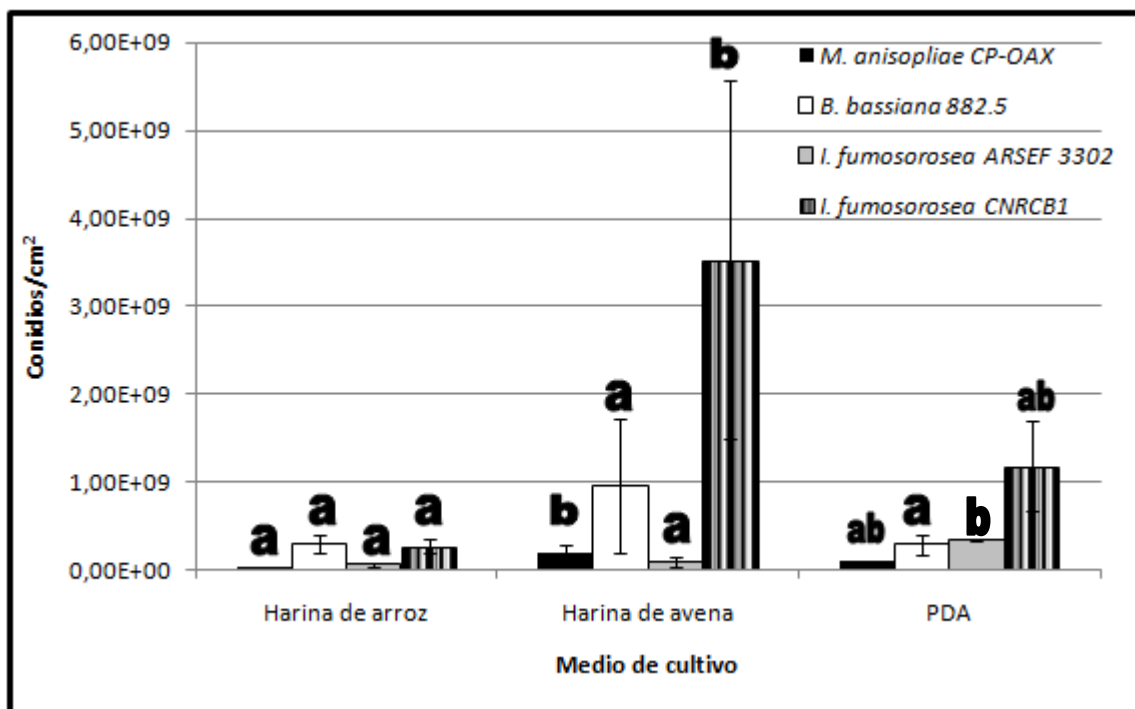


Figura 7.11. Producción de conidios por *I. fumosorosea* ARSEF 3302, *I. fumosorosea* CNRCB1, *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5 en los medios de cultivo harina de arroz, harina de avena y PDA. Las letras indican el grupo al que pertenece cada uno de los datos al realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$).

7.5 Producción de conidios en medio harina de avena en atmósfera normal (21% de O₂) y modificada con pulsos de 26% O₂

7.5.1 *Metarhizium anisopliae* CP-OAX

Recientemente, Tlecuitl-Beristáin y col. (2010) han publicado el primer trabajo que estudia la influencia de una mayor concentración de oxígeno atmosférico (26%) para la producción de conidios por *M. anisopliae* en medio harina de avena. De acuerdo a los autores, a las 156 horas de crecimiento se encontró un incremento en la producción de conidios por este hongo (4.25×10^7 con/cm²) en el tratamiento de atmósfera modificada (26% O₂). Este aumento en el rendimiento representó hasta un 100% comparado con la producción en atmósfera normal (21% O₂). En lo correspondiente a esta investigación se encontró un perfil similar a lo encontrado en el reporte citado. La producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en atmósfera modificada fue mayor de manera constante en comparación a lo producido en

atmósfera normal (figura 7.12.). Se encontró la máxima producción de conidios en ambas condiciones a las 204 horas. En atmósfera normal se tuvo una producción de 7.33×10^7 con/cm²; mientras que en atmósfera modificada se encontró una producción de 1.28×10^8 con/cm².

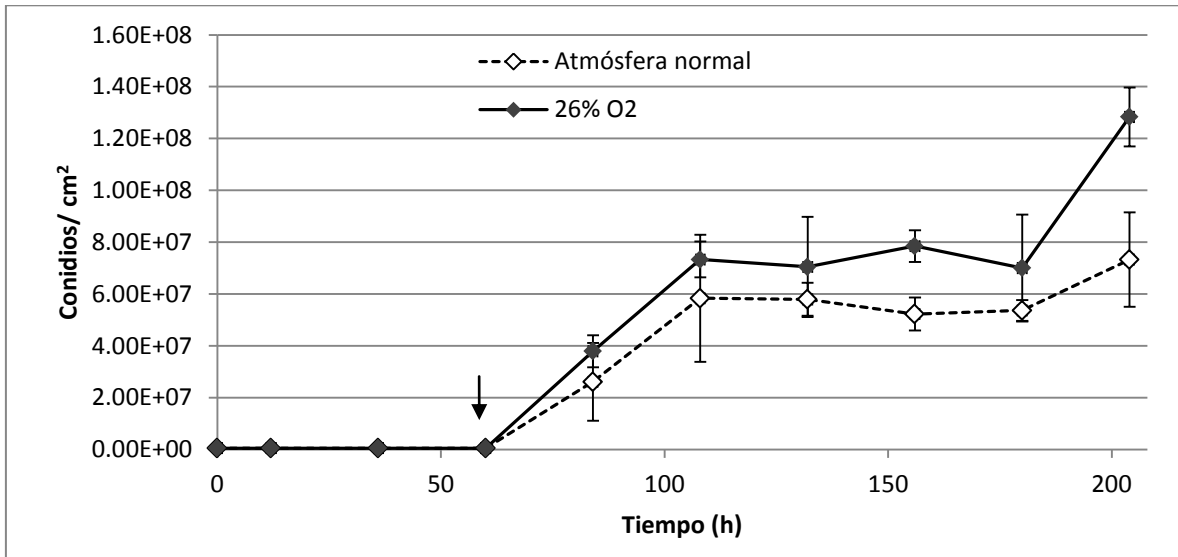


Figura 7.12. Producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. La flecha indica el tiempo en el cual se inició el cambio de atmósfera a 26% de oxígeno.

En el caso de la producción de conidios con atmósfera modificada desde la inoculación de las botellas (tiempo cero) se hicieron mediciones de producción de conidios en dos tiempos (132 y 204 horas). Tomando los datos encontrados a las 132 horas (figura 7.13) estadísticamente no hubo diferencias significativas en la producción de conidios en ninguno de los tratamientos; mientras que a las 204 horas sí se encontraron diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$) entre la producción de conidios con atmósfera modificada a las 60 horas (1.28×10^8 con/cm²) y los producidos en atmósfera normal (7.33×10^7 con/cm²); mientras que no hubo diferencias significativas la producción de conidios en el tratamiento con atmósfera con 26% O₂ modificada a las 60 horas y en tiempo cero (9.64×10^7 con/cm²).

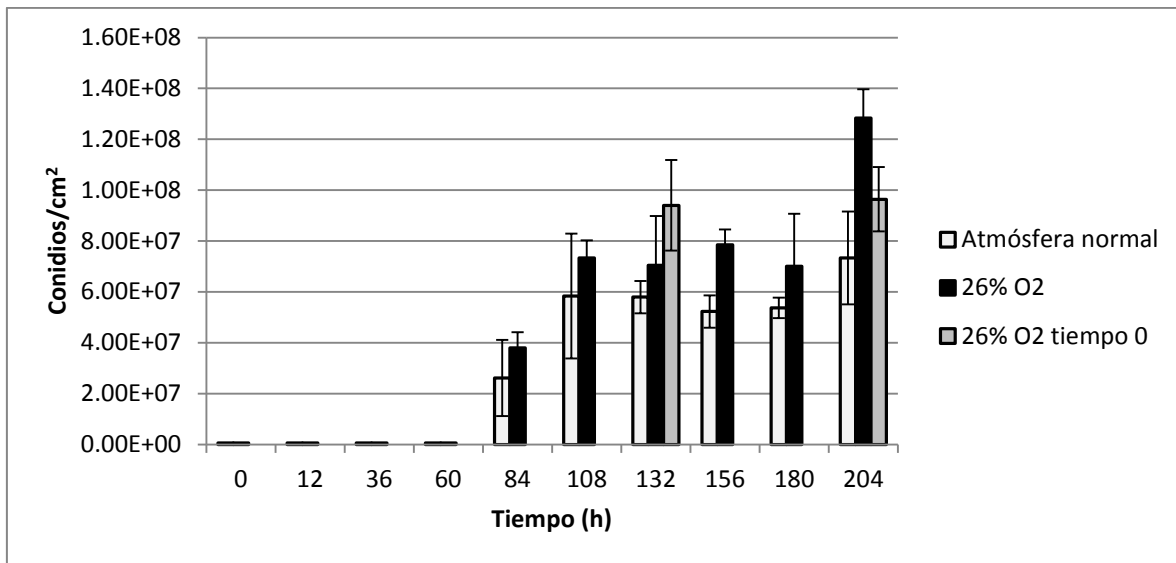


Figura 7.13. Producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en atmósfera normal, atmósfera con 26% de oxígeno modificada a las 60 horas y desde tiempo cero. El tratamiento atmósfera modificada con 26% oxígeno en tiempo cero tuvo dos conteos de conidios (134 y 204 horas).

7.5.2 *Isaria fumosorosea* CNRCB1

Como se observa en la gráfica 7.14, la producción de conidios en atmósfera normal fue significativamente mayor a la producción con pulsos de atmósfera de 26% de O₂. Alcanzando una diferencia de más del 100% a las 204 horas. De acuerdo a estos resultados, mientras que la condición hiperoxidante favoreció la producción de conidios en *M. anisopliae* CP-OAX, comparativamente con lo producido en atmósfera normal (apartado 7.5.1), para *I. fumosorosea* CNRCB1 fue un factor que disminuyó tal producción. Lo cual permite establecer que estos hongos tienen grados de tolerancia y mecanismos de respuesta distintos a tal condición.

