

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
Maestría en Ciencias en Protección Vegetal

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Sphenarium purpurascens* (Charpentier)
CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN MAÍZ”

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA

ESPINOZA GIL MIJAE

Bajo la supervisión de: Dr. Aurelio Pedroza Sandoval

Chapingo México, Octubre 2017.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada **“Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) con hongos entomopatógenos en maíz”** Realizada por Mijael Espinoza Gil Bajo la dirección del Comité Asesor Indicado, Aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR _____

Dr. Aurelio Pedroza Sandoval

CO-DIRECTOR _____

Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez

ASESOR _____

M.C. Antonio Segura Miranda

Datos biográficos

El autor nació en el municipio de San Martín de las Pirámides, estado de México, el 31 de diciembre de 1988. Cursó el nivel medio superior en el CBT Emiliano Zapata, Nopaltepec, donde obtuvo el título de Técnico Agropecuario, estudió en la Universidad Tecnológica de Tecámac del año 2006 al 2011, obtuvo su título de Ingeniero en Biotecnología, a partir del 2012 y hasta el 2015 se desempeñó como Profesor de Asignatura en la misma institución, en el 2015 se matriculó en el Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, de la Universidad Autónoma Chapingo, miembro de la generación 57, finalizó la estancia en el 2017 con la presentación de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca que me otorgo para realizar mis estudios de posgrado

A la Universidad Autónoma Chapingo, por abrirme sus puertas y permitirme ser alumno de esta noble institución.

Al Dr. Aurelio Pedroza Sandoval porque a pesar de la distancia, siempre recibí su apoyo durante mi estancia en Chapingo.

A la Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez, porque su tiempo y sus consejos fueron los pilares para realizar esta investigación.

Al M. C. Antonio Segura Miranda por su apoyo y anuencia para solventar los problemas que se presentaron.

A Mary por la confianza que me brindo desde el principio, por su apoyo para realizar los trámites, pero sobre todo por su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	2
OBJETIVO GENERAL	2
HIPÓTESIS	3
1.- CAPÍTULO I.- IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y DEL CHAPULIN QUE AFECTA AL MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.)	
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Características generales de los hongos entomopatógenos	5
Características de <i>Beauveria bassiana</i>	5
Características de <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
Características de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	6
Características generales de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier).....	7
Distribución geográfica.	7
Clasificación taxonómica.	8
Características morfológicas	8
Biología y hábitos.....	9
 MATERIALES Y MÉTODOS.....	 10
Ubicación del área de estudio.....	10
Colecta e identificación de los hongos entomopatógenos	10
Identificación taxonómica mediante morfología.....	11
Obtención de aislamientos por diluciones seriadas	11
Cultivo monospórico.	11
Medición de conidios	12
Identificación molecular.....	12
Extracción de ADN.	12

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	12
Análisis filogenético	13
Identificación de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier).....	13
Identificación morfológica	13
Identificación molecular	13
Extracción de ADN.	13
Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	14
Análisis filogenético	14
 RESULTADOS	 15
Identificación morfológica y molecular de los hongos entomopatógenos	15
Identificación morfológica y molecular de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier)	19
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	25
LITERATURA CITADA.....	25

CAPÍTULO II.- VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

RESUMEN	31
INTRODUCCIÓN.....	32
REVISIÓN DE LITERATURA	33
Proceso de infección de hongos entomopatógenos en insectos.....	33
Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto.	33
Penetración en el hemocele.	34
Desarrollo del hongo en el insecto	34
Efectividad de hongos entomopatógenos	35
Factores que afectan la Germinación de conidios	35
Bioensayos con <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) a nivel de campo	36
 MATERIALES Y METODOS.....	 41
Ubicación geográfica del área de estudio	41
Bioensayos de germinación de los aislamientos.....	41
Bioensayos de virulencia y patogenicidad.....	43
Esporulación del hongo en individuos muertos.....	44

Propagación del hongo por el método bifásico	44
Validación en campo	45
Diseño experimental.....	45
Procesamiento de los datos.....	46
 RESULTADOS	 46
Evaluación in vitro	46
Germinación de los aislamientos.....	46
Virulencia y patogenicidad.....	48
Esporulación del hongo en especímenes muertos.	51
Evaluación en campo.....	51
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	57
LITERATURA CITADA.....	57

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1.- Ciclo biológico del chapulín (Orthoptera: Acrididae) Fuente: Arana, 201410

Figura 2.- Crecimiento de micelio en Agar Dextrosa Sabourad y conidios de A)
Metarhizium anisopliae B) *Purpureocillium lilacinum* C) *Beauveria bassiana*.....16

Figura 3. Árbol filogenético ML (Máxima Verosimilitud) de la secuencia de 570pb del aislado Bbp1 de *Beauveria bassiana*, la región amplificada fue ITS 4 e ITS 5, los números de los nodos representan los valores de soporte estadístico (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra de la escala indicó que se tiene 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.17

Figura 4. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) de la secuencia del aislado MeDL de 559 pb. El cual se agrupó en el género de *Metarhizium anisopliae* con la

región amplificada de ITS4 e ITS5, de 559 pb, los nodos representan el soporte estadístico de Bootstrap de 1000 repeticiones, con 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.18

Figura 5. Árbol filogenético ML (Máxima Verosimilitud) del aislado PurlilM1 de *Purpureocillium lilacinum* amplificado con la región ITS 4 y ITS 5, los números de los nodos representan los valores de soporte estadístico (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra de la escala indicó que se tiene 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.19

Figura 6A. Vista ventral de macho y hembra de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).....20

Figura 6B. Vista dorsal de macho y hembra de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier)21

Figura 7. Árbol filogenético de los ejemplares de *Sphenarium purpurascens*, las secuencias utilizadas para la agrupación fueron fragmentos del gen Citocromo Oxidasa Subunidad 1, con el método de Máxima Verosimilitud (ML) y el modelo de Kimura de 2 parámetros. El análisis bootstrap fue realizado con 1000 repeticiones.22

CAPITULO II

Figura 1.- Proceso de infección de *Beauveria bassiana* en invertebrados. Tomado de Moura, 2016.35

Figura 2.- Crecimiento de los hongos entomopatógenos en cultivo líquido con agitación.	44
Figura 3.- Crecimiento en sustrato solido a $34\pm 2^{\circ}\text{C}$, en cuarto de incubación.....	45
Figura 4.- Germinación de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> a 25°C a las 24h (Izquierda) y 48h (Derecha) de incubación.	48
Figura 5.- Porcentaje de mortalidad de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) en laboratorio a una concentracion de 1×10^8 conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$	49
Figura 6.- Porcentaje de mortalidad de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) en laboratorio a una concentracion de 1×10^6 conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$	50
Figura 7.- Porcentaje de mortalidad de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) en laboratorio a una concentracion de 1×10^4 conidios $\cdot\text{mL}^{-1}$	50
Figura 8.- Individuos de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) micosados con <i>Beauveria bassiana</i> (derecha) <i>Metarhizium anisopliae</i> (izquierda).....	51
Figura 9. Muestreo simple aleatorio (MSA) de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) con un transecto en W y cuatro repeticiones; la unidad de muestreo fue de 1 m^2 y un tamaño de muestra 9	52
Figura 10.- Planta de maíz infestada con la plaga <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier).....	52

CAPITULO I

Cuadro 1.- Características micro y macroscópicas de los hongos entomopatógenos	15
--	----

CAPITULO II

Cuadro 1.- Diseño experimental de los bioensayos de germinación, HDI= horas después de la inoculación, Bbp1= <i>Beauveria bassiana</i> , MeDL= <i>Metarhizium anisopliae</i> PurlilM1= <i>Purpureocillium lilacinum</i>	42
--	----

Cuadro 2. Efecto de la temperatura en la germinación de conidios de diferentes especies de entomopatógenos que atacan a <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier), en diferentes tiempos de evaluación	47
---	----

Cuadro 3.- Tiempo Letal medio TL ₅₀ a tres diferentes concentraciones de los hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	49
--	----

Cuadro 4.- Porcentaje de mortalidad de <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) causada por hongos entomopatógenos en campo.	53
---	----

CONTROL BIOLÓGICO DE *Sphenarium purpurascens* (CHARPENTIER) EN MAÍZ CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Sphenarium purpurascens* (CHARPENTIER) IN MAIZE USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

RESUMEN

El chapulín es una plaga predominante y recurrente en México que genera pérdidas económicas en diferentes estados de la república mexicana. El control químico es una solución real al problema, sin embargo, causa contaminación ambiental, desequilibrio ecológico y resistencia del insecto. Una alternativa al uso de insecticidas es el control biológico. En el presente estudio se determinó la efectividad biológica de dos aislamientos nativos de hongos entomopatógenos (HE), a los que se identificó de forma morfológica y molecular con un fragmento de ITS, el análisis ML (Máxima Verosimilitud) los agrupó como: *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum*, también se utilizó una cepa comercial de *Beauveria bassiana*. El insecto plaga se identificó con claves taxonómicas y se corroboró con la amplificación de un fragmento del gen COI, el análisis ML agrupó a los individuos recolectados en *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). Se realizaron bioensayos de germinación de los tres HE, incubados en temperaturas de 5, 25 y 38°C, por 24, 48 y 72 h; el mejor porcentaje de germinación a 38°C fue para *Purpureocillium lilacinum* con 92% de conidios germinados (Tukey, $p \leq 0.05$), en condiciones de laboratorio. Se evaluó el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio TL_{50} , con tres concentraciones 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidios $\cdot ml^{-1}$, de cada uno de los HE. En laboratorio *M. anisopliae* y *B. bassiana*, mostraron un TL_{50} de 3 días y se alcanzó 100 % de mortalidad a los 7 días en la concentración 1×10^8 conidios $\cdot ml^{-1}$, para los dos HE. En las aplicaciones en campo los mejores tratamientos fueron con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (MANOVA, $P < 0.0001$, $\alpha = 0.05$). Se obtuvo 87.6% de mortalidad con *M. anisopliae* y 95.2% con *B. bassiana* (LSD, $\alpha = 0.05$), tanto el aislamiento nativo como el comercial tienen la capacidad de controlar a *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), para lograr buena efectividad en campo, es necesario aplicar la dosis y volumen de agua adecuados.

PALABRAS CLAVE *Zea mays*, Control biológico, Plagas agrícolas.

Autor: Mijael Espinoza Gil

Director: Dr. Aurelio Pedroza Sandoval

ABSTRACT

Grasshopper is a predominant and recurrent pest that generates economic losses in different states of the Mexican Republic. Chemical control is a real solution to the problem; however, it causes environmental pollution, ecological imbalance and insect resistance. An alternative to the use of insecticides is biological control. This study determined, the biological effectiveness of two isolates of entomopathogenic fungi (EF), which were morphologically and molecularly identified with an ITS fragment. The ML (Maximum Likelihood) analysis grouped them as: *Metarhizium anisopliae* and *Purpureocillium lilacinum*, a commercial strain of *Beauveria bassiana* was also used. The insect pest was identified with taxonomic keys and corroborated with the amplification of a fragment of the COI gene; the ML analysis grouped the specimens collected in *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). Germination bioassays of the three EFs were carried out, incubated at temperatures of 5, 25 and 38°C, for 24, 48 and 72 h; the best percentage of germination at 38°C was for *Purpureocillium lilacinum* with 92% of germinated conidia (Tukey, $p \leq 0.05$), in laboratory conditions. The percentage of mortality and the mean lethal time LT_{50} , were evaluated with three concentrations 1×10^4 , 1×10^6 and 1×10^8 conidia $\cdot ml^{-1}$, of each of the EF. In laboratory *M. anisopliae* and *B. bassiana*, showed a LT_{50} of 3 days and 100% mortality was reached at 7 days in the concentration 1×10^8 conidia $\cdot ml^{-1}$, for the two EF. In field applications, the best treatments were with *M. anisopliae* and *B. bassiana* (MANOVA, $P < 0.0001$, $\alpha = 0.05$). 87.6% mortality was obtained with *M. anisopliae* and 95.2% with *B. bassiana* (LSD, $\alpha = 0.05$), both the native and commercial isolates have the ability to control *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), to achieve good effectiveness in the field, it is necessary to apply the appropriate dose and volume of water.

KEYWORDS: *Zea mays*, biological control, agricultural pest.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz (*Zea mays* L.) es de gran importancia social en México, por ser básico en la alimentación de la población. En el año 2015 se sembraron en todo el país 7.6 millones de hectáreas, con un rendimiento de 24.7 millones de toneladas, lo cual generó ingresos por \$84.5 billones de pesos. En el Estado de México se cosecharon 2.03 millones de ton, lo que representa el 8.24% de la producción total del país (SIAP, 2017).

El cultivo de maíz es afectado por diferentes factores adversos, tanto de tipo físico, como biológico, dentro de estos últimos destaca el daño por plagas y enfermedades. Uno de los insectos plaga endémico de este cultivo en la región de estudio es el chapulín *Sphenarium purpurascens* (Ríos et al. 2015) el cual ha ocasionado pérdidas del 10 al 30 % en maíz para grano y del 30 al 40 % en maíz forrajero (CESAVEG, 2007). El control químico es una alternativa al problema, sin embargo, es una práctica de alto impacto por la contaminación ambiental, desequilibrio ecológico y resistencia del insecto a uno o más grupos químicos (Arana et al, 2014).

Derivado del auge en la sustentabilidad en lo ambiental, económico y social se han propuesto diversas alternativas integradoras de manejo: consumo humano de estos insectos (Cano and Cerritos, 2008); control biológico con hongos entomopatógenos; y la aplicación de extractos vegetales que tienen la capacidad de controlar la plaga a niveles de daño no significativo (Vázquez et al. 2016). El control de insectos plaga con uso de entomopatógenos ofrecen las siguientes ventajas: son seguros para la salud del ser humano (Mugdal, 2013), no atacan a organismos benéficos, los alimentos que se producen están libres de residuos tóxicos y mantienen la biodiversidad de los ecosistemas (Lacey et al, 2015; Kram, 2012).

En el presente estudio se identificaron y se determinó la efectividad de hongos entomopatógenos con bioensayos de germinación, virulencia y patogenicidad contra el insecto plaga de chapulín en maíz

OBJETIVO GENERAL

Identificar la efectividad de hongos entomopatógenos nativos contra una cepa comercial en condiciones in vitro y de campo con bioensayos de germinación, virulencia y patogenicidad contra *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

HIPÓTESIS

Ho: Las cepas nativas de hongos entomopatógenos son más efectivas en el control de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), con respecto a la cepa comercial.

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y DEL CHAPULIN QUE AFECTA AL MAÍZ (*Zea mays* L.)

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son una alternativa al uso de insecticidas químicos para controlar el insecto plaga del chapulín. En el presente estudio se realizó la identificación de género y especie de los hongos entomopatógenos que afectan a *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). Se obtuvieron dos aislamientos nativos, y se compararon con una cepa comercial de *Beauveria bassiana*; en la identificación morfológica, se midieron los conidios de las colonias de cada HE (Hongo Entomopatógeno), las características coincidieron con *Metarhizium anisopliae* (conidios $1.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$ de ancho y $3.67 \pm 0.28 \mu\text{m}$ de largo); *Purpureocillium lilacinum* (conidios $1.75 \pm 0.14 \mu\text{m}$ de ancho y $1.88 \pm 0.13 \mu\text{m}$ de largo); *Beauveria bassiana* de la cepa comercial (conidios $1.84 \pm 0.18 \mu\text{m}$ de ancho y $1.87 \pm 0.24 \mu\text{m}$ de largo). En la identificación molecular se utilizó un fragmento de la región ITS, las secuencias se analizaron con método de ML (Máxima Verosimilitud) y Bootstrap de 1000 repeticiones, los aislamientos se agruparon en *M. anisopliae*, *P. lilacinum* y *B. bassiana*.

En el caso del insecto plaga, la morfología coincidió con *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). La identificación molecular se realizó con un fragmento del gen COI, el análisis ML (Máxima Verosimilitud), Bootstrap de 1000 repeticiones y modelo de Kimura 2 parámetros, agrupó los individuos en *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

Palabras clave: Morfología, biología molecular, plagas agrícolas, filogenia.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son los agentes de control biológico de plagas agrícolas más estudiados (Dasilva et al, 2010). La identificación taxonómica de estos es importante, debido a que la patogenicidad varía de acuerdo a la especie; *Beauveria* cuenta con más de 53 especies, de las cuales las más conocidas son: *B. caledonica*, *B. asiática*, *B. australis*, *B. brongniartii* y *B. pseudobassiana*, entre otras, sin embargo las especies que predominan en México y con las cuales se han obtenido mejores resultados es *B. bassiana* y *B. pseudobassiana* (Archuleta, 2012; Carrillo et al, 2013).

