

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS  
DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLAS DE MÉXICO**

**Por**

**Q.B.P. Lucila Adriana Galán Franco**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Especialidad en Biotecnología**

**Julio 2012**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS  
DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLAS DE MÉXICO**



**Comisión de tesis:**

**DRA. ISELA QUINTERO ZAPATA**  
Director de Tesis

**DR. CARLOS F. SANDOVAL CORONADO**  
Secretario

**DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO**  
Vocal 1

**DR. JESUS GERARDO CARREON TREVIÑO**  
Vocal 2

**DRA. MYRIAM ELÍAS SANTOS**  
Vocal 3

**DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA**  
Asesor Externo

**DR. ALBERTO MORALES LOREDO**  
Asesor Externo

**DR. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ**  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS  
DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLAS DE MÉXICO

Tesis

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Especialidad en Biotecnología

Presenta

Q.B.P. Lucila Adriana Galán Franco

DRA. ISELA QUINTERO ZAPATA  
Director de Tesis

DR. JESUS GERARDO CARREON TREVIÑO  
Co-Director de Tesis

Julio 2012

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Isela Quintero Zapata** gracias por su apoyo y asesoría para poder concluir esta etapa la cual es de gran importancia para mí formación profesional.

Al **Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado** por formar parte de mi comisión de tesis y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la **Dra. Katiuhska Arévalo Niño** por su apoyo brindado a lo largo de este proyecto y por formar parte de mi comisión de tesis.

Al **Dr. Jesús Gerardo Carreon Treviño** quien ha sido una persona muy importante en mi vida personal y profesional, gracias por tu apoyo incondicional y amistad a lo largo de este proyecto.

A la **Dra. Myriam Elias Santos** gracias por su apoyo y sugerencias para poder concluir este trabajo.

A la **Dra. Claudia Patricia Larralde Corona** gracias por sus consejos y observaciones para poder concluir la parte molecular de este trabajo

Al **Dr. Alberto Morales Loredo** por su gran apoyo y sus valiosos comentarios los cuales me ayudaron a poder realizar esta tesis y me serán de gran utilidad a lo largo de mi vida profesional.

A la **Dra. Diana Resendez Perez** gracias por su apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

A la **Dra. Genoveva Alvarez Ojeda** por su apoyo y sugerencias para poder realizar la parte molecular de este trabajo.

Al **Dr. José Isabel López Arroyo** por las facilidades otorgadas para este proyecto y por su coordinación en la obtención de muestras en las diferentes regiones citrícolas.

A la **QBP Nelly Santos García** por su amistad y por ser una persona motivadora a lo largo de mi vida profesional, por sus comentarios para la elaboración de esta tesis.

A las **QBP's Fátima L. Gandarilla Pacheco** y **Claudia B. López Alvarado**, por su apoyo a este proyecto.

A la **Sra. Norma González Cantú** por su apoyo en la revisión ortográfica de esta tesis y a la **Lic. Angélica Ma. Palacios Rodríguez** por su apoyo en la impresión de la tesis.

Al Fondo Sectorial SEP-CONACYT por el apoyo económico otorgado para financiar este proyecto SEP-2004-CO1-46198 y a los Programas de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología (PAICYT) CN1320-06 y CN 1540-07.

Al CONACYT por la beca otorgada durante todo el programa de postgrado cursado.

## DEDICATORIA

A **DIOS** por haberme dado la fortaleza de terminar mis estudios y por darme el entusiasmo y la sabiduría necesaria para poder concluir y alcanzar esta meta profesional, la cual es un gran peldaño en el largo camino del saber.

En honor a la memoria de mi **abuelita Lucila Wong Guerrero**, recuerdo que le dije: “no tenga miedo yo estaré con usted hasta el final”. Sin duda alguna se que ella estuvo conmigo espiritualmente alentándome y apoyándome a lo largo de este proyecto.

A mi **Padre el Dr. Luis Jesús Galán Wong** por alentarme a seguir adelante, porque siempre estás conmigo, tendiéndome tu cálido abrazo. Por ser el mejor modelo profesional a seguir.

A mi **Madre la Sra. Nelly Franco Garza** quien ha sido la primera en educarme laboralmente y espiritualmente. Por ser una especie de poliprofesionista que se especializa en todo para darse a sus hijos, ahora entiendo y valoro lo que eres, TE AMO.

El único amor perfecto en este mundo es aquel de una madre por sus hijos, a ustedes **Diego, Franco, Leonardo y Luis Jesús** con todo mi amor, los amo.

A mis **hermanos** Luis y Nelly con mucho cariño.

A mis **sobrinos Lizeth, Luis, Jessica, Carlos y Alejandro**, por ser unas personas muy importantes a lo largo de mi vida personal y que juntos están conmigo celebrando este gran momento profesional, a todos mis familiares que me resulta muy difícil poder nombrarlos en tan poco espacio, sin embargo ustedes saben quiénes son, los quiero.

A **Luis Valenzuela** por estar junto a mí en momentos importantes personales y profesionales. Gracias por tu apoyo incondicional para poder concluir mi Tesis.

A todos mis amigos sin excluir ninguno, pero en especial a: **Gerardo, Laura, Francia, Susana, Verónica y Coty** por que en alguna etapa de mi vida han estado presentes conmigo viviendo momentos de tristeza y felicidad, y que mejor que compartir este momento tan especial para mí con ustedes.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, animo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

**Área de trabajo:**

El presente trabajo titulado “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE ZONAS CITRÍCOLAS DE NUEVO LEÓN” se llevó a cabo en el Laboratorio 6 (L6) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Isela Quintero Zapata. Y como Asesores Externos la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona del Centro de Biotecnología Genómica, IPN y el Dr. Alberto Morales Loredó del Laboratorio Central Regional del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÁREA DE TRABAJO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
4.1. Objetivo general.....	4
4.2. Objetivos específicos.....	4
4. HIPÓTESIS.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1. Plagas de importancia citrícola .....	6
5.2. Importancia de control biológico .....	9
5.2.1. Bioinsecticidas a partir de hongos entomopatógenos.....	11
5.2.2. Empleo de bioinsecticidas en México.....	13
5.2.3. Formulación de hongos entomopatógenos.....	13
5.2.4. Características básicas de una formulación comercial.....	14
5.2.5. Formulaciones líquidas.....	15
5.2.6. Formulaciones sólidas.....	15
5.3. Hongos entomopatógenos.....	16
5.3.1. <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
5.3.2. <i>Isaria fumosorosea</i> .....	20
5.3.3. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	20
5.3.4. Clasificación de los hongos entomopatógenos.....	21
5.3.5. Métodos de aislamiento de hongos entomopatógenos.....	22
5.3.5.1. Aislamiento por dilución seriada.....	23
5.3.5.2. Aislamiento directo.....	23
5.3.5.3. Aislamiento con insecto trampa.....	23
5.3.5.3.1 <i>Galleria mellonella</i> .....	24

5.3.6.	Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos en los insectos.....	25
5.3.6.1.	Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto.....	25
5.3.6.2.	Germinación de la conidia.....	25
5.3.6.3.	Penetración al integumento del hospedero.....	25
5.3.6.4.	Penetración a través de cuerpos abiertos.....	26
5.3.6.5.	Crecimiento del hongo en el hemocele.....	27
5.3.6.6.	Producción de micotoxinas.....	27
5.3.6.7.	Muerte del insecto.....	27
5.3.6.8.	Dispersión de las conidias.....	28
5.4	Distribución de los hongos entomopatógenos.....	28
5.5	Identificación de hongos entomopatógenos.....	29
5.5.1.	Identificación macroscópica..... <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin. <i>Isaria fumosorosea</i> (Wize) Brown & Smith <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	29
5.5.2.	Identificación microscópica.....	30
6.	MÉTODOS.....	32
6.1.	Reactivos y material biológico.....	32
6.2.	Equipo.....	32
6.3.	Estrategia experimental.....	33
6.4.	Establecimiento de la cría de <i>Galleria mellonella</i> a nivel laboratorio....	34
6.5.	Obtención de muestras de suelo de las diferentes zonas citrícolas de México.....	35
6.6.	Aislamiento y purificación de los hongos entomopatógenos a través de <i>Galleria mellonella</i> .....	36
6.7.	Identificación fenotípica de los hongos entomopatógenos.....	37
6.8.	Caracterización genética de los hongos entomopatógenos.....	38
6.9.	Conservación y mantenimiento de las cepas aisladas.....	38
7.	RESULTADOS.....	39
7.1.	Cría de <i>G. mellonella</i> (L.) a nivel laboratorio.....	39
7.2.	Muestreo a nivel nacional en las zonas citrícolas.....	40
7.3.	Aislamiento y purificación de hongos.....	54
7.4.	Caracterización microscópica los diferentes hongos purificados .....	62
7.5.	Identificación de los aislamientos mediante métodos moleculares basados en DNA.....	64
8.	DISCUSIÓN.....	66
9.	CONCLUSIONES.....	70



APENDICE .....	71
LITERATURA CITADA .....	73
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	85

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Insectos y ácaros que atacan a los cítricos en México.....	7
2	Mercado de bio-plaguicidas y plaguicidas sintéticos hasta el 2012.....	12
3	Principales hongos entomopatógenos.....	18
4	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Nuevo León.....	42
5	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Tamaulipas.....	43
6	Localidades de las diferentes áreas cítricas muestreadas del estado de Sinaloa.....	45
7	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Sonora.....	46
8	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de San Luis Potosí.....	48
9	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Yucatán.....	49
10	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Campeche.....	51
11	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Michoacán.....	53
12	Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Tabasco.....	54
13	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de Nuevo León.....	56
14	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de Tamaulipas.....	57
15	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de Sinaloa.....	57
16	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de Sonora.....	58
17	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de San Luis Potosí.....	59
18	Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados por cítricos en diferentes lugares del estado de Campeche.....	60

19	Resumen de cepas aisladas del género <i>Beauveria</i> spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.....	61
20	Resumen de cepas aisladas del género <i>Isaria</i> spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.....	62
21	Resumen de cepas aisladas del género <i>Metarhizium</i> spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana .....	62
22	Resumen de cepas aisladas de los tres géneros de hongos entomopatógenos encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Representación esquemática de la estrategia general.....	34
2	Mapa de la República Mexicana.....	35
3	Representación General de la obtención de suelo.....	36
4	Representación general del aislamiento y purificación de los hongos entomopatógenos.....	37
5	Preparación de la dieta para el establecimiento de <i>G. mellonella</i> .....	39
6	Ciclo biológico de <i>G. mellonella</i> obtenido en el laboratorio.....	40
7	Mapa del estado de Nuevo León donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	41
8	Mapa del estado de Tamaulipas donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	43
9	Mapa del estado de Sinaloa donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	44
10	Mapa del estado de Sonora donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	45
11	Mapa del estado de San Luís Potosí donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	47
12	Mapa del estado de Yucatán donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	49
13	Mapa del estado de Campeche donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	50
14	Mapa del estado de Michoacán donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	52
15	Mapa del estado de Tabasco donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.....	53
16	Larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por: A) <i>Metarhizium</i> , B) <i>Beauveria</i> y C) <i>Isaria</i> (= <i>Paecilomyces</i> ).....	55
17	Microfotografía a 100X de <i>B. bassiana</i> donde se puede apreciar la presencia de conidióforos y esporas.....	63
18	Microfotografía a 100X de <i>I. fumosorosea</i> donde se puede apreciar la presencia de conidióforos con cadenas de conidias.....	63