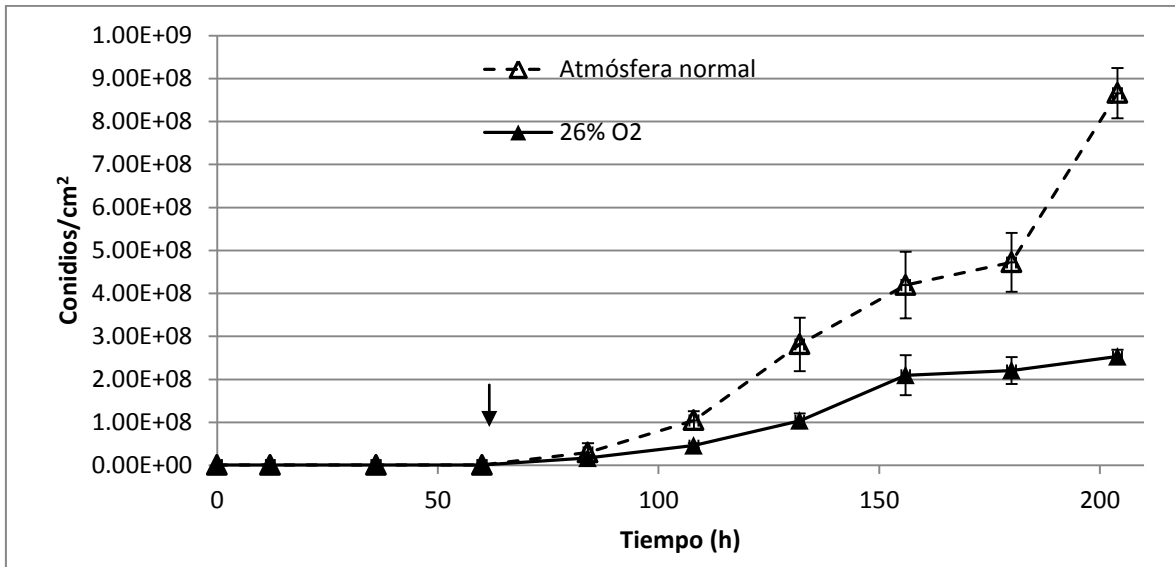


Figura 7.14. Producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 cultivado en medio harina de avena en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. La flecha indica el tiempo en el que fue modificada la atmósfera.

Tanto a las 132 como a las 204 horas de crecimiento la producción de conidios (figura 7.15) en atmósfera normal fue significativamente mayor a la producción con atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas, así como desde tiempo cero (Tukey $\alpha=0.05$).

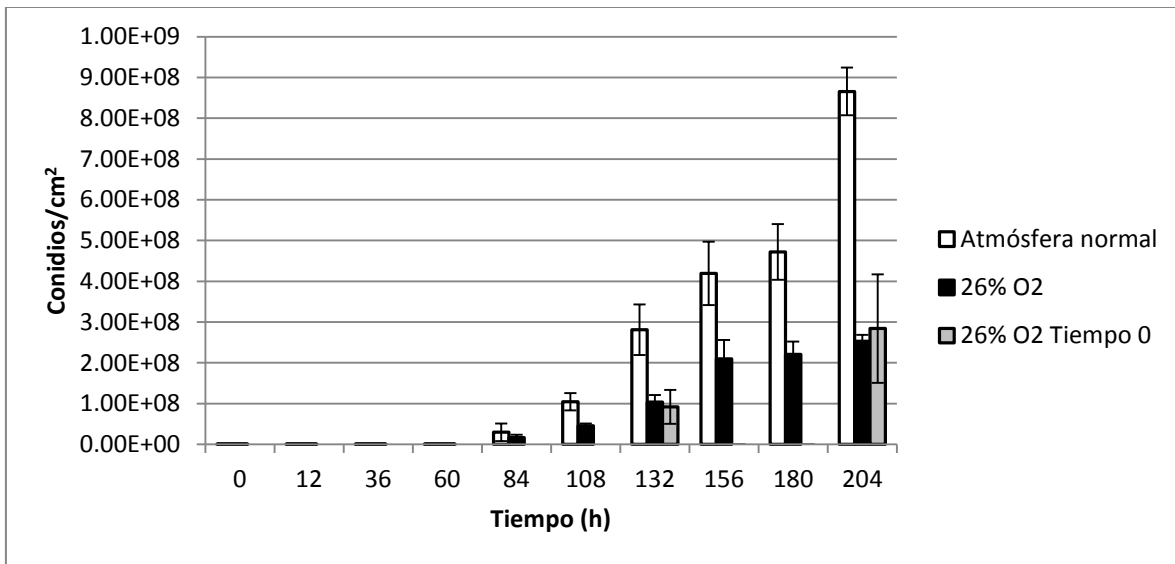


Figura 7.15. Producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero. El tratamiento atmósfera modificada con 26% de oxígeno desde tiempo cero tuvo dos conteos de conidios (132 y 204 horas).

7.5.3 *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302

A diferencia del aislado *I. fumosorosea* CNRCB1, el proveniente de la colección ARSEF (3302) presentó un perfil donde la máxima producción de conidios se observó en el tratamiento con atmósfera modificada (26% O₂). A las 180 horas se dio la mayor diferencia en producción de conidios comparando ambos tratamientos ya que, mientras en atmósfera normal se alcanzó una cifra de 3.38×10^7 con/cm², en atmósfera con 26% de oxígeno se observó una producción de 1.69×10^8 con/cm², que significa 5 veces más conidios producidos que en atmósfera normal (figura 7.16).

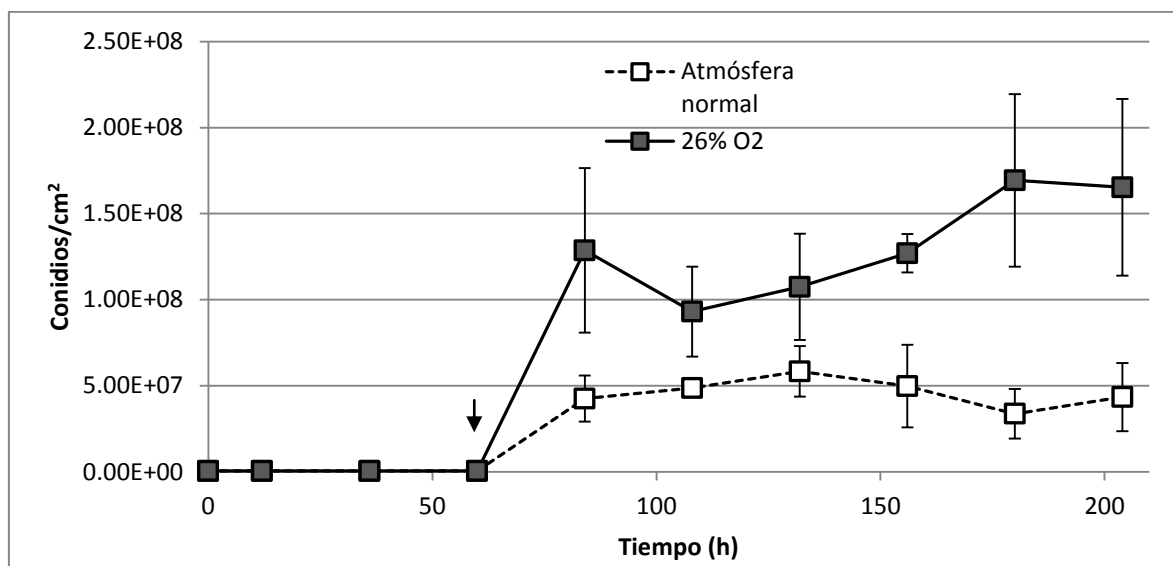


Figura 7.16. Producción de conidios por *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. La flecha indica el tiempo en el que fue modificada la atmósfera a 26% de oxígeno.

Sin embargo, cuando se modificó la atmósfera a 26% de oxígeno desde el inicio (tiempo cero) no se encontró una producción similar a los rendimientos observados con atmósfera modificada a las 60 horas (figura 7.17). Una hipótesis que puede explicar lo anterior es que, a las 60 horas, el micelio es competente al estado oxidante; mientras que, si se enfrenta a condiciones hiperoxidantes desde el primer momento, es probable que el hongo no tenga la capacidad de adecuarse a este estado lo que explicaría la disminución en la producción de conidios. De acuerdo al análisis de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$), a las 132 horas la producción de conidios en atmósfera con 26% de O₂ modificada a tiempo cero (6.0×10^6 con/cm²) fue significativamente menor a los producidos en atmósfera normal (5.84×10^7 con/cm²) y atmósfera con 26% de O₂ modificada a las 60 horas (1.08×10^8 con/cm²). A partir

del análisis de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=0.05$), a las 204 horas el tratamiento con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas produjo significativamente la mayor cantidad de conidios (1.65×10^8 con/cm²); mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con atmósfera normal (4.35×10^7 con/cm²) y con 26% de oxígeno desde tiempo cero (3.17×10^7 con/cm²).

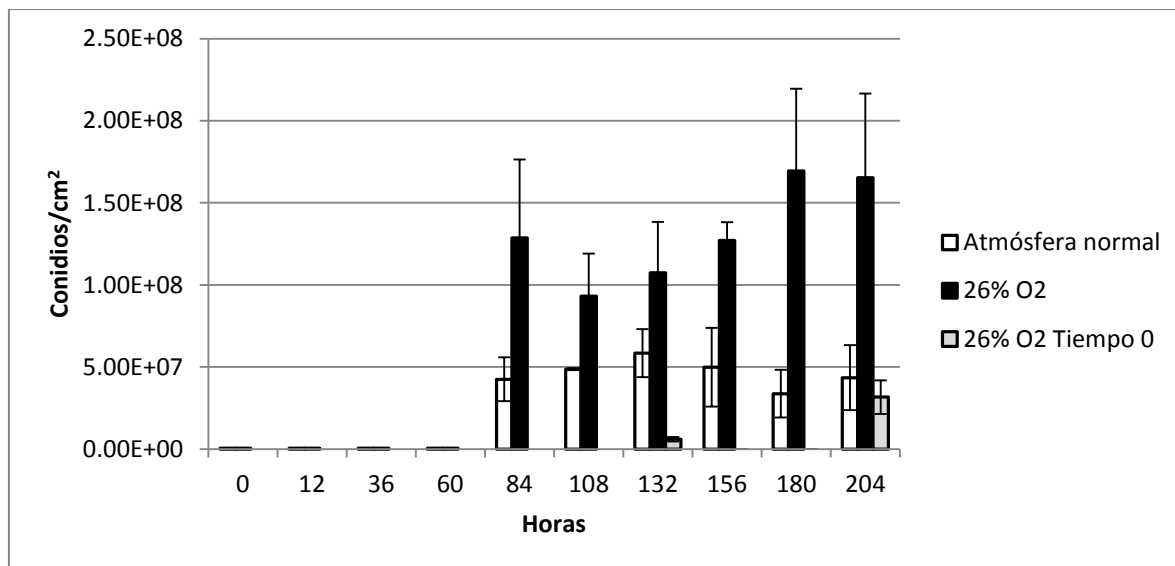


Figura 7.17. Producción de conidios por *I. fumosorosea* ARSEF 3302 en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero. El tratamiento atmósfera modificada con 26% de oxígeno en tiempo cero tuvo dos conteos de conidios (132 y 204 horas).