El género *Metarhizium* se reporta con 22 especies, las más conocidas son: *M. anisopliae*, *M. robertsi*, *M. pingshaense*, *M. brunneum* y *M. guizhouense*, (Roskov et al, 2015; Zimmermman, 2007). Algunas especies como *M. frigidum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. flavoviridae* *M. acridum*, entre otras eran consideradas formas especiales de *M. anisopliae* (Bischoff et al, 2009).

Además de *Beauveria* y *Metarhizium* el género *Isaria* ha sido ampliamente estudiado como agente de control biológico (Delgado, 2011, Jing et al, 2015). Con sólo la identificación morfológica, se clasificaba como *Paecylomyces*, con varias especies, *lilacinus* y *fumosoroseus*, como las más importantes en el control biológico (Luangsa et al, 2011); con las técnicas moleculares se clarificó la taxonomía y se transfirieron a dos géneros diferentes *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria fumosorosea*, ambos se han estudiado en nemátodos e insectos de cuerpo blando (Prasad et al, 2015).

La diferenciación entre especies de un mismo género al usar claves taxonómicas es muy difícil, por la similitud en sus estructuras y color. Mediante análisis molecular, se han obtenido resultados taxonómicos precisos y confiables. Esta técnica requiere de la amplificación y secuenciación de regiones o fragmentos del genoma, los más utilizados para hongos entomopatógenos son el gen de la β -tubulina, el factor de elongación (EF1-alpha) (Rehner,

2005) y los segmentos no codificantes que se encuentran ubicados entre las regiones 18S y 28S conocidos como Espaciadores Internos Transcriptos ITS (White, 1990, Archuleta 2012). El objetivo de este estudio fue la identificación morfológica y molecular del insecto plaga que afecta al cultivo del maíz *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), y de los Hongos Entomopatógenos (HE), en ambos casos se usaron claves taxonómicas, para identificación molecular del insecto plaga se uso un fragmento del gen Citocromo Oxidasa Subunidad I, y en el caso de los HE se utilizó un fragmento de la región ITS (5.8S).

REVISIÓN DE LITERATURA

Características generales de los hongos entomopatógenos

Características de *Beauveria bassiana*

Este hongo se caracteriza por tener micelio septado de color blanco, conidióforos sencillos en grupos verticilados, hinchados en la base, después de que varios conidios se producen, la base se presenta en forma de zig-zag, los conidios son hialinos redondeados a ovoides y unicelulares (Humber, 1997), taxonómicamente pertenece a:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota;

Clase: Sordariomycetes;

Orden: Hypocreales;

Familia: Cordycipitaceae;

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

Características de *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae es uno de los hongos con mayor potencial entomopatógeno en el control insectos plaga, se ha encontrado en aproximadamente 200 insectos en diferentes cultivos agrícolas (Albuquerque et al. 2005). Este hongo se caracteriza por, formar esporulación en capas, fialides sencillas en pares o en ramilletes, con fialoconidias producidas en cadenas basipetalas, compactadas y en columnas. Los conidios son hialinos y alargados en forma ovoide con un tamaño de 7 – 9 µm de largo y de 4 - 5 µm de ancho (Domsch y Gams. 1980; Barnett y Hunter 1972).

La clasificación taxonómica del género *Metarhizium* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *anisopliae*

Características de *Purpureocillium lilacinum*

En la naturaleza *P. lilacinum* es encontrado como habitante del suelo. Este hongo tiene la habilidad de sobrevivir en materia orgánica en el suelo, se encuentra presente en el campo principalmente en zonas húmedas, se ha encontrado también como patógeno de insectos. En medio de cultivo, las colonias de *P. lilacinum* son de color vináceo. A temperatura de 25 °C pueden alcanzar un crecimiento en diámetro de hasta 5 a 7 cm en 14 días. Los conidióforos son erectos, alcanzando entre 400 y 600 µm, y se originan individualmente (raramente en

grupos o sinemas) a partir del micelio horizontal. Los conidios son elipsoidales a fusiformes, con dimensiones de 2.5 a 3µm de largo y de 2.0 a 2.2µm de ancho (Monzón et al, 2009).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

Género: *Purpureocillium*

Especie: *lilacinum*

Características generales de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier)

Distribución geográfica

Los chapulines están clasificados en el orden Ortóptera, estos son la mayor plaga de terrenos de cultivo en todos los continentes. El género *Schistocerca* es considerado una plaga importante en Asia, África y algunas poblaciones de América, el género *Melanoplus* y *Camnula pellucida* en América del Norte, y *Oedaleus senegalensis* y *Zonocerus variegatus* en Africa (Ocampo et al, 2012). En México se conocen cerca de 920 especies y aunque las reconocidas como plaga son pocas con relación al número total, las pérdidas en agricultura son cuantiosas, sobre todo en cultivos de frijol y maíz así como en pastizales naturales en altitudes superiores a los 2,000 msnm en los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Hidalgo, México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala y Guanajuato. En esta región se han registrado los géneros *Melanoplus*, *Boopedum*, *Mermiria*, *Sphenarium* y *Brachystola*, que son considerados como importantes plagas en la región central del país, han causado pérdidas entre el 20 y 30 por ciento de la producción de esos cultivos (CESAVEG, 2007).

Clasificación taxonómica

Con el nombre de chapulín (Grasshopper en inglés) se conoce a varios géneros y especies de la Superfamilia acridoidea que se divide en varias familias (Phyrgomorphidae, Acrididae, Romaleidae etc., en México los géneros *Melanoplus*, *Brachystola* y *Sphenarium* son los más comunes, este último se clasifica de la siguiente manera:

Clase: Insecta

Orden: Orthoptera

Suborden: Caelifera

Superfamilia: Acridoidea

Familia: Phyrgomorphidae

Género: *Sphenarium*

Especie; *purpurascens*

Características morfológicas

Los chapulines pasan la temporada de invierno en estado de huevo, a finales de septiembre y octubre las hembras depositan en el suelo los huevos en paquetes de 6 a 8 a los que se les denomina Ootecas, son de color crema, alargados en forma de oval y miden aproximadamente 1.5 x 6 mm, los huevos miden 0.4 mm de longitud, son ovalados y con los extremos aguzados; presentan una coloración pardo brillante, mientras que en sus polos (extremos) se encuentran más oscurecidas (Arana et al, 2014).

Cuando empieza la temporada de lluvias en los meses de mayo y junio, los huevos eclosionan dando lugar a las ninfas, el insecto pasa por 5 estadios ninfales hasta llegar a adulto, las ninfas carecen de alas, son muy pequeñas 0.6+/-0.1 mm de coloración pardo muy pálido con manchas a manera de puntuaciones de tipo circular de color pardo oscuro, negro o ambos,

distribuidas uniformemente en todo el cuerpo; éste es fusiforme, con la cabeza proporcionalmente más grande que el resto del cuerpo en el que destacan los ojos por su dimensión.

Adulto: el macho tiene cuerpo robusto, aguzado hacia los extremos anterior y posterior, de coloración variable de pardo oscuro a verde olivo brillante con manchas negras en todo el cuerpo y el pronoto tiene forma de silla de montar, generalmente son más delgados que las hembras, miden 2.075 ± 0.17 cm. de largo por 0.78 ± 0.7 cm en su parte más ancha. Los ojos son muy prominentes en relación al tamaño de la cabeza que es de forma triangular, las hembras se distinguen de los machos, por su tamaño y coloración, son más robustas debido al ensanchamiento que sufren en la parte correspondiente al meso y metatórax, miden 2.10 ± 0.19 cm de largo por 0.83 ± 0.09 cm, cuando las hembras han ovipositado sufren cambio de coloración de verde a pardo. La cabeza es más ancha que larga, los ojos son más pequeños y las antenas se notan más cortas que en el macho; las patas son más gráciles y los femurales menos desarrollados que los de los machos (Anaya, 2000).

Biología y hábitos

El ciclo biológico del chapulín es anual, pero en condiciones de laboratorio llega a durar de 230 a 350 días. El apareamiento ocurre en los meses de agosto y septiembre, la duración máxima es de siete horas, la ovoposición ocurre cuatro a cinco días en las orillas de las parcelas, caminos, zanjas, incubándose en el suelo a una profundidad de 1.5 a 5 cm en temperatura de 30 °C durante un periodo de ocho a nueve meses.

En la región centro-norte de México la eclosión de los huevos ocurre en un periodo de 15 a 20 días, después de iniciar la temporada de lluvias (mayo-junio) (Uribe et al, 2012). Las ninfas presentan de cinco a siete estados ninfales equivalentes a un periodo de 40 a 60 días, hasta llegar a convertirse en adultos que tardan alrededor de 20 a 25 días en madurar sexualmente e iniciar su reproducción a finales del mes de julio y durante el mes de agosto; en diversas

ocasiones se puede apreciar gran parte de acrididos en estado adulto entre los meses de septiembre y diciembre (univoltinos) y otras casi todo el año (polivoltinos). Los adultos y ninfas se alimentan de maleza de hoja ancha y cuando la terminan invaden cultivos en los meses de julio a septiembre (Arana et al., 2014), en general viven tres meses al encontrarse en estado adulto, pero las especies del género *Brachystola* llegan a sobrevivir hasta cinco meses.

Es una plaga polífaga que puede llegar a consumir casi la mitad de su peso corporal de forraje verde en un día, con esto se causan importantes pérdidas que en ocasiones superan el 70% de la producción.



Figura 1.- Ciclo biológico del chapulín (Orthoptera: Acrididae) Fuente: Arana, 2014.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio. El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Posgrado de Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Chapingo, Texcoco, Estado de México.

Colecta e identificación de los hongos entomopatógenos

Colecta. Mediante un sistema de muestreo dirigido, se recolectaron muestras de suelo agrícola del ejido de Santiago Tepetitlan municipio de San Martin de las pirámides, Estado de México.

La región se ubica a 19° 38' 00" LN y 98° 48' 45" W con una altura de 2,300 msnm, el clima es templado semiseco, con precipitación anual de 500-700 mm. La muestra compuesta se llevó al laboratorio donde fue tamizada, humedecida y colocada en 15 vasos de plástico; como insecto cebo, en cada vaso se colocaron 5 larvas de *Tenebrio molitor* y cada 24 h se invirtieron, para que la larva se impregnará del suelo.

Identificación taxonómica mediante morfología

Obtención de aislamientos por diluciones seriadas. A partir de las muestras de suelo obtenidas, se realizaron diluciones seriadas, para lo cual 0.1 g de muestra se colocó en tubos eppendorf estériles, que contenían 900 µL de Tween 80 Sigma Aldrich® al 0.03%, partiendo de 10^{-1} hasta 10^{-4} ; las dos últimas diluciones se plaquearon en cajas de petri con Agar Dextrosa Sabourad (ADS) (Bioxon® Beckton Dickinson de México), más un antibiótico de amplio espectro (amikacina, $0.1\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), colocando 100µL de muestra en cada caja, las cuales se incubaron a 27 °C. Las observaciones se realizaron a las 24 h, 48 h y 72 h. Las colonias de color blanquecino polvosas típicas de hongos entomopatógenos, fueron reaisladas en el medio de cultivo ADS y se realizaron preparaciones con azul de lactofenol, para teñir las estructuras y corroborar en el microscopio compuesto la presencia del hongo siguiendo las claves de Humber (1980) y Samson (1974).

Cultivo monospórico. De los aislamientos obtenidos se tomó una pequeña cantidad con el asa bacteriológica y se colocó en un tubo eppendorff que contenía 1mL de Tween 80 al 0.03%, se agitó vigorosamente, se colocaron 10 µL de esta suspensión en cajas Petri con ADS y con un triángulo de vidrio la muestra se dispersó por todo el medio; las cajas fueron incubadas a 27°C, por 24 h para posteriormente ser observadas al microscopio estereoscópico. Se seleccionaron los conidios germinados, los cuales se colocaron, de forma independiente en cajas Petri con medio nutritivo (ADS). De las cajas que esporularon se tomaron de 5 a 10 círculos de agar con ayuda de un sacabocados estéril y se conservaron en tubos eppendorf de 2mL con glicerol al 10% en congelación a -20 °C. Para la comparación del hongo

entomopatígeno comercial con los nativos, se utilizó el bioinsectida (PHC Bea Tron®), el cual se procesó acorde al protocolo anterior.

Medición de conidios. De los aislamientos purificados, se sembró por estría una caja petri con ADS y se incubó a 27°C durante 15 días hasta que se observó esporulación abundante. De esta caja petri se tomó una asada en condiciones estériles y se colocó en un portaobjetos en el que previamente se habían puesto 15 microlitros de agua destilada estéril, se mezcló con ayuda del asa para obtener una suspensión, se observó en un microscopio óptico con objetivo de 40X y se tomaron fotografías, las cuales se editaron en el programa Imagej 1.48 ® , se seleccionaron 100 conidios de cada hongo, se midieron vertical y horizontalmente y posteriormente se determinó el tamaño promedio y la desviación estándar.

Identificación molecular

Extracción de ADN. Se tomaron 0.25 g de cultivo monospórico, los cuales fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 mL y congelados a -20°C. Para realizar la extracción de ADN, se utilizó el Kit DNeasy ® Plant QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Del ADN obtenido se midió la cantidad y calidad en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific); para visualizar la presencia de ADN se realizó un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio (GENE CHOICE/ 0.040 mL), con una electroforesis de 80 V. El gel se visualizó en un Fotodocumentador/ UV.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la identificación molecular, se utilizaron los Primers ITS4 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') e ITS5 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), con un volumen de reacción de PCR de 20 µL, a una concentración de 0.15 µM de dNTP's, 0.2 µM de cada primer, 0.025 U µL⁻¹ de TaqPolimerasa, 1X de Buffer y 1 µL de ADN. El programa consistió de un ciclo de 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 45 °C por 1 minuto, 72 °C por 1.5 min, seguido de un ciclo por 5 minutos a 72 °C y finalmente a 4 °C hasta que se retiró del termociclador (White et al, 1990). El producto de PCR se envió a secuenciar a Macrogen inc. Korea (Secuenciación por

el Método Sanger). Las secuencias resultantes se limpiaron y ensamblaron con el programa BioEdit v7.2.5, posteriormente se compararon en el programa Nucleotide BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Análisis filogenético. Se realizó la comparación de las secuencias obtenidas en el programa BLAST, para el árbol filogenético, del aislamiento MeDL se utilizaron 11 secuencias, tres de *Metarhizium anisopliae*, tres de *Metarhizium brunneum* y tres de *Metarhizium robertsii*, y como grupo monofilético externo se incluyó a *Beauveria bassiana*. Para el aislamiento Purlil1 en el análisis filogenético se incluyeron tres secuencias de *Purpureocillium lilacinum*, además tres de *Isaria fumosorosea* y tres de *Lecanicillium lecanii*, como grupo monofilético externo se incluyó a *Metarhizium anisopliae*, para *Beauveria bassiana*, se utilizaron tres secuencias de *Beauveria brongniartii*, tres de *Beauveria caledonica* y tres de *Beauveria bassiana* como grupo externo se incluyó a *Purpureocillium lilacinum*. En todos los casos, las secuencias se alinearon por el método Clustal W, los árboles se construyeron por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Kimura 2 parámetros, con bootstrap de 1000 repeticiones (Kimura, 1980; Kumar et al, 2016).

Identificación de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier)

Identificación morfológica. Se recolectaron adultos de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y se colocaron en alcohol y posteriormente se identificaron con las claves de Anaya (2000), en un microscopio estereoscópico.

Identificación molecular

Extracción de ADN. Se tomó tejido muscular del tórax y abdomen de chapulines conservados en alcohol, se eliminó la grasa de los tejidos, se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL y se liofilizaron durante 24 horas. Para realizar la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Dneasy Tissue kit, Qiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante. Para corroborar la presencia de ADN en el extracto, se preparó un gel de agarosa al 1 % con

bromuro de etidio como revelador para correr una electroforesis de 80 V. El gel se visualizó en un Fotodocumentador/ UV. El ADN obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la identificación, se amplificaron con los siguientes reactivos en un volumen de 20 µL, 1X de buffer, 0.5µM de los primers universales, LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), 0.2 mM de Mix dNTP's, 1.5mM de MgCl₂, 1U de Taqpolimerasa y 10-20 ng de ADN. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 1 min a 94 °C; 5 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 45 °C y 1.5 min a 72 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 50 °C y 1 min a 72 °C y un ciclo final de 5 min a 72 °C (Pedraza et al. 2015; Hebert et al. 2003).