19	Microfotografía a 100X de <i>M. anisopliae</i> que muestra formas características de sus conidias.....	63
20	Productos de amplificación de muestras aisladas de campo. Carril 1-3 = <i>Beauveria</i> sp (HIB-1, HIB-2 y HIB-3); carriles 4-9 = <i>Isaria</i> sp (HIB-19, HIB-20, HIB-23, HIB-28, HIB-29 y HIB-30); carriles 10 y 11 = <i>Metarhizium</i> sp (HIB-11 y HIB-12); carril = 12 control negativo y carril = 13 marcador de peso molecular Ladder 100 pb.....	64
21	Productos de digestión enzimática de muestras aisladas de campo. Carril 1 = GHA, carriles 2 a 8 = HIB-6, HIB-5, HIB-4, HIB-3, HIB-2, HIB-16, HIB-1 respectivamente. Carril 9 = Control negativo y carril 10 = Marcador de peso molecular Ladder 100 pb. .....	65

## Nomenclatura

<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>RAPD's</b>	Amplificación de DNA polimórfico
<b>AFLP's</b>	Amplificación en la longitud del DNA polimórfico
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>BCS.</b>	Baja California Sur
<b>TE Buffer</b>	Buffer tris-EDTA
<b>c/u</b>	Cada uno
<b>Camp.</b>	Campeche
<b>c.cs</b>	Células conidióforas
<b>cm</b>	Centímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro al cuadrado
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>Chis.</b>	Chiapas
<b>Cd</b>	Ciudad
<b>Col.</b>	Colima
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>Ej.</b>	Ejido
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzima
<b>Hae III</b>	Enzima de restricción
<b>ITS1</b>	Espacio transcrito interno (primero)
<b>ITS2</b>	Espacio transcrito interno (segundo)
<b>sp</b>	Especie
<b>spp</b>	Especies
<b>USA</b>	Estados Unidos de Norteamérica
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>etc.</b>	Etcétera
<b>PCR-RFLP</b>	Fragmentos polimórficos de restricción
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>g</b>	Gramo
<b>g ml<sup>-1</sup></b>	Gramos sobre mililitros
<b>Gro.</b>	Guerrero
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>Km</b>	Kilómetro
<b>Lt</b>	Litro
<b>MIP</b>	Manejo integrado de plagas
<b>m</b>	Metro
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros cuadrados
<b>Méx.</b>	México
<b>SEVAG</b>	Mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico
<b>Mich.</b>	Michoacán
<b>μ</b>	Micra
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>mg</b>	Miligramo

<b>ml</b>	Militro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>min.</b>	Minuto
<b>USD</b>	Moneda Nacional de Estados Unidos
<b>Mpio.</b>	Municipio
<b>NL.</b>	Nuevo León
<b>x</b>	Número de veces la concentración con respecto a la de trabajo
<b>Oax.</b>	Oaxaca
<b>PDA</b>	Papa-Dextrosa-Agar
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>%</b>	Porcentaje
<b>Q.Roo.</b>	Quintana Roo
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>SLP.</b>	San Luis Potosí
<b>Sta.</b>	Santa
<b>seg</b>	Segundos
<b>Sin.</b>	Sinaloa
<b>Son.</b>	Sonora
<b>Tab.</b>	Tabasco
<b>Tamps.</b>	Tamaulipas
<b>TEMED</b>	Tetrametilendiamina
<b>UBV</b>	ultra bajo volumen
<b>USSR</b>	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León
<b>Ver.</b>	Veracruz
<b><i>et al.,</i></b>	y colaboradores
<b>Yuc.</b>	Yucatán

## RESUMEN

Se colectaron 128 muestras de suelo de diferentes estados de la República Mexicana: Campeche (13), Michoacán (15), Nuevo León (25), San Luis Potosí (25), Sinaloa (12), Sonora (15), Tabasco (5), Tamaulipas (13) y Yucatán (5). Las larvas de *Galleria mellonella* (L.) fueron utilizadas como cebo para detectar, atrapar y multiplicar hongos entomopatogénicos *in vivo*. Con base a las características macroscópicas y microscópicas se obtuvo un 24% de las muestras de suelo positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. fue detectado en un 15% (19 aislados), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin en 1.5 % (2 aislados) e *Isaria fumosorosea* (Wize) en un 11% (14 aislados). La variabilidad genética de los hongos se analizó mediante la amplificación por PCR de las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS-5.8S-ITS2) de los genes ribosomales y posterior digestión enzimática con *Hae* III. Como producto de la PCR se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 600 pb para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para el caso de *I. fumosorosea*, se amplificó un fragmento por arriba de 600 pb. Tanto en cepas de referencia como en aislados se generaron patrones de restricción similares. Los géneros de hongos entomopatógenos fueron encontrados en las diferentes áreas citrícolas de México; lo que abre el campo para el control biológico de plagas que afectan los cítricos en cada región.



## ABSTRACT

A total of 128 soil samples was collected from different Mexican states: Campeche (13), Michoacán (15), Nuevo León (25), San Luis Potosí (25), Sinaloa (12), Sonora (15), Tabasco (5), Tamaulipas (13) and Yucatán (5). Larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.), were used as bait to detect, trap and multiply entomopathogenic fungi *in vivo*. Twenty-three percent of the soil samples processed were positive for the presence of entomopathogenic fungi according to the macroscopic and microscopic characteristics: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. was detected in 15% (19 isolates), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin in 1.5% (2 isolates), and *Isaria fumosorosea* (Wize) in 11% (14 isolates). Genetic variability of the fungi was analyzed using the sequences of internal transcribed ribosomal genes (ITS-5.8S-ITS2) and digested with the enzyme *HaeIII*. PCR results generated fragments of 600 bp for *B. bassiana* and *M. anisopliae*, and more than 600 bp for *I. fumosorosea*. Both reference strains and field isolates produced similar restriction patterns. Genera of native entomopathogenic fungi were found in the diverse citrus areas of Mexico, opening the possibility for biological control of pests affecting citrus in each region.

## 1. INTRODUCCIÓN

El control biológico es una práctica agrícola en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga, frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales (Spardo y Gullino, 2004). De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007).

Los hongos entomopatógenos son considerados como los patógenos más promisorios contra insectos como el caso de los áfidos, escamas y moscas blancas, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula (Hayek y Leger 1994), así como sus múltiples mecanismos de acción que les confiere una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia. Las especies más comunes como controladores de insectos son los hongos: *Isaria fumosorosea*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, el rango de hospedantes sobre los que tienen efecto patogénico es dependiente de la especie y del aislado en cuestión. En general *Metarhizium* y *Beauveria* actúan sobre varios órdenes de insectos que agrupan varias especies de lepidópteros, coleópteros, ortópteros, *I. fumosorosea* actúa sobre lepidópteros (*Spodoptera*, y especies de áfidos) y mosca blanca (*Bemisia*); *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* sobre especies de áfidos y mosca blanca (*Bemisia*).

Por otro lado para México, la citricultura representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional. La superficie establecida supera las 530 mil hectáreas, que producen un promedio anual de 6`700,000 toneladas de fruta, con un valor estimado de 8,050 millones de pesos, (Sánchez, *et al.*, 2005). La riqueza citrícola de México se encuentra amenazada por patógenos de importancia que han acabado con industrias citrícolas de otros países, o han exigido que los gobiernos y productores inviertan grandes sumas de dinero para su manejo.

Todo esto ha dado lugar a la necesidad de implementar estrategias en el manejo integrado de plagas en los cultivos de exportación y de empezar a establecer las bases para la producción de productos orgánicos. Sin embargo, la introducción de biológicos en la agricultura es incipiente. Los formulados biológicos nativos de la región en la que se va aplicar son más efectivos que los formulados con microorganismos de otras regiones, porque han sobrevivido y están adaptados a ese ecosistema.

México es un país mega-diverso y tiene gran variedad de ecosistemas, el aislar hongos entomopatógenos nativos para ser utilizados en el control biológico, es importante para conservar el ecosistema, explotar la biodiversidad y tener un manejo de plagas más eficiente (Torres *et al.*, 2004).

Considerando la importancia de la citricultura en México, aunado a la diversidad de ecosistemas en donde se localizan hongos entomopatógenos, se planteó el objetivo de aislar hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México, así como la caracterización genotípica mediante PCR-RFLP utilizando los espaciadores de transcripción internos (ITS), para determinar la existencia de variaciones moleculares entre los mismos.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Por una parte, México es un país que se encuentra en el quinto lugar mundial en producción de cítricos (SIAP, 2006) dentro de los estados productores están: Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Nuevo León, por otra parte, solo existe una colección de hongos entomopatógenos en el Centro de Referencia de Control Biológico de la SAGARPA. Por lo anterior, es importante el control biológico con hongos entomopatógenos aclimatados a cada región citrícola, para que así estos organismos nativos se desempeñen mejor. Es por esto que pretendemos aislar microorganismos nativos y caracterizarlos genéticamente, para establecer una colección de hongos entomopatógenos de regiones citrícolas de México, para en un futuro utilizarse en el control de plagas de importancia citrícola, ya que no han sido muestreadas y existen posibilidades muy altas de obtener aislados que pudieran tener ventajas que permitan su uso comercial.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Colectar e identificar la variabilidad genética entre las diferentes especies de hongos entomopatógenos provenientes de la zona citrícola de México.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Implementar la cría de *Galleria mellonella* a nivel laboratorio.
- 2.- Recolectar muestras de suelo en zonas citrícolas de México (Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Sonora, San Luis Potosí, Yucatán, Campeche, Michoacán y Tabasco).
- 3.- Aislar y purificar hongos entomopatógenos (*Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecani*, etc.) de los diferentes muestras de suelo utilizando como vehículo a *Galleria mellonella*.
- 4.- Caracterizar macroscópicamente y a nivel microscópico las diferentes hongos purificados.
- 5.- Identificar mediante métodos moleculares basados en DNA los diferentes aislamientos obtenidos.

#### **4. HIPÓTESIS**

En las diferentes zonas citrícolas de México (Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Nuevo León) es posible encontrar diferentes hongos entomopatógenos, los cuales pueden ser aislados y caracterizados molecularmente para ser aplicados como control biológico.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Plagas de importancia citrícola

Por la superficie cultivada a escala mundial, las especies de cítricos más comunes son *Citrus aurantifolia* (lima), *C. aurantium* (naranja agria), *C. grandis* (pomelo), *C. limon* (limón), *C. medica* (citron), *C. paradisi* (toronja), *C. reticulata* (mandarina o tangerina) y *C. sinensis* (naranja dulce). Entre 1993 y 2003, la producción mundial de cítricos fue de 99 millones de toneladas, mismas que se obtuvieron de un total de siete millones de hectáreas. La naranja ocupó el 51% de la superficie sembrada y aportó el 63% de la producción, seguida por las mandarinas y tangerinas con el 22% y el 17%, respectivamente. Por su parte, las limas y limones ocuparon el 13% de la superficie sembrada y el 10% del volumen producido (Muñoz, *et al.*, 2004).

