

**Universidad Autónoma Metropolitana**



Casa abierta al tiempo

**Unidad Iztapalapa  
CBS**

**“Relación entre variables de crecimiento y virulencia en  
aislados de *Beauveria bassiana*”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

IBI. Roberto Montesinos Matías

Director

Dr. Octavio Loera Corral

México D. F. 17 de Enero 2008

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Postgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con No. de Registro 0471-O.

Iztapalapa, D. F. a de 17 enero de 2008

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

**Relación entre variables de crecimiento y virulencia en  
aislados de *Beauveria bassiana***

que presentó

**IBI. Roberto Montesinos Matías**

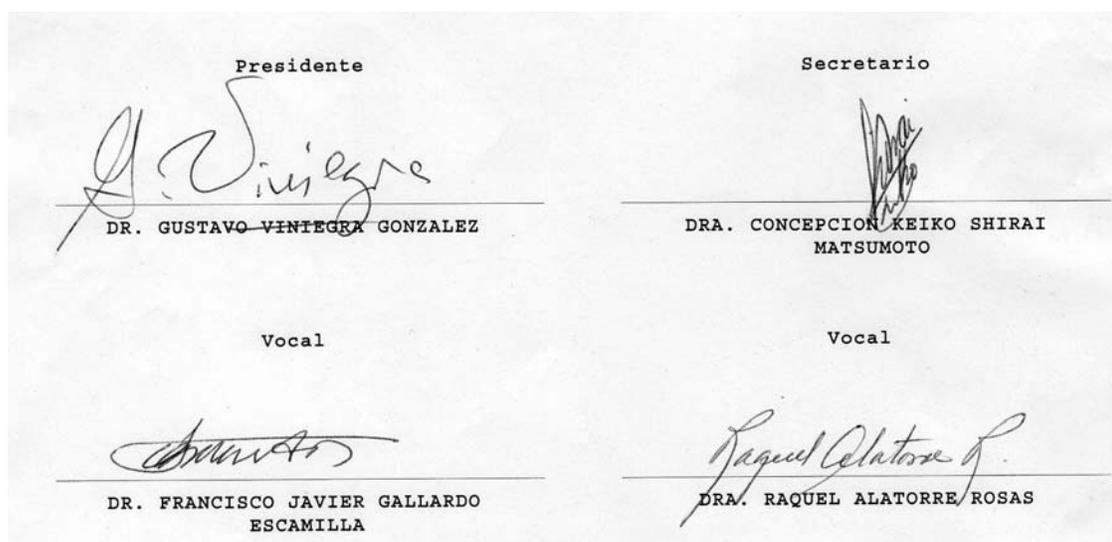
**Comité Tutorial:**

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

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

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González **Universidad Autónoma Metropolitana**

**Jurado:**



## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A la Universidad Autónoma Metropolitana. Al CONACYT por la beca otorgada (No. de Registro: 202363).

Al Dr. Octavio Loera Corral por su buena disposición para dirigir esta tesis, quien me dio la libertad y el estímulo para realizar el presente trabajo, con el cual expreso mi gratitud.

A mis asesores, Dra. Raquel Alatorre Rosas y el Dr. Gustavo Viniegra González por sus valiosas aportaciones, consejos, sugerencias y correcciones. Igualmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto y el Dr. Francisco Gallardo Escamilla por sus aportaciones, correcciones y recomendaciones.

Al Dr. Ernesto Favela le agradezco infinitamente el estímulo, consejos y sugerencias para realizar la Tesis, y también al final de la etapa de la licenciatura para iniciar esta travesía durante la realización de mi Servicio Social en el PP4.

A mis compañeros del W-104. A Tere, Armando, Eric, Misael, Saul y Divanery por su amistad y apoyo en la realización del presente trabajo.

A mi mamá, Candelaria Matías Santiago, por darme la vida, por enseñarme a creer en mí, por su amor y compromiso en este viaje. A mis hermanos, a todos ellos.

A mi familia, especialmente Ana por estar a su lado y su apoyo incondicional. A mi hijo Dante Daniel por alumbrar mi vida con su llegada y ser parte de mí.

Este trabajo es dedicado a la **Sra. Maria Guadalupe Martínez Peredo** †.

A todos, muchas gracias.

*“Al final conservaremos lo que amemos, amaremos lo que conozcamos y conoceremos lo que nos es enseñado”*

Baba Dioum

## Resumen

El control microbiano se considera como método básico en las estrategias del Manejo Integrado de Plagas para el control de las plagas agrícolas. Los hongos entomopatógenos (HE) como *Beauveria bassiana* invaden al insecto de manera directa a través del tegumento, eliminando la necesidad de que los conidios deban ser ingeridos. Los criterios para seleccionar un microorganismo entomopatógeno y desarrollarlo para el control microbiano son muy complejos, pero en general se deben tomar en cuenta las características del insecto, del ecosistema, y del microorganismo entomopatógeno. A causa de la gran diferencia en la especificidad y virulencia hacia el hospedero entre aislados, la identificación de características que puedan tener una función importante en el ataque del insecto resulta valioso para entender la virulencia en la selección y desarrollo de HE como agentes biocontrol.

El objetivo de este estudio fue evaluar algunas variables de crecimiento como viabilidad (**V**), velocidad de crecimiento radial (**V<sub>r</sub>**) y densidad superficial de conidios en caja Petri (**ρ**) y determinar su correlación con el grado de virulencia (**TL<sub>50</sub>** y porcentaje de mortalidad máxima [**M**]) para cada aislado evaluado. Además, se evaluó la hidrofobicidad de los conidios (**Hf**) empleados en el bioensayo para determinar si esta característica está relacionada con el grado de virulencia de los aislados. La producción de conidios por larvas muertas (**Φ**) se midió al final del bioensayo.

Se demostró que la **V** de los conidios, variable de crecimiento que se midió previo al bioensayo, fue el de mayor correlación positiva ( $r = 0.588$ ) con la virulencia, las demás variables de crecimiento **Φ** ( $0.425$ ), **ρ** ( $r = 0.236$ ) y **V<sub>r</sub>** ( $r = 0.221$ ) mostraron una menor correlación. En cuanto a la **Hf** no se encontró una correlación positiva con la mayor virulencia, para ambos parámetros **M** ( $r = -0.355$ ) y **TL<sub>50</sub>** ( $-0.492$ ). La afirmación previa fue corroborada mediante un Análisis de Componentes Principales y coeficientes de regresión simple que se utilizó para indagar correlaciones entre variables de estudio.

## INDICE GENERAL

Resumen.....	1
Índice de Tablas.....	4
Índice de Figuras.....	5
Lista de abreviaciones.....	7
1. Introducción.....	8
1.1 Mecanismos de infección y factores de virulencia.....	11
1.2 Patogenicidad y virulencia.....	17
1.3 Bioensayos.....	18
1.4 Conservación de virulencia.....	18
2. Antecedentes.....	21
3. Justificación.....	24
Hipótesis de trabajo.....	26
4. Objetivo general.....	26
4.1 Objetivos específicos.....	26
5. Materiales y Métodos.....	27
5.1.1 Reactivación de aislados sobre larvas de <i>T. molitor</i> .....	28
5.1.2 Métodos de conservación.....	28
5.2 Evaluación de la viabilidad.....	29
5.2.1 Medición de velocidad radial.....	29
5.2.2 Producción de conidios <i>in vitro</i> .....	30
5.2.3 Bioensayo.....	30
5.2.3.1 Cría de Insectos.....	30
5.2.3.2 Bioensayo.....	31
5.3 Producción de conidios sobre cadáveres de <i>Tenebrio molitor</i> .....	33
5.4 Hidrofobicidad.....	33
5.5 Análisis de datos.....	34
5.5.1 Análisis estadístico.....	34
5.5.2 Análisis de Componentes Principales (ACP).....	34

6. Resultados y Discusiones .....	37
6.1 Viabilidad del hongo conservado en agua desionizada .....	37
6.1.2 Reaislamiento y caracterización de aislados .....	40
6.1.3 Reactivación de aislados y obtención de cultivos monospóricos .....	41
6.1.4 Crecimiento radial y producción de conidios <i>in vitro</i> .....	44
6.2 Hidrofobicidad de conidios .....	47
6.3 Biensayo .....	49
6.3.1 Evaluación de la viabilidad de conidios .....	49
6.3.2 Prueba de virulencia .....	51
6.3.3 Producción de conidios en larvas muertas .....	54
6.4 Análisis de correlación de variables mediante Análisis de Componentes Principales .....	59
7. Resumen de resultados .....	63
8. Conclusión .....	65
9. Recomendaciones .....	66
10. Bibliografía .....	67
11. Anexo .....	77

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación actual de los géneros de hongos entomopatógenos .....	10
Tabla 2. Composición (%) en peso seco de cutícula de diferentes insectos.....	14
Tabla 3. Origen de aislados silvestres. ....	27
Tabla 4. Crecimiento radial y producción de conidios de aislados de <i>B. bassiana</i> . ....	44
Tabla 5. Tiempo letal 50 (d) y Mortalidad Máxima de aislados de <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	51
Tabla 6. Resumen de variables de crecimiento y parámetros de virulencia e hidrofobicidad obtenidos de diferentes aislados de <i>B. bassiana</i> .....	58
Tabla 7. Matriz de correlación para cada combinación de par de variables.....	60
Tabla 8. Ecuaciones de regresión múltiple para las variables respuestas TL <sub>50</sub> y mortalidad máxima.....	61

## Índice de Figuras

Figura 1. Sitios potenciales para el ingreso de un patógeno en insectos (Boucias y Pendland, 1998).....	11
Figura 2. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (Hajek y St Leger, 1994). ...	12
Figura 3. Principales estadíos de desarrollo <i>Tenebrio molitor</i> .....	31
Figura 4. Representación gráfica de los tratamientos A, B, C, D y E respecto a la variable X en un diagrama de ACP. Los tratamientos B y D tienen valores superiores al valor promedio para esas variables X, A tiene un valor muy cercano al promedio, mientras que C y E tienen valores inferiores al promedio para la variable X.....	36
Figura 5. Por ciento de viabilidad de aislados conservados en agua desionizada a 4 °C.....	37
Figura 6. Por ciento de viabilidad de aislados conservados en agua desionizada a 4 °C, después de haber sido reactivadas. ....	38
Figura 7. Pigmentación del medio cultivo sólido (AMS 2% más EL [ 0.05%]) por <i>B. bassiana</i> . ....	40
Figura 8. Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectados por <i>B. bassiana</i> . ....	41
Figura 9. Distribución de aislados de <i>B. bassiana</i> sobre un plano formado por valores relativos de velocidad radial (Vr) y densidad de esporas ( $\rho$ )....	46
Figura 10. Hidrofobicidad de conidios <i>B. bassiana</i> de diez días de cultivo. ....	48
Figura 11. Por ciento de viabilidad de conidios de <i>B. bassiana</i> a las 20 h utilizadas en el bioensayo.....	49
Figura 12. Mortalidad acumulada de <i>Tenebrio molitor</i> por aislados de <i>B. bassiana</i> . ....	53
Figura 13. Producción de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i> . Barras con la mismas letras no presentaron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). ....	55

Figura 14. Distribución de aislados de <i>B. bassiana</i> sobre un plano formado por valores relativos de mortalidad máxima (%) y cantidad de conidios por larva muerta ( $\Phi$ ).....	56
Figura 15. Diagrama derivado del Análisis de Componentes Principales con los vectores de cada variable (medidos en <i>B. bassiana</i> ). a) CP1 vs. CP2, b) CP1 vs. CP3 (82.1% de varianza explicada acumulada de los tres primeros componentes). Donde, V = viabilidad, Hf = hidrofobicidad, $\rho$ = densidad superficial de conidios en cajas Petri, $\Phi$ = cantidad de conidios producidos por larva muerta, $TL_{50}$ = tiempo al que se alcanzó el 50% de mortalidad y M = por ciento de mortalidad máxima (%). .....	59
Figura 16. Diagrama derivado del análisis de componentes principales de las variables evaluadas así como la ubicación de cada aislados de <i>B. bassiana</i> en el plano. a) CP1 vs. CP2, b) CP1 vs. CP3 (82.1% de varianza explicada acumulada de CP1 a CP3). Donde, V = viabilidad, Hf = hidrofobicidad, $\rho$ = densidad superficial de conidios en cajas Petri, $\Phi$ = cantidad de conidios producidos por larva muerta, $TL_{50}$ = tiempo al que se alcanza el 50% de mortalidad y M = mortalidad máxima (%). .....	62
Figura 17. Matriz de gráfica de dispersión de aislados para cada par de variables. ....	77

## Lista de abreviaciones

2DG: 2-desoxi-D-glucosa

AMS: Agar Maltosa Sabouraud

Bb: *Beauveria bassiana*

Bb com: *Beauveria bassiana* aislado comercial

cm<sup>2</sup>: centímetro cuadrado

d: día

E.L.: Extracto de levadura

Fig.: figura

Φ: producción de conidios en larvas muertas

g: gramos

h: horas

Hf: hidrofobicidad de conidios

HE: Hongos Entomopatógenos

l: litros

μ: velocidad máxima de mortalidad

m: por ciento de mortalidad máxima

Ma-ac: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

Ma-an: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

MIP: Manejo integrado de plagas

ml: mililitros

nm: nanómetros

rpm: revoluciones por minuto

ρ: densidad superficial de producción de conidios en cajas Petri

s: segundos

TL<sub>50</sub>: Tiempo letal 50

UV: Luz Ultravioleta

V<sub>r</sub>: Velocidad de crecimiento radial

V: Viabilidad de conidios

## 1. Introducción

El control biológico de plagas de insectos es considerado como parte importante del manejo integrado de plagas (MIP), el cual es una estrategia ecológicamente más adecuada que el control químico convencional (Whipps y Lumsden, 2001). El MIP es una combinación armoniosa de las medidas disponibles de control de plagas, que minimiza el uso de insecticidas químicos, integra el uso de plantas resistentes, control cultural, control biológico y deja el uso de los plaguicidas como última alternativa (Matson, 1997; Bravo-Mojica, 2004).

El control microbiano se considera como método básico en las estrategias del MIP para el combate de las plagas agrícolas. Para ello se utilizan microorganismos entomopatógenos tales como virus, hongos, bacterias, nemátodos y protozoarios (Padilla y col., 2005; Candas y Bulla, 2003). Los hongos entomopatógenos (HE) presentan ventajas que los hacen únicos entre los microorganismos entomopatógenos que atacan insectos ya que, en lugar de basar su patogenicidad sólo en toxinas, como sucede con la bacteria *Bacillus thuringiensis*, invaden al insecto de manera directa a través del tegumento, eliminando la necesidad de que los conidios (unidades infectivas) tengan que ser ingeridos (Jeffs y col., 1999, Kershaw y Talbot, 1998; Ortiz-Meza y col., 2005). Esta facultad propia de los HE hace difícil la aparición de organismos hospederos resistentes (Samson y col., 1988; Alves, 1998).

Se ha estimado que más de 90 géneros y 750 especies de hongos, incluyendo subespecies, patotipos, cepas y aislados de hongos, pueden infectar a los insectos (Samson y col., 1988; Khachatourians, 1996). Sin embargo, solamente unos pocos han sido estudiados en forma intensiva (Butt y Goettel, 2000; Strasser y col., 2000b; Tamez Guerra y col., 2001). Las enfermedades causadas por hongos (micosis) en insectos son muy comunes y ampliamente distribuidas, y generalmente ocasionan una reducción alta en poblaciones de insectos en forma de epizootias notables.

Considerando el grado de virulencia, Fargues y Remaudiere (1977) clasifican a los HE en cuatro grupos: accidentales, ocasionales, facultativos y patógenos

obligados. Se describe a los facultativos y patógenos obligados considerando los requerimientos nutricionales del patógeno, velocidad de crecimiento, y otras interacciones con el hospedero. Dentro del grupo de patógenos facultativos se encuentran los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, entre otros. Las características de este grupo de entomopatógenos son: una virulencia débil, son patógenos oportunistas, producen un solo tipo de conidias, la producción masiva *in vitro* es sencilla, tienen un rango amplio de hospederos y presentan una fuerte relación entre dosis-mortalidad. Usualmente producen toxinas que juegan un papel importante en la muerte del hospedero, colonizan el hemocele (sangre del insecto) en forma de blastosporas o hifas filamentosas; los insectos enfermos a menudo son encontrados en el suelo y los conidios se dispersan en forma pasiva y con poca persistencia en campo (Butt y Goettel, 2000).

En el caso de patógenos obligados, como ejemplo, se tienen a los *Zygomycota: Entomophthorales*, este grupo tiene virulencia alta (requieren de pocos conidios para causar una infección rápida). Estos HE producen más de un tipo de unidades infectivas, los cuales son descargados con fuerza de los conidióforos, estos conidios están cubiertos de mucílago, y existe poca evidencia sobre la participación de toxinas en la muerte del hospedero. Estos HE colonizan el hemocele en forma de protoplastos o cuerpos hifales sin pared celular, su producción masiva es escasa y compleja (sólo *in vivo*; hospedero), tienen rango de hospedero estrecho (alta especificidad), los insectos infectados y enfermos se localizan usualmente sobre las partes aéreas de las plantas, y la virulencia está influenciada por factores ambientales, además, tienen gran potencial para ocasionar epizootias (Butt y Goettel, 2000).

Los hongos causantes de enfermedades en insectos se encuentran virtualmente en todos los grupos taxonómicos excepto la división *Basidiomycota*. La mayoría de los HE con potencial para el control de insectos están en la división *Zygomycota* y *Ascomycota* (Tabla 1). Los hongos ascomicetos inicialmente fueron divididos en dos grupos, los *Ascomycota* y los *Deuteromycota*, estos últimos se

conocen como Hongos Imperfectos, especies de la cual no se conoce su estado sexual.

**Tabla 1. Clasificación actual de los géneros de hongos entomopatógenos**

División	Clase	Orden	Familia	Género					
<i>Zygomycota</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Entomophthorales</i>	<i>Entomophthoraceae</i>	<i>Entomophaga</i>					
				<i>Entomophthora</i>					
				<i>Erinia</i>					
				<i>Eryniopsis</i>					
				<i>Furia</i>					
				<i>Massospora</i>					
				<i>Strongwellsea</i>					
				<i>Pandora</i>					
				<i>Tarichium</i>					
				<i>Soophthora</i>					
				<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Neozygitaceae</i>	<i>Neozygites</i>	
								<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Beauveria</i>
									<i>Cordyceps</i>
									<i>Cordycepioideus</i>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Lecanicillium</i>					
				<i>Metarhizium</i>					
				<i>Nomuraea</i>					

Fuente: Roy y col. (2006), The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2007).

Algunos estudios de cultivo y biología molecular han demostrado que estos Hongos Imperfectos, (formalmente clase *Hyphomycetes* en los *Deuteromycota*) son anamórficos (forma asexual) de los *Ascomycota* dentro del orden *Hypocreales*, familia *Clavicipitaceae* (Fukatzu y col., 1997; Hodge, 2003; Krasnoff y col., 1995; Shimazu y col., 1988). Además, dentro de la división *Zygomycota*, muchas especies de entomopatógenos están en el orden *Entomophthorales* (Roy y col., 2006).