7.5.4 *Beauveria bassiana* 882.5

El efecto en la producción de conidios que tiene un incremento en la concentración de oxígeno en *B. bassiana* ya ha sido reportado por Garza-López y col. (2008). Sólo que, a diferencia de la presente investigación, el estudio citado utilizó granos de arroz como sustrato. De acuerdo a lo reportado por Garza-López, *B. bassiana* produjo la mayor cantidad de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno en el octavo día (1.14×10^9 con/gssi). Lo anterior resultó contrastante con lo encontrado en esta investigación; desde luego hay que considerar que los sustratos fueron diferentes en ambas investigaciones. Como puede observarse en la figura 7.18, la mayor producción de conidios por *B. bassiana* 882.5 se dio en el tratamiento con atmósfera normal. Mientras que la producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno apenas logró rebasar la cantidad inoculada, aunque sí se observó el desarrollo de micelio vegetativo en las botellas, por lo cual se evidenció que los conidios inoculados germinaron, pero la producción de nuevos conidios fue escasa en este tratamiento.

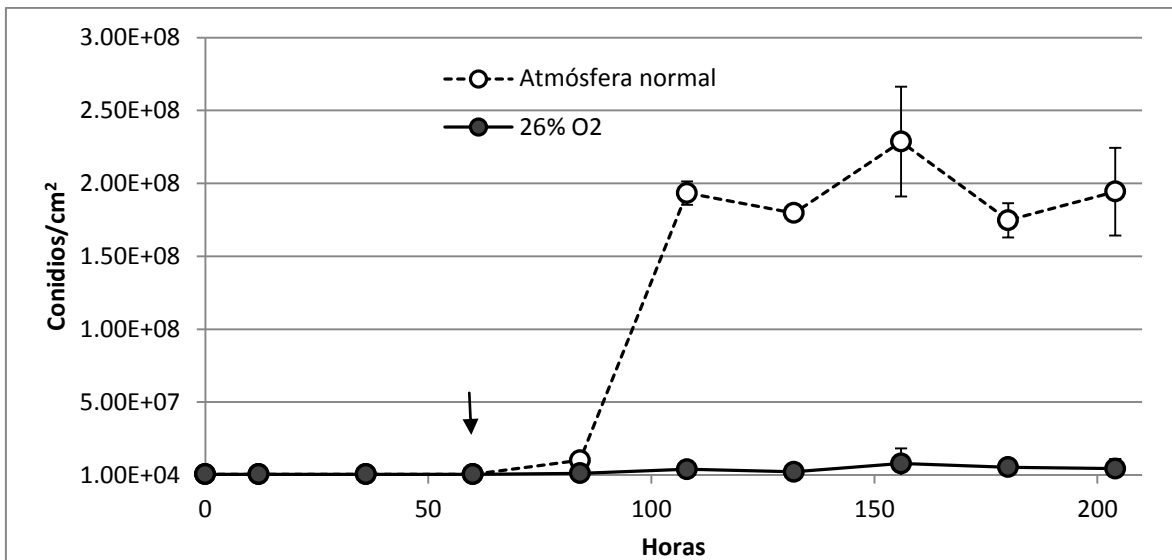


Figura 7.18. Producción de conidios por *Beauveria bassiana* 882.5 en medio harina de avena en atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. La flecha indica el tiempo en el que fue modificada la atmósfera a 26% de oxígeno.

Con el tratamiento con 26% de oxígeno desde tiempo cero en ninguno de los tiempos estudiados (132 y 204 horas) se contabilizó producción de conidios por *B. bassiana* (figura 7.19). A partir de estos resultados se evidencia que, *B. bassiana* 882.5 crecido en medio harina de avena, es el hongo que resultó más afectado para la producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno.

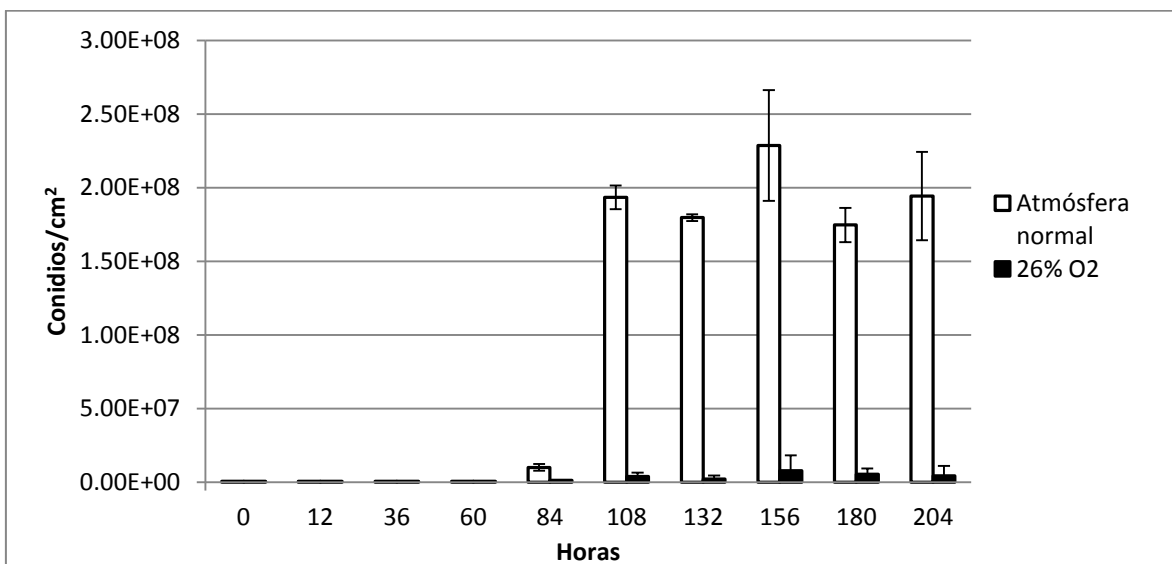


Figura 7.19. Producción de conidios por *Beauveria bassiana* 882.5 en tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno modificado a las 60 horas y en tiempo cero. El tratamiento atmósfera con 26% de oxígeno desde tiempo cero tuvo dos conteos de conidios (132 y 204 horas); sin embargo, en ninguno de los dos tiempos se encontró producción de conidios.

De acuerdo a todo lo anterior, se observaron comportamientos muy diferentes en los hongos entomopatógenos estudiados ante un estado hiperoxidante (26% de oxígeno). Los aislados de *Isaria fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302), a pesar de su especie común, mostraron respuestas diferentes. En lo tocante a *M. anisopliae* CP-OAX, se confirmó lo reportado por Tecuítl-Beristain y col. (2010) donde se establece que hubo una mayor producción de conidios en el tratamiento con atmósfera con 26% de oxígeno comparado con lo producido en atmósfera normal. Respecto a *B. bassiana* 882.5 los resultados contrastaron con lo reportado por Garza-López y col. (2008), ya que en el estudio citado la producción de conidios se vio favorecida con el tratamiento con 26% de oxígeno; mientras que en esta investigación, en atmósfera con 26% de oxígeno, la producción de conidios fue notoriamente escasa. Sin embargo es conveniente establecer que el sustrato utilizado fue diferente, ya que Garza-López y col. (2008) utilizaron granos de arroz y en la presente investigación el sustrato seleccionado fue harina de avena.

7.6 Pruebas de calidad de conidios

7.6.1. Viabilidad

Al aplicar la prueba estadística t de Student, se encontró que en ambos aislados de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302) y *M. anisopliae* CP-OAX los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O₂ resultaron significativamente más viables respecto a los conidios producidos en atmósfera normal; en el caso de *B. bassiana* se encontró que no había diferencias significativas en la viabilidad de los conidios provenientes de ambos tipos de atmósfera ($p > 0.05$). Safavi y col. (2007) demostraron que los conidios de *Beauveria bassiana* producidos en condición de estrés osmótico (medio con 8% de glucosa, 2% de peptona y 5.5% de KCl) presentaban un aumento en su tasa de germinación, del mismo modo se observó un incremento en la virulencia respecto a conidios provenientes de condiciones normales. De acuerdo a lo reportado por Shah y col. (2005), los conidios de *M. anisopliae* producidos en una condición de estrés osmótico demostraron una rápida germinación respecto a los producidos en condiciones no estresantes. Los autores postulan que esta rápida germinación puede deberse por alto contenido de polioles que tienen los conidios producidos en condiciones de estrés. Debido a lo anterior y a lo encontrado en esta investigación, se puede postular que las condiciones de estrés inducen un aumento en este

importante factor de virulencia. Los resultados de la prueba de viabilidad de los hongos entomopatógenos estudiados en esta investigación se presentan en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Viabilidad de los conidios producidos en atmósfera normal y atmósfera con 26% de O₂ de los cuatro hongos entomopatógenos estudiados en esta investigación.

Hongo entomopatógeno	Atmósfera	Viabilidad (%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	Normal	37.2 (±5.70)
	26% O ₂	56.5 (±2.81)
<i>Beauveria bassiana</i> 882.5	Normal	66.9 (±10.31)
	26% O ₂	66.1 (±12.06)
<i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1	Normal	16.5 (±4.62)
	26% O ₂	69.4 (±7.57)
<i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302	Normal	29.9 (±2.63)
	26% O ₂	76.8 (±10.67)

7.6.2 Bioensayo

Los parámetros de virulencia obtenidos en el bioensayo para *M. anisopliae* CP-OAX de ambos tratamientos se describen en la Tabla 7.3 (gráficas en anexos). Al aplicar la prueba estadística de comparación de medias (t de Student), no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de virulencia ($p > 0.05$). A partir de esto, se establece que los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX provenientes de atmósfera con 26% de O₂ no disminuyeron su virulencia respecto a los cosechados en atmósfera normal.

Tabla 7.3. Parámetros de virulencia de *M. anisopliae* CP-OAX. Porcentaje de sobrevivientes al final del ensayo: Sf (%); tiempo de retardo (días): t_0 ; tiempo en el que la mitad de la población muere: TL_{50} (días); tasa específica de muerte: k (d^{-1}). Se incluyen las desviaciones estándar.