Para México, la citricultura representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional. La superficie establecida supera las 530 mil hectáreas, que producen un promedio anual de 6'700,000 toneladas de fruta, con un valor estimado de 8,050 millones de pesos, lo que sitúa a nuestro país en el quinto lugar mundial en producción de cítricos (SIAP, 2006). De la superficie establecida, el 68.5% corresponde a naranja, 20.5% a limón mexicano, 5.2% a limón persa, y el resto a mandarinas, tangerina y pomelos (Sánchez, *et al.*, 2005).

La mencionada riqueza citrícola de México se encuentra amenazada por insectos plaga y patógenos de importancia cuarentenaria que han acabado con industrias citrícolas de otros países, o han exigido que los gobiernos y productores inviertan grandes sumas de dinero para su manejo.

Existe una diversidad relativamente grande de artrópodos que dañan a la citricultura en el Continente Americano; tan solo en México, se han registrado alrededor de 74 especies de insectos y ácaros que atacan a los cítricos, los cuales se muestran en la Tabla 1, donde pueden afectar la producción y calidad de la fruta, en ocasiones la pérdida de vigor del árbol o la muerte en infestaciones severas.

Durante cada temporada de producción en las diferentes regiones citrícolas del país comúnmente existen problemas causados por el ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Eryophidae), conocido como arador o negrilla, y por las infestaciones de la mosca Mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Díptera: Tephritidae), que frecuentemente limita la comercialización de los cítricos dulces. Conjuntamente con estas plagas, existen

otras especies de ácaros y escamas que también son reconocidas como factores limitantes de la producción.

**Tabla 1.** Insectos y ácaros que atacan a los cítricos en México.

Especie	Nombre común	Partes atacadas	Entidades afectadas
<b>Orthoptera: Acrididae</b> 1. <i>Schistocerca americana</i> (Drury)	Chapulín americano	Hojas	Tamps.
<b>Orthoptera: Tettigonidae</b> 2. <i>Scudderia mexicana</i> (Saussure)	Chiva de los cítricos	Hojas	Tamps.
<b>Isoptera: Termitidae</b> 3. <i>Reticulitermes flavipes</i> (Kollar)	Termita subterránea	Raíz, tallo	Tamps.
<b>Thysanoptera: Thripidae</b> 4. <i>Frankliniella</i> sp. 5. <i>Scirtothrips citri</i> (Moult.)	Trips de los cítricos	Hojas, frutos	Camp., Chis., Mich., NL., SLP., Tab., Tamps., Ver., Yuc.
<b>Hemiptera: Coreidae</b> 6. <i>Leptoglossus phyllopus</i> (Linnaeus)	Chinche de patas laminares	Frutos	NL.
<b>Hemiptera: Pentatomidae</b> 7. <i>Nezara viridula</i> (L.)	Chinche verde apestosa	Frutos	Tamps.
<b>Homoptera: Aleyrodidae</b> 8. <i>Aleurocanthus woglumi</i> (Ashby) 9. <i>Aleurothrixus floccosus</i> (Maskell) 10. <i>Dialeurodes citri</i> (Ashmead) 11. <i>Dialeurodes citrifolii</i> (Morgan) 12. <i>Parabemisia</i> sp. 13. <i>Paradialeurodes</i> sp. 14. <i>Tetraleurodes ursorum</i> (Cockerell) 15. <i>Trialeurodes</i> sp.	Mosca prieta de los cítricos Mosca blanca lanuda Mosca blanca de los cítricos Mosca blanca de los cítricos Mosca blanca de los cítricos Mosca blanca de los cítricos Mosca blanca anidadora Mosca de la uva de arena Mosca blanca	Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas	Camp., Col., Gro., NL., Oax., SLP., Tamps., Ver. Col., Mich., N.L. Col., NL., SLP., Tamps. NL. NL. Col., Mich., NL. Sin., Son., BCS Oax.
<b>Homoptera: Aphididae</b> 16. <i>Aphis gossypii</i> Glover 17. <i>Aphis nerii</i> B. de F. 18. <i>Aphis spiraecola</i> Patch 19. <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) 20. <i>Toxoptera aurantii</i> B. de F. 21. <i>Toxoptera citricida</i> Kirkaldy	Pulgón de algodón Pulgón de laurel Pulgón verde de los cítricos Pulgón del durazno Pulgón negro Pulgón café de los cítricos	Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas Frutos pequeños, hojas	Col., Mich., NL., Tamps., Ver. Col., Mich., NL., Tamps., Ver. Col., Mich., NL., Tamps., Ver., Yuc. Col., Mich., NL., Tamps., Ver. Camp., Col., Mich., NL., Tab., Tamps., Ver., Yuc. Camp., Q. Roo, Tab., Yuc.



Tabla 1. Continuación.

Especie	Nombre común	Partes atacadas	Entidades afectadas
<b>Homoptera: Cicadellidae</b> 22. <i>Empoasca fabae</i> Harris 23. <i>Erythroneura</i> sp. 24. <i>Homalodisca insolita</i> (Walker) 25. <i>Homalodisca vitripennis</i> (Germar) 26. <i>Oncometopia clarior</i> (Walker) 27. <i>Oncometopia</i> sp. <i>Ca. nigricans</i> (Walker)	Chicharritas Chicharrita Chicharrita de alas vítreas Chicharrita Chicharrita	Frutos Hojas, ramas Hojas, ramas Hojas Hojas	Sin., Son. Tamps. NL., Tamps. Tamps. Tamps.
<b>Homoptera: Coccidae</b> 28. <i>Coccus hesperidum</i> L. 29. <i>Coccus viridis</i> (Green)	Escama suave café Escama verde	Ramas, Frutos Follaje tierno	NL. Tamps.
<b>Homoptera: Diaspididae</b> 30. <i>Aonidiella auranti</i> (Maskell) 31. <i>Aonidiella citrina</i> (Coquillett) 32. <i>Chrysomphalus aonidum</i> (L.) 33. <i>Lepidosaphes beckii</i> (Newm.) 34. <i>Lepidosaphes gloverii</i> (Packard) 35. <i>Parlatoria pergandii</i> Comstock 36. <i>Pinnaspis aspidistrae</i> (Signoret) 37. <i>Pinnaspis strachani</i> (Cooley) 38. <i>Selenaspis articulatus</i> (Morgan) 39. <i>Unaspis citri</i> (Comstock)	Escama roja de California Escama amarilla Escama roja de Florida Escama púrpura Escama guante Escama pajiza Escama nieve menor Escama nieve menor Escama bermeja Escama de nieve	Hojas, frutos Hojas, ramas pequeñas, frutos Hojas, ramas pequeñas, frutos Hojas Hojas Hojas Hojas, frutos, corteza Hojas frutos Hojas Tallo, ramas, hojas, frutos	Camp., Chis., Mich., NL., S.L.P., Sin., Tab., Tamps., Ver., Yuc. Tamps. Camp., Chis., Mich., NL., S.L.P., Sin., Tab., Tamps., Ver., Yuc. NL., Tamps., Tab., Ver. NL., Tamps., Tab., Ver. Camp., Chis., Mich., N.L., SLP., Sin., Tab., Tamps., Ver., Yuc. Tamps. Tamps. Tab., Ver. Col., NL., Mich., Tab., Ver., Yuc.

BCS: Baja California Sur, Camp.: Campeche, Chis.: Chiapas, Col.: Colima, Gro.: Guerrero, Mich.: Michoacán, NL.: Nuevo León, Oax.: Oaxaca, Q. Roo: Quintana Roo, SLP.: San Luis Potosí, Sin.: Sinaloa, Son.: Sonora, Tab.: Tabasco, Tamps.: Tamaulipas, Ver.: Veracruz, Yuc.: Yucatán

Las siguientes especies han invadido recientemente el estado de Florida, E.U.A., y constituyen una amenaza potencial para los cítricos del país: *Anoplophora chinensis* (Forster) (Coleóptera: Cerambycidae), el escarabajo de antenas largas de los cítricos;

*Aulacaspis tubercularis* Newstead (Coccoidea: Diaspididae), la escama blanca del mango; *Mylocerus undatus* Marshall (Coleóptera: Curculionidae), el picudo de cabeza amarilla; *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae), el trips del chile; *Papilio demoleus* L. (Lepidóptera: Papilionidae), el gusano de la lima se encuentra en República Dominicana y Puerto Rico, la invasión a Florida se considera inminente (<http://mrec.ifas.ufl.edu>). La escama del mango desde hace varios años se encuentra en el estado de Nayarit, México, y desde ahí existe el riesgo potencial de dispersión a las zonas citrícolas cercanas.

Recientemente los cítricos se han visto afectados por *Diaphorina citri* Kuwayama, (psilido asiático de los cítricos) a nivel mundial. *D. citri*, es el principal vector de una de las enfermedades más destructivas para los cítricos, “greening o huanglongbing”, causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Robles García 2007). En el continente Americano, el psilido asiático de los cítricos fue citado por primera vez en Brasil (Lima, 1942), en Florida hasta 1998 fue detectado (Halbert *et al.*, 1998) y en Texas hasta septiembre de 2001. En 1998, *D. citri* fue encontrado en Guadalupe (Étienne *et al.*, 1998) y en el sur de Florida (Halbert 1998; Halbert *et al.* 2003). Desde entonces el movimiento hacia el Caribe ha sido rápido. En 1999, fue encontrado en Isla Abaco y en Islas Bahamas, en ambos casos teniendo como hospedero a *Citrus spp.* y *Murraya paniculata* (L.) Jack. En Venezuela fue reportado por primera vez en 1999 en la Península de Paraguana, estado de Falcón (Cermeli *et al.*, 2000), teniendo como huésped a *Citrus aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. latifolia* y *Murraya paniculata*. Posteriormente se encontraron infestaciones en Islas Caimán en Junio de 2000. Para el 2001 *D. citri* fue interceptado en Jamaica por primera vez el 18 de enero de 2003. En República Dominicana se detectó en septiembre de 2001 en los siguientes hospederos: *Citrus sinensis* (L.), *C. limon* (L.), *C. reticulata*, *C. limetta*, *C. sinensis* y *C. maxima*. En Cuba fue detectado en 2001 *C. sinensis* y en *C. limón*. En México el primer reporte de *D. citri* esta documentado en abril de 2004 cuando se localizó al vector en árboles cítricos en el municipio de Arroyo Seco, Querétaro, México.

## 5.2 Importancia de control biológico

El control biológico es una práctica agrícola en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga, frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales (Spardo y Gullino, 2004). Existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos, que por su capacidad de producir enfermedad y muerte en insectos, son utilizados como agentes de control biológico (Asaff *et al.*, 2002).