## 1.1 Mecanismos de infección y factores de virulencia

El ciclo de los hongos entomopatógenos se divide en dos fases importantes; la fase infectiva, que abarca desde la invasión hasta la muerte del hospedero, y la fase reproductiva en la cual los HE salen directamente a través del exoesqueleto. La infección puede ocurrir entre las partes bucales, membranas inter-segmentales o a través de los espiráculos (Figura 1), sitios donde existe humedad alta que promueve la germinación de las esporas y permite la fácil penetración de las hifas (Alatorre Rosas, 2004).

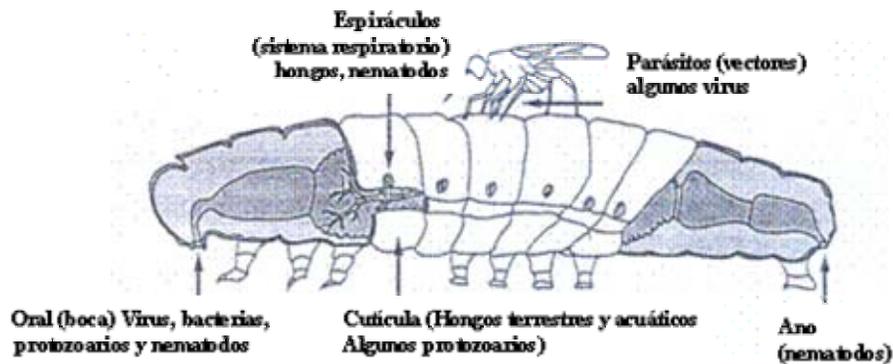
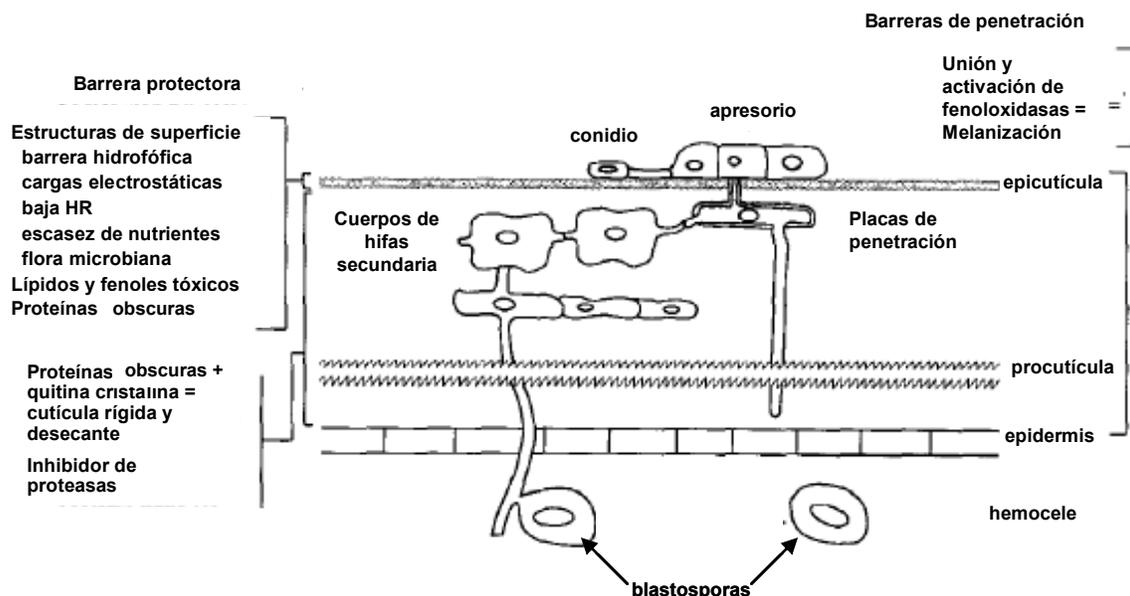


Figura 1. Sitios potenciales para el ingreso de un patógeno en insectos (Boucias y Pendland, 1998)

La unión de las conidias a la cutícula de los insectos es el evento inicial en el establecimiento de la micosis. Cuando se produce el contacto, las conidias se unen fuertemente a la epicutícula mediante interacciones hidrofóbicas no específicas que juegan un papel fundamental en la adhesión (Wösten, 2001). Además, la hidrofobicidad de las conidias es importante debido a que le confiere resistencia contra la deshidratación y facilita su dispersión en el aire (Boucias y col., 1988). La superficie exterior de la pared de las conidias y la epicutícula contienen los elementos determinantes para la unión (Figura 2).



**Figura 2. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos ( Modificado de Hajek y St Leger, 1994).**

En *B. bassiana* y *M. anisopliae*, la hidrofobicidad de las conidias es atribuida, en parte, a la presencia de proteínas tipo hidrofobinas (péptidos menores a 10 kDa) en su superficie (Boucias y Pendland, 1998; Jeffs y col., 1999). Las hidrofobinas propician las interacciones por ser proteínas poliméricas con naturaleza anfipática arreglada en forma de microfibrillas; estas proteínas se distinguen por los ocho residuos de cisteína y por sus puentes disulfuro, en el caso de *M. anisopliae*, se denomina SSGA (Kershaw y Talbot, 1998). También se ha sugerido que iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie de la cutícula para establecer junto con las hidrofobinas el acoplamiento entre la pared celular del hongo y la cutícula del insecto, promoviendo su adhesión para el establecimiento de la conidia y la subsiguiente invasión del hospedero (Pucheta y col., 2006).

Una vez que se da la unión de la conidia bajo condiciones específicas (humedad, temperatura y nutrición) inicia la germinación con la absorción de agua y nutrientes, favorecido por la alta humedad; esta germinación es disparada por

mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas de la cutícula del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). La hidratación de la espora también se favorece por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa (presente en *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Erinia radicans* y *Nomuraea rileyi*). En muchos casos, la secreción de mucílago se da entre la unión de la célula apresorial y la superficie de la cutícula. Este mucílago es higroscópico el cual crea condiciones favorables para la liberación de enzimas extracelulares por este tipo de estructuras. Además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto (Khachatourians, 1996; Pucheta y col., 2006).

Asimismo es importante mencionar que los lípidos que se encuentran en la cutícula pueden afectar potencialmente la germinación, como resultado de su acción fungilítica o fungiestática, o actuando como una barrera en la matriz de quitina del exoesqueleto del insecto, previniendo que la espora entre en contacto con los nutrientes y se inicie la señal de disparo de la germinación (James y col., 2003)

Después del hinchamiento de la conidia tiene lugar la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular. Los iones  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  entran en la punta de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía. Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio (Figura 2), una estructura especializada formada en el tubo germinativo (Riquelme y col., 1998; Harold, 1999; Wessels, 1999). El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Wessels, 1999). El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta de forma sinérgica una gran cantidad de enzimas extracelulares, principales determinantes de la virulencia, tales como proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras, que hidrolizan los componentes cuticulares y proporcionan a

su vez nutrientes al hongo (Khachatourians, 1991; Khachatourians, 1996; Monzón, 2001).

La importancia de cada enzima está relacionada con las características de la cutícula del insecto, respondiendo de manera diferenciada debido a la compleja mezcla de componentes de la cutícula de los insectos de distinta especie y de su estado fisiológico (Tabla 2) (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996).

**Tabla 2. Composición (%) en peso seco de cutícula de diferentes insectos**

Componente	Larva ( <i>Tenebrio molitor</i> )	Larvas ( <i>Zophobas morio</i> )	Gusano de cera ( <i>Galleria mellonella</i> )	Grillo ( <i>Acheta domestica</i> )	Langosta migratoria ( <i>Melanopus sanguinipes</i> )
Estadio/orden	Larva (Coleóptera: Tenebrionidae)	Larva (Coleóptera: Tenebrionidae)	Larva (Lepidóptera: Pyrilidae)	Adulto (Ortóptera: Grillidae)	Adulto (Ortóptera: Acrididae)
Proteína	50.25	46.04	39.45	40	61.4
Quitina					30.1
Grasa	36.75	36.67	51.55	30	7.4
Carbohidratos	9.75	14.13	6.50	9.85	
Cenizas	3.23	3.13	2.48	4.89	1.1

Fuente: Bidochka y col. (1993); Rangel y col. (2004); <http://www.timberlinefisheries.com>

Las enzimas de HE facultativos que hidrolizan la cutícula son principalmente proteasas del tipo subtilisina [Pr1 A y B], serina proteasas [Pr2], [Pr3], cisteína proteasas [Pr4], carbixipeptidasas [MeCPA], metaloendoproteasas y dipeptidilpeptidasa, entre otros (Hegedus y Khachatourians, 1995; St. Leger, 1995; St. Leger y col., 1996; Joshi y col., 1997; Clarkson y Charnley, 1996). La hidrólisis de quitina es mediada principalmente por una serie de exo-N-acetilglucosamidasa, quitobiosas y endoquitinasas (Hegedus y Khachatourians, 1995; Clarkson y Charnley, 1996). Las proteasa Pr1 y la quitinasa Bbchit1 son factores de virulencia muy importante en *B. bassiana* (Joshi y col., 1995; St Legar y col., 1996; Fang y col., 2005).

Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula conformada principalmente de

fibrillas laminadas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno.

Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999). Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear (Pucheta-Díaz y col., 2006). La importancia relativa de estos mecanismos varía con el aislamiento específico o con el insecto hospedero.

Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada (Gillespie y Claydon, 1989); que funcionan como unidades de dispersión e infectivas. Cada insecto infectado constituye un nuevo foco de infección para otros individuos de la población (Alatorre, 2004; Tefera y Pringle, 2003; Posada y Vega, 2005; Neves y Hirose, 2005)

Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger y Roberts, 1997). Sin embargo, los HE han desarrollado mecanismos variados de acción para evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmuno-modulatorias o toxinas que inhiben las reacciones de defensa del insecto (Khachatourians, 1991; Boucias y Pendland, 1998).

Las toxinas, metabolitos de bajo peso molecular producidos por el hongo, son de baja toxicidad para mamíferos pero muy dañinas para artrópodos, por lo que pueden causar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas (Monzón, 2001). *Beauveria bassiana* puede matar a sus hospederos, antes de invadir todos sus órganos, mediante la producción de toxinas, pero que también pueden ser producido por el hospedero como un mecanismo de defensa contra la infección

(Robert y Humber, 1981). *B. bassiana* produce varios tipos de compuestos tóxicos considerado como factores de virulencia que incluye beauvericina, bassianolida, oosporina, entre otros, (Hegedus y Khachatourians, 1995). La oosporina es una dibenzoquinona de color rojo detectado en filtrados de cultivos *in vitro* y en insectos infectados con *B. bassiana*, tiene actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas, con muy poco efecto contra bacterias Gram negativas (Strasser y col., 2000a). Se considera que la oosporina actúa con las proteínas y aminoácidos a través de reacciones redox, estos intercambios dan por resultado un mal funcionamiento enzimático. La oosporina, como la tenellina y bassiana, inhiben más del 50 % de las membranas de los eritrocitos y la actividad de la ATPasa de una manera dependiente de dosis hasta 200  $\mu\text{gml}^{-1}$  (Strasser y col., 2000b). Este pigmento inhibe en mayor grado la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa comparado con su efecto sobre  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPasa. La inhibición de la actividad de la ATPasa por este pigmento no es específica, pero es probablemente una consecuencia de la ruptura de la membrana; estos pigmentos causaron alteraciones en la morfología de los eritrocitos originando varios grados de lisis celular (Jeffs y Khachatourians, 1997).

Por otro lado varias especies de HE producen ácidos orgánicos y algunos han sido implicados en el proceso de infección. Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* (Hegedus y Khachatourians, 1995). Este compuesto también ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los HE pueda ser un elemento que coadyuve a la solubilización de la proteína cuticular (Bidochka y Khachatourians, 1991).

De manera interesante se ha observado que la virulencia frecuentemente está asociado a fenotipos que incluyen altas velocidades de germinación (Samuels y col., 1989; Khachatourians, 1996; Altre y col., 1999; Varela y col., 1996; Safavi y col., 2007), de crecimiento (Samuels y col., 1989; Khachatourians, 1996; Varela y col., 1996) y de esporulación (Feng y col., 1990; Khachatourians, 1996; Varela y col., 1996). También se ha asociado a la producción de toxinas y ácidos orgánicos y a

niveles altos de enzimas hidrolíticas extracelulares (Joshi y col., 1995; St Leger y col., 1996; Khachatourians, 1996; Talaei–Hassanloui y col., 2006; Feng y col., 1990; Safavi y col., 2007; Fan y col., 2007), cada uno de estos factores resulta crítico en una etapa concreta del ciclo infectivo que se mencionó anteriormente (Figura 2).

Una de las especies más estudiadas y utilizadas en el mundo es *Beauveria bassiana*, que puede infectar a más de 200 especies en 9 órdenes de insectos (Roy y col., 2000; Alves y col., 2002; Liu y col., 2003), esto demuestra su potencial como bioinsecticida en sistemas de MIP. La base de la entomopatogenicidad de *B. bassiana* ha sido investigada por muchos años (Joshi y col., 1995; Talaei–Hassanloui y col., 2006; Fan y col., 2007). Actualmente se sabe que las características del insecto, el potencial patógeno del hongo, y las condiciones ambientales también contribuyen en el éxito del hongo para infectar al insecto (Charnley, 1989; Hajek, 1997; Talaei – Hassanloui y col., 2006). A causa de la gran diferencia en la especificidad y virulencia hacia el hospedero entre aislados, la identificación de características que puedan tener una función importante en el ataque del insecto resulta valioso para entender la virulencia en la selección y desarrollo de aislamientos como agentes de biocontrol. Aunque algunas características como velocidad de germinación, velocidad de crecimiento, velocidad de esporulación, tamaño de la spora y producción de toxinas han sido correlacionados positivamente en la virulencia para alguna combinaciones de hongo – hospedero, en muchos otros casos no se han hallado correlaciones efectivas (Samuels y col., 1989; Feng y col., 1990; Khachatourians, 1996; Altre y col., 1999; Rangel y col., 2006; Talaei – Hassanloui y col., 2006).

## **1.2 Patogenicidad y virulencia**

La claridad y consistencia sobre el uso del término patogenicidad y virulencia en patología de invertebrados ha sido cuestionado recientemente (Thomas y col., 2004). Shapiro y col. (2005) de la Sociedad de Patología de Invertebrados llegaron a un

consenso en donde se acepta las definiciones propuestas por Steinhaus y Martignoni (1970), quienes definen patogenicidad como la cualidad o habilidad de ser patógeno. Esta habilidad se aplica a grupos o especies de entomopatógenos. La capacidad de causar enfermedad es considerada como un fenómeno de todo o nada, es decir, un grupo o especie de entomopatógenos es o no patogénica. La virulencia es definida como la fuerza con la que un microorganismo produce la enfermedad, es decir, el grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie (Shapiro y col., 2005). La patogenicidad es un término cualitativo, mientras que virulencia es un término que cuantifica la patogenicidad (Shapiro y col., 2005).

### **1.3 Bioensayos**

Una de las técnicas más importantes en el estudio de la patología de insectos es el bioensayo. El diseño de un apropiado sistema de bioensayo es crucial para la selección correcta de HE teniendo por objetivo el desarrollo comercial. Esta es una herramienta muy importante que permite la identificación de parámetros claves como son: (i) determinación del rango de hospedero, (ii) determinación de la virulencia, (iii) comparación de la virulencia entre aislamientos, (iv) determinación del potencial epizoótico, y (v) el efecto de las factores bióticos y abióticos, como son edad del hospedero, planta hospedera, temperatura, humedad y formulación, entre otros (Butt y Goettel, 2000).

### **1.4 Conservación de virulencia**

El procedimiento más utilizado para mantener la virulencia y las características morfológicas del aislado es mediante inoculación del hongo a un insecto hospedero vivo, y su posterior re-aislamiento a partir del insecto. La frecuencia de estos pases por insectos está dada por las veces que el aislado puede ser multiplicado sin perder

su virulencia, recomendándose generalmente hacerla cada 3 ó 4 veces por medios naturales o sintético (OCPI, 1986; Goettel y Inglis 1997; Jenkins y col., 1998; Bustillo y col., 2002).

Otro método empleado para mantener aislados virulentos ha sido la incorporación de larvas de lepidópteros desecados y pulverizados a un medio nutritivo comercial (Oficina Cubana de la Propiedad Industrial [OCPI], 1986; Brownbridge y col., 2001; Bustillo, 2002; Monzón, 2001).

Es importante considerar un método de conservación adecuado para mantener la virulencia en los HE, como alternativa a las transferencias frecuentes en medio de cultivo. Este método es utilizado en México por los laboratorios de producción masiva de agentes de control microbiano (Berlanga-Padilla y col., 2003). Entre los problemas asociados con este método es que los cultivos tienen un periodo corto de vida y son susceptibles a contaminaciones, además, con la continua transferencia por medios de cultivo los hongos pueden sufrir cambios morfológicos y genéticos (Humber, 1997; Sanchez-Peña y Thorvilson, 1995; Borman y col., 2006 ). Se han desarrollado una gran variedad de técnicas para la conservación de microorganismos; la selección de la técnica más apropiada tendrá que ser definida con base en las necesidades específicas de los aislados y de su uso en particular (Humber, 1997; Berlanga-Padilla y col., 2003; Borman y col., 2006). La preservación con un crioprotector a  $-196^{\circ}$  C inmerso en nitrógeno líquido, después de un congelamiento a velocidad controlada, es ampliamente recomendado como el mejor método de conservación para mantener tanto la viabilidad celular como las propiedades biológicas de virulencia (Borman y col., 2006; Sanchez-Peña y Thorvilson, 1995). Sin embargo, mantener cultivos en nitrógeno líquido es caro y requiere equipo adicional, es por esto que no es accesible para muchos laboratorios. Existen otras técnicas relativamente más simples y baratas para la preservación de cultivos, pero cada uno de estos métodos menos sofisticados, puede resultar en un éxito parcial con diferentes grupos de hongos (López-Lastra, y col., 2002; Estrada y col., 2003; Borman y col., 2006).

En el caso de *B. bassiana* los métodos más empleados son resiembra sucesiva (tubos de cultivo con medio ADS mantenidos entre 4 y 7°C); conservación en agua desionizada estéril, silica gel, y para aquellos que tienen equipos especiales emplean liofilización y nitrógeno líquido (Hegedus y col., 1992; Sánchez-Peña y Thorvilson, 1995; Estrada y col., 2003; Mier y col., 2005). La principal desventaja de los tres primeros métodos es la aparición de formas no esporulantes, pérdida de virulencia y también se contaminan fácilmente durante las resiembras; sin embargo, algunos de estos métodos han mostrado viabilidad hasta por tres años y medio para el caso del método de agua desionizada y además es de bajo costo (Mier y col., 2005).