<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	
Atmósfera normal	Atmósfera 26% Oxígeno
%Sf: 13.97 (± 10.39)	%Sf: 11.45 (± 15.71)
t_0 : 7.4 (d) (± 2.19)	t_0 : 8.77 (d) (± 1.74)
TL_{50} : 10.26 (d) (± 2.09)	TL_{50} : 10.86 (d) (± 1.32)
k : 0.456 (d^{-1}) (± 0.27)	k : 0.463 (d^{-1}) (± 0.25)

Se comprobó la muerte de las larvas por micosis (figura 7.20). Para *B. bassiana* 882.5, debido a la producción de conidios tan baja en atmósfera con 26% de oxígeno, no fue posible hacer un comparativo en la calidad de los conidios para esta prueba. En el caso de los dos aislados de *I. fumosorosea* (ARSEF 3302 y CNRCB1), el insecto *Tenebrio molitor* (hospedero) no fue adecuado para realizar el bioensayo ya que no se encontró mortalidad después de 12 días.



Figura 7.20. La micosis presente en larvas de *Tenebrio molitor* permite confirmar que su muerte fue causada por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* CP-OAX.

7.6.3 Termotolerancia

Entre los principales factores abióticos que influyen en el éxito o fracaso de los hongos entomopatógenos en campo están la temperatura, la humedad relativa (Magan, 1997) y la resistencia a la radiación UV-B (Braga y col., 2001). Desde el estudio realizado por Cooney y Emerson (1964) se evidenció que la mayoría de hongos entomopatógenos son mesófilos, con un rango de temperatura de crecimiento que va de 10 a 40°C, siendo el óptimo entre 25 y 35°C. De acuerdo a Cochrane (1958) existe un punto de muerte térmica que se define

como “la mínima temperatura a la cual los conidios mueren en diez minutos”; para *M. anisopliae* se ha establecido este punto en un amplio rango que va de 49-60°C (Benz, 1987; Liu y col., 2003). Tal variabilidad se puede deber, entre otros factores, al aislado estudiado, así como a las condiciones y medio de cultivo del cual se obtienen los conidios.

Por lo anterior, es importante establecer la resistencia de los conidios producidos por los hongos entomopatógenos a temperaturas no óptimas como una prueba de calidad muy importante.

7.6.2.1 *Metarhizium anisopliae* CP-OAX.

Esta especie se ha caracterizado por ser un organismo que tiene una temperatura límite de crecimiento micelial entre 35-40°C (Thomas y Jenkins, 1997). En la presente investigación se encontró que a 40°C el parámetro cinético TS_{50} (que, como se indicó en la sección 6.6.3 es el tiempo en el que el 50% de los conidios aún son viables), de acuerdo a los datos experimentales ajustados al modelo, fue de 46.34 horas en los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O_2 ; mientras que para los conidios obtenidos en atmósfera normal, el valor para este mismo parámetro fue de 33.7 horas. A partir de lo anterior se puede postular que, los conidios provenientes de condiciones hiperoxidantes resultan más termotolerantes que aquellos producidos en condiciones normales (figura 7.21).

A una temperatura de 45°C, los valores de TS_{50} disminuyeron notablemente para los conidios provenientes de ambos tratamientos ya que, mientras para los conidios provenientes de atmósfera normal fue de 0.75 horas, para aquellos obtenidos en atmósfera con 26% de oxígeno fue de 0.85 horas. Lo anterior indica que 45°C es una temperatura límite para la viabilidad de los conidios de este hongo (figura 7.22)

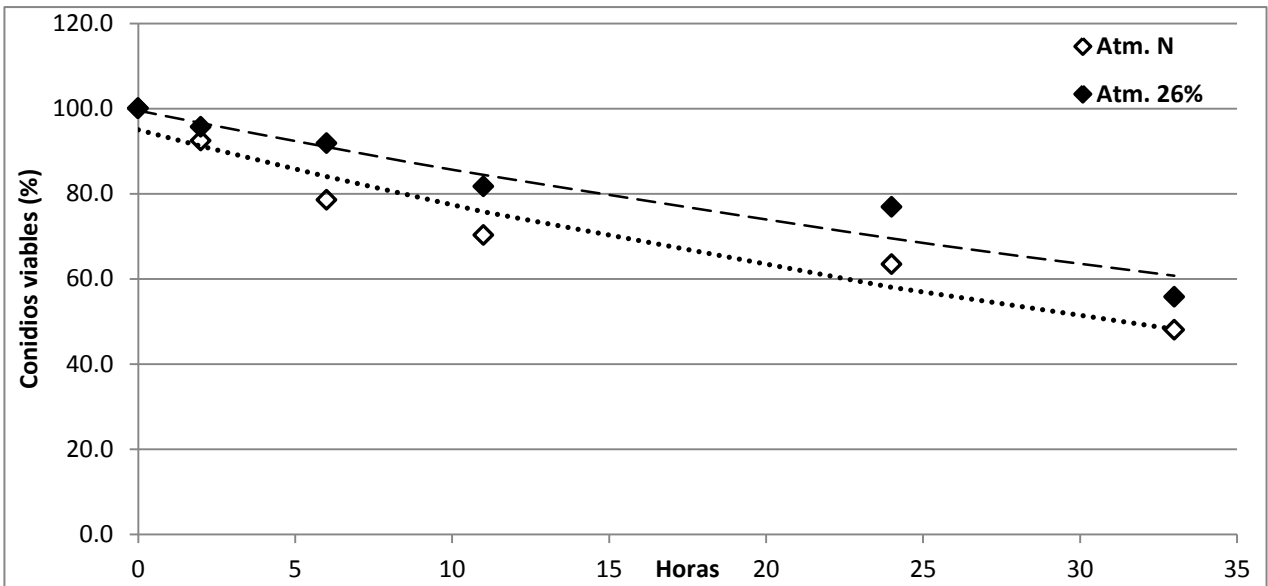


Figura 7.21. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por *M. anisopliae* CP-OAX en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. Se presentan los datos ajustados a los modelos propuestos: atmósfera normal (.....) y atmósfera con 26% de O₂ (---).

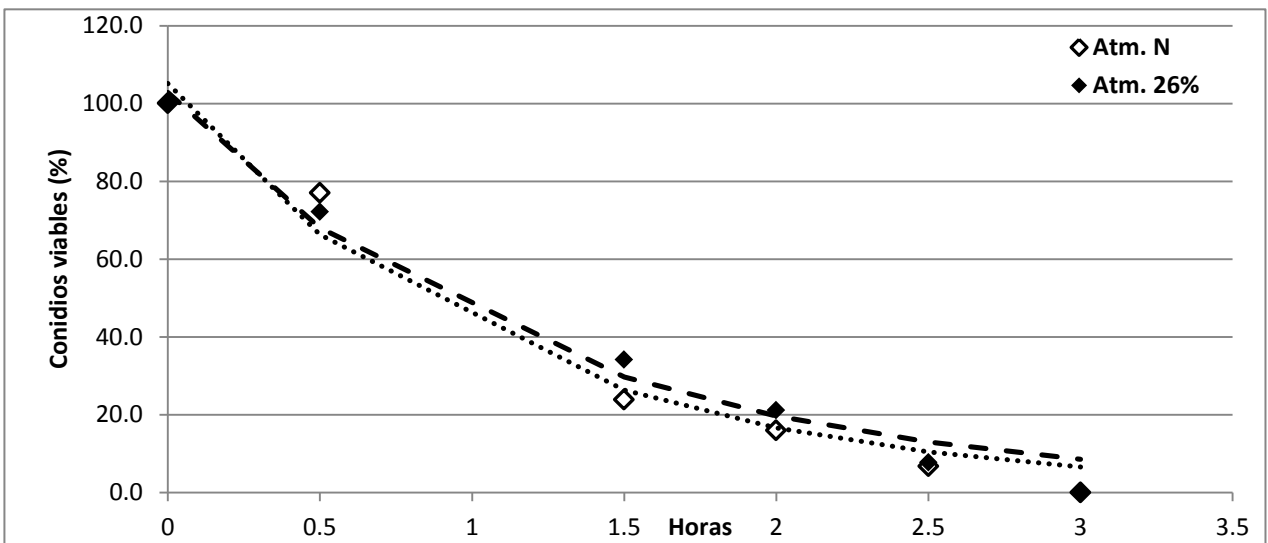


Figura 7.22. Viabilidad a 45°C de los conidios producidos por *M. anisopliae* CP-OAX en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. Se presentan los datos ajustados a los modelos propuestos: atmósfera normal (.....) y atmósfera con 26% de O₂ (---).

7.6.2.2. *Beauveria bassiana* 882.5

En la investigación realizada por Fargues y col. (1997) se establece que este hongo entomopatógeno tiene un amplio rango de temperatura para su crecimiento que va de los 8 a los 35°C. Aunque debe considerarse que los conidios toleran temperaturas mayores que el micelio, debido principalmente a que: a) cuentan con gran cantidad de ácidos grasos

saturados que disminuyen la permeabilidad de la membrana celular (Crisan, 1973; Pupin y col., 2000); b) tienen elevadas cantidades de trehalosa y manitol que sirven como protección contra la desnaturalización de proteínas y membranas (Thevelein, 1984; Rangel y col., 2006). De acuerdo a Liu y col. (2003) la temperatura a la cual sucede la muerte térmica de conidios de *B. bassiana* es de 45°C después de 10 minutos; aunque de acuerdo al estudio de Varela y Morales (1996) se encontró una temperatura de muerte térmica para los conidios de este hongo de hasta 55°C.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, los conidios de *B. bassiana* 882.5 obtenidos en atmósfera normal tuvieron un valor mayor de TS_{50} (8.45 horas) que los conidios cosechados en atmósfera con 26% de O_2 (2.19 horas). Por los datos obtenidos, para *B. bassiana* una mayor concentración de oxígeno ocasionó una menor cantidad en la producción de conidios (sección 7.5.4) y éstos fueron menos tolerantes a una temperatura de 40°C comparados con los conidios provenientes de atmósfera normal (figura 7.23). A 45°C la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* 882.5 disminuyó considerablemente a través del tiempo (figura 7.24). Para los conidios obtenidos en atmósfera normal, el valor de TS_{50} fue de 0.61 horas; mientras que los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O_2 fue de 0.32 horas. Es de hacer notar que, aunque en esta temperatura los valores de TS_{50} disminuyeron, se conservó una mayor resistencia de los conidios producidos en atmósfera normal comparativamente con los obtenidos en atmósfera 26% de O_2 .