La incorporación del control biológico, es un medio de lucha integrada que respeta el medio ambiente, debido a que no emplea productos químicos, lo que da más seguridad, evitando estos productos tóxicos para la salud humana.

El control biológico posee muchas ventajas como: (1) Poco o ningún efecto nocivo colateral; (2) casos raros de resistencia; (3) control de largo plazo; (4) elimina por completo o sustancialmente el uso de insecticidas; (5) relación beneficio/costo muy favorable; (6) evita plagas secundarias; (7) no provoca intoxicaciones y (8) se puede usar como parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Los principales logros del control biológico en América Latina han sido contra la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthus woglumi* (Ashby en Mesoamérica); el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* (F.) en Cuba, Perú, Brasil y el Caribe; la escama harinosa *I. purchasi* en casi todos los países; el pulgón lanígero de la manzana *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) en Uruguay, Chile y Argentina; la escama negra *Saissetia oleae* (Oliver) en Chile y Perú (Altieri *et al.*, 1989; Zapater, 1996). Aunque el control biológico de insectos en México despertó el interés de los especialistas desde el siglo pasado, fue hasta 1942 cuando se realizaron los trabajos más decididos con la introducción de *Aphelinus mali* (Haldeman) para el control del pulgón lanígero del manzano *E. lanigerum* en Coahuila. En 1938, se hizo el primer intento para el control biológico de la mosca prieta de los cítricos *A. woglumi*, pero fue entre 1949 y 1950 cuando el Departamento de Agricultura de E.U.A. y la entonces Dirección de Defensa Agrícola de México, llevaron a cabo un programa para la introducción de enemigos naturales desde la India y Pakistán con resultados espectaculares en el control de esta plaga (Jiménez, 1958; Smith *et al.*, 1964; Carrillo-Sánchez, 1985).

Posteriormente, en E.U.A. se establecieron diferentes programas de control con enemigos naturales previamente introducidos; las plagas consideradas y sus enemigos naturales fueron: La escama algodonosa de los cítricos *I. purchasi* con *R. cardinalis*; la escama purpúrea *Lepidosaphes beckii* (Newm.) con el parasitoide *Aphytis lepidosaphes* Compere; la escama roja de Florida *Cryosomphalus aonidum* L. con el parasitoide *Aphytis holoxanthus* (DeBach); la escama algodonosa de los pastos *Antonina graminis* (Mask) con los parasitoides *Anagyrus antoninae* (Timb) y *Neodusmetia sangwani* (Rao); las moscas de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) y *A. striata* (Schiner) con los parasitoides *Diacasmimorpha longicaudatus* (Ashmead), *Syntomosphyrum indicum* Silv. y *Pachycrepoides vindemmiae* (Rondani); y el pulgón manchado de la alfalfa *Therioaphis maculata* (Buckton) con las especies *Praon palitans* (Muesebeck), *Aphelinus semiflavus* (Howard) y *Trioxys utilis* Muesebeck (Carrillo-Sánchez, 1985). En centros localizados en diferentes Estados de la República Mexicana, desde el 2006 se cuenta con 60

laboratorios que producen y distribuyen 35 especies de agentes de control biológico, de los cuales el 20% son depredadores, el 48.5% parasitoides y el 31.5% patógenos (Arredondo, 2006).

Existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos, que por su capacidad de producir enfermedad y muerte en insectos, son utilizados como agentes de control biológico (Asaff *et al.*, 2002). De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007).

### 5.2.1 Bioinsecticidas a partir de hongos entomopatógenos

En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y directamente controladores de otras poblaciones microbianas. Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de plagas.

Por la eficiencia en el control de plagas y vectores, pueden producirse bioinsecticidas a partir de diferentes géneros y especies de hongos entomopatógenos cuyo ingrediente activo es el propio hongo (Lozano *et al.*, 2000). Algunos productos con efectividad comprobada lo constituyen los bioinsecticidas Green Guard producido en Australia a base de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para el control de langostas en cultivos, Micos Plag® a base de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *P. lilacinus*, producido para el control de diversas plagas en Colombia como trips, áfidos, ácaros, broca del café y nemátodos.

Otros productos latinoamericanos son Myctrol ES®, Naturalis-L®, Mycotech, Conidia® (*Beauveria bassiana*), Tracer® (*Saccharopolyspora spinosa*), (Orozco *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2000; Valle *et al.*, 2003). Otros productos comerciales a base de hongos son: Aseronija que tiene como ingrediente *Aschersonia aleyrodinis* y se produce en la U.S.S.R.; con *Beauveria bassiana* se elabora Biotrol FBB (USA), Boverin (U.S.S.R.) y ABG-6178 (U.S.A.); empleando *Hirsutella thompsonii*, se elabora Mycar (USA); con *Metarhizium anisopliae*, se fabrica Biotrol FMA (USA), Metaquino (Brasil); por último en Inglaterra, con las marcas de Vertalec y Mycotol, se fabrica el *Verticillium lecanii*.

Son diversos los géneros de hongos que podrían servir para elaborar productos comerciales en diversos países. Con algunos ya existen ofertas, como pueden

mencionarse: *Culicinomyces*, *Lagenidium*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea* y *Lecanicillium* (Vergara, 2004).

Los productos bioplaguicidas representaron en el mercado el 2.5% del total de ventas en el 2005, lo que produjo 672 millones USD. Se espera que en el 2010 estos alcancen el 4.2% con un promedio de crecimiento en sus ventas de un 9.9% anual (Tabla 2). Los productos que prevalecen son a base de microorganismos o metabolitos de estos directamente, en contraposición con los químicos tienen muchas ventajas, una mayor seguridad al hombre, vertebrados e invertebrados y mayor especificidad por lo que su impacto es menor sobre la biodiversidad. Su baja residualidad y en general una menor probabilidad de desarrollo de resistencia por parte del organismo diana debido a su complejo modo de acción los hacen muy atractivos. Cerca del 90% de estos bioplaguicidas están representados por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) debido a su forma relativamente fácil de obtener, su rápida acción y facilidad de registro ya que el ingrediente activo está constituido por un metabolito o metabolitos (toxinas) que son las de acción controladora.

**Tabla 2.** Mercado de bio-plaguicidas y plaguicidas sintéticos hasta el 2010

Tipo	2003	2004	2004	2010	Crecimiento Anual*
<b>Bio-plaguicidas</b>	468	562	672	1,075	9.9
<b>P** sintéticos</b>	27,144	26600	26,076	24,205	-1.5
<b>Total</b>	27,612	27162	26,748	25,280	-1.1
<b>% Total Bio-P**</b>	<b>1.69</b>	<b>2.07</b>	<b>2.51</b>	<b>4.25</b>	

Fuente: BBC, Inc y datos históricos de la EPA

\*% de crecimiento anual (2005-2010)

\*\*Plaguicidas

Los productos a base de hongos van tomando un lugar importante por el desarrollo de resistencia al *Bt* en algunos casos, lo que es consecuencia del mecanismo de acción por ingestión de la toxina (Delta endotoxina) que se activa y se une muy específicamente a receptores de las células peritróficas del intestino medio del organismo diana. En otros casos, el establecimiento en plantas transgénicas con toxinas de *Bt* incorporadas, que se expresan en diferentes órganos de la planta a niveles muy superiores, que los que se encuentran en la naturaleza y de forma muy heterogénea, favorecen también la aparición de resistencia relativamente rápida. Además, hay nichos donde el *Bt* no puede actuar o no se cuenta con aislados patogénicos para determinada especie diana como es el caso

de los locústidos y muchos otros ortópteros y coleópteros. Otra restricción es la imposibilidad de un control a mediano y largo plazo al no provocar epizootias donde los hongos entomopatógenos ejercen un control mucho más efectivo.

Entre los microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso contra especies de invertebrados plaga en la agricultura están los hifomicetos sobresalen *B. bassiana* y *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* (anteriormente *Verticillium lecanii*), *Pochonia chlamidosporia* (*V. chlamidosporium*), *Isaria* spp. con *P. lilacinus* e *I. fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. Para el control de enfermedades fúngicas y nemátodos se encuentra *Trichoderma* spp. donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens* y *T. pseudokoningii*. Todos presentan estabilidad genética y fenotípica aceptable para el escalamiento en procesos de producción, además son seguros al hombre y otras especies del ecosistema y su rango de hospederos no es tan estrecho para hacerlos demasiado específicos en su uso.

Dentro de los productos fúngicos exitosos en el mercado se encuentran Mycotrol a base de *B. bassiana* desarrollado por Mycotech Corporation para controlar a *Leptinotarsa decemlineata*; Vertalec (*Lecanicillium longisporum*) y Mycotal (*L. muscarium*), ambos desarrollados en Reino Unido para áfidos y mosca blanca respectivamente; GrenMuscle desarrollado por CABI, Reino Unido, a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de langostas; Binab T y Rootshield de *Trichoderma* desarrollados por Bio-Innovation de Suecia y Bioworks, Inc. en E.U.A. respectivamente; Soilgard, es un producto efectivo comercializado por Bioscape Inc. y Gliomix comercializado por la firma finesa Kemira Agro Oy, ambos a partir de *Gliocladium*.

### 5.2.2 Empleo de bioinsecticidas en México

Los hongos entomopatógenos en México se utilizan en la producción de bioinsecticidas a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Isaria fumosorosea*, se realizan en los estados de Colima, Guanajuato, Oaxaca y Sinaloa, para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas.

Algunos de los productos a partir de hongos y comercializados en México son BotaniGard, Bea-sin, Mycotrol, Bio-fung a base de *B. bassiana*; para el caso de *Metarhizium anisopliae* con Bio-Blasst, Meta-sin y Fitosan-M, y a base de *I. fumosorosea* Pea-sin y PFR-97 (Tamez *et al.*, 2001).

### 5.2.3 Formulación de hongos entomopatógenos

Los hongos que presentan un rango estrecho de hospederos son muy virulentos y generalmente los más difíciles de cultivar, aún más las especies que presentan fases

parasíticas y saprofiticas en su ciclo de vida. De forma natural, los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospedadores. Estos requerimientos pueden ser suplementados en cantidades adecuadas al medio de cultivo para lograr un máximo crecimiento y esporulación, aún cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa miceliar, por lo tanto, las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden ser variables para diferentes especies de hongos (Kononova, 1981).

#### **5.2.4 Características básicas de una formulación comercial**

Existen cuestiones que se deben tomar en cuenta, el mecanismo de acción mediante el cual actúa el microorganismo, así como si el efecto se encuentra estrechamente vinculado a condiciones ambientales, específicamente a condiciones de humedad, temperatura, radiación solar, entre otros factores ambientales (Samsinakova y Kalova, 1981). En la selección del método de producción de hongos entomopatógenos es importante considerar no solo la factibilidad tecnológica y económica, sino el mecanismo de acción ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infectivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico (Bansal *et al.*, 1988). Otros aspectos a tener en cuenta son la selección de la cepa; un medio de cultivo óptimo con un balance nutricional y económico que favorezca el desarrollo del hongo con mayor potencial patogénico; la posibilidad de tecnología económica para escalar el proceso a nivel de producción; la formulación que permita periodos de almacenamiento prolongados; la facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo y la estabilidad en el medio ambiente, pueden ser, incluso más importantes que la patogenicidad de la cepa en condiciones de laboratorio (Taborsky, 1992; Batista *et al.* 1998).