## 2. Antecedentes

La biotecnología agrícola está enfocada a dar solución a problemas de baja producción y pérdidas económicas de cultivos, provocadas por factores bióticos y abióticos del campo, y se enfoca principalmente a lograr una agricultura sustentable. En este sentido, un objetivo de la biotecnología agrícola es reducir la dependencia de químicos sin afectar, o incluso incrementar la producción del campo, lo cual trae como consecuencia una disminución en costos de insumos y además, ayuda a reducir los problemas ambientales (Tamez-Guerra y col., 2001). Dentro del potencial de la biotecnología agrícola en el control biológico de insectos, se encuentran los HE, actualmente utilizados para el control de una gran variedad de plagas como alternativa o complemento a los insecticidas químicos (Inglis y col., 2001). Sin embargo, los micoinsecticidas representan un pequeño porcentaje del mercado mundial bioinsecticidas (St Leger y Screen, 2001; Alatorre Rosas, 2004; Fan y col., 2007). Se espera que en las próximas décadas los plaguicidas químicos tengan un crecimiento del 2%, mientras que para los biopesticidas del 10-15% (Tamez-Guerra y col., 2001).

Una de las principales limitaciones en el desarrollo de los micoinsecticidas es que, comparado con los insecticidas químicos, después de su aplicación se requiere de un tiempo mayor para controlar la plaga, tiempo en el cual el insecto plaga puede causar serios daños a la cosecha (Quesada-Moraga y col., 2006; Fan y col., 2007).

Aunque en la naturaleza, los hongos mutan de manera natural provocando variaciones ligadas a la selección en la población; el mejoramiento de *Beauveria bassiana* se puede lograr por genética clásica o por técnicas de biología molecular que involucra la inserción de secuencias de ADN ajenas a la especie en estudio (Couteaudier y col., 1996; Deshpande, 1999; St Leger y Screen, 2001). Cuando se insertan genes o secuencias de otras especies, se tienen restricciones para su uso en aislados que se liberen al medio ambiente (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005).

La diversidad biológica constituye en la actualidad la mayor riqueza potencial de los países del tercer mundo. Sin embargo, la relación entre la actividad agrícola y la conservación/explotación de la biodiversidad, tienen un carácter excluyente, que afecta negativamente la biodiversidad debido al uso de insumos externos, como los agroquímicos. En el caso de los organismos modificados genéticamente (OMG) existe una gran incertidumbre respecto a la posibilidad de tener un efecto negativo sobre la salud humana y la biodiversidad, razón por la cuál en México no esta permitido la liberación de OGM al medio ambiente (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005). El uso de microorganismo manipulados por genética clásica como método de mejoramiento en la virulencia es una alternativa concreta al uso de OMG y no representa un riesgo en la conservación de la biodiversidad (PROBIOMA, 2000). Por otro lado, es importante resaltar que uno de los aislados silvestre, es un aislado nativo, lo que proporciona una ventaja adicional por estar adaptada a las condiciones geográficas de la región.

Robledo y col. 2005 desarrollaron una metodología para tratar de incrementar la virulencia de aislados de *Beauveria bassiana*, el proceso consistió en realizar mutaciones sometiendo a radiación ultravioleta (UV) a 2 aislados silvestres de *Beauveria bassiana* (Bb 4 y Bb 88) proporcionados por el Colegio de Posgraduados (Instituto de Fitosanidad). El protocolo de mutagénesis se realizó según Loera y col. (1999). La selección de aislados mutantes se realizo en medios con quitina y 2 DG. Se seleccionaron aquellos que no perdieron la capacidad de esporulación, secreción de enzimas hidrolíticas (halos de actividad), y que tuvieran una velocidad de crecimiento igual o mayor al aislado silvestre (Loera, 2005).

Después del proceso de selección, considerando los criterios antes mencionado, algunos aislados mutantes derivadas de Bb 88 y Bb 4 ( Bb 885.2, Bb 885.5, Bb 42.2 y Bb 49.5) se le realizaron pruebas de virulencia en el chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*). Los resultados mostraron que el aislado Bb 885.2 fue el más virulento con  $LT_{50}$  de 4 d, mientras que el aislado silvestre Bb 88 y su mutante Bb 885.5 tuvieron un  $LT_{50}$  de 6 y 8 d, respectivamente. El aislado Bb 4 y

sus mutantes (Bb 42.2 y Bb 49.5) mostraron una virulencia menor que el aislado Bb 88 y sus mutantes (Bb 885.2 y Bb 885.5).

Utilizando el aislado silvestre (Bb 88) y una de sus mutantes (Bb 885.2), Rodríguez y col. (2004, 2005, 2007) realizaron la caracterización fisiológica de diversos parámetros como indicadores de la virulencia, así como la comparación de actividad enzimática en cultivo en medio sólido utilizando cutícula de *Sphenarium purpurascens*. De esta manera se pretendía determinar los parámetros relacionados con la mayor virulencia de la mutante Bb 885.2 respecto a Bb 88, la evaluación se realizó en chapulín de la milpa y en larvas y adultos de *Tenebrio molitor*.

Por otro lado, Núñez-Gaona y col. (2005, 2006) evaluaron el efecto de la actividad de agua en el crecimiento y producción de conidias del aislado Bb 885.2, así como el efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de conidias en cultivo en medio sólido empleando salvado de trigo como sustrato. El crecimiento se dio únicamente del rango de 0.97 y 0.99 aw, obteniéndose el mismo comportamiento de producción en ambos medios de crecimiento (cultivo sólido en cajas Petri y botellas serológicas con salvado de trigo). El estudio sobre el nivel de inóculo inicial permitió establecer que en medio sólido se podría reducir el tiempo de cultivo a la mitad, sin tener repercusiones sobre el rendimiento final de conidios.

Sin embargo, la colección completa de aislados no ha sido analizada ni determinada su virulencia y características fisiológicas, razón por la cual en esta investigación se planteo determinar los parámetros fisiológicos de los diferentes aislados mejorados. Por lo tanto, el análisis completo va a permitir evaluar el método de selección, así como investigar si existe relación entre las variables de crecimiento evaluadas con la virulencia; a partir de aislados de distintas colecciones, silvestres y mutantes.

### 3. Justificación

En la actualidad el mercado de alimentos orgánicos sigue creciendo a un ritmo de 20 a 40 % anual (en ventas) y se valora en 40 mil millones de dólares anuales (2007), y se pronostica que para el 2010 alcanzará los 100 mil millones de dólares (Willer y Yussef, 2006; Soto, 2006). A nivel mundial, México ocupa el 18° lugar en superficie orgánica (215 mil ha; 2004), lo que representa apenas el 0.2% de la superficie agrícola cultivable. Sin embargo, a nivel mundial es el primero en la producción de café orgánico (70 mil ha; 2005) (Willer y Yussef, 2006). El 85% de la producción orgánica nacional es para la exportación. El mercado de los Estados Unidos registra el primer lugar en ventas de productos orgánicos, el segundo lugar es el mercado de Alemania y el mercado británico ocupa el tercer lugar (Willer y Yussef, 2006). Con ello se demandan procesos en el Manejo Integrado de Plagas, que incluyen la selección de mejores aislados fúngicos de entomopatógenos. Para seleccionar a los mejores aislados es importante evaluar la virulencia, sin embargo, puede resultar muy valioso tener elementos (parámetros fisiológicos) que puedan evaluarse en estrategias de selección, que consiste identificar características fenotípicas de crecimiento que se correlacionan con la virulencia.

El control biológico con HE representa una alternativa que rescata y fortalece el equilibrio ecológico que existía antes del uso de agroquímicos. Esta alternativa está siendo utilizada con éxito en México. En el estado de Sinaloa se usa *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* para el control de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) (Ficha Técnica CB-06; FIRA Boletín informativo, 2003). En el sureste del estado de Guanajuato, se utiliza *Metarhizium anisopliae* para el control de los chapulines *Sphenarium purpurascens* y *Melanoplus differentialis* (Tamayo-Mejía, 2006). También, en Tamaulipas, Jalisco y otros estados de la república mexicana, se utiliza *Metarhizium anisopliae* para el control de la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) (Ficha Técnica CB-08). En las regiones cafetaleras del país (12 estados productores) se considera a *Beauveria bassiana* como estrategia real de manejo integrado para el control de la plaga denominada

broca de café (*Hypothenemus hampei*), siendo esta la plaga más perjudicial de la cafecultura mundial (FIRA Boletín informativo, 2003; Ficha Técnica CB-03, Dirección General de Sanidad Vegetal). En general *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium lecanii* son los más utilizados para el control de plagas (áfidos y mosquitas blancas, entre otros) en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas en campo abierto así como en invernaderos (Tamez Guerra y col., 2001). Como puede verse, *Beauveria bassiana*, ya es considerado como parte importante en las estrategias de MIP de una gran variedad de plagas de insectos en el sector agrícola de nuestro país, sin embargo, existe una búsqueda constante de mejores aislados y además, que estén adaptados a las condiciones geográficas de nuestro país (Milner y col., 2003), pues le proporcionaría una ventaja adicional comparado con cepas comerciales provenientes de otros países.

## **Hipótesis de trabajo**

El nivel de virulencia de aislados de *Beauveria bassiana* esta relacionado con las características de los fenotipos de crecimiento medidos en caja Petri

## **4. Objetivo general**

Relacionar fenotipos de crecimiento con la virulencia de aislados silvestres y mutantes de *Beauveria bassiana*

### **4.1 Objetivos específicos**

4.1.1 Conservar los aislados y evaluar la viabilidad del hongo en conservación

4.1.2 Determinar las variables de crecimiento de la colección de aislados

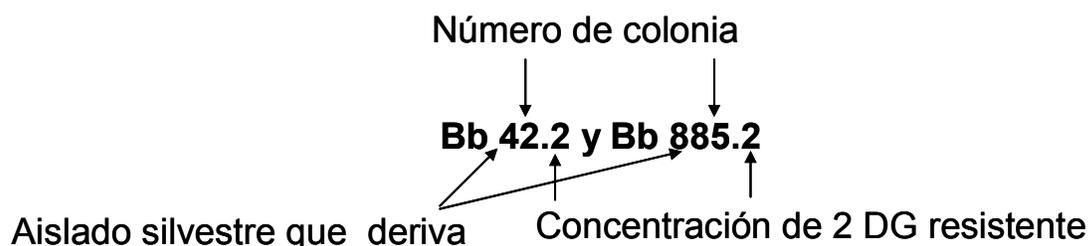
4.1.3 Comparar los parámetros de virulencia entre cada aislado evaluado y un aislado comercial

4.1.4 Hacer un análisis de correlación y regresión de las variables evaluadas con la virulencia de los aislados

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Microorganismo

Se utilizaron 2 aislados silvestres de *Beauveria bassiana* (Bb 4 y Bb 88) y sus mutantes derivadas (Bb 42.2, 49.5; Bb 881.2, 882.2, 884.5, 885.2, 885.5 y 887.5). El origen de los aislados silvestres se muestra en la Tabla 3. El significado del código de los aislados mutantes es el siguiente:



Se utilizó un aislado comercial de *Beauveria bassiana* que provino de un formulado en forma de polvo humectable, cuyo ingrediente activo son conidios de *Beauveria bassiana* en una concentración de  $1 \times 10^{12}$  conidios/gramo (presentación de 25 gramos). El formulado es elaborado por NOCON S.A. DE CV. El medio de cultivo utilizado para crecimiento y esporulación (propagación) de todos los aislados fue Agar Maltosa Sabouraud (AMS) al 2% más avena (3%) y extracto de levadura (EL) (0.05%); se incubó por 10 días a 28°C.

**Tabla 3. Origen de aislados silvestres.**

<b>País</b>	<b>Aislado</b>	<b>Hospedero original</b>	<b>Orden :Familia</b>
México (Oaxaca)	Bb 88	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleóptera: Scolytidae
Ecuador	Bb 4	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleóptera: Scolytidae

### **5.1.1 Reactivación de aislados sobre larvas de *T. molitor***

Para obtener cultivos monospóricos se sembró por estría una asada de conidias en AMS al 2% más desoxicolato de sodio (0.05%) y se incubó a 28 °C. Las colonias independientes se usaron para su propagación. Las conidias de 10 días de cultivo se usaron para hacer la reactivación de los aislados al infectar larvas de *T. molitor* (vía inmersión como se describe más abajo). Los insectos muertos se mantuvieron en cámara húmeda hasta su esporulación (Goettel e Inglis, 1997; Jenkins y col., 1998; Posada y col., 2005). Se tomaron conidios del insecto muerto y se sembró nuevamente por estría en cajas de Petri con medio AMS 2% más desoxicolato de sodio (0.05%). De esta siembra se cosecharon colonias libres de contaminación del centro de la caja Petri para propagarlas nuevamente (siembra por picadura) para conservación, y posterior medición de variables de crecimiento, hidrofobicidad y bioensayos (Goettel e Inglis, 1997; Jenkins y col., 1998; Posada y col., 2005).

### **5.1.2 Métodos de conservación**

Se emplearon dos métodos de conservación:

- a) Crioconservación, basado en la conservación de viales con 1.2 ml de una suspensión de conidios ( $1 \times 10^8$ ) en agua destilada y glicerol al 10% como concentración final. Se sometió posteriormente a un proceso de congelación gradual hasta -20 °C (López-Lastra y col., 2002; Estrada y col. 2003).
- b) Agua desionizada estéril, basado en almacenar a 4 °C viales que contenían 4 ml de agua desionizada estéril y en estos se colocaron 4 trozos de agar esporulado ( $5 \text{ mm}^2$ ) provenientes de colonias de diez días de incubación en AMS al 2% (López-Lastra y col., 2002; Garza-López y col., 2006). Los trozos de agar esporulados (medio AMS 2%) se tomaron de las cajas Petri sembradas por picadura con palillo estéril.

Solo para el método de agua desionizada se evaluó la viabilidad del hongo en conservación.

## **5.2 Evaluación de la viabilidad**

La viabilidad de los aislados se evaluó utilizando el método de cámara húmeda descrita por Monzón (2001), el cuál consistió en colocar sobre un portaobjetos una capa de medio Agar-Agua sobre la que se depositó una alícuota de suspensión de conidios. Este montaje se colocó sobre un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri estéril con papel filtro humedecido. El montaje se incubó a 28 °C. La medición de conidios germinados se realizó a las 20 horas utilizando el objetivo 40X; como mínimo se realizó un conteo de 100 conidios (germinados y no germinados). Los conidios con tubo germinativo mayor a su diámetro se consideraron como germinados (Liu y col., 2003a; Shah y col., 2005).

La viabilidad de cada aislado conservado en agua des-ionizada se realizó antes de almacenar los viales y posteriormente cada mes, hasta el tercer mes, esta determinación se realizó directamente de los viales de conservación (por triplicado). Además, se determinó la viabilidad después de haber resembrados los trozos de agar en medio AMS al 2% con EL al 0.05% (López-Lastra y col., 2002).

### **5.2.1 Medición de velocidad radial**

Cada aislado se sembró por picadura empleando un palillo de madera estéril, en el centro de las cajas Petri de 49 mm de diámetro, con 5 ml de medio AMS 2% con avena (3%) y extracto de levadura (0.5%); la concentración de la suspensión fue de  $1 \times 10^6$  conidios/ml. Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm e incubadas a 28 °C. Se midió el crecimiento radial con un Vernier cada 24 horas. Las mediciones del crecimiento radial se detuvieron cuando al menos a uno de los aislados le faltaba medio centímetro para llegar al borde de las cajas. Se calculó la pendiente por

regresión lineal, este valor se tomó como velocidad radial ( $V_r$ ), expresada en mm/d (Safavi y col., 2007). El modelo utilizado fue una ecuación de línea recta que se hizo ajustar el conjunto de datos:

$$y = a + bx$$

donde  $a$  = el valor de intersección con el eje de las ordenadas, y

$b$  = la pendiente de la línea recta, este valor se tomo como  $V_r$ .

Los resultados se presentan como promedio de tres repeticiones.

### **5.2.2 Producción de conidios *in vitro***

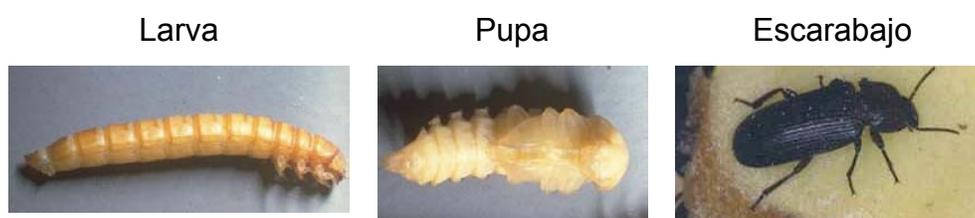
La producción de conidios se midió al final del crecimiento radial; se cortó con un tubo de ensayo (1 cm. diámetro) tres porciones del hongo ya esporulado de acuerdo al procedimiento de Kamp y Bidochka (2002). Posteriormente se cosecharon los conidios usando 5 ml de Tween al 0.05 % en tubos Falcon de 15 ml. Se agitó vigorosamente en un vórtex por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente se hicieron las diluciones necesarias para hacer el conteo al microscopio con la cámara de Neubauer, al final la producción de conidios se expresó como conidios/cm<sup>2</sup>. Los resultados se presentaron como promedio de tres repeticiones.

### **5.2.3 Bioensayo**

#### **5.2.3.1 Cría de Insectos**

Se estableció una colonia de *Tenebrio molitor* a partir de una muestra donada por el Colegio de Posgraduados (Instituto de Fitosanidad). Se usaron cajas de plástico

rectangulares para mantener los diferentes estadios de desarrollo: larvas, pupas y escarabajos adultos principalmente (Figura 3). Para el mantenimiento de los insectos, a temperatura ambiente, se utilizó una mezcla de avena y salvado de trigo (1:1), además, se colocó en cada caja de plástico un algodón húmedo estéril (Robledo, 2004). Adicionalmente se retiraron dos veces por semana las pupas que iban apareciendo en las cajas de cría; de la misma manera se hizo con los adultos que se formaban en la caja de pupas ; esto para evitar el canibalismo debido a la inmovilidad de las pupas.



**Figura 3. Principales estadios de desarrollo *Tenebrio molitor*.**

El ciclo de vida del *T. molitor* toma alrededor de 6 meses. Se trata de un insecto hexápodo que pertenece al orden Coleóptera, suborden *Polyphaga*, la superfamilia Tenebrionoidea, la familia Tenebrionidae, el género *Tenebrio* y especie *molitor* (Gerber, 1975). En México es conocido bajo diferentes nombres: gusano de las harinas, gorgojo negro ó escarabajo molinero; en inglés se conoce como yellow mealworm. En la naturaleza el *T. molitor* puede presentarse como plaga en los silos y molinos de granos (Montoya-Sansón y col., 2007)

### **5.2.3.2 Bioensayo**

Conidios propagados en AMS (2%) + avena al 3% de los aislamientos provenientes reactivados fueron utilizados en el bioensayo. Se determinó su viabilidad como se menciono anteriormente (sección 5.2). Se utilizó el estadio de larva para los

bioensayos. Se estandarizaron las soluciones de conidios para cada aislado a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml. El conteo se hizo usando una cámara de Neubauer. Se seleccionaron las larvas más activas, sanas, melanizadas de un solo color y procurando el mismo tamaño (2 cm de longitud) para garantizar la homogeneidad del material biológico utilizado en el experimento. Cada grupo de 12 larvas fue sumergido en 30 ml de la suspensión con conidios por 15 segundos (Eken y col., 2006; Butt y col., 2000; Goettel e Inglis, 1997). La unidad experimental fue de 12 larvas en cada caja Petri y 4 repeticiones por tratamiento. En el tratamiento control, las larvas se sumergieron en una solución de Tween 80 al 0.05% en las mismas condiciones.