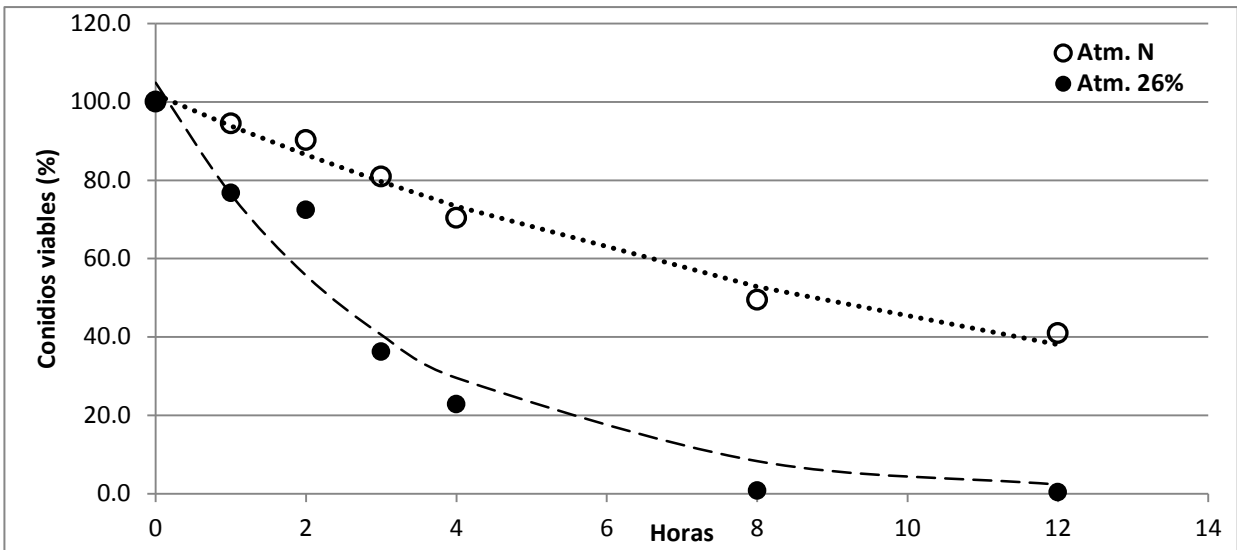


Figura 7.23. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por *B. bassiana* 882.5 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. Se presentan los datos ajustados a los modelos propuestos: atmósfera normal (····) y atmósfera con 26% de O₂ (---).

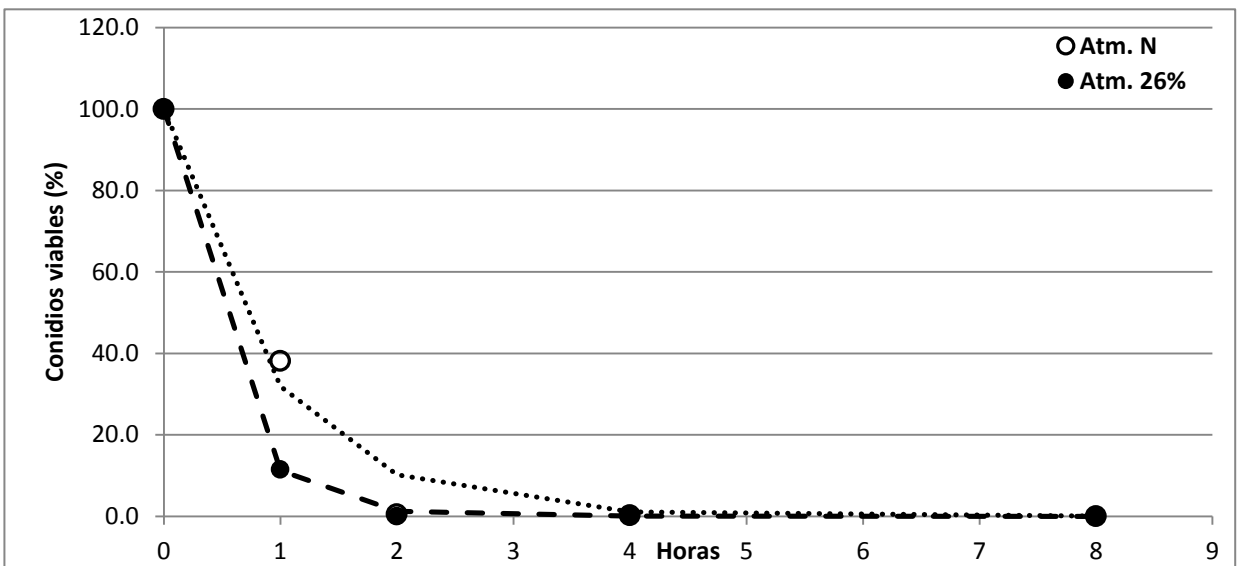


Figura 7.24. Viabilidad a 45°C de los conidios producidos por *B. bassiana* 882.5 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. Se presentan los datos ajustados a los modelos propuestos: atmósfera normal (····) y atmósfera con 26% de O₂ (---).

7.6.2.3. *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF 3302.

En esta investigación, ambos aislados de *I. fumosorosea* presentaron los menores valores de TS₅₀ a 40°C. En el caso del aislado CNRCB1 (figura 7.25), el valor de este parámetro cinético a partir de conidios obtenidos en el tratamiento con 26% de O₂ fue de 1.6 horas; mientras que para los conidios obtenidos de atmósfera normal presentó un valor de 0.55

horas. Aunque la producción de conidios de este hongo con atmósfera con 26% de O₂ fue menor a los obtenidos en atmósfera normal (sección 7.5.2), la termotolerancia de los primeros fue mayor respecto a los segundos. Respecto al aislado de *I. fumosorosea* ARSEF 3302, a una temperatura de 40°C se encontró que los conidios obtenidos a partir del tratamiento con atmósfera de 26% de O₂ tuvieron un valor de TS₅₀ de 0.7 horas; mientras que los provenientes de atmósfera normal no se encontró crecimiento desde el primer tiempo de la cinética (figura 7.26). A 45°C los conidios de ambos aislados de *I. fumosorosea* no presentaron viabilidad desde la primera hora en ninguno de los tratamientos.

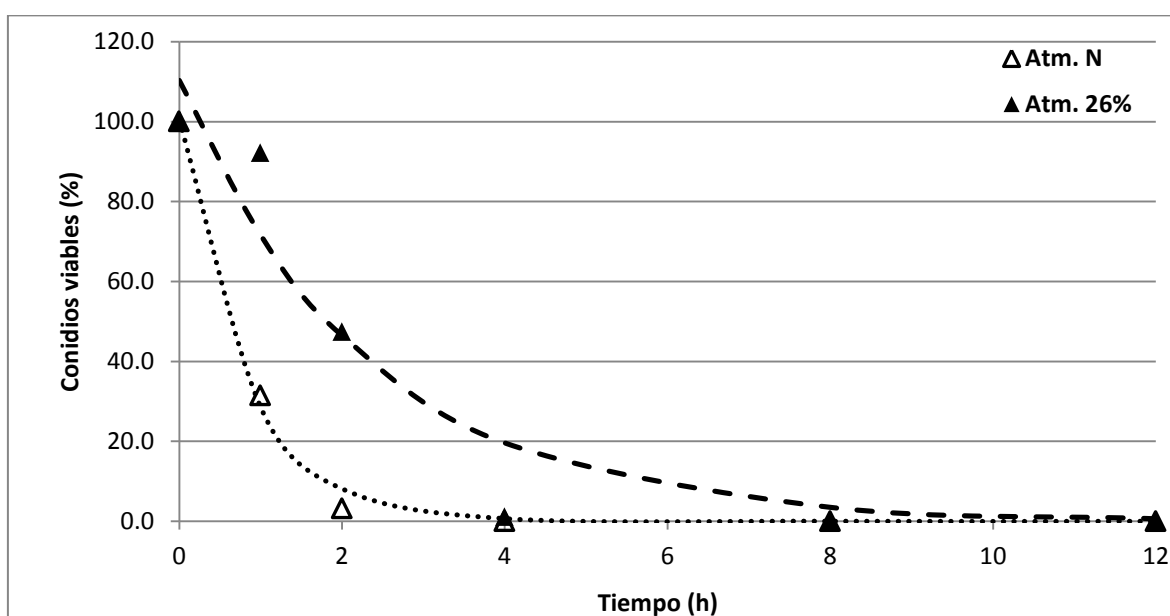


Figura 7.25. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por *I. fumosorosea* CNRCB1 en los tratamientos con atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno. Se presentan los datos ajustados a los modelos propuestos: atmósfera normal (····) y atmósfera con 26% de O₂ (---).

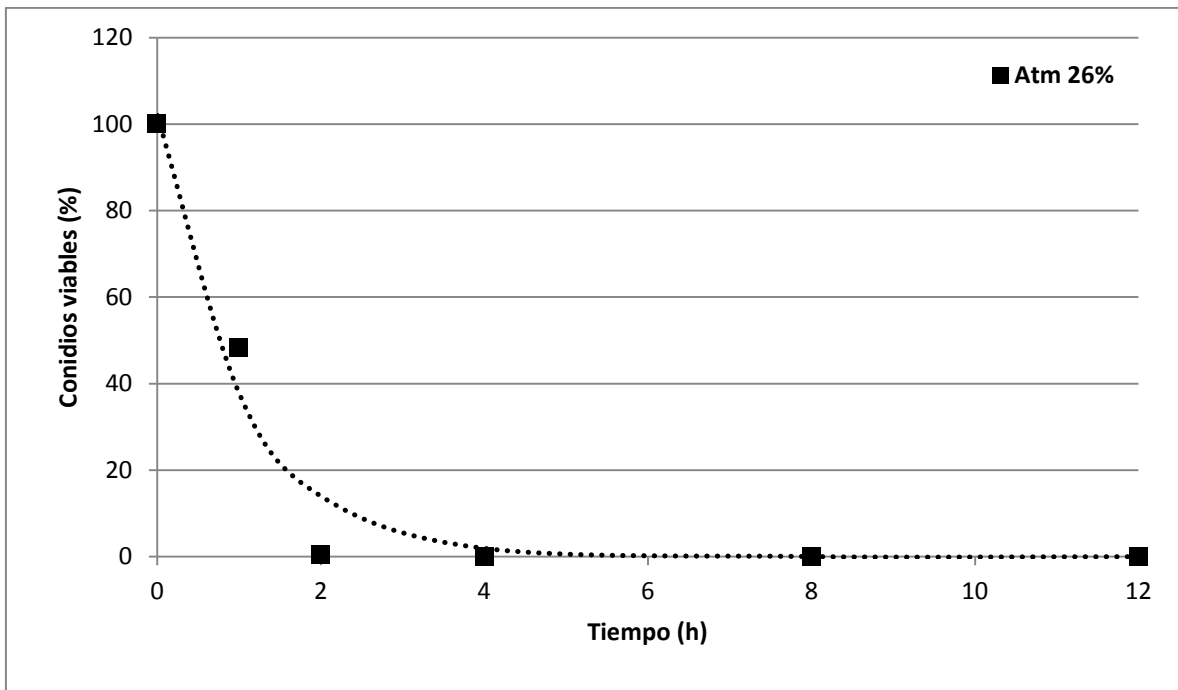


Figura 7.26. Viabilidad a 40°C de los conidios producidos por *I. fumosorosea* ARSEF 3302 en el tratamiento con atmósfera con 26% de O₂. Se presentan los datos ajustados al modelo propuestos para atmosfera 26% de O₂ (...). Los conidios producidos en atmósfera normal no presentaron viabilidad desde la primera hora.