Análisis filogenético. Posterior a la comparación en el programa BLAST, se realizaron árboles filogenéticos en el programa MEGA 7®. Para la comparación se descargaron de la base de datos del NCBI, las tres secuencias de mayor similitud a *Sphenarium purpurascens*(Charpentier), tres de *Sphenarium mexicanum* y como grupo monofilético externo se incluyó a *Locusta migratoria*; junto a estas secuencias se incorporaron las secuencias de Cha1 y Cha2 y se alinearon por el método Clustal W. El árbol se construyó por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Kimura 2 parámetros, con bootstrap de 1000 repeticiones (Kimura, 1980; Kumar et al, 2016).

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular de los hongos entomopatógenos.

Los conidios del aislamiento de *Metarhizium anisopliae* son alargados de forma cilíndrica, miden $1.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$ de ancho y $3.67 \pm 0.28 \mu\text{m}$ de largo; *Purpureocillium lilacinum* presenta conidios redondos, hialinos, miden $1.75 \pm 0.14 \mu\text{m}$ de ancho y $1.88 \pm 0.13 \mu\text{m}$ de largo; *Beauveria bassiana* también forma conidios redondos hialinos que miden $1.84 \pm 0.18 \mu\text{m}$ de ancho y $1.87 \pm 0.24 \mu\text{m}$ de largo (Cuadro 1, Figura 1).

Cuadro 1.- Características micro y macroscópicas de los hongos entomopatógenos aislados.

Hongo entomopatógeno	Tamaño de conidio	Forma del conidio	Color del micelio
<i>Beauveria bassiana</i>	$1.87 \pm 0.24 \mu\text{m} \times 1.84 \pm 0.18 \mu\text{m}$	Ovoide	Blanco
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	$1.75 \pm 0.14 \mu\text{m} \times 1.88 \pm 0.13 \mu\text{m}$	Redondo	Rosa – lila
<i>Metarhizium anisopliae</i>	$1.98 \pm 0.15 \mu\text{m} \times 3.67 \pm 0.28 \mu\text{m}$	Cilíndrico	Verde oscuro

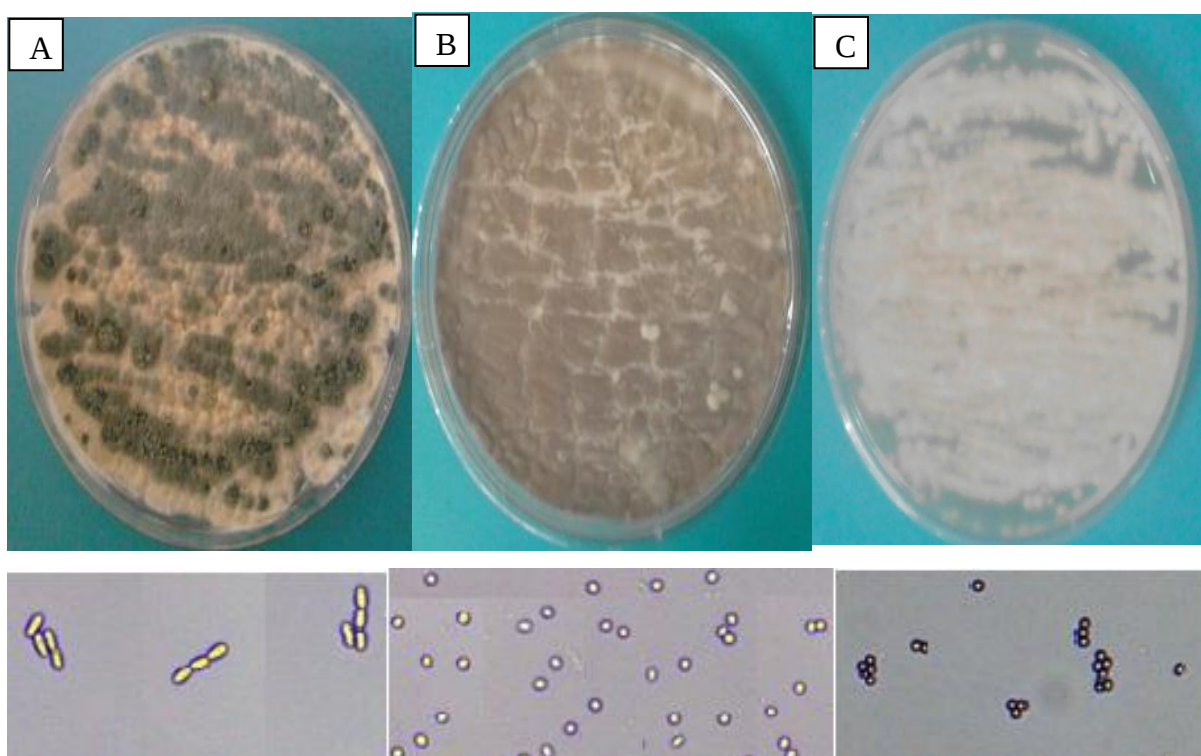


Figura 2.- Crecimiento de micelio en Agar Dextrosa Sabourad y conidios de A) *Metarhizium anisopliae* B) *Purpureocillium lilacinum* C) *Beauveria bassiana*.

El crecimiento de micelio en agar ADS de *M. anisopliae* inicia con un color blanquecino y posteriormente cambia a amarillo y después de la esporulación tiene un color verde (Figura 2A); *P. lilacinum* presenta un micelio color blanco al principio y posteriormente se torna de color lila, lo cual indica que ha iniciado la fase de esporulación (Figura 2B); y *B. bassiana* es de color blanco y permanece de ese color hasta el final de la esporulación (Figura 2C).

El cluster agrupó el aislado comercial PHC en *Beauveria bassiana* con 100 % de similitud con respecto a los otros aislamientos (Figura 3), Lo que indicó que el aislado al ser comparado con las secuencias obtenidas del GenBank, tiene confiabilidad de ser el género *Beauveria*. Se muestra el árbol con mayor probabilidad de registro (-1011.5146). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas con un total de 437 posiciones en el conjunto de datos final.

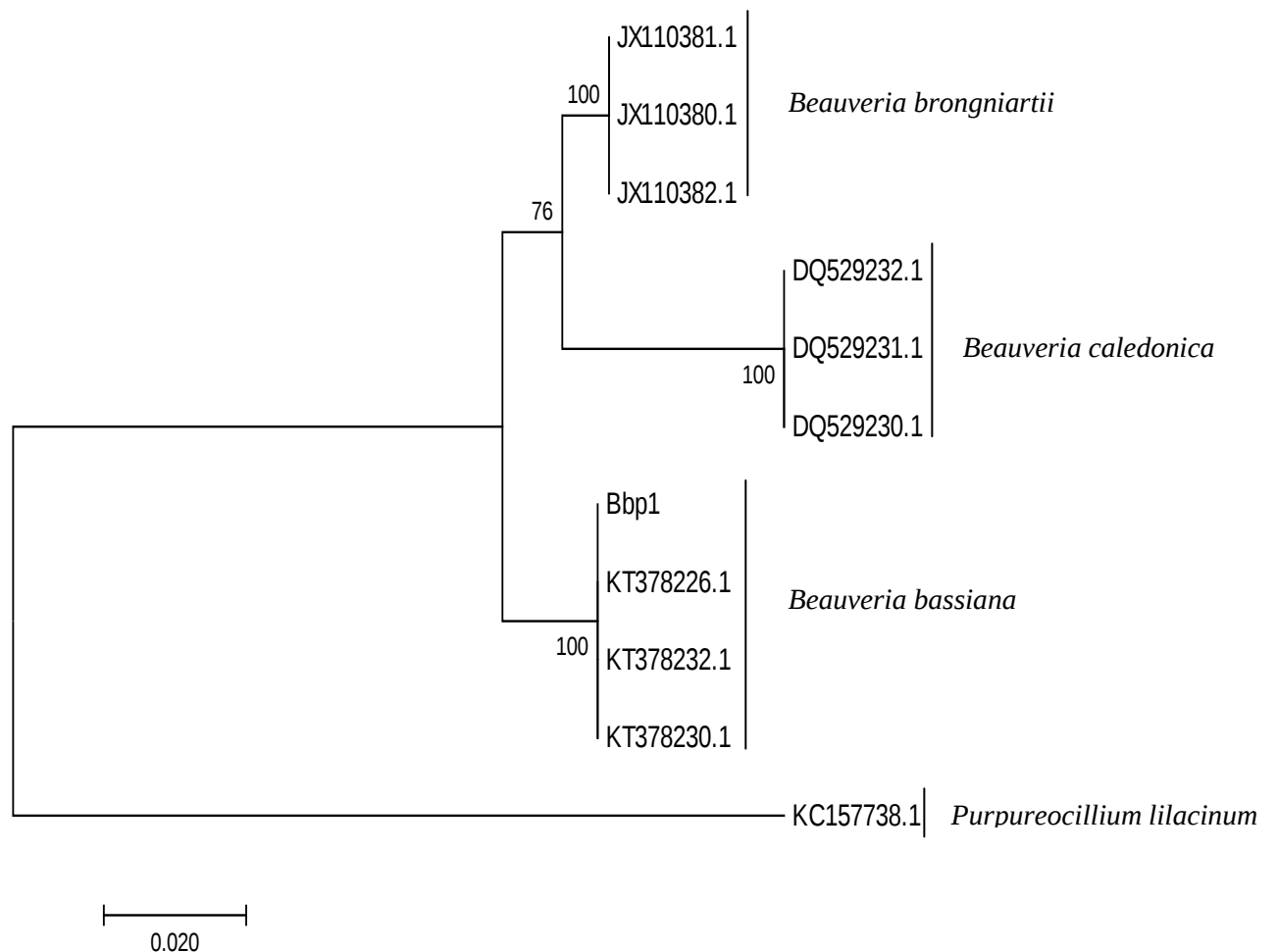


Figura 3. Árbol filogenético ML (Máxima Verosimilitud) de la secuencia de 570pb del aislado Bbp1 de *Beauveria bassiana*, la región amplificada fue ITS 4 e ITS 5, los números de los nodos representan los valores de soporte estadístico (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra de la escala indicó que se tiene 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.

Para el aislamiento MeDL, se obtuvo una secuencia de 559pb, la cual se utilizó para el análisis filogenético con otras secuencias descargadas de la base de datos del GenBank, el análisis de máxima verosimilitud colocó a MeDL cercano a *Metarhizium anisopliae* (Figura 4)

Se muestra el árbol con mayor probabilidad de registro (-1096.5776). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Había un total de 506 posiciones en el conjunto de datos final.

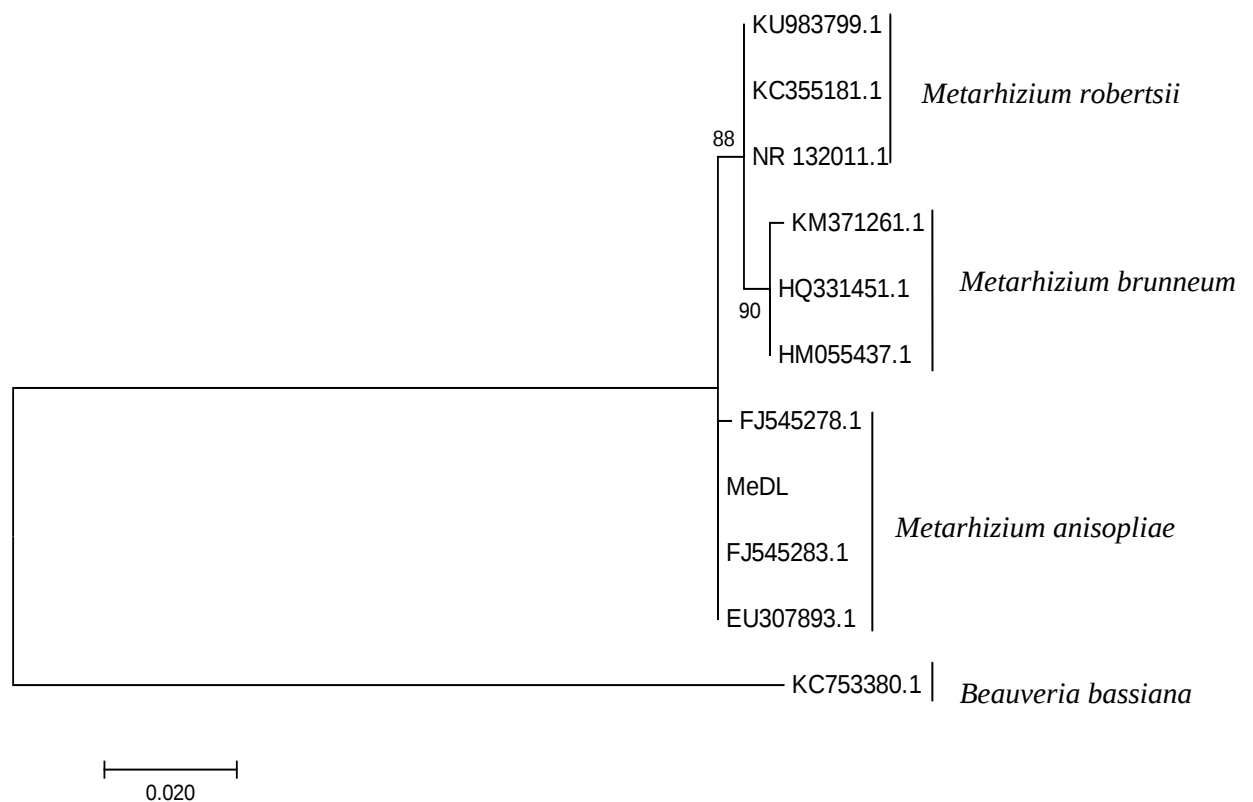


Figura 4. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) de la secuencia del aislado MeDL de 559 pb. El cual se agrupó en el género de *Metarhizium anisopliae* con la región amplificada de ITS4 e ITS5, de 559 pb, los nodos representan el soporte estadístico de Bootstrap de 1000 repeticiones, con 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.

En el caso del aislado PurlilM1 con 590pb, en el árbol filogenético se separaron dos grupos, en el primer grupo se compararon secuencias de *Purpureocillium lilacinum*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea* y en el segundo grupo a *Metarhizium anisopliae*; con el Método de Máxima Verosimilitud y el modelo Kimura 2-parametros, el aislado se colocó en las secuencias de *Purpureocillium lilacinum*, con un soporte de de rama de 100 %, con valores de substitución de 0.020 por unidad de longitud de la rama (Figura 5). Se muestra el árbol con mayor probabilidad de registro (-1845.6078). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Había un total de 469 posiciones en el conjunto de datos final.

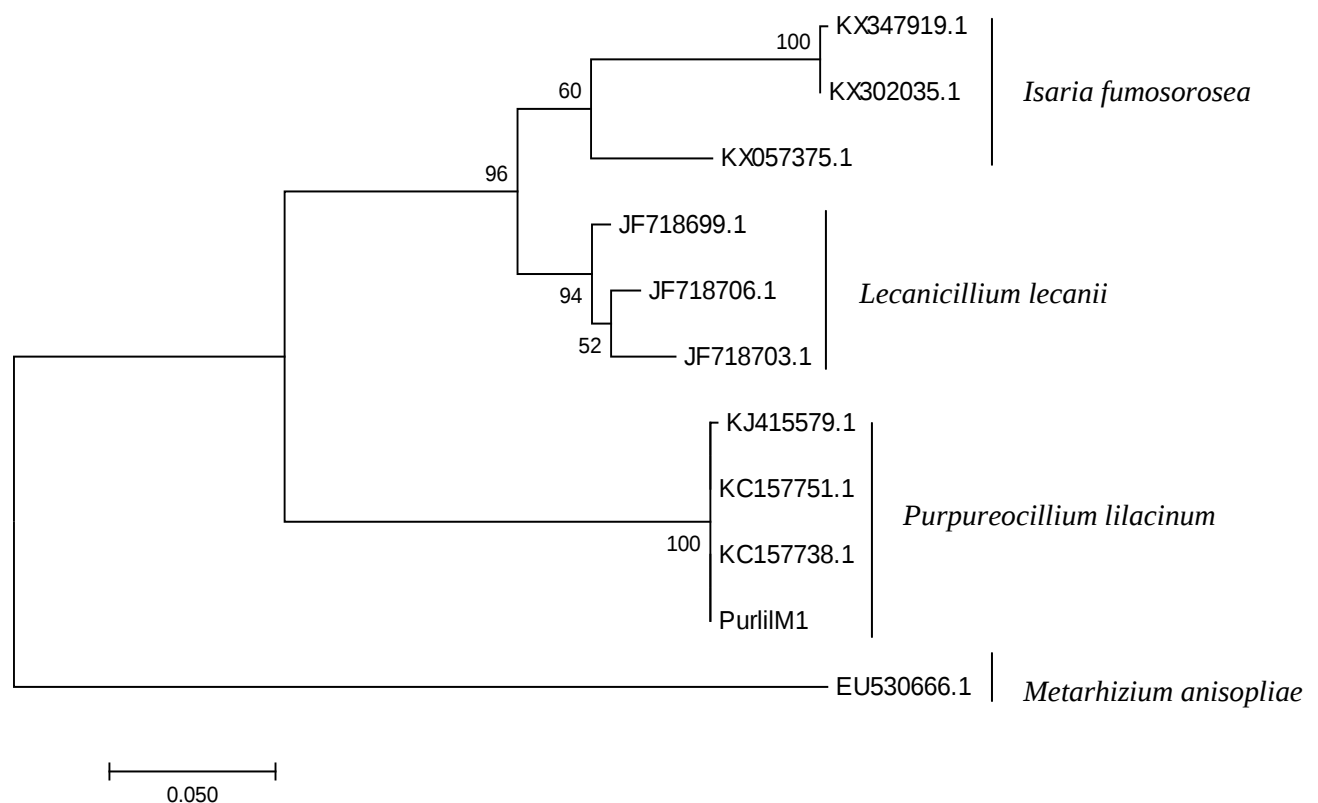


Figura 5. Árbol filogenético ML (Máxima Verosimilitud) del aislado PurlilM1 de *Purpureocillium lilacinum* amplificado con la región ITS 4 y ITS 5, los números de los nodos representan los valores de soporte estadístico (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra de la escala indicó que se tiene 0.020 substituciones por unidad de longitud de la rama.