Se agregó alimento esterilizado (avena/salvado de trigo 1:1) en cada caja. Posteriormente se colocaron las cajas Petri en una cámara húmeda (caja de plástico transparente con papel filtro húmedo y sellado con Parafilm) y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  con fotoperíodo de 12:12 h. La cámara húmeda se mantuvo por 5 días, para promover la germinación de los conidios. Se realizaron observaciones todos los días y se registró el número de larvas muertas. Posteriormente, estas larvas fueron colocadas en cámara húmeda con papel filtro para promover el crecimiento del hongo y confirmar la presencia de micosis en los insectos muertos, con el propósito de adjudicar que la muerte del insecto fue debido al hongo y no por otras causas (Tefera y Pringle, 2003).

El tiempo al que se alcanza el 50% de mortalidad ( $TL_{50}$ ) se calculó a partir del ajuste de los datos experimentales del crecimiento de la mortalidad según la ecuación logística la cual se muestra a continuación:

$$m(t) = \frac{m_{\text{máxima}}}{1 + Ce^{-\mu t}}; \quad \text{donde } C = \frac{m_{\text{máxima}} - m_{\text{mínimo}}}{m_{\text{mínimo}}}$$

Donde  $\mu$  es la velocidad máxima de mortalidad específica y  $m$  es la mortalidad al tiempo  $t$ . Mediante el algoritmo Solver (Excel, Microsoft) se obtuvieron los mejores ajustes de los datos experimentales.

### 5.3 Producción de conidios sobre cadáveres de *Tenebrio molitor*

En insectos que se observó la presencia de micosis se estimó la producción de conidios por larva a los 12 días. Se seleccionaron al azar 4 larvas muertas esporuladas y se agitó en 10 ml de Tween 80 al 0.01% con un agitador magnético por 5 min. y por triplicado para cada aislado (Tefera y col., 2003; Posada y col., 2005). De esta solución se hizo una dilución 1:20 y se realizó el conteo (40X) en cámara de Neubauer, al final la producción de conidios se expresó como número de conidios por larva (Posada y col., 2005).

### 5.4 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se determinó mediante el método modificado de exclusión de fases (Boucias y col., 1988; Romano Machado, 1996; Jeffs y Khachatourians, 1997). Se estandarizaron suspensiones de conidios con Tween 80 0.05%, se centrifugaron (5000 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los conidios recuperados después de desechar el sobrenadante se lavaron dos veces con agua destilada a una temperatura de 50°C; y se centrifugaron en las condiciones descritas.

Posteriormente de eliminar el sobrenadante de la tercera centrifugación, los conidios se resuspendieron en solución amortiguadora de acetatos (0.1M, pH 6). Posteriormente se hicieron mezclas iguales con tolueno, agitando durante 15 s y manteniéndose en refrigeración durante 12 horas para separar los solventes. Se recuperó la fase acuosa excluida de la fase orgánica, y se midió la absorbancia a 600 nm contra un testigo del mismo buffer de acetatos. La hidrofobicidad de los conidios se calculó mediante la siguiente formula:

$$Hf = \left( \frac{ab_0 - ab_f}{ab_0} \right) \times 100$$

Donde,

$H_f$  = Hidrofobicidad de los conidios (%)

$ab_0$  = absorbancia de la suspensión de conidios en solución amortiguadora de acetatos

$ab_f$  = absorbancia de la fase acuosa excluida del solvente orgánico

## **5.5 Análisis de datos**

### **5.5.1 Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza utilizando la prueba de Tukey para comparaciones múltiples a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Para las variables de crecimiento los parámetros analizados fueron:  $V_r$ , densidad superficial de conidios, viabilidad y número de conidios por larva. Los parámetros analizados para virulencia fueron: el tiempo al que se alcanza el 50% de mortalidad ( $TL_{50}$ ) y mortalidad máxima. Se usaron los programas Minitab 14 (Minitab Inc.) y SPSS para Windows versión 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

### **5.5.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Para determinar la correlación de las variables estudiadas se aplicó el método de estadística multivariable de Análisis de Componentes Principales que consiste en transformar las variables originales en componentes principales, que son funciones lineales de las primeras (Manly, 1986). El primer componente principal (CP1) representa la mayor porción de variabilidad de los datos y sucesivamente los componentes restantes (CP2, CP3, etc.) la mayor porción de variabilidad restante. Para interpretar el ACP es necesario considerar cuántos componentes principales logran una explicabilidad adecuada. Es ideal conseguir una reducción a dos

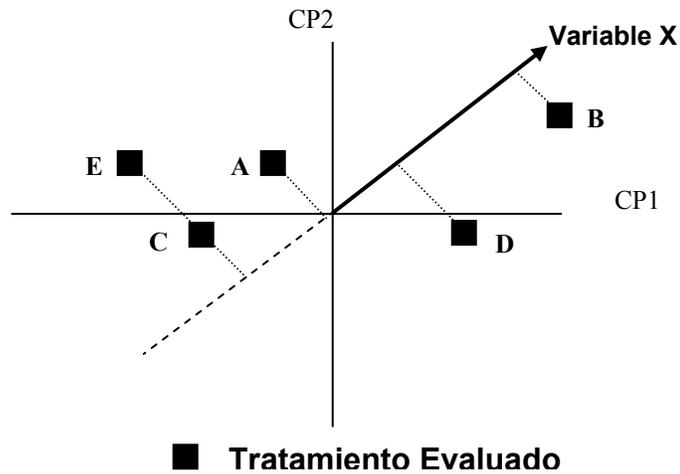
dimensiones, ya que así es posible representar gráficamente en un diagrama (sistema de ejes de coordenadas cartesianas) a los resultados de ACP (Pérez-López, 2005). Se puede considerar que la información más importante (Manly, 1986; Escalona-Buendía, 1995) que se genera mediante la aplicación de este método comprende:

1. Las variables más importantes en la diferenciación de los tratamientos (2 aislados silvestres de *Beauveria bassiana* [**Bb 4** y **Bb 88**] y sus mutantes derivadas [**Bb 42.2, 49.5; Bb 881.2, 882.2, 884.5, 885.2, 885.5 y 887.5**]).
2. La correlación que existe entre las variables (inversa, directa o ninguna relación).
3. Las variables que caracterizan a cada tratamiento de estudio por presentar valores superiores al promedio de los demás materiales de estudio lo que se ilustra en la Fig. 4.

La obtención de diagramas en un plano facilita la interpretación del ACP ya que la información generada se visualiza más claramente. Por ejemplo, si se tienen dos variables no correlacionadas entre sí, estas se representan como vectores con un ángulo de 90° mientras que dos variables con correlación igual a +1 tendrán vectores que forman un ángulo de cero grados.

Respecto a los tratamientos, el hecho de estar ubicados cercanos entre sí indica comportamiento similar respecto a las variables medidas; y la posición de los primeros respecto a los vectores indica la tendencia del valor obtenido en cada variable. En un vector (variable), los valores que tomaron los tratamientos aumentan en su dirección correspondiente, y el promedio de todos los valores se encuentra en el punto de origen (0,0).

## ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DIAGRAMA BIDIMENSIONAL



**Ordenamiento respecto a la variable X:  $B > D > A > C = E$**

Figura 4. Representación gráfica de los tratamientos A, B, C, D y E respecto a la variable X en un diagrama de ACP. Los tratamientos B y D tienen valores superiores al valor promedio para esas variables X, A tiene un valor muy cercano al promedio, mientras que C y E tienen valores inferiores al promedio para la variable X.

## 6. Resultados y Discusiones

### 6.1 Viabilidad del hongo conservado en agua desionizada

Se determinó la viabilidad de cada aislado antes de almacenar los viales en refrigeración. A los tres meses se presentó un rango de viabilidad de entre 25 hasta 62%. El aislado que mejor persiste en este método de conservación fue el comercial (62.37 ± 9.35 %); el más sensible fue Bb 887.5 (24.05 ± 1.85%). El resto presentó un comportamiento intermedio (Fig. 5). Estos resultados muestran que el método de conservación afecta de igual manera tanto a aislados parentales como mutados. En ambos se observa declinación en su viabilidad a través del tiempo.

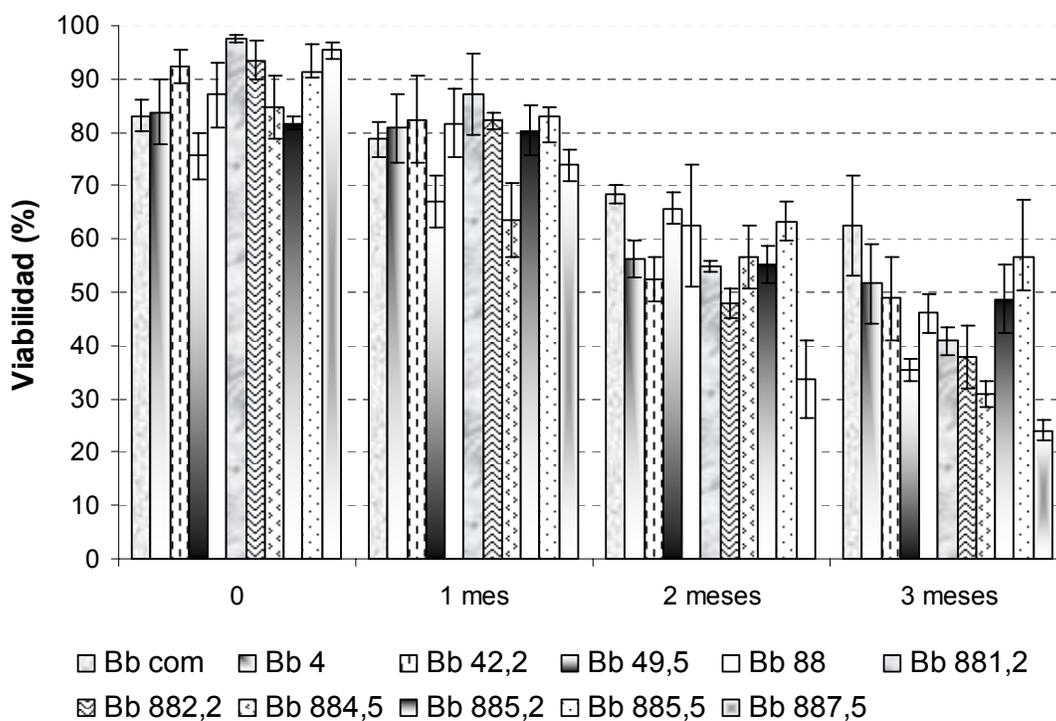
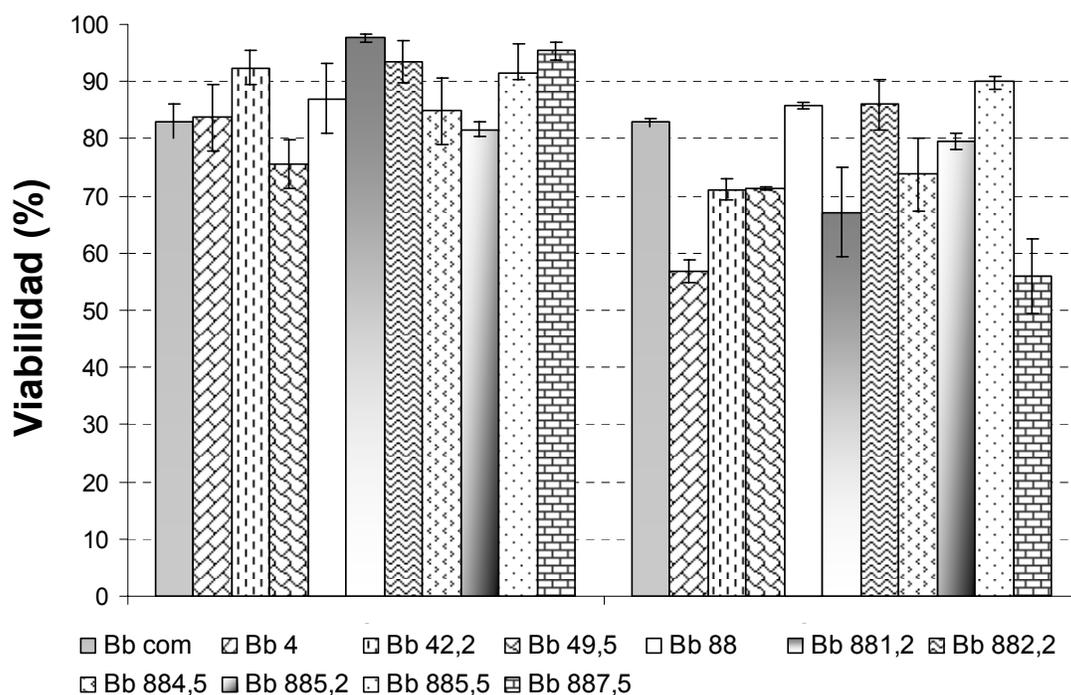


Figura 5. Por ciento de viabilidad de aislados conservados en agua desionizada a 4 °C.

La viabilidad de cada aislado después de haber sido reactivados en medio AMS al 2% se muestra en la Figura 6. Se observó un nivel de viabilidad de entre 58

y 90%. El aislado Bb 885.5 presentó una viabilidad de  $90.01 \pm 0.86$  %, mientras que el aislado con la más baja viabilidad fue Bb 887.5 ( $56.03 \pm 6.57\%$ ). Estos valores representan una disminución de la viabilidad entre 2 y 40 % respecto a los valores antes de la conservación. Bajo estas condiciones de evaluación (al tercer meses), en general se observó una mejoría en el porcentaje de viabilidad de la mayoría de los aislados respecto a la determinación directa de los viales de conservación que se mencionó anteriormente.



**Figura 6. Por ciento de viabilidad de aislados conservados en agua desionizada a 4 °C, después de haber sido reactivadas.**

La conservación de HE en agua desionizada es un método simple y económico. Además ha sido probado de forma exitosa en muchos otros hongos patógenos de animales y plantas (López-Lastra y col., 2002; Borman y col., 2006). A pesar del éxito ya probado, el pase frecuente sobre un hospedero o medio de cultivo puede incrementar el riesgo de contaminación, cambios morfológicos de crecimiento y a veces hasta la pérdida del hongo. Entre los HE, Ellis (1979) observó que algunas especies de los géneros *Conidiobolus* y *Entomophthora*, permanecieron viables en

agua desionizada durante más de año y medio en condiciones semejantes a las probadas en este estudio. También, bajo condiciones similares, con agua desionizada, Rivera y col. (1998) mostraron que tanto conidios como blastosporas de *L. lecanii* conservaron su viabilidad durante un periodo de tres años. Para *B. bassiana* se ha reportado que la conservación por este método mantiene la viabilidad y características morfológicas durante 3.5 años. Con la adición de glicerol (10%) y almacenados 4 °C se encontró un tiempo de conservación de 1.6 años según lo reportado por Mier y col. (2005), sin embargo no se reporta ningún dato sobre el efecto en la virulencia de los aislados evaluados.

Todos los métodos empleados para conservar o preservar la vida y las características genéticas de los hongos, se basan fundamentalmente en la reducción o suspensión de su actividad metabólica (Mier y col., 2005). En los HE, el efecto de los subcultivos seriados ocasiona una atenuación de la virulencia, como medida precautoria se recomienda evitar las resiembras frecuentes debido a la aparición de formas no esporulantes, mutaciones o alteraciones morfológicas de la colonia que en muchas ocasiones son originadas por elementos extracromosómicos como los micovirus (Melzer y col., 1998; Roberts y St Leger, 2004). La presencia de partículas de micovirus de doble helice de RNA se ha reportado ampliamente en hongos filamentosos. En HE a principios de los 90s se reportó la presencia de estas partículas de un tamaño de cerca de 35 nm en *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Roberts y St Leger, 2004). Posteriormente se realizó una comparación entre aislados con ausencia y presencia de micovirus y se observó que los primeros son mas virulentos que su contraparte debido a la presencia del micovirus, sin embargo, esta conclusión es tentativa (Roberts y St Leger, 2004).

Otros factores como la temperatura y la humedad relativa también tienen un efecto decisivo sobre el mantenimiento de la viabilidad y virulencia durante periodos de tiempo prolongado. Borman y col. (2006) sugieren que el método de conservación en agua desionizada sea propuesto como un segundo método de conservación debido a que se ha observado pleomorfismo en ciertos aislados, y utilizar la

liofilización o nitrógeno líquido (-196 °C) como método principal de conservación si se cuenta con el equipo específico para estos métodos.

### 6.1.2 Reislamiento y caracterización de aislados

El inóculo de la mayoría de los aislados se obtuvo de tubos de vidrio conteniendo agar inclinado conservados en refrigeración. En el aislado comercial se observó una contaminación con otro hongo, el cual fue eliminado por resiembra sucesiva. La recuperación del aislado Bb 4 fue posible después de realizar varias resiembras en medio AMS 2% más extracto de levadura (0.5 g/L) hasta obtener colonias con crecimiento micelial y esporulación sin presencia de formas levaduriforme (crecimiento dimórfico), lo cual ha sido reportado para *B. bassiana* (Alves y col., 2002).

Durante la propagación, después de haber recuperado los 11 aislados, se observó una pigmentación de color rojizo en el medio de cultivo AMS 2% más EL (0.05%), el aislado Bb 887.5 produjo el color más intenso (Figura 7). El color rojo es característico de uno de los metabolitos con actividad tóxica y antibiótica que produce *B. bassiana*, la oosporina (Strasser y col., 2000b).



Figura 7. Pigmentación del medio cultivo sólido (AMS 2% más EL [0.05%]) por *B. bassiana*.

### 6.1.3 Reactivación de aislados y obtención de cultivos monospóricos

En este estudio, después de aislar cada hongo mediante un cultivo monospórico a partir de material conservado se reactivó cada aislado de *Beauveria bassiana* mediante la inoculación por inmersión de larvas de *Tenebrio molitor*. Los diferentes hongos se reaislaron a partir del insecto muerto (Figura 8) y obteniendo cultivos monospóricos. Para la obtención de cultivos monospóricos se utilizó desoxicolato de sodio con la finalidad de ayudar a la selección de la colonia monoespórica, en el medio de cultivo sólido. De esta manera se obtuvieron los 11 aislados (Bb 4, Bb 88, Bb 42.2, 49.5, Bb 881.2, Bb 882.2, Bb 884.5, Bb 885.2, Bb 885.5, Bb 887.5 y Bb com) para la evaluación de los estudios posteriores. Con este procedimiento se intentó recuperar o retener las características morfológicas y de virulencia de cada aislado.

Durante la propagación de los aislados en AMS al 2% más EL (0.05%) se observó que las colonias mostraron diferencias morfológicas, siendo el aislado Bb 88 el que más se diferenció por la abundante producción de micelio, además de que tomó más tiempo en esporular (9 d) respecto al resto de los aislados. Por otro lado, la mutante Bb 885.2 produjo poco micelio y además, esporuló tempranamente (5 d) respecto al resto de los aislados. En cuanto al tiempo de esporulación, el resto de los aislados esporularon entre 5 y 9 d.