En la tabla 7.4. se resumen los parámetros cinéticos TS₅₀ y k de los cuatro hongos estudiados, así como el coeficiente de determinación (r²) que indica el grado de ajuste de los datos experimentales con el modelo propuesto que se presentó al inicio de esta sección (7.6.2).

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la prueba de termotolerancia para *M. anisopliae* CP-OAX, *B. bassiana* 882.5, *I. fumosorosea* CNRCB1 e *I. fumosorosea* ARSEF 3302*.

Hongo entomopatógeno	Temperatura	Atmósfera	Parámetros Cinéticos	Coefficiente de determinación
<i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX	40°C	Normal	k: -0.021 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 33.70 h	0.968
		26% O ₂	k: -0.015 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 46.34 h	0.965
	45°C	Normal	k: -0.923 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.75 h	0.989
		26% O ₂	k: -0.828 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.85 h	0.991
<i>Beauveria bassiana</i> 882.5	40°C	Normal	k: -0.082 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 8.45 h	0.992
		26% O ₂	k: -0.317 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 2.19 h	0.978
	45°C	Normal	k: -1.143 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.61 h	0.992
		26% O ₂	k: -2.192 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.32 h	0.999
<i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1	40°C	Normal	k: -0.612 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.55 h	0.981
		26% O ₂	k: -0.340 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 1.60 h	0.966
<i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 3302	40°C	Normal	N.D. / N.D.	
		26% O ₂	k: -0.993 h ⁻¹ /TS ₅₀ : 0.70 h	0.982

*Se indican los parámetros cinéticos y el coeficiente de correlación en cada tratamiento. Ninguno de los conidios de los aislados de *I. fumosorosea* presentó viabilidad a 45°C desde la primera hora. El parámetro k es la tasa de decaimiento en la viabilidad de los conidios (h⁻¹); el parámetro TS₅₀ indica el tiempo (h) en el cual el 50% de los conidios se encuentran viables. N.D.: No se determinó porque los conidios no lograron sobrevivir desde el primer tiempo de muestreo.

Los datos registrados en la tabla 7.3 muestran que, *M. anisopliae* CP-OAX tuvo el mayor valor del parámetro TS_{50} a 40°C respecto a los demás hongos entomopatógenos estudiados. Para este hongo, los conidios obtenidos en atmósfera hiperoxidante presentaron un mayor valor de TS_{50} (46.34 h) que la registrada por los provenientes de atmósfera normal (33.7 h). En contraste, también a 40°C, *B. bassiana* 882.5 tuvo un valor de TS_{50} casi cuatro veces mayor en el tratamiento de atmósfera normal (8.45 h) que el encontrado en atmósfera hiperoxidante (2.19 h). Resulta oportuno recordar que ambos hongos también presentaron respuestas distintas en la producción de conidios en los dos tratamientos de concentración de oxígeno (secciones 7.5.1. y 7.5.4.).

En el caso de los dos aislados de *I. fumosorosea* la prueba mostró su baja tolerancia a las altas temperaturas. Desde 40°C el parámetro cinético TS_{50} de estos aislados obtenido del tratamiento atmósfera normal fue menor comparado con los valores de *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5. Sin embargo, cabe resaltar que en el caso de *I. fumosorosea* CNRCB1 el valor de TS_{50} obtenido en atmósfera hiperoxidante fue casi tres veces mayor al mismo parámetro registrado en atmósfera normal.

A 45°C, los valores de TS_{50} en *M. anisopliae* CP-OAX fueron muy parecidos con conidios obtenidos de atmósfera normal (0.75 h) y los provenientes del tratamiento de atmósfera con 26% de oxígeno (0.85 h). Para *B. bassiana* 882.5 sí se evidenció una diferencia en este parámetro ya que, mientras que en el tratamiento con atmósfera normal el valor de TS_{50} resultó de 0.61 horas, este mismo parámetro en atmósfera hiperoxidante tuvo un valor de 0.32 horas, lo que significa casi el 50% de disminución en la viabilidad de los conidios en este último tratamiento.

Los resultados obtenidos a partir de esta prueba, dan pauta para un estudio más profundo acerca de la naturaleza diversa de los hongos estudiados; incluyendo los dos aislados de *Isaria fumosorosea* que mostraron respuestas distintas entre sí. De acuerdo al estudio de Rangel y col. (2005), el 65% de los aislados de *M. anisopliae* que mostraron tolerancia a la temperatura, tuvieron igualmente tolerancia a radiaciones UV. En otro estudio hecho por Bidochka y col. (2001) se establece que, aproximadamente el 90% de los aislados de *M. anisopliae* resistentes al calor fueron igualmente resistentes a radiaciones UV. Por ello, en el ya citado estudio de Rangel y col. (2005), los autores establecieron que los aislados provenientes de regiones cercanas al ecuador terrestre presentaron mayor resistencia al calor y a la radiación UV-B comparados con los provenientes de latitudes septentrionales. Debido a lo anterior, la región geográfica donde son aislados los hongos entomopatógenos

puede, de manera tentativa, ofrecer características a esperar en los aislados en cuanto a su termotolerancia y resistencia a la radiación UV factores que, como ya ha sido establecido, inciden en el éxito de éstos como agentes de control biológico.

8. Resumen de resultados.

Fue posible la obtención de tres cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX; mientras que de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 se obtuvieron 5 cultivos monospóricos. Aunque en la presente investigación solamente se estudió uno de cada aislado, se consideró importante conservar los demás cultivos monospóricos obtenidos para futuras investigaciones.

Se logró confirmar la identidad de los aislados de *Isaria fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302) con un 99% de identidad máxima. Además, se ingresaron las secuencias encontradas en cada uno de éstos en la base de datos del GenBank para tener una referencia en posteriores investigaciones que involucren a los mismos. Debido a las diferencias encontradas en ambos aislados en la presente investigación, tanto en la producción de conidios en los tres medios de cultivo, como en la producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno, resultó importante la confirmación de la identidad de ambos microorganismos y, a partir de lo anterior, poder teorizar acerca de las diferencias que pueden darse entre aislados de una misma especie.

El método de conservación elegido en esta investigación (viales con agua desionizada estéril almacenados a una temperatura de 4°C) fue adecuado para tres de los cuatro hongos entomopatógenos (*M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* 882.5), lo cual se sustenta en el mantenimiento de la viabilidad de los mismos a los 6 (*M. anisopliae* y *B. bassiana*) y 2 meses (*I. fumosorosea* CNRCB1). Para *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 no se encontró que éste fuese un método adecuado para su conservación ya que el crecimiento de este hongo, a partir de los trozos de agar conservados, fue deficiente a partir de los cuatro meses de conservación. Lo anterior, aunque no es un parámetro numérico, se evidenció por cambios en su morfología y capacidad de crecimiento.

Por primera vez fue evaluado el medio de cultivo con harina de arroz. Aunque la producción de conidios en este medio no fue la que se esperaba por ser el arroz un sustrato muy usado para este fin. El medio harina de avena fue el que sobresalió para la producción de conidios por tres de los cuatro hongos estudiados, con excepción de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (PDA). Tomando en cuenta el promedio de producción de conidios de cada uno de los

hongos en medio harina de avena, comparado con el segundo mejor medio para este fin (PDA) para *I. fumosorosea* CNRCB1 la diferencia fue 3 veces mayor; para *B. bassiana* 885.2 la diferencia fue mayor en 3.2 veces; mientras que para *M. anisopliae* CP-OAX fue de casi el doble.

El tratamiento de atmósfera con 26% de oxígeno para la producción de conidios evidenció distintos comportamientos a ésta por los cuatro hongos entomopatógenos estudiados. Para *M. anisopliae* CP-OAX la producción de conidios aumentó en esta condición hasta alcanzar un 75% más que lo producido en atmósfera normal a las 204 horas. En contraste, para *B. bassiana* la producción de conidios en la condición hiperoxidante tuvo un máximo de sólo 7.91×10^6 con/cm² (156 horas) y, más aún, no se encontró producción de conidios en el tratamiento de atmósfera con 26% de oxígeno desde tiempo cero. En el caso de los dos aislados de *I. fumosorosea*, el aislado CNRCB1 disminuyó la producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno comparado con lo obtenido en atmósfera normal (hasta 3.4 veces menos a las 204 horas). Por el contrario, el aislado ARSEF 3302 produjo más conidios en la condición hiperoxidante comparado con lo producido en la atmósfera normal (5 veces más a las 180 horas). Fue de interés, para futuros estudios, encontrar las diferencias citadas tanto en aislados de diferentes especies (*M. anisopliae* y *B. bassiana*) como en aislados de la misma especie (*I. fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF 3302).

El porcentaje de viabilidad de los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O₂ fue mayor que los producidos en atmósfera normal en *I. fumosorosea* CNRCB1, *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y *M. anisopliae* CP-OAX. En el caso de *B. bassiana* 882.5 no se encontró diferencia en la viabilidad de los conidios producidos en ambos tratamientos.

En la prueba de bioensayo para *M. anisopliae* CP-OAX se encontró que los parámetros de virulencia, obtenidos a partir de los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O₂, fueron similares a los obtenidos a partir de los conidios provenientes de atmósfera normal. En el caso de *B. bassiana* 882.5, debido a la escasa producción de conidios en el tratamiento con 26% de oxígeno (promedio máximo de 7.91×10^6 con/cm²), no fue posible realizar esta prueba ya que la metodología establece una concentración de 1×10^8 con/ml. En el caso de los aislados de *Isaria fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302) el insecto

Tenebrio molitor no resultó un hospedero adecuado para realizar esta prueba. Sin embargo, se comparó otra variable de importancia en campo como es la termotolerancia y viabilidad.

A partir de los resultados obtenidos en la prueba de termotolerancia, se confirmó la resistencia característica de la especie *M. anisopliae* a temperaturas de 40°C o mayores (Hallsworth y Magan, 1999; Rangel y col. 2005). El aislado CP-OAX alcanzó, en ambos tratamientos, los máximos valores en el parámetro cinético TS_{50} de los cuatro hongos estudiados a 40°C. En este hongo, el TS_{50} obtenido en atmósfera hiperoxidante resultó mayor que el registrado en atmósfera normal (más del 30%). A 40°C, salvo *B. bassiana* 882.5, los valores TS_{50} de los conidios producidos en atmósfera con 26% de oxígeno fueron mayores que los obtenidos en atmósfera normal. Esta particularidad en *B. bassiana*, además de la no producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno desde tiempo cero, permiten establecer otras perspectivas para el estudio de este aislado. Es decir, encontrar respuestas a su alta sensibilidad ante una atmósfera hiperoxidante.