Las formulaciones fúngicas, aún aquellas en las que se logran bajos porcentajes de humedad necesitan ser conservadas en frío. Temperaturas superiores a 10°C no garantizan la estabilidad de estos productos por más de tres meses, lo cual es sin duda uno de los mayores inconvenientes para su producción a escala industrial (Chet, 1987). El objetivo de una formulación es preparar una combinación de ingredientes de tal forma que el principio activo se mantenga estable, efectivo y de fácil de aplicación. Una de las principales desventajas de los productos microbiológicos para el control de plagas es el efecto negativo de las condiciones ambientales, lo cual afecta la estabilidad y eficacia. Esta desventaja puede ser resuelta en gran medida con la preparación de formulaciones, una vez obtenido el ingrediente activo se mezcla con los diferentes componentes. El

desarrollo de una formulación a partir de microorganismos resulta similar a la de un insecticida químico (Devotto y Gerding, 2000).

Las formulaciones básicas se agrupan en líquidas como suspensiones acuosas o emulsificantes y sólidas como polvos para espolvoreo, polvos humedecibles, cebos y granulados (Burgues y Hussey, 1971). En toda formulación se distinguen tres tipos de componentes: (1) principio activo (microorganismo y sus toxinas); (2) soporte o vehículo, que puede ser sólido o líquido y es un material inerte y (3) coadyuvante, es inerte pero tiene función protectora, dispersante y adherente, entre otras. Para mejorar la formulación es importante obtener la estabilidad física y biológica durante el almacenamiento, evitar la evaporación, incrementar la cobertura y adherencia en el follaje, mejorar la dispersión y la suspensibilidad, aumentar la resistencia a las condiciones ambientales (lluvia, temperatura, radiación, etc.) y facilitar la aplicación (Hernández, 1996).

### **5.2.5 Formulaciones líquidas**

Una de las alternativas de las formulaciones líquidas es el desarrollo de emulsiones, que surgen de la mezcla de aceite, conidias y material inerte, agua y un emulsificador. La formulación permite la dispersión estable y homogénea de partículas menores a 10 micras en el agua. En formulaciones de *B. bassiana* se han empleado diferentes tipos de suspensiones con aceite mineral. Las formulaciones oleosas se emplean frecuentemente para aplicaciones en UBV (ultra bajo volumen), ya que evitan la evaporación, favorecen una mejor adhesión y dispersión de las conidias. El ingrediente activo (conidias) se mezcla con productos comestibles o materiales inertes y se prepara como pequeñas esferas o bloques que resultan atractivos para el insecto plaga. En caso de que no sea necesario ingerirlos para su acción, las formulaciones protegen a las conidias de condiciones adversas. El salvado de trigo se ha usado con conidias de *B. bassiana*, obteniendo un incremento significativo en la mortalidad de insectos (Hernández, 1996; Morales, 1993).

### **5.2.6 Formulaciones sólidas**

La característica de los ingredientes para este tipo de formulaciones como tal, es utilizar un soporte sólido para diluir el principio activo. Se pueden emplear sales solubles en agua como cloruros, carbonatos, sulfatos, fosfatos, además se usan tierras inertes como talco, arcillas, caolín, bentonita, silicato, zeolita, etc. También se utilizan soportes líquidos, solubles o emulsionables como el xileno, derivados del petróleo, ciclohexano, alcoholes, aceites minerales, etc. También se utilizan tensoactivos que son sustancias que disminuyen la tensión superficial de los líquidos, favoreciendo la formación de



emulsiones y humedad; mientras que para el esparcimiento del principio activo, pueden ser compuestos catiónicos, aniónicos y no iónicos como el Tween® o los detergentes. Otros adyuvantes protegen las conidias de las condiciones ambientales, como polímeros (aumentan tamaño de gota y evitan evaporación), enzimas (aumentan actividad del patógeno), protectores de radiación, agentes de fluidez (silicatos de aluminio y sodio), adherentes (gelatina, gomas, dextrinas, polímeros, aceites), dispersantes (gomas, albúminas, almidón, alcoholes), estabilizantes (aminas, glicoles, fenoles) y protectores como melaza y Tritón X® (Burges y Hussey, 1971).

Las formulaciones sólidas y oleosas al mantener humedades relativas inferiores al 10% permiten mejorar la viabilidad del hongo al retardar los procesos de germinación y disminuir el impacto de los cambios en la temperatura, aunque en general los entomopatógenos se almacenan a temperatura de refrigeración y los mejores resultados se obtienen entre 4-10°C. Las formas liofilizadas aunque estables al almacenamiento, tienen la dificultad de formar agregados en la aplicación, por lo cual se requiere de un disolvente, además las conidias no disponen de materiales nutritivos que faciliten su germinación en el campo (Galán *et al.*, 1992; Cenicafé, 1996).

### **5.3 Hongos entomopatógenos**

El control biológico es una disciplina muy amplia basada en el principio natural en que muchas especies de organismos se alimentan, viven y se reproducen sobre otras, cuyas poblaciones son reguladas por las primeras en los diferentes ecosistemas (Madrigal, 2001). Existe un grupo de organismos fungosos que son patógenos obligados o facultativos de los insectos, conocidos como hongos entomopatógenos. Su crecimiento y desarrollo está limitado principalmente por las condiciones ambientales externas, en particular por la humedad, la radiación solar y la temperatura, que determinan la adecuada esporulación y germinación de las conidias (Tanada y Kaya, 1993). Los hongos son microorganismos eucariontes, sin clorofila y pueden ser unicelulares o pluricelulares; son filamentosos y sus paredes contienen quitina y/o celulosa; su reproducción es sexual o asexual (con o sin conidias); las conidias se originan a partir de los conidióforos y se diseminan por el viento, el agua y otros agentes (Kuno *et al.*, 1982). Son considerados como los patógenos más promisorios contra insectos, ya que pueden infectarlos directamente por contacto de esporas sobre la cutícula, además poseen múltiples mecanismos de acción que les confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Hayek y Leger, 1994).

Se conocen más de 100 géneros y 700 especies, entre los más importantes destacan *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* (= *Paecilomyces*) y *Lecanicillium*, siendo estos los de mayor importancia en el control biológico por la susceptibilidad en los insectos plaga y por su facilidad de multiplicación (Monzón, 2001). En la Tabla 3 se describen los principales hongos entomopatógenos.

Dentro de la clase Deuteromyces existe un grupo morfológico de hongos conocidos como Hyphomycetes. Éstos son hongos filamentosos que se reproducen por conidios y generalmente se forman aeróbicamente en conidióforos derivados del sustrato. Muchos de los géneros de hongos entomopatógenos se ubican dentro de dicha clase y poseen uno de los más amplios rangos de hospederos, incluyendo numerosas especies de mosquitos. La ruta más común de invasión del huésped es por medio del tegumento externo, también es factible la infección a través del tracto digestivo (Goettel y Inglis, 1997). El conidio se adhiere a la cutícula, germina y penetra a través de ella. Una vez en el hemocele, el micelio crece dentro del huésped, formando hifas y blastoesporas. La muerte del insecto se debe en ocasiones a la combinación de toxinas del hongo, la obstrucción física de la circulación sanguínea, el agotamiento de nutrientes o la invasión a órganos. Una vez que el huésped ha muerto, las hifas usualmente emergen del cadáver y al presentarse condiciones abióticas adecuadas, el conidio se produce al exterior del huésped y es esparcido por el aire o el agua (Goettel y Inglis 1997).

Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los órdenes de insectos en su mayoría al orden Hemiptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Hymenoptera y Orthoptera (Ferron, 1978). Los estados inmaduros (ninfas y larvas) a menudo son más infectados por hongos que los adultos, mientras que los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados. La mayoría de estos hongos son patógenos obligados o facultativos y causan en el insecto enfermedades denominadas micosis (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados taxonómicamente en el phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina de la clase Sordariomycetes, subclase Hipocreomycetidae (Rehner y Buckley, 2005). Pertenecen al orden Hypocreales de la familia Clavicipitaceae (Hawksworth *et al.*, 1983) donde ejercen un papel muy importante en la reducción natural de poblaciones de insectos y ácaros fitófagos en la agricultura, silvicultura y otros agroecosistemas (Humber, 1989). La familia Clavicipitaceae presenta un elevado grado de adaptabilidad expresado por sus características patológicas, biológicas, genéticas y ecológicas, manifestando su gran variabilidad de formas y estructuras entre los diferentes géneros y especies existentes (Humber, 1997).

**Tabla 3.** Principales hongos entomopatógenos (Tanada y Kaya, 1993)

Subdivisión	Clase	Orden	Género
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coelomycidium</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladales	<i>Myiophagus</i>
	Oomycetes	Lagenidiales	<i>Coelomomyces</i> <i>Lagenidium</i>
	Oomycetes	Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales Entomophthorales	<i>Sporodiniella</i> <i>Conidiobolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrum</i> <i>Neozygites</i>
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastodendrion</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Mycoderma</i> <i>Saccharomyces</i>
	Plectomycetes	Ascospaerales	<i>Ascospaera</i>
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i>
Deuteromycotina	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Hesperomyces</i> <i>Trenomycetes</i>
	Loculoascomycetes	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
	Loculoascomycetes	Pleosporales	<i>Podonectria</i>
	Hyphomycetes		<i>Akanthomyces</i> <i>Aschersonia</i> <i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Isaria</i> <i>Paraisaria</i> <i>Pleurodesmospora</i> <i>Polycephalomuces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>Stilbella</i> <i>Tetranacrium</i> <i>Tilachlidium</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Verticillium</i>

**Tabla 3.** Continuacion. (Tanada y Kaya, 1993)

Subdivisión	Clase	Orden	Género
Mycelia sterilia			<i>Aegerita</i>
Basidiomycotina	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>

### 5.3.1 *Beauveria bassiana*

*Beauveria* es uno de los géneros de hongos entomógenos que se aísla con más frecuencia y que presenta una distribución cosmopolita. Aunque el género cuenta con un amplio rango de hospederos (Roberts, 1974), los acontecimientos naturales de *Beauveria* en mosquitos han sido reportados tan solo en cuatro ocasiones, tres de ellas con *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, dos casos fueron mencionados por Clark y colaboradores en 1968 (Clark *et al.*, 1968) infectando a *Culex tarsalis*, *C. pipiens* y *Anopheles albimanus*, y uno por Pinnock y colaboradores en 1973 (Pinnock *et al.*, 1973), infectando *Ochlerotatus sierrensis*

Los conidios de *B. bassiana* son eficaces para matar las larvas de mosquitos cuando se aplica en formulaciones de polvo de conidios sobre la superficie del agua de los criaderos (Clark *et al.*, 1968). Los conidios son hidrofóbicos, por lo que flotan en la superficie del agua, entrando en contacto con los mosquitos y las larvas que se alimentan debajo de la superficie, principalmente en el extremo del sifón, aunque Miranpuri y Khachatourians en el 1991 encontraron la cabeza como un sitio de infección de igual importancia (Miranpuri y Khachatourians, 1991).