Figura 8. Larvas de *Tenebrio molitor* infectados por *B. bassiana*.

La virulencia de HE es afectada por diversos factores como temperatura, la humedad, el estado nutricional del insecto; pero también por otros factores durante

el proceso de obtención de los conidios, como es la resiembra sucesiva sobre sustratos sintéticos que causan una reducción en el grado de virulencia hacia el insecto (Brownbridge y col., 2001). Hay algunos reportes donde mencionan la pérdida de virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus* y *Lecanicillium lecanii* (Brownbridge y col., 2001, Ryan y col., 2002), mientras que para otros aparentemente retienen su virulencia después de resiembras sucesivas (Butt y Goettel, 2000, Brownbridge y col., 2001). Una de las alternativas para incrementar y/o conservar la virulencia es reactivar el HE mediante inoculación en insectos huéspedes vivos y su posterior reaislamiento una vez muerto el insecto (Jenkins y col., 1998). La potencial pérdida de virulencia es relevante en general en la conservación de aislados y también para la conservación de virulencia durante la realización de un bioensayo (Brownbridge y col., 2001). En el caso de cepas comerciales la conservación de la virulencia es crítico debido al ciclo habitual de escalamiento de la fermentación (Jenkins y col., 1998).

Samsinakova y Kalalova (1982) mencionan la selección de mutantes de *Beauveria bassiana* a partir de cultivos monospóricos que presentaron un aumento en la virulencia en larvas de *Galleria mellonella*, sin embargo, no mostraron cambios en las características morfológicas. Hall (1980) al evaluar la patogenicidad de aislamientos monospóricos y multiespóricos de *L. lecanii* sobre *Macrosiphoniella sanborni*, en cultivos provenientes de medio artificial y pasados a través del insecto hospedante, no encontró diferencia significativa de patogenicidad entre ambos tratamientos.

Estrada-Valencia y col. (1997) evaluaron cultivos monospóricos y multiespóricos de *Beauveria bassiana* en cuanto producción de esporas, germinación, y virulencia sobre *Hypothenemus hampei*. Además, se evaluaron estos mismos parámetros para el caso de cultivos monospóricos reactivados y no reactivados (medio de cultivo suplementado con cutícula de broca de café). Los resultados en cuanto a virulencia no mostraron diferencias significativas entre

aislamientos monospóricos y multiespóricos, al igual que los monocultivos reactivados y no reactivados en broca de café.

Estrada-Valencia y col. (1999) evaluaron cultivos monospóricos de *Beauveria bassiana* en cuanto a virulencia y germinación luego de tres subcultivos sin reactivar y reactivados sobre *Hypothenemus hampei*. En sus resultados no se observó una relación directa entre mortalidad y otros parámetros, sin embargo, algunos aislados mostraron germinación alta y/o esporulación, características útiles en la selección de aislados.

La variabilidad genética de los cultivos multiesporicos es atribuida a la mezcla de esporas que genera variaciones en las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas, y puede ser minimizada mediante la obtención de cultivos monoespóricos, los cuales suministran información genómica de una sola espora (Estrada y col., 1997). El aislamiento monospórico asegura pureza genética, sin embargo, no se puede tener la certeza de la obtención de aislamientos genéticamente puros cuando se trata de esporas heterocarióticas o cuando se trata de generaciones de este aislamiento inicial, puesto que pueden presentarse mutaciones. Cabe resaltar que un solo aislamiento derivado de una célula no es tan representativo del aislamiento original de una especie, como sucede cuando se realiza una transferencia de células en masa.

De acuerdo a la literatura, no hay consistencia en los resultados sobre el uso de cultivos monospóricos y también sobre la reactivación de aislado. Sin embargo, es importante considerar que la variabilidad en los resultados sobre la retención o pérdida de virulencia, se puede deber a las diferentes metodologías empleadas en su estudio, como es la utilización de cultivos monospóricos o multiespóricos, la utilización de medios de cultivo enriquecidos, etc., especialmente porque estos eventos pueden ocasionar atenuación de la virulencia debido a mutaciones al azar o también debido a las condiciones de cultivo (Brownbridge y col., 2001). Sin embargo, es deseable realizar estas dos actividades previas a la evaluación de las cepas debido a que ofrece algunas ventajas, como es, conservación de la virulencia.

### 6.1.4 Crecimiento radial y producción de conidios *in vitro*

La velocidad de crecimiento radial (mm/d) para cada aislado se muestra en la Tabla 4. Los resultados presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para este parámetro con valores en un rango de entre 1.77 y 2.43 mm/d. Los aislados Bb 881.2 ( $2.43 \pm 0.03$  mm/d), Bb 4 ( $2.43 \pm 0.10$  mm/d), Bb 887.5 ( $2.40 \pm 0.05$  mm/d), Bb 885.5 ( $2.38 \pm 0.02$  mm/d), Bb 882.2 ( $2.31 \pm 0.05$  mm/d) y Bb 42.2 ( $2.29 \pm 0.01$  mm/d) tuvieron la mayor velocidad de crecimiento radial.

**Tabla 4. Crecimiento radial y producción de conidios de aislados de *B. bassiana*.**

Aislamiento	Crecimiento radial			Producción de conidios		
	$V_r$ (mm/d)	Error	P < 0.05	conidios/cm <sup>2</sup> (x10 <sup>7</sup> )	Error (x10 <sup>7</sup> )	P < 0.05
<b>Bb com</b>	2.34	0.03	d, e	10.8	0.007	a, b
<b>Bb 881,2</b>	2.43	0.03	e	75.6	0.055	f
<b>Bb 885,2</b>	2.23	0.01	c, d, e	34.7	0.047	d
<b>Bb 49,5</b>	1.77	0.12	a	13.4	0.016	a, b, c
<b>Bb 42,2</b>	2.29	0.01	c, d, e	7.3	0.008	a, b
<b>Bb 4</b>	2.44	0.10	e	7.5	0.009	a, b
<b>Bb 882,2</b>	2.31	0.05	d, e	4.3	0.006	a, b
<b>Bb 887,5</b>	2.40	0.05	e	60.6	0.075	e
<b>Bb 88</b>	1.98	0.06	b	15.4	0.020	b, c
<b>Bb 885,5</b>	2.38	0.02	d, e	22.3	0.018	c
<b>Bb 884,5</b>	2.14	0.03	b, c, d	16.5	0.018	b, c

Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey;  $P < 0.05$ ).

Mientras que el aislado Bb 49.5 ( $1.77 \pm 0.12$  mm/d) tuvo la menor velocidad de crecimiento radial. De manera general se observa que las mutantes provenientes de Bb 4 tuvieron una disminución en el crecimiento radial respecto a este aislado. En

cuanto a las mutantes derivadas de Bb 88 parental se observa un crecimiento radial superior.

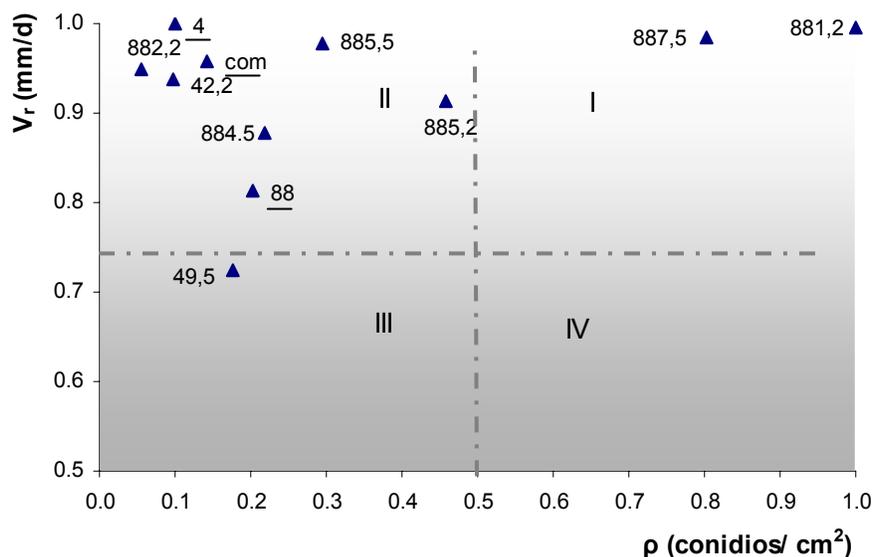
La velocidad de crecimiento es un indicativo de la capacidad del hongo para invadir los sustratos donde crece, pero también puede estar relacionado con su capacidad para crecer sobre la cutícula, como estrategia competitiva contra otros microorganismos durante el ciclo saprófito, acelerando la rápida infección del hospedero (Varela y Morales, 1996; Liu y col., 2003).

Respecto a la evaluación de la densidad superficial de producción de conidios ( $\Phi$ ) en cajas Petri también se presentaron diferencias significativas entre aislados ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4). Referente a los aislados parentales (Bb 4, Bb 88 y Bb com), no mostraron diferencias significativas entre ellos en cuanto a esta evaluación. Sin embargo, de manera general, el aislado Bb 881.2 produjo la mayor cantidad de conidios ( $[75.6 \pm 0.055] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>), mientras que el aislado comercial ( $[10.8 \pm 0.007] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>), Bb 882.2 ( $[13.4 \pm 0.016] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>), Bb 4 ( $[7.5 \pm 0.009] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>), Bb 42.2 ( $[7.3 \pm 0.008] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>) y Bb 49.5 ( $[13.4 \pm 0.016] \times 10^7$  conidios/cm<sup>2</sup>) presentaron la más baja producción de conidios.

Los parámetros fisiológicos  $V_r$  y densidad de conidios se normalizaron para obtener la Figura 9. Los aislados del cuadrante I son los mejores de acuerdo a estas dos variables de crecimiento (Bb 881.2, Bb 887.5); se desarrollaron rápidamente y presentaron alta esporulación, características que son de vital importancia como estrategia competitiva frente a otros microorganismos. En el cuadrante II se encuentran los aislamientos parentales (Bb 4, Bb 88 y Bb com) junto con 5 aislamientos obtenidos de los aislamientos mutantes. Respecto al cuadrante IV vacío, indica que no hubo aislados con crecimiento pobre que presentaran abundante densidad de conidios.

La relación C/N del medio utilizado para la determinación de estas variables fue de aproximadamente 26:1. Safavi y col. (2007) reportan que el crecimiento radial y la producción de conidios no únicamente varía entre especies o aislados, sino también con la relación C/N del medio cultivo utilizado para su crecimiento. Estos

autores obtuvieron la máxima producción de conidios de *B. bassiana* en medio con baja relación C/N de 10:1. Resultados similares también se han obtenido de cepas *B. bassiana* y *M. anisopliae* utilizando medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA; relación C/N 10:1) (Wyss y col., 2001; Kamp y Bidochka, 2002). Mas recientemente, Gao y col. (2007) evaluaron la influencia en el crecimiento y esporulación de diferentes relaciones C/N y concentraciones de carbono de varios hongos de control biológico. Sus resultados indican que el crecimiento y esporulación depende más de la relación C/N que de la concentración de carbono, pero que también se debe considerar a la cepa y los componentes del medio de cultivo.



**Figura 9. Distribución de aislados de *B. bassiana* sobre un plano formado por valores relativos de velocidad radial ( $V_r$ ) y densidad de esporas ( $\rho$ ).**

De manera específica, la producción de conidios por cm<sup>2</sup> para el aislado Bb 881.2, con un tiempo de cosecha de 8 días de cultivo, fue 78 veces superior a lo reportado por Kamp y Bidochka (2002) utilizando medio ADS al 4 % y un tiempo de incubación de 2 semanas. Estos autores mencionan que la producción óptima de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* depende del tipo de aislado y medio de cultivo, pero además, de la profundidad del agar en la caja del cultivo.

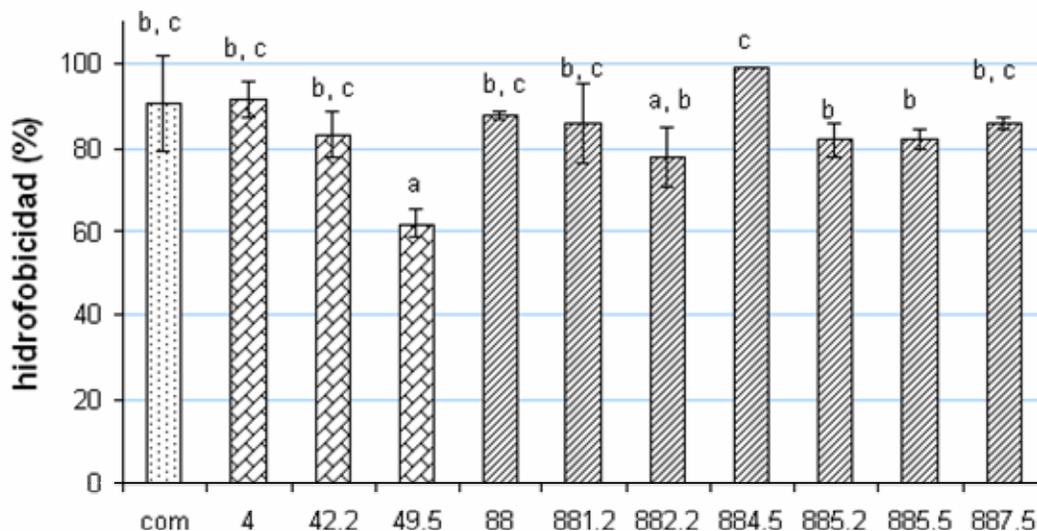
Respecto a la relación entre estas variables y la virulencia, Feng y Johnson (1990) encontraron que los aislados de *B. bassiana* más virulentos contra *Diuraphis noxia* fueron los que tuvieron una esporulación superior al resto de las cepas evaluadas, lo que permite considerar que Bb 881.2 tenga dicho potencial. Sin embargo, Estrada-Valencia y col. (1997) al caracterizar cultivos monospóricos y multispóricos de un mismo aislado de *B. bassiana* no encontraron una relación directa entre el nivel de esporulación y la patogenicidad contra *Hypothenemus hampei*.

La conidias son las unidades infectivas de los HE y su estudio es esencial para tener consistencia en su producción durante las prácticas comerciales o de laboratorio. Pero si se muestra que la abundancia superficial de conidios está correlacionado con la virulencia, resulta más valioso.

## 6.2 Hidrofobicidad de conidios

Previo a la realización del bioensayo se determinó este parámetro. En la Figura 10 se observa la hidrofobicidad mostrada por los conidios de 10 días de incubación en AMS al 2% adicionado con avena al 3%. Del Análisis de Varianza y prueba de medias se encontró que sí hubo diferencia significativa en cuanto al porcentaje de hidrofobicidad entre los aislados evaluados ( $P < 0.05$ ), se formaron tres grupos, los que pertenecen al grupo c son los de mayor hidrofobicidad (Figura 10). El aislado Bb 49.5 tuvo el valor más bajo ( $61.91 \pm 3.55$  %), mientras que el aislado que presentó hidrofobicidad del 100 % fue Bb 884.5. Al comparar únicamente a los aislados parentales se observó que no hay diferencia significativa entre ellos. En cuanto a los aislados provenientes de Bb 4, se observa un descenso en el porcentaje de hidrofobicidad. Respecto a los mutantes provenientes del parental Bb 88 todos mostraron valores muy similares, excepto el aislado Bb 884.5 con valores altos de hidrofobicidad (99.25 %). La hidrofobicidad es debida también a las condiciones de

cultivo líquido, sólido o en la naturaleza sobre la cutícula del insecto (Hegedus y col., 1992).



**Figura 10. Hidrofobicidad de conidios *B. bassiana* de diez días de cultivo. Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey;  $P < 0.05$ ).**

La hidrofobicidad es un factor importante en la evaluación de un bioinsecticida ya que es un indicativo de la adhesión a la cutícula del insecto; aunado a lo anterior, es un factor no específico de virulencia, que depende del tipo de insecto y entomopatógeno (Boucias y col., 1988; Hegedus y col., 1992), por lo que resulta de utilidad para la comparación de diversos aislados y relacionar esta característica con la virulencia. La principal vía de infección para HE es a través del tegumento del insecto hospedero, y un prerequisite para iniciar el proceso de infección es la unión de la conidia al tegumento del insecto. La unión de la conidia a la cutícula es un proceso de dos pasos. Primero, se efectúa una adhesión no específica de la conidia con el tegumento que es mediado por interacción hidrofóbica de la epicutícula del insecto y la pared celular de las conidas. El segundo paso es una unión específica, es mediado a través de la asociación entre antígenos de la superficie de la conidia y la cutícula del hospedero (Jeffs y Khachatourians, 1997). Además las capas

hidrófobas exteriores de las conidias las protegen contra condiciones adversas en el ambiente (Boucias y col., 1988). Por lo tanto, la hidrofobicidad es una característica importante para determinar si las conidias de *B. bassiana* poseen el potencial requerido para ser utilizados como bioinsecticidas.

## 6.3 Biensayo

### 6.3.1 Evaluación de la viabilidad de conidios

Después de realizar las pruebas de viabilidad, mediante cámara húmeda por el método de Monzón (2001), los 11 aislados presentaron un intervalo de viabilidad de 50 y 87% a las 20 h. Del Análisis de Varianza y pruebas de comparaciones múltiples se encontró que existen diferencias significativas entre los aislados evaluados ( $P < 0.05$ ). Numéricamente la viabilidad del aislado Bb 881.2 fue superior al resto ( $87.07 \pm 7.66\%$ ), sin embargo, solo hubo diferencia significativa con el aislado Bb 884.5 ( $50.14 \pm 8.96\%$ ) y Bb 49.5 ( $67.10 \pm 4.87\%$ ). Al comparar a los aislados parentales se observa que no hay diferencias significativas entre ellos. Los resultados de esta variable de crecimiento se muestran a continuación (Figura 11).

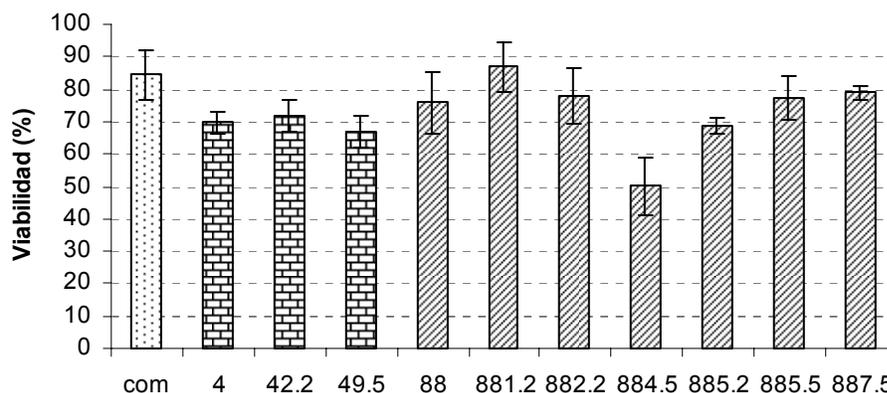


Figura 11. Por ciento de viabilidad de conidios de *B. bassiana* a las 20 h utilizadas en el bioensayo.