A temperatura de 45°C, los valores de TS_{50} de *M. anisopliae* en ambos tratamientos fueron muy parecidos (0.75 h atmósfera normal y 0.85 h atmósfera 26% O_2). Para *B. bassiana* se repitió lo visto a 40°C, el valor de TS_{50} en atmósfera normal fue mayor (8.45 h) al obtenido en atmósfera con 26% de oxígeno (2.19 h).

9. Conclusiones

- El método de conservación a partir de viales con agua desionizada resultó adecuado para *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* 882.5. Se sugiere otro método de conservación para *I. fumosorosea* ARSEF 3302.

La mayor producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* se dio con el medio harina de avena. Mientras que la mayor producción de conidios por *I. fumosorosea* ARSEF 3302 se observó en medio PDA.

- La respuesta ante estados hiperoxidantes (atmósfera con 26% de O₂) por los hongos estudiados fue diversa. Mientras que para *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y *M. anisopliae* CP-OAX se favoreció la producción de conidios. En el caso de *I. fumosorosea* CNRCB1, disminuyó la producción de conidios en esta condición respecto a la atmósfera normal. El caso extremo se dio con *B. bassiana* 882.5 cuya limitada tolerancia al estado oxidante inhibe la producción de conidios.

- La viabilidad de los conidios cosechados en atmósfera con 26% de O₂ fue mayor respecto a los provenientes de atmósfera normal en el caso de ambos aislados de *I. fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302) y *M. anisopliae* CP-OAX. Para *B. bassiana* 882.5 no hubo diferencias entre los conidios obtenidos de ambos tratamientos. Este es otro resultado que mostró la respuesta diferencial entre los hongos estudiados.

- La prueba de bioensayo sólo pudo realizarse para *M. anisopliae* CP-OAX debido a que *B. bassiana* 882.5 presentó una baja producción de conidios en atmósfera con 26% de oxígeno y, en el caso de los dos aislados de *I. fumosorosea*, el insecto *Tenebrio molitor* no fue un hospedero adecuado para éstos.

- La prueba de termotolerancia evidenció diferencias importantes entre los hongos estudiados. Para *M. anisopliae* CP-OAX y los dos aislados de *I. fumosorosea*, los conidios obtenidos en atmósfera hiperoxidante resultaron tener mayor capacidad para resistir temperaturas de 40°C; para *B. bassiana* 882.5 los conidios provenientes de atmósfera con 26% de O₂ resultaron menos resistentes a temperatura de 40°C. Ambos aislados de *I. fumosorosea* no presentaron viabilidad a una temperatura de 45°.

10. Recomendaciones

- Un estudio a nivel genético o proteómico de estos hongos, permitirá dilucidar las principales diferencias a nivel molecular de los mismos y la comprensión aún más profunda de ellos. A partir de lo anterior, se podrían seleccionar aislados para inducir características deseables en su uso como agentes de control biológico, con base en perfiles genéticos o proteómicos.
- Es necesario confirmar con otras pruebas (germinación, analizador de imágenes, etc.), la mayor viabilidad encontrada en los conidios de ambos aislados de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* provenientes de atmósfera con 26% de O₂ respecto a los obtenidos en atmósfera normal. Es un resultado que podría evidenciar que puede aumentarse la viabilidad de los conidios de estos hongos al exponerlos a este tipo de atmósfera.
- También es recomendable elaborar cinéticas de termotolerancia a temperaturas menores, con el fin de evidenciar y cuantificar las diferencias en la viabilidad de los conidios provenientes de atmósfera normal y atmósfera con 26% de oxígeno que se encontraron en esta investigación. Esto podría confirmar que los hongos creciendo en este tipo de atmósfera producirían conidios más termoresistentes.
- Además se sugiere la selección de un hospedero adecuado para los aislados de *Isaria fumosorosea*, CNRCB1 y ARSEF 3302, que permita comparar la virulencia de los conidios producidos por estos hongos entomopatógenos en las atmósferas mencionadas.
- Otra contribución se puede basar en la prueba de resistencia a la radiación UV-B, que se integre a las pruebas de calidad para establecer la posible diferencia entre los conidios de los hongos entomopatógenos producidos en las dos atmósferas estudiadas y estudiar posibles correlaciones con los resultados encontrados en esta investigación.

11. Bibliografía

Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 13: 111-118.

Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos. En: Teoría y Aplicación del Control Biológico. L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 9. 127-143.

Benz, G. 1987. Environment. In: Fuxa, J.R., Tanada, Y. (Eds.), *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, New York, pp. 177–214.

Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, M.T., Dekoning, J., De Cross, J.N.A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species?. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1335–1342.

Braga, G.U.L., Destéfano, R.H.R., Messias, C.L. 1999. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *J. Invertebr. Pathol.* 74:112-119.

Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2001. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *J. Invertebr. Pathol.* 78:98–108.

Butt, T.M., Jackson, C. Magan, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI International, Wallingford

Candas, M., Bulla, L.A. 2003. Microbial Insecticides. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © 2002 by John Wiley & Sons.

Carruthers, R., Hural, K. 1990. Fungi as natural occurring entomopathogens. En Baker RR, Dunn PE (Eds.) *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Liss. Nueva York, EEUU. pp. 115-138.

Charnley A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In *The Mycota IV, Environmental and microbial relationships*. (Wicklow D and Soderstrom M., eds), pp 185-201, Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania.

Cochrane, V. 1958. The action of physical agents. In: Cochrane, V. (Ed.), *Physiology of Fungi*. John Wiley, New York, pp. 423–439.

Cooney, D.G., Emerson, R., 1964. *Thermophilic Fungi. An Account of Their Biology, Activities and Classification*. W.H. Freeman, SanFrancisco, London 188 pp.

Crisan, E.V., 1973. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia* 65:1171–1198.

Dalla Santa, H.S., Sousa, N.J., Brand, D., Dalla Santa, O.R., Pandey, A., Sobotka, M., Páca, J., Soccol, C.R. 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. by solid state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiol.* 49:418-422.

Eilenberg, J., Hajak, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387-400.

Eken, C., Tozlu, G., Dane, E., Coruh, S., Demirci, E. 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycete) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia* 162: 69-71.

Estrada-Valencia MN., Vélez-Arango PE, Montoya-Restrepo EC. 1997. Caracterización de cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*, 48(4):217-224.

Estrada-Valencia MN., Vélez-Arango PE, Montoya-Restrepo EC, Bustillo-Pardey AE. 1999. Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monospóricos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*, 48(4):217-224.

Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Rougier, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89:383–392.

F.A.O. 2002. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Dumas, C., Robert, P., Pais, M., Vey, A., and Quiot, J.-M. (1994). Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. *Comp. Biochem. Physiol.* 108C, 195–203.

Garza-López, M., Konisberg, M., Saucedo, G., Loera, O. 2008. Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como respuesta a la composición atmosférica. Congreso de control biológico Zacatecas 2008.

Glare, T. R., 2004. Biotechnological Potential of entomopathogenic Fungi. En: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. D. K. Arora. Marcel Dekker Inc. New York, USA. Capítulo 7. 79-90.

Greathead, D., Waage, J. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.

Grimm, C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection*. 20:623-630.

Hall RA. 1980. Effect of repeated subculturing on pathogenicity morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.* 36:216-222.

Hallsworth, J.E., Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* 74:261-266.

- Hernández-Torres, I., A. Berlanga, J.I. López, J. Loera, y E. Acosta. 2007. Evaluación de hongos entomopatógenos para el control del pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), en México. INIFAP. CIRNE. Campo Experimental General Terán. General Terán, Nuevo León, México. Folleto Científico No. 01. 20 p.
- Hoffmann, M., Frodsham, A. 1993. Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 pp.
- Inglis, P.W., Tigano, M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. Genet. Mol. Biol. 23: 132-136.
- Kamp, A.M., Bidochka, M.J. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Lett. Appl. Microbiol. 35:74-77.
- Lacey, L. and M.S. Goettel. 1995. Current developments in microbial control of insects pests and prospects for the Early 21st Century. Entomophaga 40: 3.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B.P., 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). J. Invertebr. Pathol. 82: 139–147.
- Lledías, F., Rangel, P., Hansberg, W. 1999. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. Free Radic. Biol. Med. 26:1396-1404.
- López-Lastra, C.C., Hajek, A.E., Humber, R.A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Can. J. Bot. 80:1126-1130
- Magan, N. 1997. Fungi in extreme environments. In “The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships” (D.T. Wicklow and B. Soderstrom, Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Marchant, R. 1984. The ultrastructure and physiology of sporulation in *Fusarium*. In *The Applied Mycology of Fusarium*. British Mycological Society Symposium Series (7), pp. 15–37. Queen Mary College, London: Cambridge University Press.
- Montesinos-Matías, R. 2008. Relación entre Variables de Crecimiento y Virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.
- Montoya-Sansón E, Zavala-Ramírez M, Mier T, Hernández-Velázquez V, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2007. Virulencia de diversos aislados de *Metarhizium anisopliae* en el modelo experimental de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposium del IOBC, Mérida, Yucatán
- Morton, A.G. 1961. The induction of sporulation in mould fungi. Proceedings of the Royal Society 153, 548–569.
- Neves, P. J., Alves, S. B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). Brazilian Archives of Biology and Technology. 43: 373-378.

- Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L. 2001. Growth and sporulation of *Metarhizium flooviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. *Sci. agric.* 58:613-616.
- Pace N.I., Olsen G.I, and Woese C.R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45:325-326.
- Pupin, A.M., Messias, C.L., Piedrabuena, A.E., Roberts, D.W., 2000. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. *Braz. J. Microbiol.* 31:121–128.
- Rangel D.E., Braga G.U., Anderson A.J., Roberts D.W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae*, isolates from different geographic origins. *J. Invertebr. Pathol.* 88:116-125.
- Rangel, D.E., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J. Invertebr. Pathol.* 93:127-134.
- Rodríguez del Bosque, L., Arredondo, H. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México.
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., Viniegra-Gonzalez, G. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 3:513-518.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Reza, G., Bandani, A.R., Butt, T.M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:116-123.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S, Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1985. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning. a laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , New York .
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 116 pp.
- Sánchez-Murillo, R.I., de la Torre-Martínez, M., Aguirre-Linares, J., and Herrera-Estrella, A. 2004. Light-Regulated Asexual Reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology* 150:311-319.
- Schmid-Hempel, P.2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50:529-551.
- Shah, F.A., Wang, C.S., Butt, T.M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251:259-266.