En pruebas de laboratorio demostraron que un hongo virulento fue eficaz contra larvas de *Culex pipiens*, *C. tarsalis*, *C. tritaeniorhynchus* y *Anopheles albimanus*, pero no contra el *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus sierrensis* (Clark *et al.*, 1968; Sandhu *et al.*, 1993; Geetha y Balaraman 1999), y *C. quinquefasciatus* (Alves *et al.*, 2002). Las especies sensibles eran propensas a la infección tiempo después de la muda, si la infección se produjo poco antes de la muda, el micelio se perdió en la muda. En tres pruebas de campo a pequeña escala con conidias de *B. bassiana*, las reducciones de 82, 95 y 69% se encuentran en larvas y pupas de *Culex pipiens*, después de dos semanas (Clark *et al.*, 1968).

Un extracto de diclorometano del micelio que contiene beauvericina y dos análogos (beauvericina A y B), mostró actividad cuando se ensayó contra larvas de *Aedes aegypti* a 100 ppm (Gupta *et al.*, 1995). Las propiedades de larvicida de la beauvericina ya

había sido reportado por Grove y Pople en el año 1980 (Grove y Pople, 1980), quienes encontraron 86% de mortalidad de larvas de *A. aegypti*, después de 48 horas a 20 g/ml, pero solo el 39% a 10 g/ml. La infección no parece ser dependiente de la temperatura (Schaerffenberg, 1964; Ferron, 1981). Sin embargo, para conidios las altas temperaturas pueden ser perjudiciales, especialmente en combinación con condiciones de alta humedad. Las conidios y blastoconidios son las etapas del hongo más efectivas contra las larvas, siendo la última etapa más patógena (Miranpuri y Khachatourians, 1991). La humedad es considerada como uno de los factores críticos que afectan los resultados de laboratorio y pruebas de campo con *B. bassiana* (Clark *et al.*, 1968).

### 5.3.2 *Isaria fumosorosea*

*I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) se ha observado en diferentes tipos de suelo a muy bajas densidades (Bolckmans *et al.*, 1995). Este hongo entomopatógeno ha sido citado como posible agente de control biológico para insectos de 25 familias distintas, incluyendo 41 especies (Smith, 1993). Su ciclo de vida consiste en las siguientes etapas: adhesión de las conidias o blastosporas al huésped, germinación, penetración, crecimiento vegetativo y conidiogénesis. En mosca blanca el hongo crece y se desarrolla rápidamente sobre todos los estadios, completando su ciclo de vida a las 120 horas, bajo condiciones de campo, (Osborne y Landa, 1993). En medio de cultivo sintético, las colonias de *I. fumosorosea* crecen de manera moderada cuando son incubados a 24°C (25–30 mm de diámetro a los 7 días y 50-65 mm a las 2 semanas).

### 5.3.3 *Metarhizium anisopliae*

*Metharhizium*, como *Beauveria*, son de los hongos entomopatógenos más comunes, con una distribución mundial. Muchos estudios han demostrado el potencial de *Metarhizium anisopliae* como agente de control de mosquitos (Roberts, 1970).

*Metharhizium* es un hongo que es transmitido por la tierra e infecta principalmente insectos que viven en el suelo. La taxonomía de *Metarhizium* no es sencilla. La clasificación actual del taxón se basa principalmente en la morfología de los conidios y las células conidiógenas. Algunos autores combinan estas características con pruebas bioquímicas y moleculares (Riba *et al.*, 1986), y/o patogenicidad en el hospedero, actividad en el frío y color de la esporulación (Yip *et al.*, 1992; Rath *et al.*, 1995).

*M. anisopliae* se compone de cuatro variedades (Driver *et al.*, 2000), dos de los cuales se consideran importantes, que son *M. anisopliae* var. *acridum* (previamente designados como *M. flavoviride*) y *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, siendo esta última la más conocida de las dos especies. *M. anisopliae* cuenta con un

amplio rango hospedero, incluyendo arácnidos y cinco órdenes de insectos (Boucias y Pendland, 1998), que comprenden más de 200 especie. En insectos terrestres, el ciclo de vida comienza cuando un conidio se une a la cutícula del huésped, forman un apresorio, para penetrar a través de la cutícula. Después de entrar al hemocele, se forman hifas que producen y liberan toxinas, causando la muerte al hospedero en 4 a 16 días (dependiendo principalmente de la especie huésped) después de la infección (Ferron, 1981; Khachatourians, 1991; Boucias y Pendland, 1998).

Daoust y Roberts (1983), encontraron que en más de la mitad de las 52 cepas de *M. anisopliae* tomados de nueve países causaron más del 50% de mortalidad en larvas de *Culex pipiens* tratados con 1 mg de conidias por cada 16 cm<sup>2</sup>. En el mismo estudio se demostró que la virulencia de las cepas en mosquitos podría aumentar a 1,6 a 2,5 veces por el paso a través de las larvas de mosquitos (Daoust y Roberts, 1983). En pruebas a pequeña escala al aire libre en pequeños estanques artificiales, con 300 mg ó 600 mg de conidios/m existió una disminución de *C. pipiens* de un 91% y 94% y *Ochlerotatus sollicitans* de un 85% y 98% en los tres días (Roberts, 1974). Además de las larvas, los mosquitos adultos resultaron ser susceptibles al hongo.

A partir de un estudio de evaluación de riesgo, se ha concluido que el hongo no representa un riesgo evidente para los seres humanos o el medio ambiente (Strasser *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha informado de que el hongo puede causar queratitis humana (De Garcia *et al.*, 1997). Otros trabajos han demostrado que el hongo puede causar una mortalidad significativa de embriones camarones, ranas y peces expuestos a las conidias (Genthner *et al.* 1994, 1998).

#### **5.3.4 Clasificación de los hongos entomopatógenos**

De acuerdo a la clasificación realizada por Ainsworth (1973), los hongos son separados en dos divisiones: Myxomycota, aquellos que forman plasmodios, y Eumycota, aquellos que no forman plasmodios y son frecuentemente micelianos. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota dentro de cinco subdivisiones: Mastigomycotina (forman zoosporas, oosporas y presentan estado perfecto), Zygomycotina (no presentan zoosporas, presentan estado perfecto y forman zygosporas), Ascomycotina (presentan estado perfecto y forman ascosporas), Basidiomycotina (presentan estado perfecto y forman basidiosporas) y Deuteromycotina (no presentan estado perfecto, ni zoosporas y forman conidias) esta división se presenta en la Tabla 3. Las clases de mayor importancia desde el punto de vista del control de plagas agrícolas son Zygomycetes e Hyphomycetes (Ainsworth, 1973; Tanada y Kaya, 1993).

Dentro de la clase Deuteromyces existe un grupo morfológico de hongos conocidos como Hyphomycetes. Éstos son hongos filamentosos que se reproducen por conidio generalmente formado aeróbicamente en conidióforos derivados del substrato. Muchos de los géneros de hongos entomopatógenos aparecen dentro de dicha clase. Éstos poseen uno de los más amplios rangos hospederos dentro de los entomopatógenos, incluyendo numerosas especies de mosquitos. La ruta más común de invasión del huésped se da por medio del tegumento externo, asimismo la infección a través del tracto digestivo también es factible (Goettel y English 1997). El conidio se adhiere a la cutícula, germina y penetra a la cutícula. Una vez en el hemocele, el micelio crece dentro del huésped, formando hifas llamadas blastoesporas. La muerte del insecto se debe en ocasiones a la combinación de las toxinas del hongo, la obstrucción física de la circulación sanguínea, el agotamiento de nutrientes o la invasión a órganos. Una vez que el huésped ha muerto hifas usualmente emergen del cadáver y al presentarse condiciones abióticas adecuadas, el conidio se produce al exterior del huésped. El conidio es esparcido por el aire o el agua (Goettel y English 1997).

Muchos hongos entomopatógenos se encuentran en la subdivisión Zygomycotina, clase Zygomycetes, orden Entomophthorales; en Ascomycotina, clase Pyrenomycetes, orden Sphaeriales; clase Laboulbeniomycetes, orden Laboulbeniales y en Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Moniliales.

### **5.3.5 Métodos de aislamiento de hongos entomopatógenos**

Dentro de los hongos entomopatógenos más frecuentes y estudiados a nivel mundial se encuentran *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, debido a su alta eficiencia y facilidad para multiplicarse, (Allendes, 2007), por lo tanto tienen ventajas como como agentes de control. Para aislar hongos entomopatógenos se requiere una fuente de inóculo, tal como insectos, plantas, suelo, entre otros, además de medios artificiales como agar papa dextrosa (PDA). Dentro del aislamiento de los hongos se considera importante la obtención de cultivos puros o monospóricos, ya que es la primera etapa para un proceso de producción, que pueda garantizar el éxito del mismo, por lo que se debe tener la seguridad con el hongo aislado que corresponda al hongo entomopatógeno de interés, que deberá estar libre de contaminantes y tener un buen vigor para su crecimiento. Dentro de las diferentes técnicas para aislar hongos entomopatógenos están: dilución seriada, aislamiento directo (Monzon, 2001) o utilizando insectos como cebo o trampa.

Es importante destacar que los estudios de muestreo no deben realizarse en zonas donde se hayan aplicado o se apliquen microorganismos de las especies que

estamos tratando de aislar y siempre debe obtenerse un aislado monospórico para lograr mayor homogeneidad genética.

#### **5.3.5.1 Aislamiento por dilución seriada**

Este método consiste en colocar un insecto micosado en un recipiente que contiene 10 ml de Tween 80 al 0.01% en agua destilada estéril. La suspensión resultante se agita por 1 minuto para desprender las conidias del cuerpo del insecto. Lo que resulta es una suspensión concentrada o solución madre del inóculo más otras partículas. A partir de la solución madre se preparan diluciones en serie. La primera dilución ( $10^{-1}$ ) se obtiene con 10 ml de la solución madre en un tubo que contiene 9 ml de Tween 80 al 0.01% en agua destilada estéril, esta operación se repite varias veces hasta obtener una serie de diluciones ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ). Para realizar la siembra y obtener los cultivos del hongo, se utilizan las últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ).

#### **5.3.5.2 Aislamiento directo**

Consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo. Una de las desventajas de esta técnica es que pueden acarrear problemas de contaminación en el aislamiento debido a que las muestras que provienen de suelo pueden contener diversidad de microorganismos. Por lo cual se recomienda hacer una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio, enjuagándose con agua destilada estéril. Este tipo de aislamiento puede ser de dos formas: el primero puede ser raspando con un asa bacteriológica las partículas del hongo a partir de un insecto desinfectado, y pasándola luego mediante la técnica de estriado a un medio de cultivo; y la segunda, con una pinza seca y estéril, tomar el insecto esporulado previamente desinfectado y agitarlo con movimientos verticales y horizontales sobre la superficie del medio de cultivo.