Identificación morfológica y molecular de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

En la caracterización morfológica de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) se observaron al microscopio las siguientes características: los especímenes tienen antenas con 13 artejos, cabeza triangular con ojos prominentes y abdomen con ocho segmentos, las fémora de las tres patas están engrosadas; en la cara externa de las tibias se observaron dos hileras de espinas que se engrosan de la parte basal a la parte distal, en las patas traseras se presentan dos hileras

de espinas que finalizan donde empiezan los espolones en forma de cuña. La diferencia entre macho y hembra es por el tamaño de la cabeza al abdomen: el macho es más largo (2.3 cm) y la hembra más corta (2.0 cm); además la hembra es más robusta (0.85 cm), mientras que el macho es más delgado (0.75 cm), sin embargo la principal diferencia es en el aparato reproductor (Figura 6 A y B). Todas las características fueron comparadas con las claves de Anaya et al. (2000).



Figura 6A. Vista ventral de macho y hembra de *Sphenarium purpurascens*(Charpentier)



Figura 6B. Vista dorsal de macho y hembra de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier)

Respecto a la identificación molecular, se obtuvieron secuencias de 683 y 735pb para los individuos etiquetados como Cha1 y Cha2. El análisis molecular de las secuencias utilizadas, mostró agrupación de Cha1 y Cha2 con el grupo de secuencias de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) apoyado en 99 % de soporte de rama (Figura 7), con lo cual se corrobora que efectivamente, se trata de *Sphenarium purpurascens*.

Se muestra el árbol con mayor probabilidad de registro (-1566.2783). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Había un total de 622 posiciones en el conjunto de datos final.

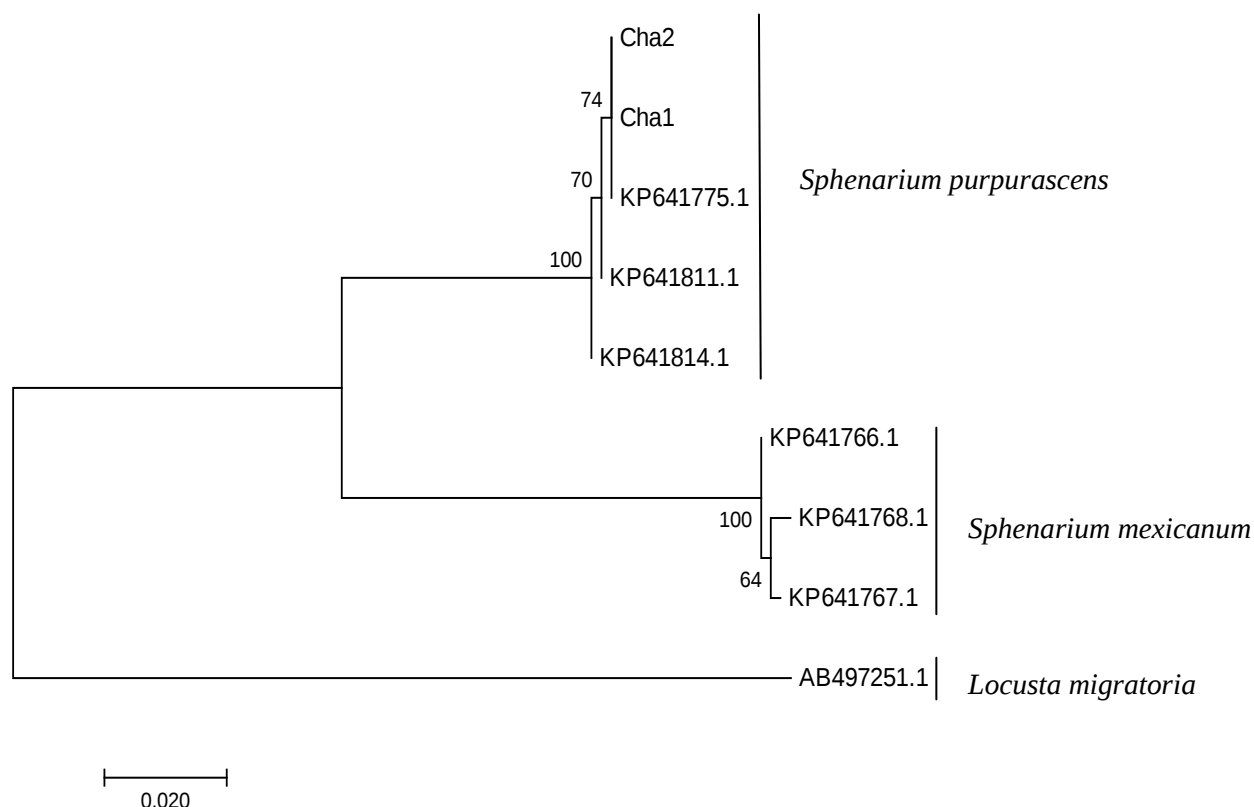


Figura 7. Árbol filogenético de los ejemplares de *Sphenarium purpurascens*, las secuencias utilizadas para la agrupación fueron fragmentos del gen Citocromo Oxidasa Subunidad 1, con el método de Máxima Verosimilitud (ML) y el modelo de Kimura de 2 parámetros. El análisis bootstrap fue realizado con 1000 repeticiones.

DISCUSIÓN

La identificación morfológica se realizó en base a características macroscópicas y microscópicas. Dentro de las primeras, destacan: tipo de micelio y color característico de cada hongo: blanco para *B. bassiana*; verde para *M. anisopliae*, (Humber, 1997); y lila para *P. lilacinum* (Domsh and Gams, 1980; Samson, 1974). Con respecto a las características microscópicas Bischoff *et al.* (2009), mencionan que para *M. anisopliae* la más importante es la forma y tamaño de los conidios tanto de largo como de ancho; las medidas del aislamiento MeDL coinciden con las reportadas por Schapovaloff *et al.* (2015). En el caso del hongo

comercial *B. bassiana*, los conidios observados fueron cilíndricos a ovoides, corresponden a *B. bassiana* de acuerdo a las claves de Barnett and Hunter (1972); *P. lilacinum* presenta un tamaño de conidios en un rango de 1.75 a 2.21 μm , lo cual concuerda con lo reportado por Won *et al.* (2015).

La identificación molecular se realizó con los primers universales ITS4 e ITS5, para el aislamiento PurlilM1 la secuencia que se obtuvo mostró 100 % de similitud con secuencias de *P. lilacinum*. Los grupos monofiléticos cercanos a este género son *Isaria* y *Pochonia* (Luangsa *et al.* 2005); debido a que no es posible diferenciar a *Purpureocillium* de *Isaria* a nivel morfológico, por la similitud en la forma y tamaño de estructuras y conidios, en el análisis filogenético se incorporaron secuencias de ambos. Como resultado, PurlilM1 quedó incluido en el grupo de *Purpureocillium lilacinum* y no en *Isaria*, lo que coincidió con Luangsa *et al.* (2005), quienes reordenaron la clasificación de *Paecilomyces* con base a regiones ITS y β -tubulina. El aislamiento se obtuvo de suelo agrícola y Prasad *et al.* (2015), mencionan la amplia distribución de este hongo en desiertos, selvas, suelos agrícolas y pastizales.

La secuencia del aislamiento MeDL, mostró 99% de similitud con las secuencias de *M. anisopliae*, esto coincidió con la identificación morfológica, sin embargo Bischoff *et al.* (2009), mencionan que el linaje monofilético de *Metarhizium* es complejo; con la construcción del árbol filogenético, el aislamiento MeDL quedó cercano al grupo de *Metarhizium anisopliae*, Luangsa *et al.* (2017) mencionan que solo un nombre debe ser aplicado a un hongo. Con base en lo anterior, la taxonomía de MeDL es más clara y se descarta que pertenezca a las especies *M. robertsii* o *M. brunneum*, aunque por la gran cantidad de especies de este género, con el análisis filogenético realizado en el presente estudio no es posible determinar si el aislamiento MeDL pertenece a otras especies como *acridum* que también ataca a insectos de la familia Orthoptera.

En el caso del análisis molecular del aislamiento Bbp1, obtenido del producto comercial PHC Bea tron®, la secuencia tuvo 100% de similitud, con secuencias de *B. bassiana*, el árbol

filogenético agrupo al hongo en la especie *bassiana*, y lo separo de otras especies como *caledonica* y *brongniartii*, Nageswara *et al.* (2009), mencionan que la distancia genética entre especies es grande, esto permite obtener un árbol con resolución muy alta (Zumaquero *et al.* 2014), aunque es deseable corroborar con secuencias de factor de elongación (EF1- alpha).

Además de la identificación, es posible evaluar la variabilidad y diversidad genética entre especies con marcadores moleculares específicos (RAPD's y RFLP's) (Becerra *et al.* 2007) o con las secuencias del genoma completo de estos microorganismos (Prasad *et al.* 2015; Staats *et al.* 2014).

Para confirmar y definir correctamente la especie del insecto plaga, se utilizaron herramientas de biología molecular, realizándose la secuenciación del gen que codifica la síntesis de la enzima Citocromo Oxidasa I; el análisis filogenético agrupo los individuos colectados Cha1 y Cha2 dentro de la especie *S. purpurascens*. Pedraza *et al.* (2015) reportan siete especies *S. mexicanum*, *S. histrio*, *S. borrei*, *S. minimum*, *S. macrophallicum*, *S. rugosum*, *S. purpurascens* y Sanabria *et al.* (2017) describen 8 nuevas especies *S. adelinae*, *S. crypticum*, *S. infernalis*, *S. miztecum*, *S. occidentalis*, *S. tarascum*, *S. totonacum* y *S. zapotecum*.

Respecto a la caracterización morfológica, el género *Sphenarium* es endémico de México y Guatemala, pertenece a la superfamilia acridoidea y a la familia Phrygomorphae. Los estudios de identificación de género y especie se realizaron con claves taxonómicas de tipo morfológico (Anaya, 2000), identificándose que, de acuerdo a las características morfológicas, los especímenes colectados pertenecían a *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

La distribución de las especies en México depende de la altitud, Sanabria *et al.* (2015) mencionan que *S. purpurascens* está adaptado a zonas con altitud superior a 2000 msnm, la cual corresponde a la altitud de la zona de colecta en el presente estudio, mientras que otras especies como *S. mexicanum* y *S. histrio* están adaptadas a altitudes menores.

Los estudios moleculares realizados han permitido clarificar las diferencias entre las especies incluidas en el género *Sphenarium*, sin embargo, es necesario realizar investigación más

detallada con respecto a *Sphenarium purpurascens* para saber si es un taxón compuesto de más de una especie (Sanabria et al. 2015).

CONCLUSIONES

La identificación molecular de hongos confirmo a *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum* y *Metarrhizium anisopliae* con 100% de similitud al compararlos con las bases de datos del NCBI, además del 99 y 100% de similitud en el agrupamiento de los arboles filogenéticos generados para cada hongo.

A nivel morfológico y molecular, esta última con la secuenciación del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), se confirmó la identidad *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), como plaga asociada al cultivo del maíz en la zona de estudio.

LITERATURA CITADA

- Albuquerque, A.C., Pereira, K.C.A., Cunha, F.M., Veiga, A. and Athayde, A.C.R. (2005). Patogenicidad de *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* Sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology* 34 (4):585-591.
- Anaya, R. S., Romero, N. J. y López, M. V. (2000). Manual de diagnóstico para las especies de chapulín (ORTHOPTERA: Acridoidea) del Estado de Tlaxcala y estados adyacentes. Colegio de Postgraduados, México. 266p.
- Arana C. A., Huerta A., Espinoza F., Téllez J. A., Maqueda G. A. (2014). Control Biológico del Chapulín en México, *BioTecnología* 18 (1): 28-49.
- Archuleta T. A. (2012). Caracterización morfológica y molecular de *Beauveria bassiana*(Balsamo) Vuillemin y *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin de suelos cultivados y no impactados en el norte de Sinaloa, Tesis de Maestría, CIDIIR, IPN. 83 pp
- Barnett, L. and Hunter, B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. New York. United States of America. 241 pp

- Becerra V., Paredes M. C., Rojo C. M., y France A. I. (2007). RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*, Agricultura Técnica 67(2):115-125.
- Bischoff, J. F., Rehner S. A. and Humber R. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101 (4): 512-530. DOI: 10.3852/07-202
- Cano S. Z., and Cerritos R. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection* (27): 3–5.
- Carrillo B. M. G., Guzmán F. A. W., Alatorre R. R., Enríquez V. J. N. (2013). Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microb. Ecol.* 65: 437–449.
- CESAVEG (2007). Campaña de manejo fitosanitario de cultivos básicos: chapulín, Boletín informativo. 12 p
- Da silva W. O., Santi L., Correa A. P. F., Silva L. A., Schrank A., Vainstein M. H. (2010). The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle *Fungal Biology*. 114: 911-916
- Delgado, P. A. M.; Murcia O. B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, Taubaté. 6 (2): 77-90.
- Domsh, H. and Gams, W. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press. New York USA 859 pp.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball, S. L. and Waard J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* DOI 10.1098/rspb.2002.2218

- Humber, R. (1997). Fungi: Identification In Manual-of-Techniques-in-Insect-Pathology. USDA, Ithaca, New York 154-185 pp.
- Jing T. H. D., Li L., Chi H., Steven A., Ruiyan M. (2015). Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to *Bemisia tabaci*, with some observations on the fungal infection process and host immune response, *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 147–153
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kram A. A. and Kram J. K. (2012). Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review), *Forest Ecosystems - More than Just Trees*, Dr Juan A. Blanco (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/30596. -
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* Mol. Biol. Evol. 33(7):1870–1874
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I, Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future, *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1–41.
- Luangsa J. J., Nigel H. J., Leka M. and Samson R. (2005). On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109 (5): 581–589
doi:10.1017/S0953756205002741
- Luangsa J. J., Houbraken J, Van Doorn T, Hong S. B, Borman A. M. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinum*. *FEMS Microbiol Lett* 321: 141–149.