Respecto a los aislados provenientes de Bb 4, se observa que no hubo diferencias significativas. En cuanto a los aislados provenientes de Bb 88 se observó que Bb 884.5 se afectó significativamente su viabilidad, este mostró el valor más bajo (50.14%) comparado con el resto de aislamientos provenientes del mismo aislado silvestre. Al seleccionar aislados con una rápida germinación permitirá tener mayor probabilidad de éxito en campo, ya que los aislados con una lenta germinación, pueden ser afectados por variaciones ambientales. Comúnmente la germinación se evalúa a las 24 h (Goettel e Inglis, 1997), sin embargo, es recomendable evaluar este parámetro desde las 12 h, hasta 48 ó 72 horas, para tener una mejor idea del potencial del aislamiento en combinación con su virulencia según lo reportado por Posada y Vega (2005).

### 6.3.2 Prueba de virulencia

En esta etapa, todos los aislados se probaron sobre larvas de *Tenebrio molitor*. Los parámetros medidos fueron: mortalidad máxima, tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y cantidad de conidios producidos por cadáver (Tabla 5). Todos los aislados de *B. bassiana* causaron distinto grado de mortalidad a larvas de *Tenebrio molitor*. Además, en cuanto a mortalidad máxima (%) mostraron diferencias significativas entre aislados; al realizar la prueba de medias (Tukey; P<0.05), se formaron 5 grupos.

**Tabla 5. Tiempo letal 50 (d) y Mortalidad Máxima de aislados de *B. bassiana* sobre larvas de *Tenebrio molitor*.**

Aislado	TL <sub>50</sub> (d)	Mortalidad Máxima (%)
<b>Bb com</b>	4.78 ± 0.27 a	100 ± 0.00 e
<b>Bb 881,2</b>	6.31 ± 0.84 ab	97.92 ± 4.17 de
<b>Bb 885,2</b>	5.91 ± 0.56 ab	97.92 ± 4.17 de
<b>Bb 49,5</b>	6.29 ± 0.69 ab	87.50 ± 8.33 de
<b>Bb 42,2</b>	6.60 ± 0.60 ab	86.74 ± 11.56 de
<b>Bb 4</b>	6.53 ± 0.20 ab	85.04 ± 8.14 cde
<b>Bb 882,2</b>	6.27 ± 0.49 ab	85.00 ± 3.33 cde
<b>Bb 887,5</b>	6.76 ± 0.65 ab	81.25 ± 4.17 bcd
<b>Bb 88</b>	7.73 ± 1.52 b	63.83 ± 10.39 abc
<b>Bb 885,5</b>	7.81 ± 1.56 b	60.98 ± 3.06 abc
<b>Bb 884,5</b>	--	45.83 ± 4.81a

Valores seguidos de la misma letras no presentaron diferencia significativa (P<0.05).

Los aislados que pertenecer al grupo **e** causaron el mayor porcentaje de mortalidad, Bb comercial, Bb 881.2, Bb 885.2, Bb 49,5, Bb 42,2, Bb 4 y Bb 882,2. A

su vez, los aislados que causaron el menor porcentaje de mortalidad fueron, grupo a: Bb 88, Bb 885,5 y Bb 884,5 (Tabla 4, Figura 12).

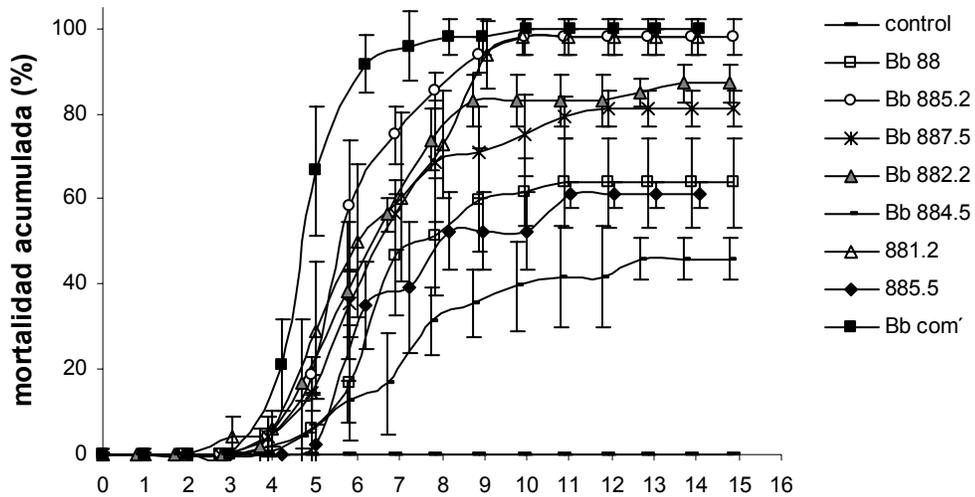
El aislado Bb 4 y sus mutantes presentaron un comportamiento similar de mortalidad máxima sobre *Tenebrio molitor*; aunque el aislado comercial numéricamente fue superior a ellos, en la prueba de medias no presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). (Figura 12). Sin embargo, para el aislado 88 se obtuvieron mutantes superiores al parental respecto a mortalidad máxima (Tabla 5). En el control negativo no se observó mortalidad (Figura 12).

Para el parámetro  $TL_{50}$  se hallaron diferencias significativas formándose dos grupos entre los aislados evaluados (Tabla 5). El  $TL_{50}$  de los aislados más agresivos fue para Bb comercial ( $4.76 \pm 0.27$  d), seguida de la cepas mutante Bb 885.2 ( $5.91 \pm 0.55$  d) y Bb 882.2 ( $6.26 \pm 0.49$  d), entre estos aislados no se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Para el aislados Bb 884.5 no fue posible calcular este parámetro debido a que la mortalidad máxima alcanzada fue inferior al 50% (45.83 %). Respecto a la comparación de los aislado Bb 4, Bb 88 y sus respectivas mutantes no se observo diferencia significativa respecto al  $TL_{50}$  (Tabla 5).

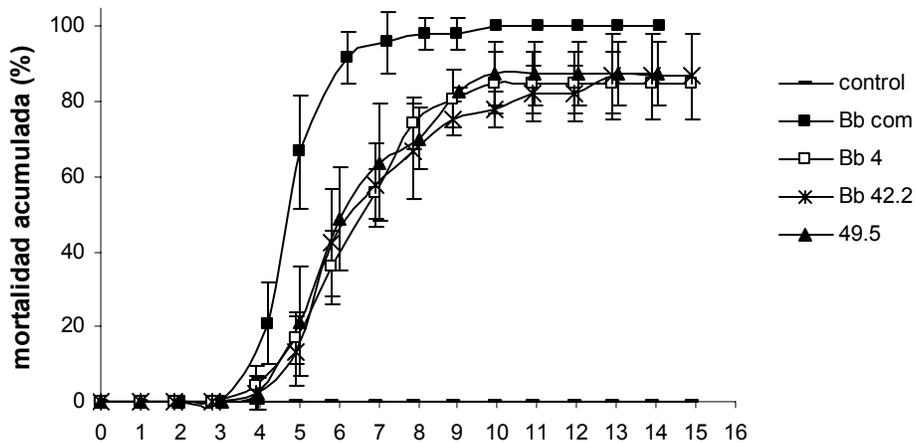
El  $TL_{50}$  varió en un rango de 4.8 a 7.8 días para los once aislados evaluados. Safavi y col. (2007) reportan valores de  $TL_{50}$  entre 3.05 y 8.86 días para *B. bassiana* en larvas de *Tenebrio molitor*. Sin embargo, durante el desarrollo del bioensayo, los insectos fueron mantenidos sin alimento. Estas circunstancias debilita al insecto, haciéndolos más susceptible a la infección por *B. bassiana* y por lo tanto la mortalidad de los insectos no solo depende del efecto por *B. bassiana*, sino también por otros factores (inanición). Existen datos de mortalidad de 100%, reportados por Wang y col. (2002) en larvas de *T. molitor* después de 4 días de inoculación con *M. anisopliae*, con un tiempo de inmersión de 15 segundos.

En cuanto a la observación de la pigmentación del medio de cultivo, la intensidad de la pigmentación del medio no se correlacionó de manera positiva con aislados más virulentos ( $TL_{50}$  y mortalidad máxima). Al respecto, Varela y Morales (1996) observaron que los aislados con pigmentación de la colonia visto a través del agar tuvieron una pobre virulencia contra la broca de café. Por otro lado Feng y

Johnson (1990) observaron diferentes intensidades de coloración a través del agar por esta toxina, el cual sí se correlacionó positivamente con los aislados más virulentos.



d



d

Figura 12. Mortalidad acumulada de *Tenebrio molitor* por aislados de *B. bassiana*.

Es importante resaltar que el incremento de la virulencia de los aislados mutantes más agresivos (Bb 881.2 y Bb 885.2) con respecto a la silvestre (Bb 88) fue de un 24 %, comparando los correspondientes valores de  $TL_{50}$ . Utilizando aislamientos manipulados genéticamente, Fan y col. (2007), obtuvieron datos similares de virulencia. Estos autores quienes reportan un incremento en virulencia con una mejora de este parámetro del 23%, para *B. bassiana*.

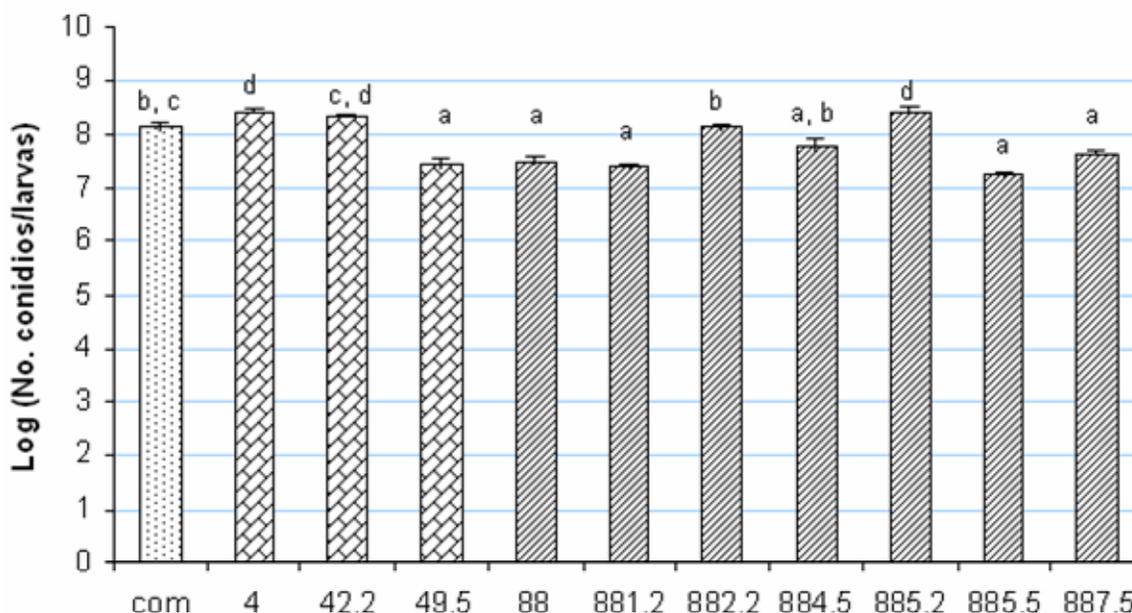
Es importante mencionar que en México no está permitido la liberación de organismos transgénicos (Ley de Bioseguridad, 2005), sin embargo, para HE mejorados por UV no tienen esta limitante. En cuanto al incremento de mortalidad máxima para los mejores aislados (Bb 881.2 y Bb 885.2) respecto al aislado silvestre, se mejoró en un 35%, sin embargo, para el aislado Bb 884.5 este parámetro se vio afectado en un 28%.

Por otro lado, las diferencias en el grado de virulencia pueden deberse a distintas mutaciones pleiotrópicas, puesto que la mutación en estos aislados fue al azar (Hegedus y Khachatourians, 1994; Robledo y col., 2004). Además, es necesario considerar que los aislados silvestres estudiados provienen de diferentes orígenes geográficos, lo que tiene efecto en las variables de virulencia medidas en condiciones controladas (Alves, 1998; Coates y col., 2002).

### **6.3.3 Producción de conidios en larvas muertas**

La determinación de la cantidad de conidios producidos por cadáver ( $\Phi$ ) de *Tenebrio molitor* se estimó después de 12 días, esto para asegurar que *B. bassiana* completara su ciclo de vida (saprogénesis)(Posada y col., 2005). La cantidad de conidios por larva se muestra en la Figura 13. La prueba de medias mostró diferencia significativa (Tukey;  $P < 0.05$ ) entre el aislado comercial y los aislados Bb 885.2, Bb 4 y Bb 42.2, estos últimos fueron superiores. Al comparar a los aislados parentales, se observa que hay diferencias significativas entre los tres, siendo Bb 4 el que produjo la mayor cantidad de conidios por larva. En cuanto a los aislados mutantes de Bb 4,

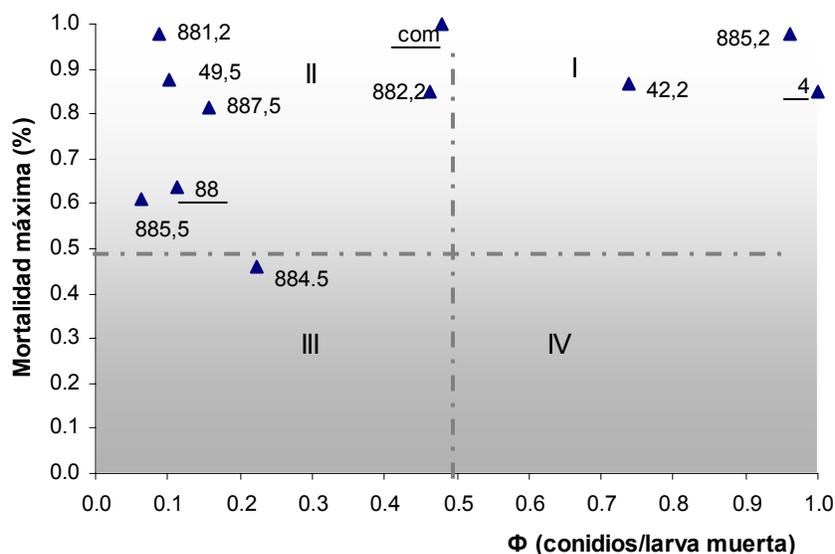
hubo una declinación en la producción de conidios por larva. Con relación a los aislamientos provenientes de Bb 88, la mayoría mostró un comportamiento similar, excepto Bb 885.2 que fue superior a su parental y al resto (Figura 13)



**Figura 13. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Tenebrio molitor*. Barras con la mismas letras no presentaron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).**

Los parámetros fisiológicos mortalidad máxima y cantidad de conidios por larva muerta se normalizaron para obtener la Figura 14. Los aislados del cuadrante I (Bb 885.2, Bb 4 y Bb 42.2) son las mejores para estas dos variables. Como se mencionó anteriormente, en cuanto a mortalidad máxima no hay diferencia significativa entre el aislado comercial y los aislados del cuadrante uno, sin embargo, en cuanto a cantidad de conidios por larva, los aislados del cuadrante I producen prácticamente el doble que el aislado comercial; una característica de gran importancia en la selección de mejores aislados. Por otro lado la mayoría de los aislados están en el cuadrante II, con características de producción de conidios por debajo del promedio y con mortalidad máxima por arriba del promedio, de hecho dos de los aislados más virulentos (Bb 881.2 y Bb com) se encuentran en este cuadrante. En cuanto a la ubicación en el plano para estas dos variables respecto a los

aislados parentales se muestra que Bb com y Bb 88 están en el cuadrante II y que el aislado Bb 4 esta ubicado en el cuadrante I, sobresaliendo para ambas variables. Por otro lado, el cuadrante IV vacío, indica que no hubo aislados que causaran una pobre mortalidad y que produjeran abundante conidias sobre insectos muertos.



**Figura 14. Distribución de aislados de *B. bassiana* sobre un plano formado por valores relativos de mortalidad máxima (%) y cantidad de conidios por larva muerta ( $\Phi$ ).**

Respecto a los aislados que produjeron pocos conidios, cuadrante II y III, hay diversas razones que pueden explicarlo, tales como la afectación para aprovechar nutrientes o la carencia de factores esenciales requeridos para el desarrollo de las conidias (Gottwald y Tedders, 1984; Tanada y Kaya, 1993). La capacidad de esporulación del hongo sobre su hospedero es fundamental para la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo, ya que permite reinfecciones a partir de insectos muertos (Gottwald y Tedders, 1984; Tefera y Pringle, 2003). La dispersión de unidades infectivas hacia nuevos hospederos representa una fase bastante crítica del ciclo del patógeno, debido a la acción negativa de algunos factores abióticos como la temperatura y radiación UV. Edginton y col. (2000) observaron que los

conidios de *B. bassiana* son desactivados completamente después de 1 h a la exposición a la luz solar. Por otro lado, un mayor número de conidios producido por cadáver compensaría parcialmente la elevada desactivación de conidios por las condiciones ambientales, impidiendo la re-infección de nuevos hospederos (Hajek y St Leger, 1994). De acuerdo a esto, los aislados Bb 885.2 y Bb 4 son los más promisorios, debido a que producen abundante conidias por insecto muerto, además de que mostraron valores de  $TL_{50}$  superiores al promedio de todos los aislados.

Como se mencionó, la producción de conidios de *B. bassiana* sobre cadáveres provee una fuente de inóculo fresco directa sobre el agroecosistema. Pero además, el hongo al pasar por el hospedero, mantiene la virulencia (Tanada y Kaya, 1993; Lomer y col., 2001; Brownbridge y col., 2001; Jenkins y col., 1998). De manera interesante, el aislado Bb 885.2 produjo abundante conidias tanto en medio de cultivo artificial como en el insecto muerto, esto representa una ventaja comercial respecto a costos de producción de conidios en sustrato artificial. En la tabla 6 se presenta un resumen de todas las variables evaluadas en este estudio.

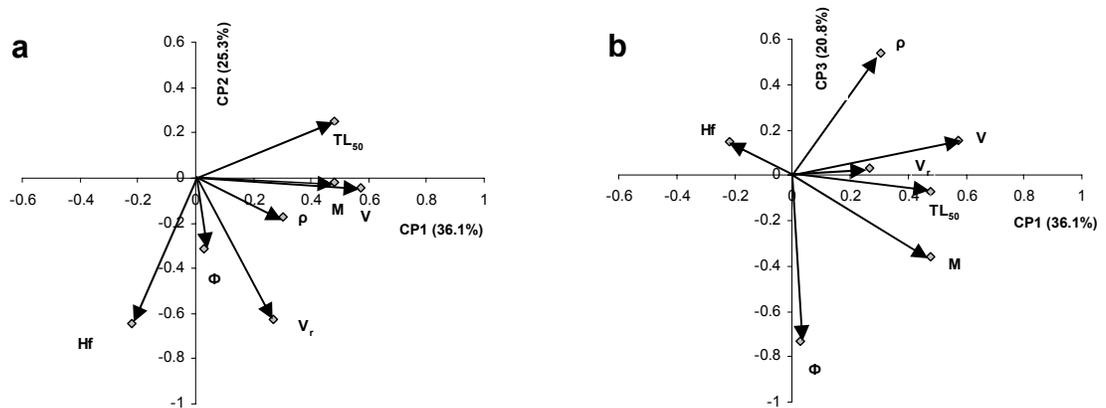
Tabla 6. Resumen de variables de crecimiento y parámetros de virulencia e hidrofobicidad obtenidos de diferentes aislados de *B. bassiana*.