#### **5.3.5.3 Aislamiento con insectos trampa**

Consiste en insectos trampa para aislar el microorganismo deseado y evitar que en el proceso se presenten problemas de contaminación por otros organismos. Esta técnica se ha utilizado para hongos y nemátodos entomopatógenos. Bedding y Akhurst en el año de 1975, desarrollaron el método para recuperar nemátodos parásitos de insectos en muestras de suelo, atrapados con las larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria*



*mellonella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae) principalmente de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Bedding y Akhurst, 1975)

Lezama y colaboradores (2001) aislaron *M. ansiopliae*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, y nemátodos pertenecientes a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* a partir de muestras de suelo cultivadas con maíz y sorgo provenientes de los estados de Michoacán, Colima y Jalisco (Lezama *et al.*, 2001).

En otra investigación, Molina y colaboradores del 2003, recuperaron *M. anisopliae* en localidades de Colima, Jalisco, Nayarit y Michoacán, y *B. bassiana* en Veracruz y Michoacán, además de nemátodos de *Steinernema sp* y *Heterorhabditis* (Molina *et al.*, 2003).

#### **5.3.5.3.1. *Galleria mellonella***

Polilla mayor de la cera es comúnmente conocida *G. mellonella*, es una clase de insecto lepidóptero de aproximadamente 14 mm a 35 mm de ancho alar y una longitud total entre los 8 y 17 mm (Maceda y González, 2008). Tiene una coloración marrón, gris o púrpura y su cabeza es gris o marrón claro. Su larva (oruga) roe y se alimenta de los panales de cera. El tamaño de la larva oscila entre 1 mm en su nacimiento, hasta 25-30 mm en su último estado larval (Pérez, 2011). Su ciclo biológico es de aproximadamente 50 a 60 días y consta de cuatro fases; 1) Huevo: dependen de la temperatura, eclosionan de 5 a 8 días a temperatura de 24 a 27°C, mientras que a una temperatura de 10 a 16°C lo hacen a los 35 días, por debajo de los 9°C no hay postura. 2) Larva: pasa de 1 a 23 milímetros en 28 días a una temperatura de 29 a 35°C. 3) Pupa: dura 9 semanas en un rango de temperatura de 29 a 35°C. 4) Imago (adulto): sobrevive de 1 a 3 semanas, a temperatura de 29 a 35°C, deposita entre 300 y 1000 huevos. *G. mellonella* es uno de los insectos más utilizados en fisiología, inmunología, bioquímica, a pesar de ser considerada una plaga para la apicultura, sorpresivamente este modelo no ha sido secuenciado. Las ventajas de *Galleria* son su rápido ciclo de vida, fácil lectura en dieta artificial y su comercialización en países como: España, Alemania, Estados Unidos, México, Chile y Perú (Páez y Hyrsi, 2010).

Un ejemplo de su uso, es como alimento vivo tanto para aves, reptiles y batracios así como en artrópodos depredadores, esto es en su estado larval. Finalmente, el cultivo de esta especie no representa ningún problema, a pesar de la especificidad alimenticia de sus larvas: la cera de las colmenas de la *Apis mellifera*. Se conocen varios medios de cultivo aptos para este insecto, una vez realizado el mismo, es suficiente con introducir una cepa de orugas en avanzado estado de desarrollo o imagos.

### **5.3.6 Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos en los insectos**

El proceso infectivo de un hongo entomopatógeno ocurre bajo condiciones de humedad y temperatura favorables al patógeno, pero si éstas no se dan, el hongo producirá estructuras no infectivas llamadas conidias de reposo o de resistencia, con paredes gruesas y abundantes sustancias de reserva, con las que sobrevivirá frente a condiciones adversas impuestas por el medio. Cuando las condiciones climáticas son adecuadas, las conidias germinan y producen conidias infectivas, dando inicio nuevamente al ciclo biológico del hongo. Las limitaciones de los avances científicos y estudios aplicados están relacionados con las dificultades de crecimiento en medios de cultivo artificial y con las diferencias de cada género o especie.

#### **5.3.6.1 Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto**

El primer contacto que hacen las conidias con la superficie del hospedero es la cutícula. Las características físicas y químicas de la superficie de la cutícula del insecto y la conidia son las responsables de esta unión. Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las conidias (Tanada y Kaya, 1993).

#### **5.3.6.2 Germinación de la conidia**

Es el proceso mediante el cual una conidia emite uno o varios pequeños tubos germinales, que por crecimiento y alargamiento originan las hifas (Volcy y Pardo, 1994). La germinación de las conidias en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura y en menor grado de las condiciones de luz o de su balance nutricional (Tanada y Kaya, 1993). El nivel de agua es determinante en el crecimiento del hongo, por lo cual pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa pueden ser un factor determinante en el éxito del hongo en el control de insectos plaga después de la aplicación de conidias (Guilliespie, 1988). El resultado de la germinación y la penetración no necesariamente dependen del porcentaje total de germinación, sino de la agresividad del hongo, tipo de conidia y susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

#### **5.3.6.3 Penetración al integumento del hospedero**

La penetración de conidias germinadas a la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica del tubo germinal (Gilliespie, 1988). El modo de penetración depende principalmente de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. La fuerza mecánica es notable en el extremo de una hifa invasiva, donde

la capa cuticular es deformada por presión (Tanada y Kaya, 1993). Se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto mediante presión mecánica. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El segundo mecanismo es químico y consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001). Las enzimas descubiertas en el tubo germinativo son proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y N-acetilglucosamidasa (quitinasas). Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Tanada y Kaya, 1993). Los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Isaria* spp. y *L. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido (Gilliespie, 1988). La producción de proteasa, lipasa y quitinasa sobre la cutícula del insecto, se ha demostrado con *M. anisopliae* mediante coloración de enzimas específicas, recuperadas de moscas previamente inoculadas con conidias del hongo (Tanada y Kaya, 1993). En varios aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* la enzima principal es una endoproteasa que disuelve la proteína matriz que cubre la quitina cuticular. Por lo tanto, la producción de quitinasa ocurre después del proceso de infección y una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del mismo (Gilliespie, 1988).

#### **5.3.6.4 Penetración a través de cuerpos abiertos**

Los hongos pueden infectar insectos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápido en este ambiente; por otra parte, los fluidos digestivos pueden destruir la espora o la hifa germinativa. La digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (Charnley, 1984). Los hongos pueden infectar insectos a través de los espiráculos y otros cuerpos abiertos, *M. anisopliae* ocasionalmente infecta larvas a través de los espiráculos y poros de órganos de los sentidos, *B. bassiana* infecta varias especies de mosquitos a través del sifón, en *Heliothis zea* a través del espiráculo y en el gorgojo de la alfalfa *Hypera postica* a través de la tráquea y no por la cutícula del integumento. La región anal de las larvas del gusano de seda es más frecuentemente infectada por el hongo *Aspergillus flavus oryzae* (Tanada y Kaya, 1993).

### **5.3.6.5 Crecimiento del hongo en el hemocele**

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente carecen de toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física (Bustillo, 2001). Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por (1) desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto (2) formación de cuerpos hifales que se multiplican y dispersan rápidamente (Samson *et al.*, 1988) y (3) producción de micotoxinas (Tanada y Kaya, 1993). Las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas, seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Ferron, 1981). Posterior al crecimiento del hongo en el hemocele, la micosis induce síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. En la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales y cambio de color del cadáver (Ferron, 1981). Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta, los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones son inadecuadas queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producir conidias cuando las condiciones sean favorables. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres, pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada y Kaya, 1993).

### **5.3.6.6 Producción de micotoxinas**

Durante el proceso de multiplicación de los hongos en el hemocele se producen toxinas que pueden matar al insecto ya que presentan propiedades insecticidas además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del hospedante alterando los hemocitos y retardando la agregación de las células de la hemolinfa. Entre las principales toxinas producidas por los hongos entomopatógenos se destacan la beauvericina, beauverolides, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas (a, b, c y d) y cytochalasinas (López, 1994).

### **5.3.6.7 Muerte del insecto**

Posterior al crecimiento del hongo, la micosis induce síntomas fisiológicos anormales en el insecto como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos

alterados. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal, se producen sustancias antibacteriales y cambios de coloración en el insecto (Leucona, 1996). Los síntomas en la fase infectiva de una larva enferma por hongos entomopatógenos son: pérdida de apetito, decoloración del integumento, hinchazón, flacidez, falta de movilidad hasta la parálisis, muerte y la momificación. Las larvas de lepidópteros y coleópteros que son afectadas en los últimos estados de su desarrollo larval, pupan en actitud de defensa antes de completar el ciclo (Ferron, 1981). Los adultos que se enferman pierden el apetito, interrumpen la oviposición, pierden movilidad hasta la parálisis, la muerte y la momificación. Los coleópteros adultos enfermos se retiran del lugar donde se alimentan en actitud de protección de su especie. Este comportamiento lo acompaña con una segregación de feromonas informantes que evitan que otros adultos de su especie, lleguen al sitio a infectarse. La finalización de esta fase generalmente resulta en la muerte del insecto. Algunos de los insectos muertos a causa de los hongos entomopatógenos manifiestan la miceliación y la esporulación (Ferron, 1981).

#### **5.3.6.8 Dispersión de las conidias**

La dispersión de la spora puede ser un proceso activo o pasivo, que depende de las características de la conidia y el esporangio, cada conidia puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por diseminación (Tanada y Kaya, 1993). El integumento de los cadáveres aparece recubierto por una masa fúngica micelar constituida por conidióforos, que dan lugar a nuevas conidias en la región conidiogénica, secuenciando así el ciclo biológico del hongo. La debilidad del insecto causada por la intoxicación hace difícil su sostenimiento y generalmente las plantas caen por la acción de la lluvia y el viento (López, 1994).

#### **5.4 Distribución de los hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* son especies que presentan una distribución cosmopolita y cuentan con un amplio rango hospedero (Tanada y Kaya, 1993; Roberts, 1974). El suelo es el hábitat natural para estas especies de hongos (Hajek, 1997); sin embargo se ha demostrado diferencia en cuanto a su cantidad, tanto en suelos de uso agrícola como en suelos adyacentes a cultivos y bosques (Vänninen, 1996; Bidochka *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 2003). La ubicación geográfica es un factor determinante para la distribución de los hongos entomopatógenos. Por otra parte, el tipo de suelo no afecta la distribución de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*. Los patrones de distribución de hongos se

relacionan directamente con los requerimiento de temperatura en las diferentes especies así como su modo de supervivencia a largo plazo en suelo (Vänninen, 1996).

## 5.5 Identificación de hongos entomopatógenos

### 5.5.1 Identificación macroscópica

#### ***Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin**

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* o *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*, sin embargo las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko (Bustillo, 2001).