- Luangsa J. J., Mongkolsamrit S., Thanakitpipattana D., Khonsanit A., Tasanathai K., Noisripoom W., and Humber R. (2017). Clavicipitaceous entomopathogens: new species in *Metarhizium* and a new genus *Nigelia* Mycol Progress 16:369–391 DOI 10.1007/s11557-017-1277-1
- Monzon A., Herrera I., Mendez E. R. (2009). Guía Producción artesanal de *Paecilomyces lilacinum* para el control de nematodos. Funica, p17
- Mudgal, S., De Toni, A., Tostivint, C., Hokkanen, H., Chandler, D., (2013). Scientific Support, Literature Review and Data Collection and Analysis for Risk Assessment on Microbial Organisms Used as Active Substance in Plant Protection Products – Lot 1 Environmental Risk Characterization. EFSA Supporting Publications, EN-518. 149 pp.
- Nageswara R. R. N., Annette R., Uma M. R. C. and Uma D. K. (2009). Molecular phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi*. Rev. Iberoam. Micol. 26(2):129-145.
- Ocampo V. R. V., H. M. I., Quijano C. J. A., Yañez L. R., I., Torres P. R., Guevara G., Rico G. E., Castro R. A. E. (2012). Elements for the sustainable management of acridoids of importance in agriculture. African Journal of Agricultural Research 7(2): 142-152.
- Pedraza L. C., Barrientos L. L., Rocha S. A., Zaldívar R. A. (2015). Montane and coastal species diversification in the economically important Mexican grasshopper genus *Sphenarium* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 84: 220–231.
- Prasad P., Varshney D. and Adholeya A. (2015). Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. BMC Genomics 16:1004. DOI 10.1186/s12864-015-2229-2

- Rehner S. A., and Buckley E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs, *Mycologia* 97(1): 84–98.
- Rios V. C., Bustillos R. J. C., Berlanga R. D. I., Acosta M. C. H., Ruiz C. M. F., Salas M. M. Á. (2015). Reporte preliminar de identificación molecular de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. Patogénicos al chapulín gordinflón *Brachystola magna* (Girard) (Orthoptera: Romaleidae) en Chihuahua, México. *Entomología Mexicana* 2: 247-252.
- Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., and Hernandez, F. (2015). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/col>.
- Samson R.A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6: 1-119.
- Sanabria U. S., Song H, Oyama K, González R. A, Serrano M. A., and Cueva del Castillo R. (2015). Body Size Adaptations to Altitudinal Climatic Variation in Neotropical Grasshoppers of the Genus *Sphenarium* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *PLoS ONE* 10 (12): e0145248. doi:10.1371/journal.pone.0145248
- Sanabria U. S. Song H, Oyama K, González R. A, and Cueva del Castillo R. (2017). Integrative taxonomy reveals cryptic diversity in neotropical grasshoppers: taxonomy, phylogenetics, and evolution of the genus *Sphenarium* Charpentier, 1842 (Orthoptera: Pyrgomorphidae), *Zootaxa* 4274 (1): 001–086
- Schapovaloff M. E., Angeli L. F. A., Urrutia M. I. y López C. C. (2015). Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 47(2):138-142

- SIAP (2017). Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA). México, D.F. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Staats C. C., Junges A., Muniz G. R. L., Thompson C. E., Morais G. L., Boldo J. T., Gonzaga L., Andreis F. C., Gerber A. L., Nicolau S., Rana L. A. P, Broetto L., Landell M., DaSilva W. O. B., Silveira C. P., Serrano T. R., Oliveira E. S., Kmetzsch L., Marilene H. V., Vasconcelos A. T. R. and Schrank A (2014). Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics* 15:822 1-18
- Uribe G. E. y Santiago B. M. Á. (2012). Contribución al conocimiento de enemigos naturales del chapulín (orthoptera: acridoidea) en el estado de Querétaro, México. *Acta Zoológica Mexicana* 28(1): 133-144
- Vázquez J., M. Á., Aragón G. A., Martínez M. D., Castillo H.D., Nava G. S. and Pérez T. B. (2016). *Sphenarium purpurascens* control with *Beauveria bassiana* and extracts amaranth (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 235-247.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., New York, pp. 315–322
- Won W. L., Tae Y. S., Sung M. B., Soo D. W. (2015). Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools, *Journal of Asia-Pacific Entomology* 18: 607–615
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol. Sci. Technol.* 17: 553–596.

Zumaquero R. J. L., López T. J. J., Rojas G. R., Sansinenea E. (2014). Lethal effects of a Mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). Brazilian Journal of Microbiology 45(2): 551-557.

CAPÍTULO II

VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

RESUMEN

El control biológico con hongos entomopatógenos (HE), es una alternativa en el manejo de insectos plaga de importancia económica, los aislamientos nativos y comerciales usados para el control de insectos se evalúan con bioensayos de germinación y virulencia en laboratorio y en campo. En el presente estudio se estableció un bioensayo de germinación con tres temperaturas (5, 25 y 38 °C) en tres tiempos (24, 48 y 72 h) para los HE *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum* los datos se analizaron con un diseño experimental de bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas con cinco repeticiones, las parcelas grandes (PG) fueron las temperaturas y las parcelas chicas (PCh) fueron los aislamientos. Se obtuvo una germinación del 100 % a una temperatura de 25 °C y de 0.2% a 5°C para los tres hongos (PG, $P < 0.0001$ $\alpha = 0.05$), cuando se incubaron a 38°C el aislamiento de *P. lilacinum* alcanzo 92% de germinación. La virulencia en especímenes de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), evaluada como tiempo letal medio (TL_{50}) a una concentración de 1×10^8 conidios·ml⁻¹, fue de 3.12 días para *M. anisopliae* y de 3.09 días para *B. bassiana*. En el bioensayo en campo, *Metarhizium anisopliae* tuvo 87.6 % de mortalidad a los 7 días y con *Beauveria bassiana* se obtuvo 95.2% a los 9 días (MANOVA, $P < 0.0001$, $\alpha = 0.05$).

Palabras clave: Termotolerancia, Chapulín, Aplicación.

INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 100 géneros y cerca de 700 especies de hongos entomopatógenos, sin embargo, la mayoría de los hongos producidos comercialmente están basados en unas cuantas especies de *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Lecanicillium* (Jaber et al 2017), para ser utilizados en programas de control biológico. Esto se debe a que son capaces de afectar a insectos plaga de diferentes taxas: (Lepidoptera:Noctuidae, Bombycidae Diptera:Agromyzidae (Fernandes et al. 2008); Thysanoptera:Thripidae Coleoptera:Curculionidae, Melolonthidae, Tenebrionidae, Elateridae, Crysomelidae, Scolytidae, Elateridae (Sonja et al. 2014); Hymenoptera: Cynipidae, Vespidae, Formicidae; Hemiptera: Aphididae, Aleyrodidae (Jaber et al. 2017); Orthoptera: Acrididae (Mullie et al. 2010; Quesada, 2004); además de que afectan a importantes plagas urbanas como mosquitos, cucarachas, garrapatas y ácaros (De Paula et al. 2008; Dogan et al. 2017).

La investigación que se ha desarrollado con hongos entomopatógenos desde el año de 1983 ha sido muy amplia (Vega et al. 2009), y respalda la aplicación de hongos entomopatógenos en la agricultura, como una alternativa viable para minimizar los daños al medio ambiente y a la salud del ser humano, causados por los insecticidas químicos.

Algunos estudios reportan el uso de hongos entomopatógenos para el control biológico del chapulín en cultivos como el maíz y frijol. Tamayo (2009), reporta la aplicación de *Metarhizium anisopliae* con buenos resultados en el control de esta plaga. Sin embargo a pesar de las investigaciones realizadas, los problemas agrícolas que se pretenden resolver con hongos entomopatógenos aún están presentes; la virulencia y patogenicidad en condiciones *in vitro*, disminuye en las pruebas de campo. Un estudio realizado por Orduño (2009) demuestra una disminución del 84 % a 7% en el porcentaje de mortalidad al pasar de laboratorio a campo, respectivamente.

Las causas asociadas a la disminución de la efectividad parasitológica de los hongos entomopatógenos al pasar de condiciones *in vitro* a las condiciones de campo son: cambios

bruscos de condiciones ambientales, por ejemplo temperatura, humedad, lluvias, radiación solar; especificidad de la cepa; forma y volumen de aplicación; tiempo de almacenamiento; y la contaminación del producto; así como, cambios en los hábitos y biología de la plaga (Guerrero *et al.* 2013; Polovinko, 2013). El objetivo de este estudio fue evaluar el porcentaje de germinación, virulencia y patogenicidad de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum* en condiciones *in vitro* a diferentes temperaturas y su comparación de comportamiento en condiciones de campo, como agentes de control biológico contra *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

REVISIÓN DE LITERATURA

La plaga de chapulín ha ido en aumento debido a los cambios climáticos que está sufriendo el país, por lo que es necesario realizar el control con métodos efectivos y amigables con el medio ambiente para evitar daños a la fauna benéfica (Delgado, 2011; Arana et al, 2014).

Los hongos entomopatógenos son una alternativa para el control de plagas, los géneros de mayor importancia son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Verticillium*, a pesar de los avances en el desarrollo de nuevos productos a base de hongos entomopatógenos se necesita determinar experimentalmente la forma de interacción del hongo con su hospedero y con el medio ambiente.

Proceso de infección de hongos entomopatógenos en insectos

Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto

La adhesión del hongo esta mediado por unas moléculas que el hongo sintetiza y que reciben el nombre de adhesinas y también por el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica, después de la adhesión la espora germina y desarrolla un apresorio para pasar a la fase de penetración

Penetración en el hemocele.

La forma de penetración depende de las características de la cutícula tales como el grosor, la presencia de sustancias anti fúngicas y nutricionales, se llevan a cabo dos mecanismos el primero es físico una estructura fúngica denominada haustorio ejerce presión la cual deforma y luego rompe la capa cuticular, el segundo mecanismo es químico consiste en la acción enzimática, comienza con la producción de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo, de hecho en diversos estudios se menciona la activación de cepas de hongos entomopatógenos a partir del pase en medio de cultivo implementado con cutícula de *Sphenarium purpurascens*(Charpentier) como inductor de proteasas y quitinasas (Saucedo et al 2002), aunque en ocasiones los hongos pueden penetrar por las aberturas naturales del insecto, sin embargo los fluidos digestivos pudieran destruir las hifas y la espora.

Desarrollo del hongo en el insecto

Una vez en el hemocele, los hongos realizan la transición de micelio a levadura y deben enfrentarse al sistema inmune del insecto el cual produce antígenos que atacan al hongo, o bien lo encapsulan para inhibirlo, los insectos también son capaces de modificar su comportamiento con el propósito de luchar contra los agentes patógenos, tal es el caso de la langosta *Locusta migratoria* que al ser infectada por *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff ; Sorokin) incrementa su temperatura corporal por exposición al sol deteniendo el desarrollo de las blastosporas del hongo y facilitando la acción de los hemocitos de su sistema inmune, si el hongo tiene la capacidad de evadir el sistema inmune del insecto, se produce la septicemia (Téllez et al, 2009).

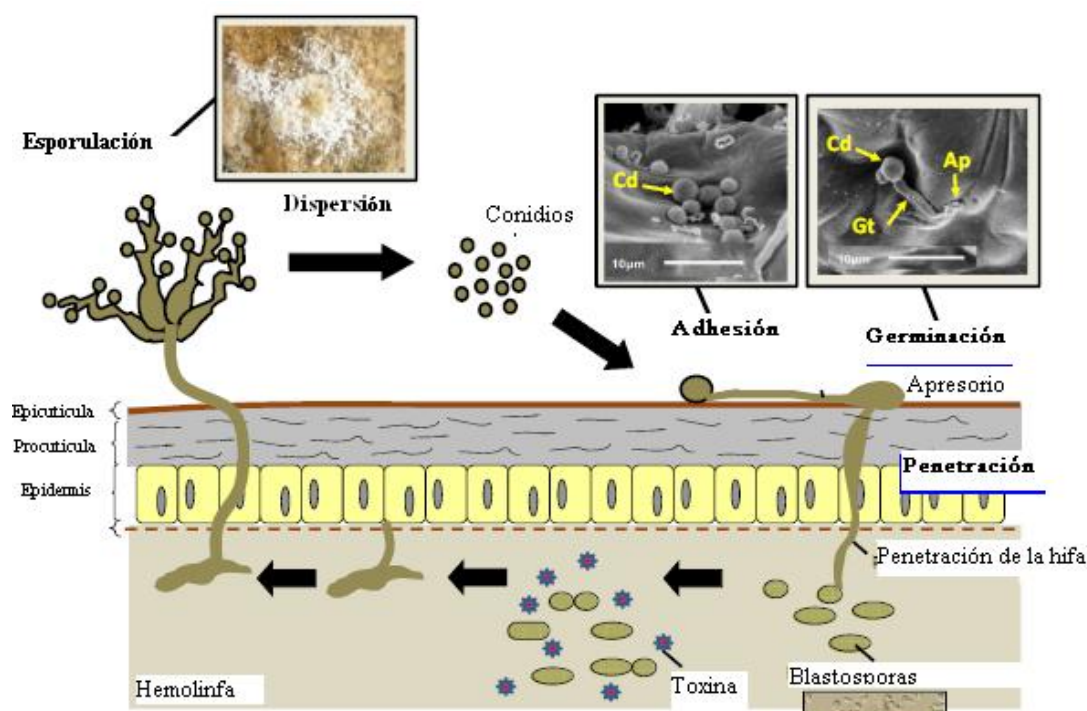


Figura 1.- Proceso de infección de *Beauveria bassiana* en invertebrados. Tomado de Moura, 2016.

Efectividad de hongos entomopatógenos

Factores que afectan la germinación de conidios

Los hongos entomopatógenos son organismos vivos que pueden ser afectados por factores químicos (fungicidas), biológicos (variabilidad genética, otros hongos), físicos (calor, radiación solar), y otros más que formen parte del ecosistema donde se desarrollan. Cuando se realizan bioensayos en laboratorio todos estos factores son controlados en cuartos o cámaras de incubación sin embargo cuando se realizan en condiciones de cielo abierto o invernadero Guerrero et al, 2013 realizaron muestreos durante un periodo de 68 semanas en aire, suelo y vegetación de un área cultivada con amaranto en donde se había aplicado *Metarhizium acridum*, encontraron que el hongo puede permanecer viable hasta por un año y cuatro meses, sin embargo la presencia y concentración del hongo varía dependiendo del lugar y la estación, por ejemplo en el suelo puede permanecer a concentraciones de hasta 2×10^4 UFC/g, pero en el aire y la vegetación prácticamente desaparece después de unas horas probablemente debido a

la radiación solar y a las lluvias, en conclusión el hongo puede permanecer en el suelo pero no en el aire ni en la vegetación pues la radiación solar y la lluvia disminuyen considerablemente su concentración por lo que es necesario la aplicación frecuente del hongo para tener un buen control de la plaga. En el caso de Torres et al , 2013 en nivel laboratorio el desarrollo micelial de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* en temperaturas de 25, 30 y 35°C, encontraron que al aumentar la temperatura de 25 a 30°C el micelio se incremento 27%, sin embargo al aumentar de 30 a 35°C hubo una disminución de 83.9%, además evaluaron la velocidad de germinación y efectividad patogénica para cultivos plurisporicos y monosporicos y encontraron que la efectividad patogénica aumento más de 50% para los cultivos monosporicos, por lo que concluyen que el rango óptimo de temperatura es de 25 a 30°C y que los aislamientos monosporicos tienen mayor potencial de uso.

Otro problema relacionado a la efectividad biológica es el tiempo de almacenamiento, cuando se almacena *Beauveria bassiana* en bajas temperaturas (8°C), puede permanecer viable hasta por 3 años sin embargo cuando se almacenan a 18°C la viabilidad no dura más de un año (Polovinko, 2013).

Bioensayos con *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) a nivel de campo

El chapulín en los últimos años se ha convertido en una de las principales plagas de los cultivos de maíz y frijol en zonas de temporal, esto se debe a su alta capacidad de reproducción, amplio rango de hospederos y hábitos migratorios. Las principales especies de chapulín que atacan los cultivos de temporal son *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), *Melanoplus differentialis*, *Brachystola magna* y *Boopedon diabolicum*, las cuales en términos generales pueden llegar a causar pérdidas en rendimientos de 10 al 30% en granos básicos y se ha observado que pueden disminuir entre un 30 y 40% la producción de forraje; por lo que es muy importante prevenir el aumento de su población (CESAVEG, 2007). Después de la

langosta, el chapulín es uno de los insectos plaga más predominantes en México, tiene efectos devastadores en diferentes estados de la república, lo que genera importantes pérdidas económicas.

El chapulín se puede presentar desde junio después de las primeras lluvias con el temporal ya establecido, sin embargo, si este temporal se retrasa puede darse el caso que se presenten hasta el mes de agosto. En su estado natural se pueden observar diferentes estadios a la vez, se pueden encontrar ninfas de primer estadio desde junio o julio hasta octubre, apareamientos de septiembre a diciembre, oviposuras de octubre a enero y muerte casi al 100% de la población en enero, sin embargo su población disminuye sensiblemente por el frío desde octubre.

En un estudio realizado por Tamayo, 2009 se hicieron aplicaciones del hongo *Metarhizium anisopliae*, a dosis de 1.5×10^{13} conidios/ha con 200, 300, 400 y 600 L de agua/ha, contra ninfas del tercer estadio de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentialis* (Thomas) (Orthoptera: Acrididae) en maíz y frijol, en Acámbaro, Guanajuato, México durante 2003-2006. Las dosis con mejor respuesta para el control de las especies de chapulines fueron 5×10^{12} , 8×10^{12} y 1×10^{13} conidios/ha. Realizaron evaluaciones de *M. anisopliae* sobre *S. purpurascens* en poblaciones de ninfas de segunda y tercera fase y adultos; las ninfas registraron mortalidad a los 15 días después de la aplicación (<80%), mientras que en los adultos se alcanzó 100% de control. Las aplicaciones de *M. anisopliae* por parte de los productores en Guanajuato se inician con las ninfas y se intensifican en el estado adulto, para obtener mejores resultados.