Aislamiento	Hf (%)	Viabilidad (%)	V <sub>r</sub> (mm/d)	conidios/cm <sup>2</sup> (x10 <sup>7</sup> )	TL <sub>50</sub> (d)	Mortalidad Máxima (%)	conidios/larva (x10 <sup>7</sup> )
<b>Bb com</b>	90.83 ± 11.31 bc	84.47 ± 7.66 bc	2.34 ± 0.03 de	10.8 ± 0.007 ab	4.78 ± 0.27 a	100 ± 0.00 e	13.21 ± 3.07 bc
<b>Bb 881,2</b>	85.93 ± 9.49 bc	87.07 ± 7.66 c	2.43 ± 0.03 e	75.6 ± 0.055 f	6.31 ± 0.84 ab	97.92 ± 4.17 de	2.44 ± 0.37 a
<b>Bb 885,2</b>	81.99 ± 4.09 b	68.80 ± 2.42 b,c	2.23 ± 0.01 cde	34.7 ± 0.047 d	5.91 ± 0.56 ab	97.92 ± 4.17 de	26.54 ± 5.91 d
<b>Bb 49,5</b>	61.92 ± 3.55 a	67.10 ± 4.87 b	1.77 ± 0.12 a	13.4 ± 0.016 abc	6.29 ± 0.69 ab	87.50 ± 8.33 de	2.78 ± 0.59 a
<b>Bb 42,2</b>	83.19 ± 5.40 bc	71.52 ± 4.90 bc	2.29 ± 0.01 cde	7.3 ± 0.008 ab	6.60 ± 0.60 ab	86.74 ± 11.56 de	20.38 ± 2.51 cd
<b>Bb 4</b>	91.69 ± 4.38 bc	69.64 ± 3.34 bc	2.44 ± 0.10 e	7.5 ± 0.009 ab	6.53 ± 0.20 ab	85.04 ± 8.14 cde	27.58 ± 2.63 d
<b>Bb 882,2</b>	77.83 ± 7.15 ab	78.11 ± 8.67 bc	2.31 ± 0.05 de	4.3 ± 0.006 ab	6.27 ± 0.49 ab	85.00 ± 3.33 cde	12.75 ± 2.38 b
<b>Bb 887,5</b>	85.78 ± 1.42 bc	79.08 ± 2.18 bc	2.40 ± 0.05 e	60.6 ± 0.075 e	6.76 ± 0.65 ab	81.25 ± 4.17 bcd	4.33 ± 0.75 a
<b>Bb 88</b>	87.78 ± 0.91 bc	75.88 ± 9.36 bc	1.98 ± 0.06 b	15.4 ± 0.020 bc	7.73 ± 1.52 b	63.83 ± 10.39 abc	3.13 ± 0.62 a
<b>Bb 885,5</b>	82.14 ± 2.19 b	77.34 ± 6.55 b,c	2.38 ± 0.02 de	22.3 ± 0.018 c	7.81 ± 1.56 b	60.98 ± 3.06 abc	1.75 ± 0.27 a
<b>Bb 884,5</b>	99.25 ± 0.03 c	50.14 ± 8.96 a	2.14 ± 0.03 bcd	16.5 ± 0.018 bc	--	45.83 ± 4.81 a	6.19 ± 2.00 ab

Las letras distinguen los grupos que resultaron de la prueba de medias (Tukey; P<0.05).

## 6.4 Análisis de correlación de variables mediante Análisis de Componentes Principales

El análisis del diagrama generado mediante ACP para las variables medidas se muestra en las Figuras 15a y 15b.



**Figura 15. Diagrama derivado del Análisis de Componentes Principales con los vectores de cada variable (medidos en *B. bassiana*). a) CP1 vs. CP2, b) CP1 vs. CP3 (82.1% de varianza explicada acumulada de los tres primeros componentes). Donde, V = viabilidad, Hf = hidrofobicidad,  $\rho$  = densidad superficial de conidios en cajas Petri,  $\Phi$  = cantidad de conidios producidos por larva muerta, TL<sub>50</sub> = tiempo al que se alcanzó el 50% de mortalidad y M = por ciento de mortalidad máxima (%).**

Las Figs. 15a y 15b muestran que hay una correlación positiva entre la variable por ciento de mortalidad máxima y las variables viabilidad ( $r = 0.588$ ),  $\rho$  ( $r = 0.236$ ), y  $V_r$  ( $r = 0.221$ ); siendo en la viabilidad en donde se obtiene la mayor correlación con esta variable ( $r = 0.588$ ) (Fig. 15a y Tabla 7). Es importante destacar que los parámetros V,  $\rho$ , y  $V_r$  se midieron previo del bioensayo. En literatura se ha reportado que la viabilidad es una de las características que más se ha correlacionado de manera positiva con la mayor virulencia (Hall, 1984; Samuels y col., 1989; Varela y col., 1996; Altre y col., 1999; Safavi y col., 2007); en este estudio, se demostró que los aislados más virulentos se correlacionaron de manera positiva con la más alta capacidad de germinación (Bb 881.2 y Bb comercial). Asimismo en esta gráfica puede observarse una correlación positiva entre la variable TL<sub>50</sub> y viabilidad (Figura

15) debido a que entre sí tienen un ángulo menor a 90°, además el coeficiente de correlación entre estas variables es mayor que el resto ( $r = 0.67$ ) (Tabla 7).

También en las Figs. 15a y 15b se observa una correlación positiva entre las variables  $\rho$ ,  $\Phi$  y el por ciento de mortalidad máxima en ambos diagramas (Fig. 15a y 15b), aunque el grado de correlación lineal es bajo. La Tabla 7 muestra el coeficiente de correlación lineal para las variables, M y  $\Phi$  ( $r = 0.425$ ), y M y  $\rho$  ( $r = 0.236$ ). En cuanto a la hidrofobicidad de los conidios se observó una relación inversa respecto al por ciento de mortalidad máxima (%) ( $r = -0.355$ ) y  $TL_{50}$  ( $-0.492$ ) en ambas figuras (Fig. 15a y 15b) y también en la Tabla 7.

**Tabla 7. Matriz de correlación para cada combinación de par de variables.**

Correlación $\rho$		$\rho$	$V_r$	V	Hf	$\Phi$	$TL_{50}$	M
Correlación $\rho$	$\rho$	1.000	0.334	0.397	0.068	-0.350	0.120	0.236
	$V_r$	0.334	1.000	<b>0.443</b>	<b>0.514</b>	0.301	0.107	0.221
	V	0.397	0.443	1.000	-0.158	-0.168	<b>0.670</b>	<b>0.588</b>
	Hf	0.068	0.514	-0.158	1.000	0.172	-0.492	-0.355
	$\Phi$	-0.350	0.301	-0.168	0.172	1.000	-0.004	<b>0.425</b>
	$TL_{50}$	0.120	0.107	0.670	-0.492	-0.004	1.000	0.367
	M	0.236	0.221	0.588	-0.355	0.425	0.367	1.000
valor p	$\rho$		0.158	0.113	0.421	0.146	0.363	0.243
	$V_r$	0.158		<b>0.086</b>	<b>0.053</b>	0.184	0.377	0.256
	V	0.113	0.086		0.321	0.311	<b>0.012</b>	<b>0.029</b>
	Hf	0.421	0.053	0.321		0.306	0.062	0.142
	$\Phi$	0.146	0.184	0.311	0.306		0.495	<b>0.096</b>
	$TL_{50}$	0.363	0.377	0.012	0.062	0.495		0.134
	M	0.243	0.256	0.029	0.142	0.096	0.134	

La Tabla 8 muestra las ecuaciones de regresión simple y múltiple que se obtuvieron considerando las variables de crecimiento medidos previo al bioensayo, así como la producción de conidios por larva muerta evaluado después del bioensayo. Con estas ecuaciones se pretende estimar el por ciento de mortalidad máxima y  $TL_{50}$  utilizando esta información. Los modelos obtenidos muestran que la ecuaciones 1 y 2 son las que mejor predicen el por ciento de mortalidad máxima. En cuanto a los modelos de  $TL_{50}$ , la ecuación 5 es la que mejor predice esta variable.

**Tabla 8. Ecuaciones de regresión múltiple para las variables respuestas  $TL_{50}$  y mortalidad máxima.**

Variable	Modelo	Coefficiente de correlación (r)	Ecuación
M	$M = 6.9 + V$	0.5863	1
	$M = 7 + V + 2 \times 10^{-10} \rho$	0.5863	2
	$M = -15 + 1.16V + 9.45 \times 10^{-8} \Phi$	0.7914	3
	$M = 12.60 + 1.03V - 3.43V_r + 7.78 \times 10^{-10} \rho$	0.5874	4
$TL_{50}$	$TL_{50} = 18.9 - 0.16V$	0.7582	5
	$TL_{50} = 16.13 - 0.17V + 1.781V_r$	0.774	6
	$TL_{50} = 17.77 - 0.19V + 1.31V_r + 2.08\rho$	0.8011	7

Es importante mencionar que en la interpretación del ACP se engloba a todas las variables medidas en la colección de aislados, y que las observaciones antes realizadas son una tendencia general que abarca a todas estas variables. Sin embargo de manera particular, hubo algunos aislados, los de mayor virulencia (Bb 881.2 y Bb 885.2) que se correlacionaron de manera más efectiva con las variables de crecimiento viabilidad, velocidad de crecimiento radial y producción de conidios en caja Petri (Tabla 6 ).

La ubicación de cada aislados en el plano de ACP y las respectivas variables que los caracterizan se muestra en la Fig. 16. Se observa que el aislado Bb 884.5 es diferente respecto al resto, debido a que destaca por sus valores distintos.

Esta correlación positiva entre algunas variables de crecimiento con la virulencia, observaciones derivadas del ACP, coinciden parcialmente con lo reportado en la literatura, donde se ha observado que algunos aislados más virulentos presentan fenotipos de crecimiento que incluyen altas velocidades de germinación (Samuels y col., 1989; Khachatourians, 1996; Altre y col., 1999; Varela y col., 1996; Safavi y col., 2007), de crecimiento (Samuels y col., 1989; Khachatourians, 1996; Varela y col., 1996) y densidad superficial de esporulación (Feng y col., 1990; Khachatourians, 1996; Varela y col., 1996).

Sin embargo, es importante señalar que tratar de explicar el grado de virulencia considerando solo fenotipos de crecimiento o algunas características morfológicas es limitado, debido a que para algunas combinaciones de aislados-hospedero estas características o algunas no están relacionados con la virulencia o no se observó una relación efectiva, sin embargo, como se mencionó anteriormente para algunos aislados estas características si se relacionaron con fenotipos virulentos hacia *Tenebrio molitor*. Además, *B. bassiana* emplea múltiples mecanismos de acción durante el proceso de infección de su hospedero, que comprende varios pasos, muchos de los cuales no están dilucidados, particularmente a nivel molecular (Talaiei-Hassanloui y col., 2006; Cho y col., 2006).

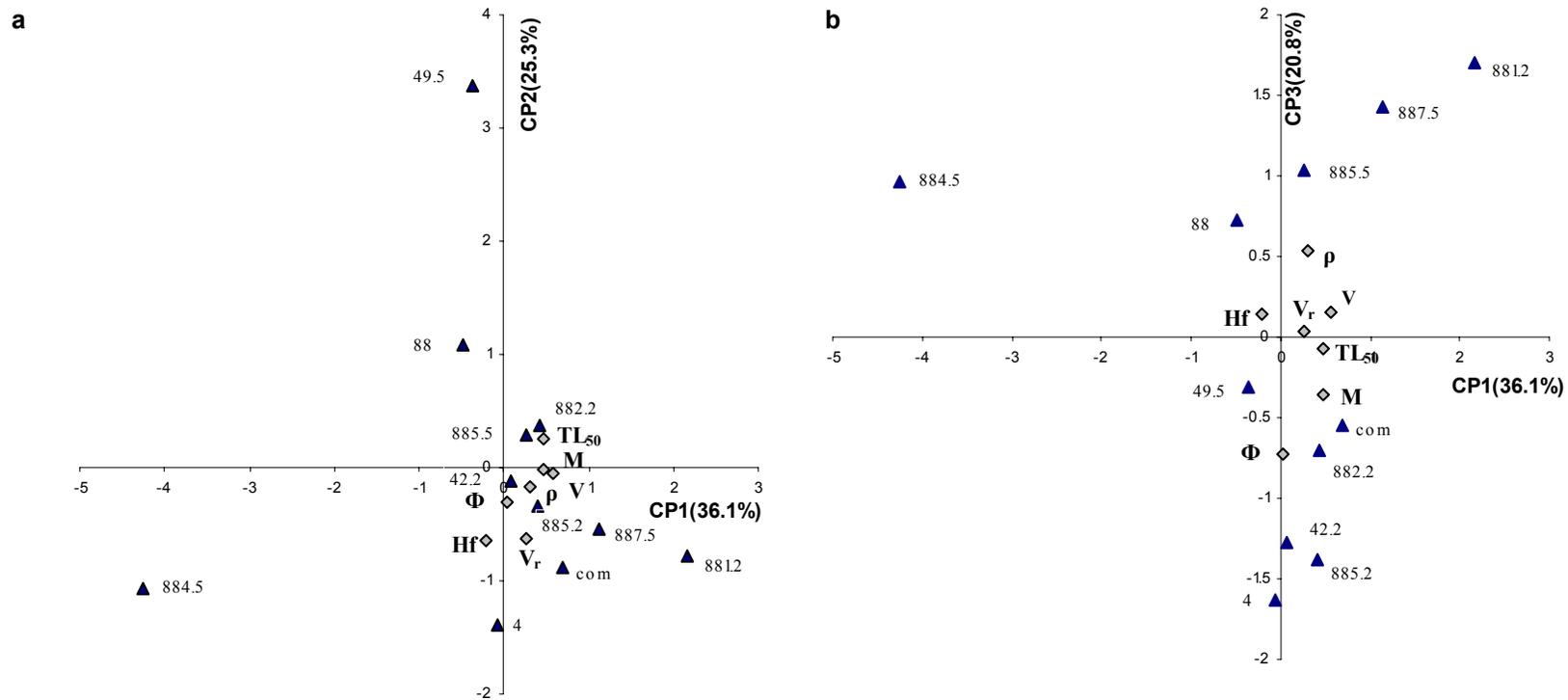


Figura 16. Diagrama derivado del análisis de componentes principales de las variables evaluadas así como la ubicación de cada aislados de *B. bassiana* en el plano. a) CP1 vs. CP2, b) CP1 vs. CP3 (82.1% de varianza explicada acumulada de CP1 a CP3). Donde, V = viabilidad, Hf = hidrofobicidad, ρ = densidad superficial de conidios en cajas Petri, = cantidad de conidios producidos por larva muerta, TL<sub>50</sub> = tiempo al qué se alcanza el 50% de mortalidad y M = mortalidad máxima (%).

## 7. Resumen de resultados

Derivado del estudio efectuado es posible mencionar las observaciones más importantes:

1. El método de conservación en agua desionizada después de 3 meses presentó un rango de viabilidad entre 25% y 62% (directamente del vial). Sin embargo, después de una resiembra a los tres meses la viabilidad aumentó considerablemente (50-90 %), donde los aislados Bb 885.2 y Bb 885.5 presentaron los valores más altos. También se puede decir que el método de conservación afectó de igual manera tanto a aislados parentales como mutados; se observó declinación de la viabilidad a través del tiempo.
2. Los aislados que mostraron una mayor viabilidad,  $V_r$ , densidad de conidios en cajas Petri, fueron los de mayor virulencia; estas variables de crecimiento se midieron previo al bioensayo. La baja viabilidad del aislado Bb 884.5 explica su pobre virulencia y no su alta hidrofobicidad. Por lo tanto las diferencias en los parámetros de crecimiento pueden explicar los diferentes grados de virulencia.
3. La afirmación previa fue corroborado mediante el Análisis de Componentes Principales que se utilizó para indagar interrelaciones entre variables de estudio. Se encontraron relaciones parciales entre variables de crecimiento y virulencia de *B. bassiana* al ser ensayados en larvas de *Tenebrio molitor*, el porcentaje de mortalidad máxima (%) se correlacionó de forma notoria con las variables en este orden, viabilidad de conidios, producción de conidios en caja Petri (densidad superficial) y velocidad radial.

4. En cuanto a la hidrofobicidad de los conidios, no se observó ninguna relación clara con la virulencia.
5. El aislado Bb 885.2 produjo más del doble de conidios por larva infectada comparada con el aislado comercial, por lo que podría ser considerado para estudios posteriores con la idea de llegar a ser una opción para un formulado comercial.
6. Aunado a lo anterior, se logró mejorar hasta en un 24% el  $TL_{50}$  del aislado Bb 885.2 en relación al aislado parental; en cuanto a mortalidad máxima (%) se incrementó hasta en un 35% para los aislados mutantes Bb 881.2 y Bb 885.2 en relación a su aislado parental.
7. De la colección de aislados evaluados se vio que existen al menos dos (Bb 881.2 y Bb 885.2) con características interesantes de virulencia (porcentaje de mortalidad máxima) similares al aislado comercial en los parámetros evaluados. Estos pueden ser seleccionados para estudios posteriores.
8. Este método de evaluación y selección de aislados puede ser utilizado como estrategia para seleccionar aislados más virulentos. De manera que se evalúen solo aquellos parámetros que se correlacionaron positivamente con la virulencia.

## 8. Conclusión

Se demostró que la **V** de los conidios, variable de crecimiento que se midió previo al bioensayo, fue el de mayor correlación positiva ( $r = 0.588$ ) con la virulencia, las demás variables de crecimiento  $\Phi$  ( $0.425$ ),  $\rho$  ( $r = 0.236$ ) y  $V_r$  ( $r = 0.221$ ) mostraron una menor correlación. En cuanto a la **Hf** ( $r = -0.355$ ) de los conidios no se encontró una correlación positiva con la mayor virulencia. La afirmación previa fue corroborada mediante un Análisis de Componentes Principales y coeficientes de regresión simple que se utilizó para indagar correlaciones entre variables de estudio.

## 9. Recomendaciones

1. El análisis genético de otros factores permitirá correlacionarlos con determinantes de patogenicidad en aislados afectados, de manera positiva o negativa después de la mutagénesis al azar.
2. Es recomendable que después de las resiembras del hongo para evaluar la viabilidad de los conidios conservados también se evalué la virulencia mediante sistemas de bioensayos, para corroborar la conservación de ambos (viabilidad y virulencia).
3. Se recomienda evaluar un método más sensible para evaluar la hidrofobicidad, de manera que se discrimine adecuadamente entre los diferentes aislados.