Shaukat, A., Zheng, H., Shunxiang, R. 2009. Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. Nether. Entomol. Soc. 131:30-38.

St. Leger, R.J. 1993. Biology and Mechanisms of Insect-Cuticle Invasion by Deuteromycete Fungal Pathogens, pp. 211-229. *In: Parasites and Pathogens of Insects. Vol.2:Pathogens.* Academic Pres, Inc.

Stehr, F. W. 1975. Parasitoids and predators in pest management, pp. 147-188. *In: R.L. Metcalf & W.H. Luckmann (eds.), Introduction to pest management.* John Wiley & Sons, N.Y.

Summy, K. R. and J. V. French. 1988. Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* 41:119-133.

Tanada, Y., Kaya, H. 1993. *Insect Pathology.* London: Academic Press, Inc.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera, O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 5:387-394.

Thevelein, J.M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48:42–59.

Thomas, M.B., Jenkins, N.E., 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Mycol. Res.* 101, 1469–1474.

Thomas, M.B., Read, A.F. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Microbiology Reviews* 5: 377-383.

Van den Bosh, R., P. S. Messenger., Gutierrez, A. P. 1982. *An introduction to biological control.* Plenum Press, N.Y. 247 p.

Varela, A., Morales, E., 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 67:147–152.

Vega, F.E., Jackson, M.A., Mercadier, G., Poprawski, T.J. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:363-368.

Zhang, Y.J., Li, Z.H., Luo, Z.B., Zhang, J.Q., Fan, Y.H., Pei, Y. 2009. Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Bio. Sci. and Tech.* 19:91-101.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/28/figure/F1?highres=y>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

12. Anexos

12.1 Secuencias obtenidas de los aislados de *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1

Una vez purificada la banda obtenida del producto de amplificación a partir de los cebadores ITS1 e ITS4 se continuó con la secuenciación de esta región del ADN. Las secuencias obtenidas se muestran en las figuras 12.1 y 12.2.

```
CGATGGATCAT TACGAGTTTTTTCACTCCCTAACCCCTTGTGAACATAACC  
TATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCGGCGTCCGGACGGCCCTGCGCCGC  
CCGCGACCCGGACCCAGGCGGCCGCCGGAGACCCACAAATCTGTTCCTA  
TCAGTCTTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACTTTC  
AACAAACGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTT  
CAACCCCTCGACACCCCTTCGGGGGAGTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCATA  
CCGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCACCTCTGCGTA  
GTACTCCAACGCGCACCGGGAACCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACACC  
AACTTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA  
GCATATCATTAAGCGGAGGA
```

Figura 12.1. *I. fumosorosea* ARSEF 3302. Secuencia de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S obtenida a partir del amplicón de 500pb encontrado con el uso de los cebadores ITS1 e ITS2.

```
ACAATGGATCAT TACGAGTTTTTTCACTCCCTAACCCCTTGTGAACATAC  
CTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCGGCGTCCGGACGGCCCTGCGCCG  
CCGCGACCCGGACCCAGGCGGCCGCCGGAGACCCACAAATCTGTTCCTA  
ATCAGTCTTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACTTTC  
CAACAAACGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT  
TCAACCCTCGACACCCCTTCGGGGGAGTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCAT  
ACCGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCACCTCTGCGT  
AGTACTCCAACGCGCACCGGGAACCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACACC  
CAACTTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA  
AGCATATCATTAAGCGGAGGAA
```

Figura 12.2. *I. fumosorosea* CNRCB1. Secuencia de la región ribosomal 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S obtenida a partir del amplicón de 500pb encontrado con el uso de los cebadores ITS1 e ITS2.

12.2. Información disponible en GenBank (NCBI) de los aislados de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 (número de acceso HM209049) y ARSEF 3302 (número de acceso HM209050).

```

LOCUS      HM209049          572 bp    DNA        linear    PLN 27-JUN-2010
DEFINITION Isaria fumosorosea strain CNRCB1 18S ribosomal RNA gene, partial
           sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
           and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S
           ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  HM209049
VERSION   HM209049.1  GI:299013889
KEYWORDS   .
SOURCE     Isaria fumosorosea
  ORGANISM Isaria fumosorosea
           Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta;
           Pezizomycotina; Leotiomyceta; Sordariomyceta; Sordariomycetes;
           Hypocreomycetidae; Hypocreales; Cordycipitaceae; mitosporic
           Cordycipitaceae; Isaria.
REFERENCE  1 (bases 1 to 572)
  AUTHORS  Miranda,J.F. and Loera,O.
  TITLE    Production of conidia by Isaria fumosorosea under oxidant states
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 572)
  AUTHORS  Miranda,J.F. and Loera,O.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (07-MAY-2010) Biotechnology, Universidad Autonoma
           Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Mexico City, DF
           09340, Mexico
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..572
            /organism="Isaria fumosorosea"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="CNRCB1"
            /db_xref="taxon:114497"
            /country="Mexico"
   rRNA    <1..14
            /product="18S ribosomal RNA"
   misc RNA 15..191
            /product="internal transcribed spacer 1"
   rRNA    192..351
            /product="5.8S ribosomal RNA"

```


LOCUS HM209050 570 bp DNA linear PLN 27-JUN-2010
 DEFINITION *Isaria fumosorosea* culture-collection ARSEF:3302 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION HM209050
 VERSION HM209050.1 GI:299013890
 KEYWORDS .
 SOURCE *Isaria fumosorosea*
 ORGANISM [Isaria fumosorosea](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta; Pezizomycotina; Leotiomyceta; Sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Cordycipitaceae; mitosporic Cordycipitaceae; *Isaria*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 570)
 AUTHORS Miranda,J.F. and Loera,O.
 TITLE Production of conidia by *Isaria fumosorosea* under oxidant states
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 570)
 AUTHORS Miranda,J.F. and Loera,O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-MAY-2010) Biotechnology, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Mexico City, DF 09340, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..570
 /organism="*Isaria fumosorosea*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /culture_collection="ARSEF:3302"
 /db_xref="taxon:[114497](#)"
[rRNA](#) <1..13
 /product="18S ribosomal RNA"
[misc RNA](#) 14..190
 /product="internal transcribed spacer 1"
[rRNA](#) 191..350
 /product="5.8S ribosomal RNA"
[misc RNA](#) 351..511

12.3 Gráficas bioensayo *Metarhizium anisopliae* CP-OAX

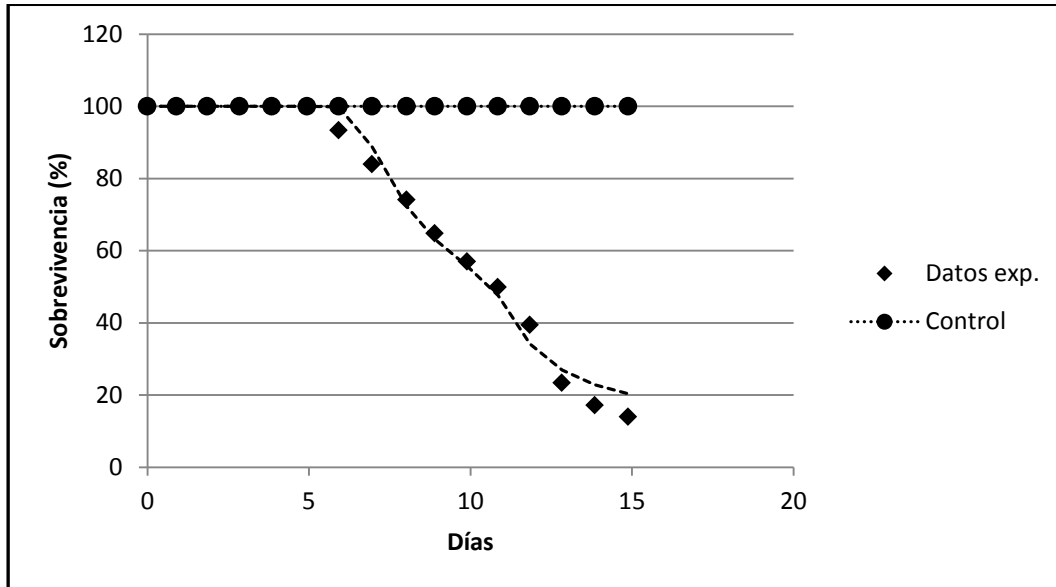


Figura 12.3 Cinética de mortalidad para larvas de *Tenebrio molitor* a partir de bioensayo con *M. anisopliae* CP-OAX en atmósfera normal. Se incluyen los datos experimentales, los datos ajustados al modelo (---) y el control. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9400.

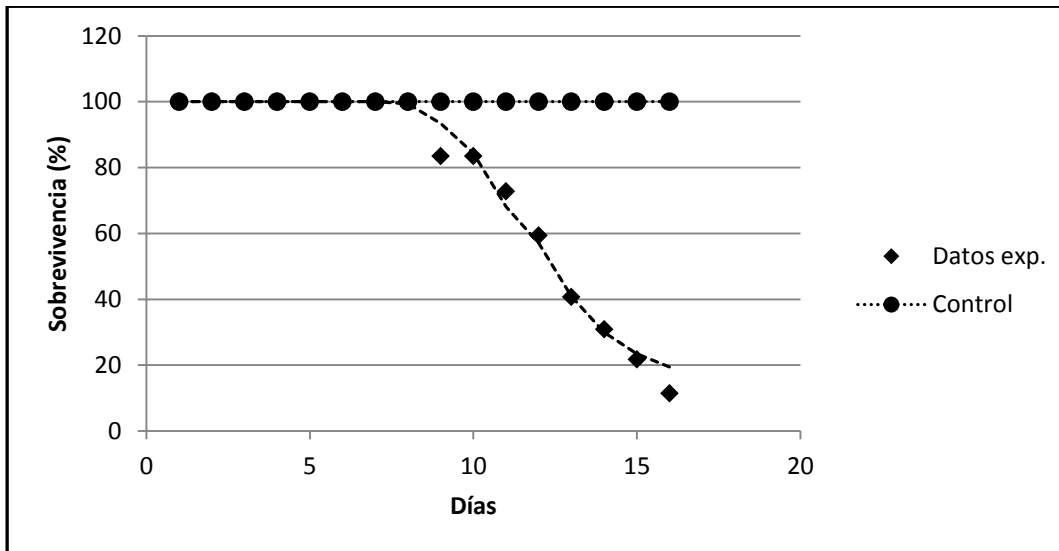


Figura 12.4. Cinética de mortalidad para larvas de *Tenebrio molitor* a partir de bioensayo con *M. anisopliae* CP-OAX en atmósfera con 26% de O₂. Se incluyen los datos experimentales, los datos ajustados al modelo (---) y el control negativo. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9727.