En el estado de Tlaxcala se propuso la alternativa de control biológico utilizando los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para ser evaluados por los mismos productores en las comunidades de Vicente Guerrero, Álvaro Obregón y Pipiyola. Los resultados de las evaluaciones demostraron que la densidad de población de chapulines presentes en las parcelas experimentales se redujo considerablemente, sin embargo es

necesario realizar nuevas evaluaciones para tener resultados más confiables e incorporar a los productores en este proceso (Palerm et al, 2005).

En el estado de Querétaro el chapulín es la plaga económicamente más importante en el sur del Estado, principalmente para cultivos de temporal. Las especies más importantes por su cantidad son *M. differentialis* y *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Acridoidea) de 25 registradas para el estado. El complejo de especies llamado chapulín tiene hábitos fitófagos muy variados, comen casi todo tipo de vegetal y en casos extremos de falta de material verde hacia el final de su ciclo biológico pueden comer o roer desde papel hasta materiales de poliestireno, comportamiento que se desconoce si su objetivo es cubrir algún requerimiento nutricional o es algún tipo de hábito (Uribe et al, 2012).

En Durango, México se mencionan estudios de control biológico de chapulín (Orthoptera: Acrididae). Los enemigos naturales de la plaga se conocieron realizando colectas intensivas en áreas de pastizales con mayor incidencia de ortópteros. Se evaluó la toxicidad de un aislamiento nativo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin usando un bioensayo por inmersión de hojas de frijol contra ninfas de *Brachystola magna* (Girard). Además se documentó la presencia de *Entomophaga* spp., sobre *B. magna*, *Melanoplus* spp. y *Boopedun* sp. En relación a los enemigos naturales, el primer año de muestreo se colectaron 1,200 individuos con un parasitismo máximo de 1.5 %, en el segundo año el total de chapulines fue de 1,346 con 19.6% de parasitismo. Los principales parasitoides correspondieron a las familias Sarcophagidae, Nemestrinidae y Tachinidae. La cepa de *B. bassiana* causó una mortalidad de ninfas del 100% en dosis de 1.2×10^9 blastosporas·mL⁻¹. La CL50 fue de 5.1×10^6 (2.8×10^6 - 8.3×10^6 blastosporas·mL⁻¹). No se encontró la presencia de *Entomophaga grylli* (Fresenius) Batko en las poblaciones de chapulines en las áreas muestreadas de pastizales de Durango.

Con base en el conocimiento de los parasitoides y depredadores más importantes de chapulines es posible implementar técnicas para la conservación, producción y liberación masiva de estos organismos. Entre los microorganismos entomopatógenos, *M. anisopliae*, *M. flavoviridae* y *B. bassiana* han demostrado efectividad para el control de chapulín en programas extensivos de control de plagas. No obstante, para su uso en el control del chapulín en Durango, se recomienda realizar pruebas de validación de la efectividad tóxica de estos productos en laboratorio y campo. Respecto al momento de la aplicación, es recomendable considerar la biología y ecología del insecto, es necesario dirigir el control sobre las ninfas para que el patógeno sea capaz de causar una epizootia, de tal modo que el microorganismo pueda propagar la infección en la población, García et al., (2009) seleccionó las cepas más tóxicas de *B. bassiana* y *Metarhizium* spp., para propagarlas en medio de cultivo mixto y formularlas en aceite o tierra de diatomeas, para elaborar un producto que sustituya el uso de insecticida químico

En el estado de Chihuahua, el chapulín frijolero (*Brachystola magna* Girard), es un problema en la zona temporalera, ya que afecta más del 60 % de la superficie sembrada anualmente. Para su control se emplean insecticidas organofosforados y cebos envenenados (CESAVECH, 2001); sin embargo, su uso excesivo ha provocado resistencia de la plaga, acumulación de residuos en el medio ambiente y daños a la flora y fauna silvestre benéfica.

Como una alternativa de control biológico se consideró el uso de organismos benéficos, que pueden ser incorporados al manejo integrado de plagas, sin efectos nocivos para el medio ambiente y la salud del hombre y los animales, se estudiaron las condiciones óptimas (medio de cultivo, luz y temperatura) para el desarrollo de los aislamientos nativos de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bb001) y *Metarhizium anisopliae* (Ma002), con el fin de utilizarlas en la regulación de la población del insecto plaga. Los aislamientos se evaluaron en siete medios de cultivo y siete temperaturas. La mayor esporulación se observó en el medio

SDAY. El aislamiento Bb001 mostró el mayor crecimiento en AHM. El crecimiento y esporulación fueron mayores bajo oscuridad continua y a una temperatura de 25 °C. Por otro lado, Ma002 mostró mayor crecimiento en SDA, mayor crecimiento micelial en oscuridad continua y mayor esporulación con luz continua, la temperatura óptima fue de 30 °C. Los resultados mostraron que pueden controlarse adecuadamente las variables ambientales en el laboratorio, para la reproducción de los hongos *B. bassiana* (Bb001) y *M. anisopliae* (Ma002), aislamientos prometedores como una alternativa de control biológico (Barajas et al, 2011).

Los chapulines de las especies *Brachystola magna* (Girard) y *B. mexicana* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae), se presentan año con año en el Estado de Zacatecas, México con un promedio de 86 insectos/m² ocasionando pérdidas totales en el cultivo de frijol. Se realizó un estudio en Laguna del Carretero del municipio de Villanueva, Zacatecas, de septiembre a octubre de 2006, para investigar la diversidad de enemigos naturales. Además se elaboró un bioinsecticida a partir de un aislamiento nativo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a una concentración de 1.5×10^9 esporas/ml, la cual se evaluó en campo. Por otro lado, se inyectó una solución de esporas dentro del homocelo del chapulín a la misma concentración. Respecto a la presencia de enemigos naturales, se observó la presencia de adultos y larvas de *Calosoma* sp. (Carabidae) depredando a ninfas; otros insectos benéficos fueron: Asilidae, *Polistes* sp. (Vespidae), *Epicauta* sp. (Meloidae) y *Sarcophaga* sp. (Sarcophagidae), contra *Brachystola* spp. La mosca *Sarcophaga* presentó un promedio de larvas dentro de chapules hembras de 9.21 ± 1.31 y de chapulines machos de 2.98 ± 0.66 , existiendo preferencia por las hembras. La aplicación del bioinsecticida redujo la población de 15.08 a 3.03 insectos/m²; las poblaciones de ninfas de *Brachystola* spp., previas y posteriores a la liberación de chapulines inyectados con *B. bassiana*, fueron de 2.68 a 0.5 insectos/m².

MATERIALES Y METODOS

Ubicación geográfica del área de estudio. La primera fase *in vitro* se realizó en los laboratorios de control biológico del Posgrado en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en el municipio de Texcoco, Estado de México. La fase de campo, se realizó en el municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México, ubicado a 19° 39' 38.4" LN y 98° 49' 30.8" W con una altura de 2300 msnm. El clima es templado semiseco, con un rango de precipitación anual de 500 - 700 mm (García et al, 1990)

Bioensayos de germinación de los aislamientos. Para determinar la viabilidad de los conidios de los aislamientos obtenidos, se utilizaron los cultivos monospóricos. Se usó un diseño experimental de bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas con cinco repeticiones, donde las parcelas grandes (PG) fueron las temperaturas 5, 25 y 38°C y las parcelas chicas (PCh) fueron los aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum*. La variable medida fue el porcentaje de conidios germinados.

Cuadro 2.- Diseño experimental de los bioensayos de germinación, HDI= horas después de la inoculación, Bbp1=*Beauveria bassiana*, MeDL=*Metarhizium anisopliae* PurlilM1=*Purpureocillium lilacinum*.

HDI									
Parcelas Grandes	24h			48h			72h		
Temperatura	Aislamientos								
5°C	MeDL	Bbp1	PurlilM1	Bbp1	PurlilM1	MeDL	Bbp1	MeDL	PurlilM1
25°C	PurlilM1	MeDL	Bbp1	Bbp1	MeDL	PurlilM1	Bbp1	PurlilM1	MeDL
38°C	Bbp1	PurlilM1	MeDL	PurlilM1	MeDL	Bbp1	MeDL	PurlilM1	Bbp1

Para realizar los bioensayos se tomó un asa de conidios que se diluyeron en 1mL de Tween 80 a 0.03%, se colocaron 100 µL de esta solución en cajas con ADS, y se esparció con ayuda de un triángulo de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 28 °C por 15 días para la producción de conidios, los cuales se recolectaron por raspado en 20 mL de Tween 80; esta solución se agitó y filtró para eliminar el micelio. Del filtrado se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer y se observó en el microscopio con el objetivo 40X para cuantificar los conidios.

La fórmula utilizada para la cuantificación fue:

$$\frac{Conidios}{mL} = \frac{\sum n}{4} [50,000][Fd]$$

Donde:

Σn=número de conidios contados en 4 repeticiones

Fd=Factor de dilución

La solución se ajustó a una concentración de 1×10^8 conidios·mL⁻¹, a partir de la cual se colocaron 50 µL en cajas petri que contenían 15 mL de Agar Dextrosa Sabourad. Las observaciones se realizaron a 24, 48 y 72 h; se contaron 100 conidios y se observó cuántos de ellos habían germinado. Se consideró como conidio germinado aquél que tuviera el tamaño del tubo germinativo mayor al diámetro del propio conidio.

Bioensayos de virulencia y patogenicidad. Se recolectaron en la zona de estudio una cantidad de 500 especímenes de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). Para inspeccionar el buen estado de los especímenes, se mantuvieron en cuarentena con la finalidad de descartar los individuos que murieran por causa diferente a la infección de entomopatógenos. Posteriormente con el procedimiento descrito para las pruebas de germinación, se prepararon tres concentraciones de conidios: baja (1×10^4 conidios·mL⁻¹), media (1×10^6 conidios·mL⁻¹) y alta (1×10^8 conidios·mL⁻¹), de cada uno de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinum*, más el testigo. Se utilizó como unidad experimental seis vasos de plástico con un individuo por vaso, incluyendo tres repeticiones y dos réplicas en diferente tiempo. Los especímenes se sumergieron durante 30 s en cada una de las soluciones de acuerdo al tratamiento y durante un periodo de 15 días se revisaron cada tercer día durante un periodo de 15 días, para observar el número de individuos muertos; los insectos se alimentaron diariamente con follaje de malezas lavado y desinfectado, el cual se obtuvo de la zona donde se colectaron los chapulines.

Para la determinación del porcentaje de mortalidad se usó la fórmula de Abbot corregida (Abbot, 1925):

$$\% \text{ mortalidad corregida} = \frac{\% \text{mortalidad muestra} - \% \text{mortalidad testigo}}{100 - \% \text{mortalidad testigo}} 100$$

Esporulación del hongo en individuos muertos. Para corroborar la infección por el hongo entomopatógeno, se colocaron los individuos muertos en cámaras húmedas, pasando por dos minutos en soluciones de hipoclorito de sodio 0.03 %, alcohol 70 % y agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron en cajas petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, colocadas en incubación a 25 °C por 7 días.

A partir de los datos registrados se obtuvo el tiempo letal medio TL_{50} , correspondiente al tiempo en días a partir de la infección para que cause el 50 % de la mortalidad; se realizó un análisis Probit (Finney, 1976).

Propagación del hongo por el método bifásico. Se prepararon y esterilizaron tres matraces con 150 mL de Caldo Dextrosa Sabourad, los cuales se inocularon con cinco círculos de cada uno de los aislamientos fúngicos, con crecimientos de 15 días. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 120 rpm, a temperatura ambiente durante 15 días.



Figura 2. Crecimiento de los hongos entomopatógenos en cultivo líquido con agitación.

Se pesaron 250 g de arroz lavado y se colocó en botellas de vidrio que se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C y 15 lb·Pulg⁻² de presión. En condiciones de esterilidad, se

agregaron 10 mL del caldo fermentado en las botellas con arroz y se incubaron a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 15 días. Una vez invadido el sustrato con el hongo entomopatógeno, el producto se trituró y se tamizó para determinar la concentración de conidios por gramo de cada aislamiento, para lo cual se pesaron 0.1 g de cada producto y se colocaron en tubos eppendorf que contenían 900 μL de solución de Tween80 al 0.03 % y se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-3} ; el conteo se realizó en la cámara de Neubauer.



Figura 3. Crecimiento en sustrato sólido a $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en cuarto de incubación.

Validación en campo

El experimento se realizó en el ciclo primavera-verano 2016. Se estableció un cultivo de maíz de temporal, la preparación del terreno fue de forma mecanizada, mediante barbecho y surcado a 0.80 m de separación entre surcos. Se realizó un muestreo simple aleatorio (MSA) en un transecto en W para determinar el grado de infestación de la plaga, mediante la cantidad de individuos presentes por metro cuadrado del cultivo.

Diseño experimental. Los datos se analizaron con un análisis de varianza multivariado (MANOVA) y una prueba de medias LSD, por porcentajes acumulativos con los siguientes tratamientos: T1: aplicación de agua (testigo); T2: aplicación del producto comercial del hongo *Beauveria bassiana*; T3: solución de *Metarhizium anisopliae* aislamiento nativo; T4:

solución de *Purpureocillium lilacinum* aislamiento nativo. Cada tratamiento fue una jaula de tela de mosquitero que abarcó 1 m² del cultivo. Para la aplicación de los productos biológicos se utilizó una aspersora manual de 15 L de capacidad, la cual previamente se calibró para un volumen de agua de 500 L ha⁻¹, a una dosis de 480 g 200 L⁻¹ de agua y esta dosis se utilizó para los demás, se aplicó como coadyuvante Break Thru® a razón de 60 mL 100 L⁻¹ de agua. La infestación de la plaga fue de 20 insectos por metro cuadrado para todos los tratamientos.

La variable medida fue el porcentaje de mortalidad, la cual se obtuvo con base al número de insectos muertos por metro cuadrado por tratamiento. Para esto, se determinó el número de chapulines muertos cada tres días, los especímenes muertos se colocaron en cámara húmeda para asegurar que la muerte fue causada por el hongo entomopatógeno.

Procesamiento de los datos. Los datos obtenidos se analizaron con el software SAS versión 9.0 para Windows, SAS institute Inc. Cary USA, con una prueba de comparación de medias de LSD para observar diferencia estadística significativa $P < 0.05$.

RESULTADOS

Evaluación *in vitro*

Germinación de los aislamientos. Los conidios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. lilacinum* germinaron entre un 99 y 100 % a partir de las 24 h de incubación. Cuando los aislamientos de estas especies fueron expuestas en 38 °C la germinación conidial disminuyó drásticamente sin diferencia estadística entre especies fungosas a las 24 h con un promedio de germinación de 3.4 %, en tanto que, a partir de las 48 h si se diferenció significativamente la germinación, la más alta fue en *P. lilacinum* (37 %), la media para *M. anisopliae* (12.6 %) y la más baja para *B. bassiana* (2.8 %); estas diferencias estadísticas se mantuvieron hasta las 72 h, con incremento importante para *M. anisopliae* y *P. lilacinum*; en tanto que *B. bassiana* prácticamente mantuvo el nivel de germinación identificado desde las primeras 24 h. Los tres

hongos fueron afectados en la germinación al ser incubados a 5 °C, con niveles incipientes de germinación menores al 1 %, sin diferencia estadística entre ellos en los diferentes tiempos de evaluación ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la temperatura en la germinación de conidios de los HE que afectan a *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), en diferentes tiempos de evaluación.