## 10. Bibliografía.

- Alatorre Rosas, R. 2004. Hongos Entomopatógenos. En Memorias del XXII Congreso Nacional de Control Biológico, SMCB. Guanajuato, México.
- Alves SB. 1998. Fungus Entomopatogenicos. p. 289-370. Controle microbiano de insetos. Fundacao de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaga, Sao Paulo, Brasil.
- Alves SBB, Rossi LS, Lopes RB, Tamai MA, Pereira RM. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharlis* (Lepidóptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal Invertebrate Pathology* 81:70-77.
- Altre JA, Vandenberg JD, Cantone FA. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamondback Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 332-338.
- Barnes SE, Moore D. 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research* 101: 662-666.
- Berlanga-Padilla, AM, Hernández-Velásquez VM. 2003. Control microbial de mosca pinta *Aenelolamia* spp. con *Metarhizium anisopliae*. Ficha técnica CB-08. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. México.
- Berlanga-Padilla, AM, Hernández-Velásquez VM. 2003. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Ficha técnica CB-23. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. México.
- Bidochka, MJ., Khachatourians, G. 1991. The implication of metabolic acids produce by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal Invertebrate Pathology* 58:106-117.
- Bidochka, MJ., Khachatourians, G. 1993. Regulation of extracellular N-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal Microbiology*. Vol. 39, p 6-12.
- Borman AM, Szekey A, Campbell CK, Johson EM. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161, 361-368.
- Boucias, DG., Pendland, JC. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. Pag. 1-14.

- Boucias, DG., Pendlland, JC. Latge, JP. 1988. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* vol 54, No. 7: 1975-1805.
- Bravo-Mojica, H. 2004. Control biológico en el contexto del MIP. En *Memorias del XXII Congreso Nacional de Control Biológico*, SMCB. Guanajuato, México. P. 90-92.
- Brownbridge M, Costa S, Jaronki ST. 2001. Effect of in vitro Passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77,280-283.
- Bustillo PAE, Marin M P. 2002. ¿Como reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la braca de café? Hoja Técnica No. 40 MIP(Costa Rica) No. 63 p. i-iv.
- Butt TM, Goettel MS. 2000. Bioassays with Entomogenous Fungi. In: A. Navon and K.R.S. Ascher eds. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*: Willingford, UK: CABI Publishing,141-195.
- Candas, M., Bulla, LA. 2003. Microbial Insecticides. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © 2002 by John Wiley & Sons.
- Charnley AK. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in Insects. In: Whipps JM, Lumsden RD, editors. *The biotechnology of fungi for improving plant growth*. London: Cambridge University Press. pp 85-125.
- Chatfield C y Collins AJ. 1980. *Introduction to multivariate Analysis*. Chaman and Hall Ltd. Londres, Gran Bretaña.
- Cho EM, Liu L, Farmerie W, Keyhani O. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. 1. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. *Microbiology* 152: 2843-2854.
- Clarkson JM y Charnley AK. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* vol. 4 No. 5 : 197- 203.
- Coates BR, Hellmich R, Lewis L. 2002. Allelic variation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome* 45: 125-132
- Couteaudier Y, Viaud M, Riba G. 1996. Genetic Nature, Stability, and Improved Virulence of Hybrids from Protoplast Fusion in *Beauveria*.
- Deshpande MV. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3):229-243.
- Edginton S, Segura H, De la Rosa W, Williams T. 2000. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. *Int. J. Pest Manag.* 45: 169-176.

- Ehrenberg ASC. 1975. Data reduction. *Análisis and Interpreting Statistical Data*. John Wiley & Sons. Gran Bretaña.
- 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
- Ellis JJ. 1979. Preserving fungus strains in sterile water. *Mycologia* 71: 1072-1075.
- Escalona-Buendía EB. 1995. Evaluación estadística de metodologías para pruebas sensoriales a través de estudios de caso. Tesis de Maestría UAM-Iztapalapa.
- 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. 1997. Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monospóricos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*, 48(4):217-224.
- Estrada-Valencia MN, MN., Vélez-Arango PE. 2003. Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*: No. 70 p. 97-103
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ, Pei Y. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strain overexpressing and engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 73, No. 1: 295-302.
- Farges J y Remaudiere G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia* 62: 31-37
- Feng MG, Jonson JB. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* vol. 19 (3): 185-790.
- Fukatzu T, Sato H, Kuriyama H. 1997. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Journal Invertebrate Pathology* 70: 203-208.
- FIRA BOLETIN INFORMATIVO, 2003. Agricultura orgánica una oportunidad sustentable de negocios para el sector agroalimentario mexicano. No. 322, Vol. XXXV, 10ª. Epoca, año XXXI, Diciembre 2003.
- Garza-López, PM, Loera-Corral, O. 2006. Comparación de métodos de conservación de aislados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (MONILIALES: MONILIACEAE). XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, Noviembre 2006.

- Gerber G. H. 1975. Reproductive behavior and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae). *Can. Ent.* 107: 551-559.
- Gillespie AT, Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science* 27: 203-215.
- Goettel MS y Inglis DG. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: LA Lacey ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA, Academic Press, INC. 213-249.
- Gottwald TR, Tedders WL. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. *Environmental Entomology* 13: 557-560.
- Hajek AE., St. Legar, RJ. 1994. Interactions between fungal pathogen and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- Hajek AE. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In Jones, editor. *Advances in microbial ecology*. New York: Plenum, pp 193-249.
- Hall RA. 1980. Effect of repeated subculturing on pathogenicity morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal Invertebrate Pathology* 36, 216-222.
- Harold FM. 1999. In pursuit of the whole hypha. *Fungal Genetic Biology* 27: 128-133.
- Hegedus DD, Bidochka MJ, Miranpuri GS, Khachatourians GG. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 785-789.
- Hegedus DD y Khachatourians GG. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances* 13 (3): 455-490.
- Hegedus DD, Khachatourians GG. 1994. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal Microbiology* vol 40:766-775.
- Hernández-Velásquez VM Berlanga-Padilla, AM. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Ficha técnica CB-03. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. México.
- Hernández-Velásquez VM Berlanga-Padilla, AM. *Paecilomyces* spp. ENEMIGO NATURAL DE MOSQUITAS BLANCAS. Ficha técnica CB-06. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. México.
- Hodge KT. 2003. Clavicipitaceous anamorphs. In *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impact*, ed. JF White, CW Bacon, NL Hywel-Jones, JW Spatafora, pp. 751-752. New York: Marcel Dekker.

- Hope K. 1968. Methods of Multivariate Analysis. University of London Press Ltd. Gran Bretaña.
- Humber, RA. 1997. Fungi: preservation of cultures, p 269-279. In: Lacey, L. (ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic press.
- Inglis, GD., Goettel, MS., Butt and Straser, TM. 2001. Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potential. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan p 23-45.
- James RR, Bruckner JS, Freeman TP. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Journal Invertebrate Pathology 84: 67-74.
- Jeffs LB, Khachatourians GG. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. Canadian Journal Microbiology: 43: 23-28.
- Jeffs LB, Xavier IJ, Matai RE, Khachatourians GG. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Lecanicillium*. Canadian Journal Microbiology: 45: 936-948.
- Jenkins EN, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information Vol. 19 No. 1 21N-31N.
- Joshi L, St Leger RJ, Bidochka MJ. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters 125: 211-218.
- Kamp AM, Bidochka MJ. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology 35: 74-77
- Kershaw MJ, Talbot NJ. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Genet. Biol. 23: 18-33, 83.
- Khachatourians GG. 1991. Physiology and Genetics of Entomopathogenic fungi. Handbook of Applied Mycology Vol. 2, Humans, Animals and Insect. Edited by: Dilp k. Arora, Livero Ajello y KG Mukeji. Marcel Dekker, INC. New York
- Khachatourians GG. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. The Mycota VI . Human and animal relationships. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 332-363.
- Krasnoff SB, Watson DW, Gibson DM, Kwan EC. 1995. Behavioral effects of the entomopathogenic fungus, *Entomophthora muscae* on its host *Musca domestica*: postural changes in dying host and gated pattern of mortality. Journal Insect Physiology 41: 895-903.

- Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial, Viernes 18 de Marzo de 2005. Secretaría de Salud. México.
- Liu, H., Skinner, M., Parker BL. 2003. Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera : Miridae). Journal Applied Entomology 127: 299-304
- Liu H, Skinner M, Brownbridge M, Parker BL. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera : Miridae). Journal of Invertebrate Pathology 82: 139-147.
- Loera, O., Aguirre, J., Viniegra-González, G. 1999. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. Enzyme and Microbial Technology, 25: 103-108.
- Loera, O. 2005. Mejoramiento de aislados de *Beauveria bassiana*. Simposium en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Mérida, Yucatán.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Lagewald TM. 2001. Biological Control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology 46:667-702.
- López-Lastra, C.C., Hajek, A.E., Humber, R.A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of botany, 80 1126-1130
- Manly B.F.J. 1986. Multivariate Statistical Methods. A Primer: Chapman & Hall, UK
- Matson PA, Parton WJ, Power AG y Swift MJ. 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. Science 277: 504-509.
- Melzer MJ, Bidochka MJ. 1998. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations for fungal growth and virulence. Mycologia 90: 586-594.
- Mier T, Toriello C, Ayala-Zermeño MA, Navarro-Barranco H. 2005. Conservación de HE para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco.
- Milner RJ, Barrientos-Lozano L, Driver F y Hunter D. 2003. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* – strain characterization, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. Biocontrol 48: 335-3348.
- Montoya-Sansón E, Zavala-Ramirez M, Mier T, Hernandez-Velazquez 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.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63: 95-103.

- Morrison DF. 1990. Multivariate statistical methods. McGraw Hill. 3a. Edición. EUA.
- Neves PMOJ, Hirose EE. 2005. *Beauveria bassiana* strains selection for Biological Control of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera: Scolytidae). *Neotropical Entomology* 34(1): 077-082.
- Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R y Loera O. 2005. Effect of water activity on grown and conidia production in *Beauveria bassiana*. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
- Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R y Loera O. 2006. Efecto del nivel de inóculo sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación den medio sólido. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, Noviembre 2006.
- OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL. Medio de cultivo para la preservación de virulencia en aislados de hongos entomopatógenos. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. La Habana Cuba. Certificado de Autor de Invención. <http://www.ocpi.cu/doc/1989/t11186.PDF>. 20 marzo 2006.
- Ortiz Meza JA, González Hernández A, Salazar Solís E, Torres Guzmán C. 2005. Aislamiento de cDNAs de expresión diferencial durante el crecimiento *Metarhizium anisopliae* en cutícula de *Phyllophaga ravidata* mediante la técnica de RDA. . International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
- Padilla Guerrero, IE; González Hernández A; Salazar Solís, E; Torres Guzmán, JC. 2005. Estudios para evaluar la participación de gene de expresión diferencial en el proceso de invasión de *Metarhizium anisopliae* a su hospedero. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
- Pérez-López C. 2005. Técnicas Estadísticas con SPSS 12 Aplicaciones al análisis de datos. Prentice Hall paginas; 824.
- PROBIOMA. El control biológico vs. Transgénicos. [http://www.wikilearning.com/el\\_control\\_biologico\\_vs\\_transgenicos-wkccp-2819-1.htm](http://www.wikilearning.com/el_control_biologico_vs_transgenicos-wkccp-2819-1.htm) 15 Octubre, 2007.
- Pucheta Díaz, M., Flores Macias, A., Rodríguez Navarro, S., De la Torre, Mayra. 2006. Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. INCI vol. 31 No. 12.
- Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yield conidia with increased UV-tolerance. *Journal Invertebrate Pathology* 93: 127-134.
- Riquelme M, CG., Reynaga Peña, CG., Bartnicki-García, S., Gires, G. 1998. What determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Gen. Biol.* 24: 101-109.

- Rivera F, Valdés M, Mier T. 1998. Estudio preliminar sobre la obtención y conservación de propágulos de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas. Revista Mexicana de Micología 14: 33-36.
- Roberts DW y St Leger RJ. 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. Advances in Applied Microbiology, Volumen 54:1-70.
- Robledo M., Alatorre-Rosas R., Viniegra-González G y Loera O. 2005. Effects of improved *Beauveria bassiana* strains toward *Sphenarium purpuracens* (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE). International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
- Rodríguez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. 2004. Caracterización enzimática de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* y su mutante en cultivo sólido. Memorias: XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa.
- Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., y Viniegra-González G. 2005. Estimation of  $\mu$  for *Beauveria bassiana* on agar plates and its correlation with complex solid cultures. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
- Rodríguez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. 2007. Caracterización fisiológica de aislamientos de *Beauveria bassiana* en cultivo sólidos, en medio sólido y en medio superficial. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán. Junio, 2007.
- Romano Machado JM. 1996. Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría UAM-Iztapalapa.
- Roy, HE., Pell, JK. 2000. Interactions Between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implications for Biological Control. Biocontrol Science and Technology 10: 737-752.
- Roy HE, Steinkraus DC, Eilenberg J, Haje AE, Pell JK. 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. Ann. Rev. Entomol. 51:331-57.
- Ryan, M.J., P.D. Bridge, D. Smith and P. Jeffries. 2002. Phenotypic degeneration during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. Journal of Applied Microbiol. 93, 163-168
- Samsinakova A y Kalalova. 1982. The Influence of a single spore isolated and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. J. of Invertebr Patholo 42, 156-161.
- Samson, RA; Evans HC; Latge JP. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, New York, USA

- Shapiro-Ilan, DI; Fuxa, JR; Lacey, LA; Onstad, DW; Kaya, HK. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1-7.
- Posada FJ, Vega FE. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science* 5:37: 1-10
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasouljan GR, Bandani AR, Butt RM. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 270: 116-123.
- Samuels KDZ, Heale JB, Llewellyn M. 1989. Characteristics Relating to the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 25-31.
- Sanchez-Peña SR y Thorvilson HG. 1995. Effect of Long-Term Cryogenic Storage and Conidial Suspending Agent on the Virulence of *Beauveria bassiana* toward *Solenopsis invicta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 65,248-252.
- Shah FA, Wang CS, Butt TB. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251:259-266
- Shimazu M, Mitsuhashi W, Hashimoto H. 1988. *Cordyceps brongniartii* spp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 29: 323-330.
- Soto, G. Memorias del Taller Agricultura Orgánica: una herramienta para el desarrollo rural sostenible y la reducción de la pobreza. [[http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/30476\\_es\\_RUTAtaller.pdf](http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/30476_es_RUTAtaller.pdf)] 2006-02-21.
- St Leger R y Screen S. 2001. Prospects for Strain Improvement of fungal pathogens of Insects and Weeds. *Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potential*. CABI International. *Fungi as Biocontrol Agents*. Edts T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan p 219-237.
- St Leger R, Bidochka MJ, Roberts DW. 1994. Isoforms of the Cuticle-Degrading Pr1 Proteinase and Production of Metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 313, No. 1 pp. 1-7
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, MJ., Roberts, DW. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 93: 6349-6354.
- St Leger R y Roberts DW. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnology* 15:87-87.
- St Leger R. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73 (Supp. 1): S1119-11125.

- Strasser H, Abendstein D, Stuppner H, Butt TM. 2000a. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research* 104(10):1227-1233.
- Strasser H, Vey A, Butt TM. 2000b. Are there any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. *Biocontrol Science and Technology* 10:717-735.
- Steinhaus, EA; Martignoni, ME. 1970. An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology(2<sup>nd</sup> edition). USDA Forest Service, PNW Forest and Range Experiment Station.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 2006; 16(5): 525\_534.
- Tamez Guerra P, Galán Wong LJ, Medrano Roldan H, García Gutierrez C, Rodríguez Padilla C, Gomez Flores RA, Tamez Guerra RS. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, abril-junio, año/vol. IV, número 002: 143-152
- Tamayo Mejía, F. 2006. Control Biológico de los Chapulines y en el Sureste del estado de Guanajuato. Taller: Hongos Entomopatógenos (*Ascomycetes* anamórficos (*Deuteromycota*), *Entomophthorales*): Control de Calidad. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, Noviembre 2006.
- Tanada Y y Kaya HK. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. USA. pp. 666
- Tefera T y Pringle KL. 2003. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* 84:90-95.
- The National Center for Biotechnology information (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com). 15 Octubre 2007.
- Thomas SR y Elkinton JS. 2004. Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 146-151.
- Varela A y 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.
- Wang C, Typas MA, Butt TM. 2002. Detection and characterization of *prl* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letter* 213 :251-255.
- Wessel JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetic Biol.* 27: 134-145.

Whipps JM y Lumsden RD. 2001. Commercial Use of Fungi as Plant as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan p 9-22.

Willer, H., Yussefi, M. The World of Organic Agricultura: Statistics and Emerging Trends [ [http://www.soel.de/inhalte/publikationen/s/s\\_74.pdf](http://www.soel.de/inhalte/publikationen/s/s_74.pdf)]. 2006-11-11.

Wösten HAB, 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. Ann. Rev. Microbiol. 55: 625-646

Wyss GS, Charudattan R, DeValerio JT. 2001. Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. Plant Disease 85: 1165-1170.

## 11. Anexo

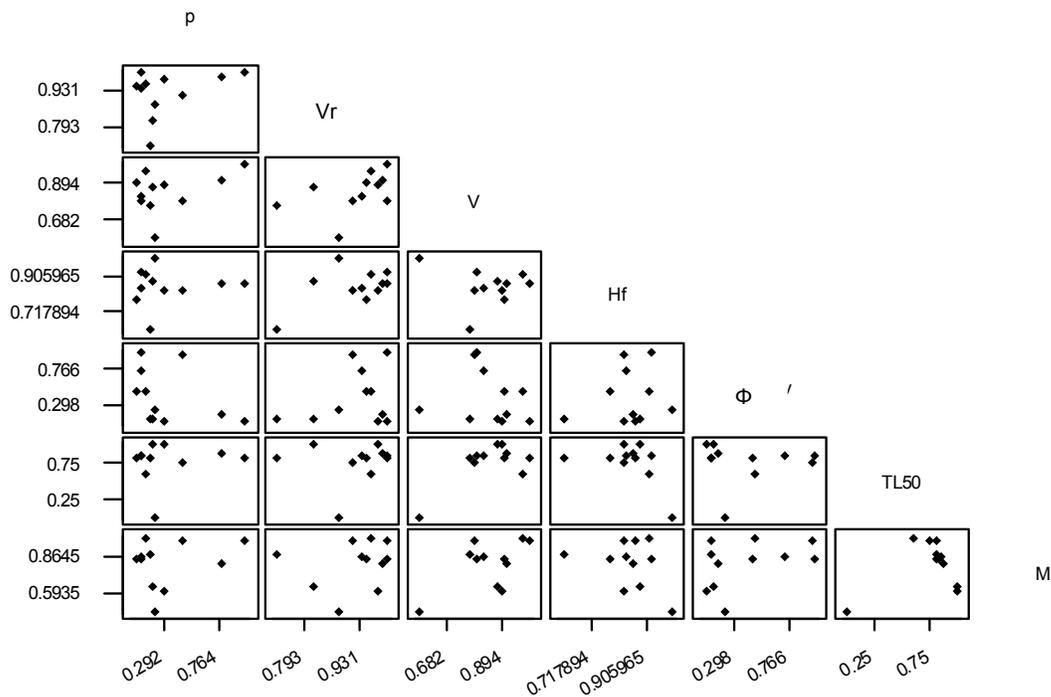


Figura 17. Matriz de gráfica de dispersión de aislados para cada par de variables.