Temperatura	Hongo entomopatógeno	Porcentaje de Germinación (%)		
		Tiempo (h)		
		24	48	72
38 °C	<i>M. anisopliae</i>	4 a ±1.87	12.6 b ±2.50	33.20 b ±2.16
	<i>B. bassiana</i>	2.8 a ±1.30	2.01 c ±1.00	1.8 c ±0.83
	<i>P. lilacinum</i>	3.4 a ±0.89	37± a 2.73	90.8 a ±2.58
	<i>M. anisopliae</i>	99.2 a ±1.09	100 a ±0	100 a ±0
	<i>B. bassiana</i>	99.4 a ±0.89	100 a ±0	100 a ±0
	<i>P. lilacinum</i>	99.8 a ±0.44	100 a ±0	100 a ±0
25 °C	<i>M. anisopliae</i>	0.2 a ±0.44	0.8 a ±0.83	0.4 a ±0.54
	<i>B. bassiana</i>	0.4 a ±0.57	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>P. lilacinum</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.2 a ±0.44
	<i>M. anisopliae</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>B. bassiana</i>	0.4 a ±0.57	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>P. lilacinum</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.2 a ±0.44
5 °C	<i>M. anisopliae</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>B. bassiana</i>	0.4 a ±0.57	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>P. lilacinum</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.2 a ±0.44
	<i>M. anisopliae</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>B. bassiana</i>	0.4 a ±0.57	0.4 a ±0.54	0.4 a ±0.54
	<i>P. lilacinum</i>	0.2 a ±0.44	0.4 a ±0.54	0.2 a ±0.44

Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Cifras con las mismas letras dentro de cada temperatura, son estadísticamente iguales.

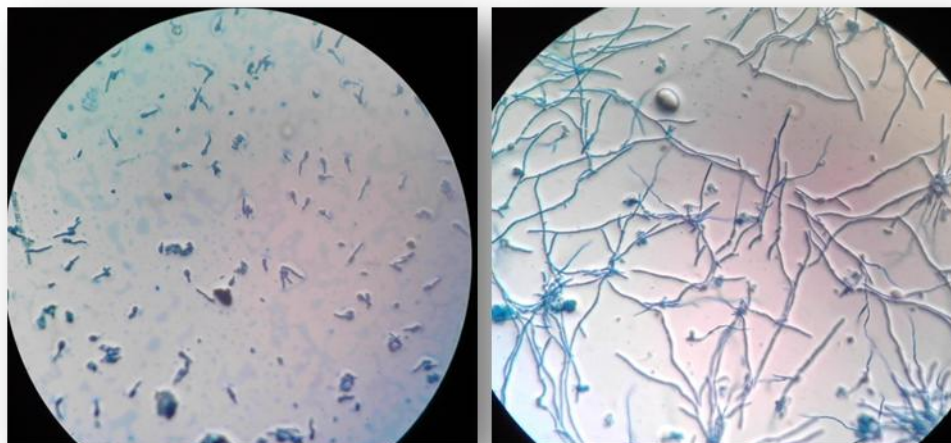


Figura 4.- Germinación de conidios de *Metarhizium anisopliae* a 25°C a las 24 h (Izquierda) y 48 h (Derecha) de incubación.

Virulencia y patogenicidad. El tiempo letal medio (TL₅₀) para *M. anisopliae* fue de 3 días, sin variación en las diferentes concentraciones conidiales probadas; en tanto que para *B. bassiana* fue de 6.34 días, disminuyendo conforme se incrementó la concentración de los conidios. En el caso de *P. lilacinum*, no aplicó la medición de esta variable debido a que el aislamiento no fue patogenico (Cuadro 4).

Con respecto al efecto de mortalidad de *Sphenarium purpurascens*(Charpentier) de acuerdo a la concentración de conidios de cada tipo de hongo, se tiene que la cepa de *Metarhizium anisopliae*, tuvo un control de 100% de mortalidad en las tres concentraciones evaluadas a los 7 días después de la inoculación; en cambio, el hongo *Beauveria bassiana* a menor concentración, identificó un menor porcentaje de mortalidad, aunque en la concentración más alta (1×10^8) mostró el mismo porcentaje de control que *Metarhizium anisopliae* e incluso el periodo de tiempo para alcanzar el 100% de mortalidad fue el mismo (Figuras 5, 6 y 7). A una concentración baja *Beauveria bassiana* no mostró buen porcentaje de mortalidad, con valores menores al 55 % a los 12 días después de la inoculación; *Metarhizium anisopliae* alcanzó el 100% a los 5 días (Figura 7).

Cuadro 3.- Tiempo Letal medio TL_{50} a tres diferentes concentraciones de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Hongo	Concentración de conidios·(mL ⁻¹)	Tiempo letal medio TL_{50} (Días)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Alta 1×10^8	3.12
	Media 1×10^6	3
	Baja 1×10^4	3.05
<i>Beauveria bassiana</i>	Alta 1×10^8	3.09
	Media 1×10^6	5.63
	Baja 1×10^4	10.3
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Alta 1×10^8	No Aplica
	Media 1×10^6	No Aplica
	Baja 1×10^4	No Aplica

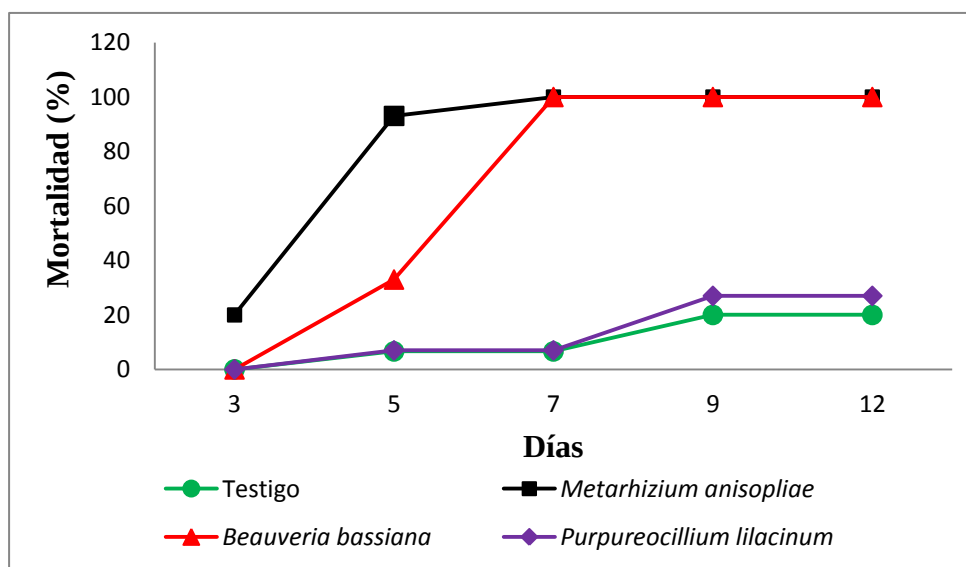


Figura 5.- Porcentaje de mortalidad de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) en laboratorio a una concentración de 1×10^8 conidios·mL⁻¹.

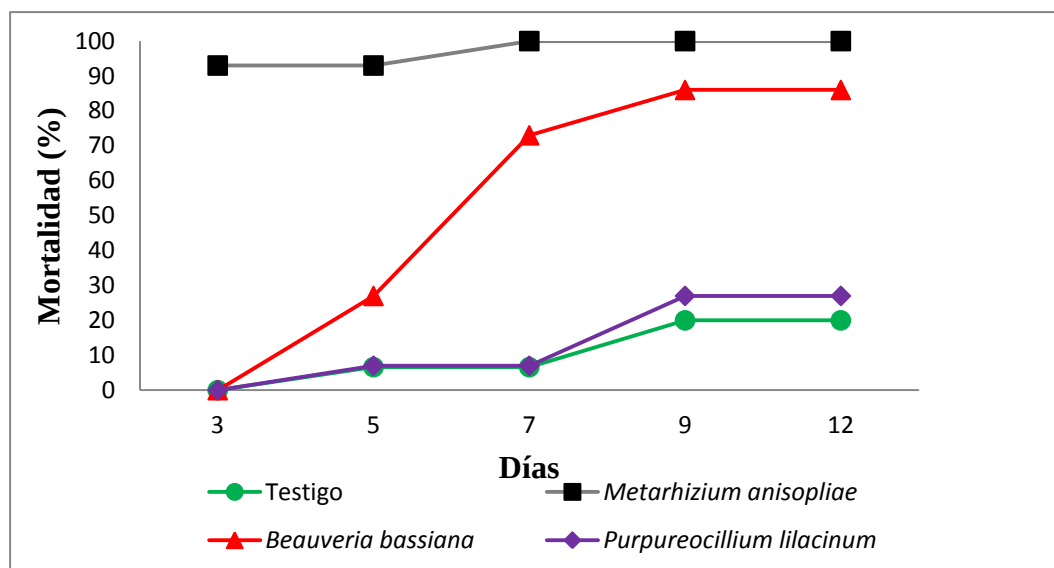


Figura 6.- Porcentaje de mortalidad de *Sphenarium purpurascens*(Charpentier) en laboratorio a una concentración de 1×10^6 conidios·mL⁻¹

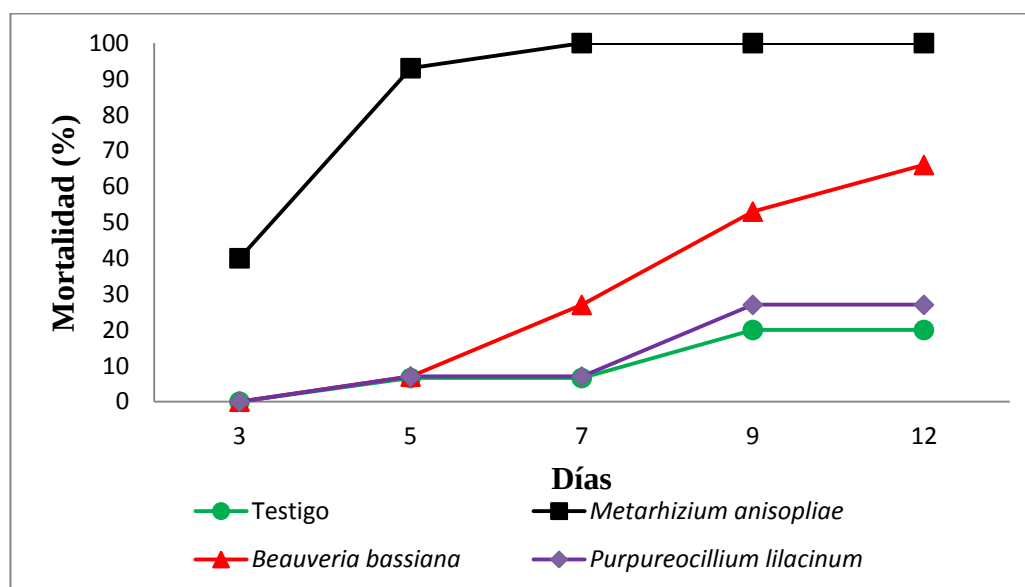


Figura 7.- Porcentaje de mortalidad de *Sphenarium purpurascens*(Charpentier) en laboratorio a una concentración de 1×10^4 conidios·mL⁻¹

Esporulación del hongo en especímenes muertos. La esporulación tanto de *Beauveria bassiana* como de *Metarhizium anisopliae* en individuos de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier), confirma que estos hongos son los causantes de la muerte del insecto (Figura 8); *Purpureocillium lilacinum* no observó esporulación de los individuos inoculados.



Figura 8.- Individuos de *Sphenarium purpurascens* micosados con *Beauveria bassiana* (derecha) *Metarhizium anisopliae* (izquierda).

Evaluación en campo

El patrón de distribución espacial de la plaga es más o menos regular en el área de muestreo en el cultivo, con variaciones de 6 a 14 individuos por sitio de muestreo (Figura 10). Sin embargo el grado de infestación por planta es muy variable, observándose en algunos casos hasta 5 insectos por planta, en tanto que en otras la presencia de la plaga fue casi nula; el daño corresponde a defoliación severa (Figura 10).

Mediante el análisis multivariado de la varianza se comprobó que existen diferencias significativas entre los tratamientos $P < 0.0001$. Para Lambda Wilks fue de 0.01578428, $P < 0.0001$. la prueba de medias (LSD), menciona que los mejores tratamientos fueron dos y tres , el mejor fue con *B. bassiana* (92.063%) , seguido del tratamiento dos (87.6 %) correspondiente a *Metarhizium anisopliae*, por último el tratamiento de *P. lilacinum* y el testigo.

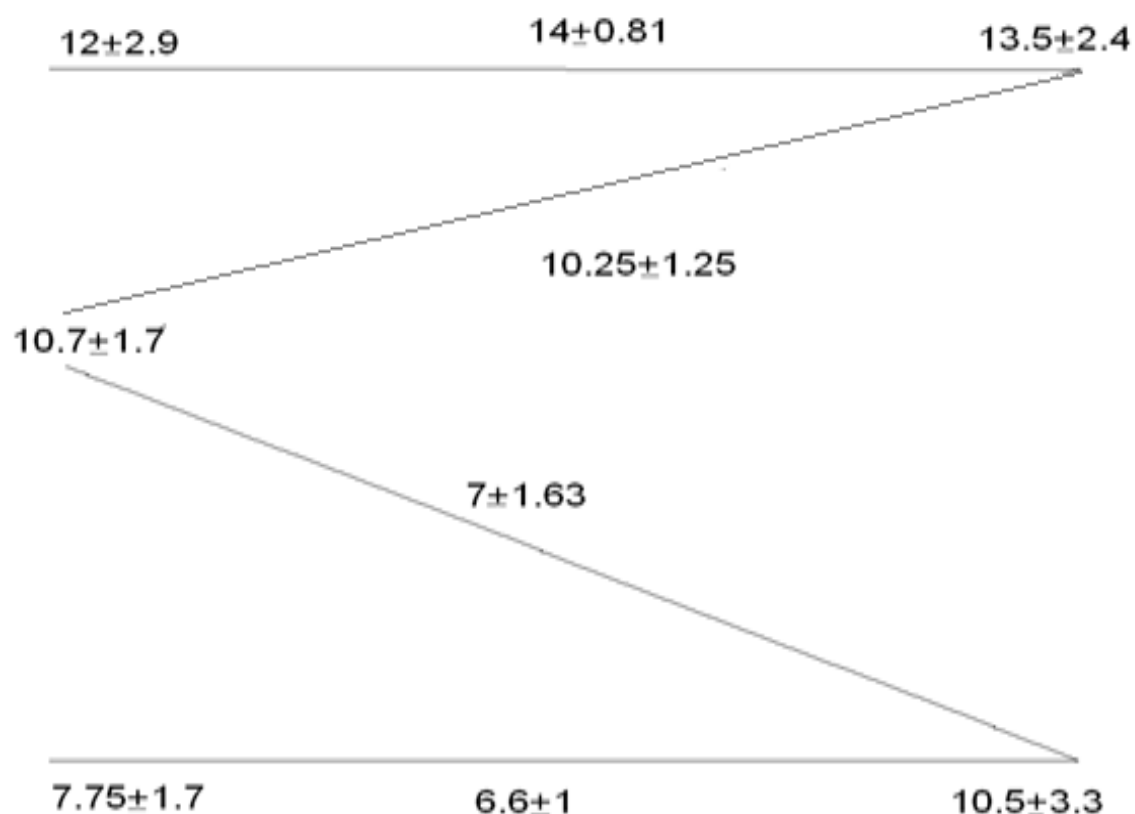


Figura 9. Muestreo simple aleatorio (MSA) de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) con un transecto en W y cuatro repeticiones; la unidad de muestreo fue de 1 m² y un tamaño de muestra 9.

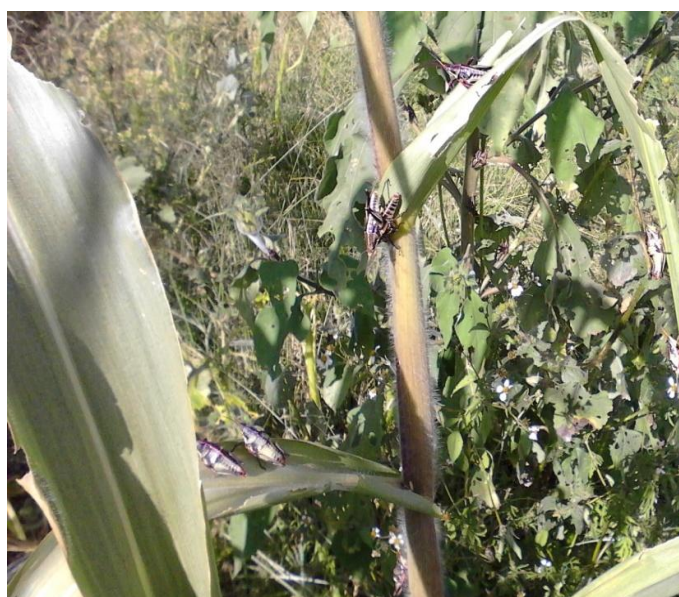


Figura 10. Planta de maíz infestada con la plaga *Sphenarium purpurascens* (Charpentier).

B. bassiana y *M. anisopliae* tuvieron el mismo efecto de control, sin diferencia estadística entre ellos (Prueba de LSD, $P \leq 0001$), en el caso de *B. bassiana* el porcentaje de mortalidad varió de 41.02 en el día 3 a 92.03% en el día 7, el análisis estadístico agrupó a *P. lilacinum* diferente al testigo, sin embargo se considera que no tuvo ningún efecto de control (Cuadro 4).

Cuadro 4.-Porcentaje de mortalidad de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) causada por hongos entomopatógenos en campo.

TRATAMIENTO	t Agrupamiento	Media	N
<i>Beauveria bassiana</i>	A	92.063	3
<i>Metarhizium anisopliae</i>	A	87.600	3
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	B	25.613	3
Testigo (Agua)	C	12.720	3

Prueba de LSD ($P \leq 0001$). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

DISCUSIÓN

En la mayoría de investigaciones en las que se realizan bioensayos con temperaturas cercanas a $26^{\circ}\text{C} \pm 3$, se observan porcentajes de germinación altos en menos de 48 h (Rodríguez et al, 2009; Torres et al, 2013; Schapovaloff et al, 2015), En este estudio la diferencia significativa se observó cuando se cambió la temperatura de 25 a 5°C , varió de 100% a 0.2% para los tres hongos evaluados. En el caso de la temperatura alta de 38°C , *Beauveria bassiana* mostró 0.2% de germinación, la cual es muy baja comparada con el 34 y 92 % que se obtuvieron para *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum*.

La germinación a diferentes temperaturas es muy variable, se han encontrado aislamientos de *B. bassiana* que pueden germinar tanto a condiciones de baja temperatura (Fargues et al. 1997; Spurgeon, 2010), como también a condiciones de alta temperatura. Fernandes, et al (2008), mencionan que después de 15 días de incubación, se obtiene 100 % de germinación de *B. bassiana* a 44 °C; en cambio *Beauveria bassiana* PHCbea tron® tuvo un porcentaje de germinación del 0.2%, a los 3 días de evaluación; estos resultados deben considerarse específicos del aislamiento. En este estudio, el aislado MeDL de *Metarhizium anisopliae* mostró buen porcentaje de germinación. Lo anterior coincide con lo reportado por Torres et al. (2013), y Ruelas et al. (2013), donde *Metarhizium anisopliae* registró porcentajes de germinación mayores al 50 % a 35°C. Por otro lado, el porcentaje de germinación de *Purpureocillium liliacinum* fue de 92 % a temperatura de 38°C, sin embargo se observó que no es patogénico al chapulín.

La temperatura de germinación es importante, porque se sabe que algunos insectos aumentan su temperatura corporal, como respuesta inmune a los entomopatógenos, (Wojda, 2017); por lo que se requiere de más investigación para comprender este efecto a nivel molecular y para obtener entomopatógenos termoresistentes a corto plazo (<3días). La mayoría de los productos comerciales disponibles en el mercado, así como los aislamientos evaluados en este estudio, carecen de esta característica, sin embargo, de acuerdo con la $TL_{50} = 3$ días, para Bbp1 y MeDL en concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} , puede inferirse que el insecto plaga no aumentó su temperatura corporal, en tal caso el porcentaje de mortalidad no habría alcanzado más del 80%, estos resultados coinciden con estudios llevados a cabo con chapulines de diferente género (Springate and Thomas, 2005; Blanford et al. 2000).

Los porcentajes de germinación pueden variar, aunque los hongos se aislen de la misma zona de estudio, lo cual puede indicar que la variación es a nivel de macro y microambientes, con respecto a la temperatura (Fernandes, et al. 2008), lo cual no se ajusta al criterio de que los

aislamientos nativos son mejores por su fácil adaptación al ambiente (Ruiz et al, 2013). Por tanto, además de algunos aspectos ambientales específicos como la temperatura, se deben considerar otros factores, como la concentración y el volumen de aplicación, la persistencia y viabilidad del hongo en el área donde se aplica (Guerrero et al, 2013), el tiempo y temperatura de almacenamiento del producto (Polovinko, 2013; Faria et al. 2012), así como la patogenicidad específica del aislamiento contra la plaga que se desea controlar.

La virulencia evaluada como TL_{50} fue de 3 días para los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sin que haya diferencia significativa entre ambos, a los 7 días los dos hongos lograron 100% de mortalidad. A nivel laboratorio, se observó que *Metarhizium anisopliae* es excelente agente de control con porcentajes de mortalidad del 100 %, aun a la concentración más baja (1×10^4 conidios mL^{-1}), mientras que *Beauveria bassiana* aumentó su eficiencia directamente proporcional a la concentración. Este comportamiento de respuesta podría deberse a que la patogenicidad depende de la actividad enzimática; comúnmente las enzimas más importantes en el proceso de infección son proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales permiten al hongo degradar la cutícula del insecto y de esta manera pasar con éxito la primera barrera. Tanto *Metarhizium anisopliae* como *Beauveria bassiana* poseen todas las enzimas mencionadas, además de otras como B-galactosidasa y L-glutaminasa (Mondal et al. 2016; Da silva et al. 2010).

En el caso de *Purpureocillium lilacinum* no mostró patogenicidad contra *Sphenarium purpurascens* (Charpentier); estudios realizados con este hongo reportan que es eficaz para controlar nematodos (Khan et al. 2006; Prasad et al 2015) e insectos de cuerpo blando como trips, afidos, hormigas y parásitos (Isabele et al. 2012; Castillo et al. 2014; Dararat et al 2015; Goffré y Folgarait, 2015; Won et al. 2015). La ausencia de efecto patogénico de este hongo, puede estar relacionada a la cantidad de quitina de la cutícula de *Sphenarium purpurascens*, que la hace más difícil de degradar para la penetración del agente biológico, lo que podría

sugerir la inducción al hongo a producir quitinasas capaces de degradar cutículas más esclerotizadas. Prasad et al. (2015), mencionan que *P. lilacinum* tiene genes para la síntesis de las enzimas degradadoras antes citadas, pero además de esto, se sugiere monitorear el proceso de infección, el cual es complejo debido a que el hongo requiere de atravesar las barreras inmunológicas del insecto.

La variación espacial en un patrón regular del chapulín en el campo y la densidad de la plaga de superficie (m^2), es similar a lo reportado por otros estudios. Morales *et al.* (2013), reportaron 18 individuos m^{-2} y García et al. (2011) reportaron 15 individuos m^{-2} . De acuerdo a Lozano (2011), cuando se tiene una densidad de 10 individuos m^{-2} o más en etapa de adultos, se debe implementar un método de control.

Los resultados obtenidos en campo coinciden con los de las pruebas de laboratorio, *Metarhizium anisopliae* mostró porcentaje de control de 87.6 % a los 7 días y *Beauveria bassiana* un 95.2 % a los 9 días, ambos hongos pueden controlar a esta plaga (García et al. 2009; Barajas et al, 2009; Vázquez et al, 2016). Para alcanzar estos porcentajes de control, es necesario aplicar concentraciones mínimas de 1×10^{12} conidios $\cdot \text{ha}^{-1}$. García et al. (2009), reportaron que a una concentración de 1.2×10^9 blastosporas mL^{-1} , la mortalidad fue de 100 %; en contraste, a una concentración de 8.6×10^5 blastosporas mL^{-1} , la mortalidad fue de 4 %; Tamayo (2009) recomienda que para obtener controles cercanos al 100 %, el volumen de aplicación debe ser de 400 a 600 L $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{ha}^{-1}$. En el presente estudio se consideraron ambas condiciones con resultados positivos. Los resultados de las pruebas de campo con el hongo *Purpureocillium lilacinum* coinciden con las de laboratorio y sugieren que el hongo tiene especificidad por su hospedero, por lo que se recomienda hacer pruebas de patogenicidad contra la plaga estudiada, antes de realizar alguna aplicación, para asegurar que se tendrá buen control.

CONCLUSIONES

Beauveria bassiana y *Metarhizium anisopliae*, hongos comercial y nativo, respectivamente, mostraron buenos porcentajes de control sin diferencia estadística significativa tanto a nivel laboratorio como de campo. La patogenicidad, concentración y volumen de agua utilizada, son aspectos importantes en relación a la eficiencia de control en porcentaje de mortalidad de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier). *Purpureocillium lilacinum* tiene cierto grado de termotolerancia con 92 % de germinación a 38 °C en tres días, sin embargo no es patogénico al insecto plaga.

LITERATURA CITADA

- Abbot, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Albuquerque, A.C., Pereira, K.C.A., Cunha, F.M., Veiga, A. and Athayde, A.C.R. (2005). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology* 34 (4):585-591.
- Barajas O. G., Morales R. D., Del Pozo N. E. M., Rodríguez A. M. L. y Núñez L. J. J. (2009). Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero *Tecnociencia* 3(1): 33-38
- Blanford, S., Thomas, M.B., Langewald (2000). Thermal ecology of *Zonocerus variegatus* and its effects on biocontrol using pathogens. *Agric. For. Entomol.* 2: 3–10.
- Castillo L. D., Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA. (2014). The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both

- Greenhouse and Field Conditions. PLoS ONE 9(8): e103891.
doi:10.1371/journal.pone.0103891
- CESAVEG (2007). Campaña de manejo fitosanitario de cultivos básicos: chapulín, Boletín informativo. 12 p
- Da silva W. O., Santi L., Correa A. P. F., Silva L. A., Schrank A., Vainstein M. H. (2010). The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle *Fungal Biology*. 114: 911-916
- Dararat H., Alongkorn A., Chan M., Siraprapa S. and Monchan M. (2015). Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* CKPL-053 in controlling *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) in orchid farms in Thailand, *Appl Entomol Zool*. 50: 317–329
- Delgado, P. A. M.; Murcia O., B. 2011, Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, 6(2): 77-90.
- De Paula A. R, Brito E. S, Pereira C. R, Carrera M. P, Samuels R. I. (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control. *Biocontrol, Science & Technology*. 18: 1017-1025.
- Dogan Y. O., Selcuk H., Yildiz A., Butt T., Cakmak, I. (2017). Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the effect of *Metarhizium brunneum* on the predatory mites (Acari: Phytoseiidae) *Biological Control*. 111: 6–12

- Faria M., Hotchkiss J. H., Wraight S. P., 2012, Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. *Biological Control* 61: 78–88
- Fernandes E. K.K., Drauzio E.N. Rangel A. M.L., Morales V. E. P. Bittencourt D. W. R., 2008, Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*, *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 69–78.
- Finney D. J. (1972). Probit analysis. Cambridge University Press. p. 76 - 80.
- García, G. C. y Lozano, G., J. (2011). Control biológico de plagas de chapulín en el norte-centro de México. Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ). Zacatecas, México. 170 pp.
- García G. C. y González M. M. B. (2009). Control Biológico De Plaga De Chapulín (Orthoptera: Acrididae) En Durango, México. *Vedalia* 13 (2): 79-83.
- García E. (1990). Regímenes Pluviométricos y Distribución de la Precipitación en "Canícula, Sequía Intraestival o Medio Verano", IV.5.1. Atlas Nacional de México. Vol. II. Escala 1:8000 000 Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Goffré D. and Folgarait P.J. (2015). *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 107–115
- Guerrero G. C., Reyes M. R., Toriello C., Hernández V. V., Santiago L. I., Mora P. L., Calderón S. M. E., Ocampo F., Calderón E. S. C. (2013). Study of the persistence and viability of *Metarhizium acridum* in Mexico's agricultural area, *Aerobiologia* 29:249–261

- Isabele C. Angelo, Éverton K. K. Fernandes T. C., Bahiense, W., Perinotto P. S., Golo A. P., Morales and Vânia R. E. P. (2012). Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions *Parasitol Res.* 111:1473–1480
- Jaber, L.R., Ownley, B.H., 2017, Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control* article in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Khan A, Williams K. L, Nevalainen H.K.M. (2006). Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biocontrol* 51: 659–678
- Lozano G. J. y España L. M. P. (2011). Ecología y control biológico del chapulín *Brachystola* spp en Zacatecas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Méx. 170 p.
- Morales M. N., Hernández H. E. M., Ramírez A. S., Solís A. J. F. (2013). Abundancia de *Sphenarium purpurascens* charpentier (orthoptera: pyrgomorphidae) en cultivos de importancia económica en la localidad de Tepepa, San Miguel Tenancingo, Tlaxcala, *Revista Entomología Mexicana EA* 1122-1127.
- Mondal S., Sibashish B., Andras K., Gyula V., 2016 Journey of enzymes in entomopathogenic fungi, *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* 18: 85-99
- Moura M. G., Jaronski S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide, *World J Microbiol Biotechnol* 32:177 1-26 DOI 10.1007/s11274-016-2131-3
- Mullié W. C. and Youssoupha G. (2010). Does Bird Predation Enhance the Impact of Green Muscle® (*Metarhizium acridum*) used for Grasshopper Control?. *Journal of Orthoptera Research* 19(1):139-155

- Nourrisson, D C., Dupont, R.-A. Lavergne, J. Dorin, F. Forouzanfar, J. Denis, K. Weeks, R. Joubert, F. Chiambaretta, T. Bourcier, S. Roux, A. Sénéchal, G. Benaïm, M. Wallon, E. Candolfi, V. Letscher-Bru, Poirier P., Sabou M. (2017). Species of complex implicated in human infections: retrospective sequencing study. *Clinical Microbiology and Infection* Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.001>.
- Orduño C. N. (2009). Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae*, sobre el picudo del nopal, *Metamasius spinolae*. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados, Montecillo México. 79 p
- Palerm V. J., Ávila C. C. y Alatorre R. R. (2005). El control biológico al alcance de productores que enfrentan la plaga del chapulín en Tlaxcala. *Comunicaciones En Socioeconomia, Estadística e Informática* 9 (1): 1-19.
- Polovinko G.P. (2013). Dependence of the Viability and Virulence of Siberian Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Bals_Griv.) Vuill. on the Period of Their Storage at Positive Temperatures. *Contemporary Problems of Ecology* 6(3): 247–251.
- Quesada M. E. and Vey A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* *Mycol. Res.* 108 (4): 441–452. DOI: 10.1017/S0953756204009724
- Reyes R. J. M., Castro C. A. M., Torres D. G., Cervantes M. J. F., Izquierdo S. T., Lozada G. M. C. (2014). efecto insecticida del aceite esencial de cuatro especies de lavandas (*lavandula* spp.: lamiaceae) sobre *Sphenarium purpurascens* charpentier (Orthoptera: Acrididae) y composición química. *Entomología Mexicana* 1: 731– 736
- Rodríguez G. D. Loera O. G. Saucedo C. G. Viniegra G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of

Tenebrio molitor, *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 513–518 DOI 10.1007/s11274-008-9917-x

Ruelas A. D, García G. C. and Archuleta T. A. (2012). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates Tolerant to High Temperatures for the Control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) *Southwestern Entomologist.* 28(2): 313-324. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3958/059.038.0214>

Saucedo C. G. Barranco F. E., Alatorre R. R., Gutierrez R. M., Viniegra G. G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 910–915.

Schapovaloff M. E., Angeli A. L. F., Urrutia M. I. y López L. C. C. (2015). Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 47(2): 138-142.

Springate, S., Thomas, M.B. (2005). Thermal biology of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*, and the implications for resistance to disease. *Ecol. Entomol.* 30: 724–732.

Spurgeon D. W., 2010, Efficacy of *Beauveria bassiana* Against *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae) at Low Temperatures *J. Entomol. Sci.* 45(3): 211-219

Torres M., Cortez M. H., Ortiz C. F. G., Silvia C. G. y De la Cruz P. A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México, *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 40-46.

- Tamayo M. F. (2009). Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (charpentier) y *Melanoplus differentialis* (thomas) (orthoptera: acrididae) con *Metarhizium anisopliae* (metschnikoff) sorokin, en Guanajuato, México. *VEDALIA* 13 (2): 85-90.
- Téllez J. A., Cruz R. M. G., Mercado F. Y., Torres A. A., Arana C. A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30 73:80
- Uribe G. E. y Santiago B. M. Á. (2012). Contribución al conocimiento de enemigos naturales del chapulín (orthoptera: acridoidea) en el estado de Querétaro, México. *Acta Zoológica Mexicana* 28(1): 133-144
- Vázquez J., M. Á., Aragón G. A., Martínez M. D., Castillo H.D., Nava G. S. and Pérez T. B. (2016). *Sphenarium purpurascens* control with *Beauveria bassiana* and extracts amaranth (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 235-247.
- Vega F. E, Goettel M. S, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzon A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy H.E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol* 2:149–159
- Wojda, I. (2017). Temperature stress and insect immunity, *Journal of Thermal Biology* 68: 96–103
- Won W. L., Tae Y. S., Sung M. B., Soo D. W. (2015). Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools, *Journal of Asia-Pacific Entomology* 18: 607–615