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco. Las colonias en PDA son de aspecto aterciopelado a polvoriento, raras veces formando sinemas; blancas en los bordes volviéndose amarillentas, en ocasiones rojizas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas. Presenta conidióforos sencillos de 1-2 $\mu$  de diámetro donde nacen células conidiógenas, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zigzag, después de que varias conidias se producen. Las células conidiógenas (c.cs) están agrupadas en forma de grupos compactos grandes y a veces solitarias, en forma de botellitas de 3 a 6 x 3 a 5 $\mu$ . En ciertos casos, las c.cs. se ramifican formando c.cs secundarias. Al final de las c.cs se forma un raquis que sostiene las conidias. Las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo, 2001). *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5  $\mu$ m) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Samson, *et al.*, 1988).

#### ***Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith**

El género *Isaria* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presentan ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias; éstas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide (Bustillo, 2001).

En nuestro medio se registran como mínimo cinco especies de *Isaria* infectando ocho insectos diferentes. Las infecciones causadas por *I. fumosorosea* se reconocen por

el color rosado pálido mientras que en *P. lilacinus* son de color violeta claro. La especie más importante del género es *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith (Bustillo, 2001).

### ***Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin**

Es un hongo imperfecto, cosmopolita, ataca a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (ortópteros, hemípteros, dípteros, lepidópteros, dermápteros, himenópteros y coleópteros), principalmente es un parásito de coleópteros en la naturaleza.

Las colonias generalmente están: pegadas al medio, completamente redondas, de colores oliváceo, amarillento, verdoso o marrón oscuro dependiendo del proceso de aislamiento. El envés marrón, a veces verdoso cetrino. El conidióforo nace del micelio y es ramificado irregularmente con dos a tres ramas en cada septa; de 4 a 14 de longitud x 1.5 a 2.5  $\mu$  de diámetro. Sus fiálides cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice; miden 6 a 13 de longitud y 2 a 4  $\mu$  de diámetro. Las conidias pueden ser unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo que miden 3.5 a 9 de longitud x 1.5 a 3.5  $\mu$  de diámetro

### **5.5.2 Identificación microscópica**

En la caracterización fenotípica, también existen avances tecnológicos, por ejemplo el uso de analizadores de imágenes y contadores de partículas para la determinación de parámetros geométricos (incluida la dimensión fractal) y tamaño de estructuras (Guarro, 1999). Además, también se ha implementado un sistema de taxonomía numérica para facilitar su clasificación (Hawksworth *et al.*, 1995).

Otra de las alternativas para la identificación de los hongos son las técnicas fisiológicas y bioquímicas. En las primeras, los aislamientos se analizan en cuanto a su velocidad de crecimiento en medios específicos, determinándose además su temperatura óptima de crecimiento. Dentro de las técnicas bioquímicas se incluye el análisis de producción de metabolitos secundarios (tales como esteroides, terpenos, alcaloides, ciclopéptidos y cumarinas) que sin embargo presentan el inconveniente de ser altamente dependientes de las condiciones de cultivo (Paterson y Bridge, 1994).

Con el crecimiento exponencial que han tenido las técnicas moleculares en los últimos 10 años, y en especial con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es ahora posible utilizar regiones de ADN con secuencias conservadas para corroborar, y en su caso modificar, las relaciones taxonómicas y pertenencias de género de los hongos. Existen reportadas varias técnicas para el análisis del ADN y búsqueda de información de su secuencia en regiones específicas en hongos. Dentro de las técnicas

más importantes reportadas, se pueden utilizar por ejemplo alguna de las siguientes para la caracterización de hongos fitopatógenos: Amplificación al azar de polimorfismos en el ADN (*RAPD*'s), o la amplificación del polimorfismo en la longitud de fragmentos (*AFLP*'s). Para estas técnicas se utilizan combinaciones de iniciadores (oligonucleótidos) que produzcan patrones de bandas que puedan diferenciar el ADN de los diferentes individuos (Bulat *et al.*, 2000). En el mercado se encuentran disponibles *kits* con oligonucleótidos universales para microorganismos y plantas, que pueden ser utilizados para hongos. También es posible hacer ribotipificación o *RFLP*'s como generalmente se le conoce, que consiste en amplificar y cortar con enzimas las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS), que se sabe están altamente conservadas en todos los organismos, por lo que pequeños cambios en ellas pueden ser utilizados para clasificar a nivel inclusive de especies. Ha sido utilizado para hongos tales como *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium herbarum* y *Alternaria alternata* (Haugland *et al.*, 1999) además de *Trichoderma* spp (Lübeck *et al.*, 2000) y *Phytophthora fragariae* (Martín *et al.*, 2000). Se puede complementar esta técnica con la utilización de sondas (basadas en la hibridación o complementación de fragmentos de ADN) para realizar su detección rápida y menos cara mediante pruebas tipo ELISA. En una etapa posterior, el conocimiento generado con las técnicas mencionadas, se podría utilizar para crear microarreglos (de genes o sondas), en los cuales se pueden manejar grandes volúmenes de muestras, y hacer un diagnóstico completo y rápido de las especies presentes en un suelo (Martín *et al.*, 2000).

Todas estas tecnologías se encuentran en una etapa incipiente de desarrollo, y los hongos son uno de los grupos que menos han sido estudiados desde el punto de vista molecular, por lo que todavía se tiene prácticamente todo su genoma para realizar la búsqueda de regiones que nos permitan su identificación rápida e inequívoca (Martín *et al.*, 2000).



## 6. MÉTODOS

### 6.1 Reactivos y material biológico

Las cepas de hongos entomopatógenos se obtuvieron de muestras de suelo de cultivos agrícolas en diferentes estados de México (Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Nuevo León). En la Tabla 6 se muestran las cepas obtenidas en este trabajo de experimentación (la tabla se localiza en la sección de resultados).

Se trabajó con las larvas de sexto estadio de *Galleria mellonella* (orden *Lepidóptera* y de familia *Pyridae*) como insectos trampa, para la obtención de los hongos entomopatógenos.

Para la implementación de la cría se utilizó los siguientes ingredientes: miel de abeja, glicerol, vitamina de pollo, 15 cereales Nestlé, polen de abeja y agua destilada. Para el aislamiento se utilizó agar papa dextrosa, cloramfenicol y para la conservación de las cepas aisladas se utilizó glicerol.

Para la parte de biología molecular se utilizaron los siguientes reactivos, agarosa, fenol, cloroformo etanol, isopropanol, alcohol isoamílico buffer de lisis, proteinasa K, tris base. Para el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó lo siguiente: acrilamida, bis-acrilamida, glicina, persulfato de amonio y N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED).

### 6.2 Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se describen a continuación: campana microbiológica (*Labconco Co. Inc.*), balanza granataria (*Mettler, Toledo*), balanza analítica (*Mettler, Toledo*), potenciómetro (*Beckman*), placa de agitación (*Termolyne*), agitadores magnéticos (*Thermoline*), gradillas (*Glaser*), incubadora (*Yamato*), placa de calentamiento 17600 modelo DB17615 (*Thermoline*), termociclador (*PCR Sprint Hybaid*), cámara de electroforesis vertical y fuente de poder (494 *ISCO*), equipo de captura de imágenes (*EDAS 40 Kodak*), espectrofotómetro DU-650 (*Beckman Coulter*), espectrofotómetro modelo SmartSpect (Bio-Rad *TM3000*), microcentrífuga (*Beckman, Coulter TM22R*), centrífuga Allegra (*Beckman Coulter TM21R*), centrífuga Avanti (*Beckman Coulter J25I*), concentrador a vacío (Labconco Corporation), mini vortex (*VWRbrand 58816-121*), incubadora con agitación (*Lab-Line Instruments Inc.*), bomba de vacío (*0322-V4B-G180X General Electric*), autoclave (*Aesa*), olla de presión 21 litros (*Presto*), congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*Torrey*) y 2 refrigeradores (*Torrey*)

Para la identificación microscópica se utilizó una cámara de video Hitachi KDP-51 conectada a un microscopio Olympus CX 30. Para el procesamiento de datos y esquemas se empleó una computadora Compaq presario MV540 (*Compaq*), el procesador de texto Microsoft Word XP (*Microsoft Corporation, 2002*), el procesador de gráficos Microsoft Power Point XP (*Microsoft Corporation, 2002*) y la hoja de cálculo Microsoft Excel XP (*Microsoft Corporation, 2002*).

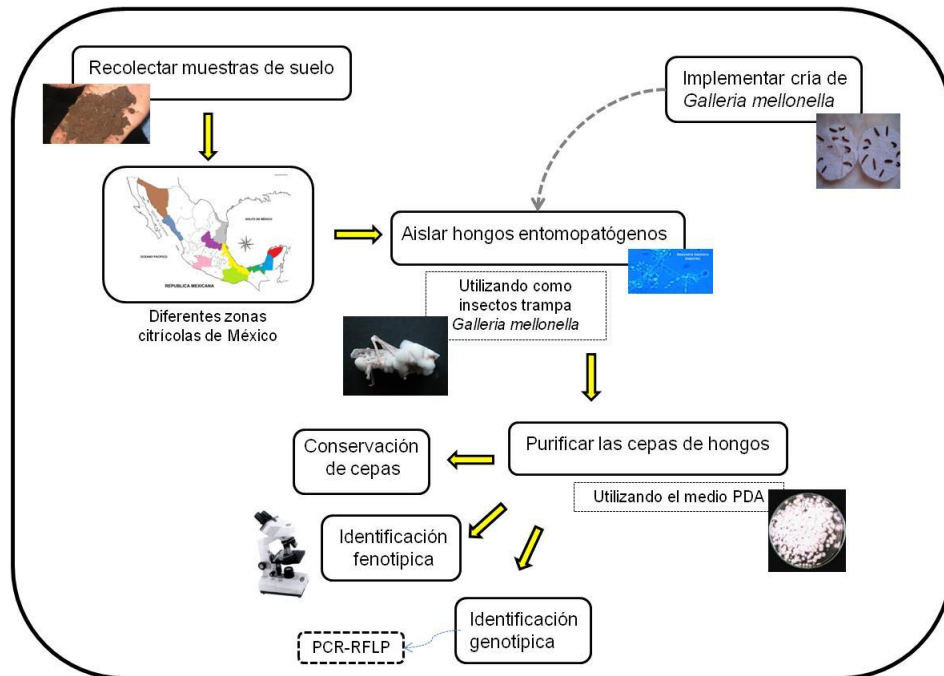
### **6.3 Estrategia experimental**

En la Figura 1 se ilustra el diagrama general de la estrategia experimental. Para el aislamiento de las cepas de hongos entomopatógenos y su posterior identificación, se obtuvieron muestras de suelo de diferentes zonas citrícolas de México. Para el caso del aislamiento de los hongos entomopatógenos se utilizaron insectos trampa *Galleria mellonella*. Las muestras de suelo, se tamizaron, humedecieron y colocaron en recipientes de plástico, junto con las larvas de *G. mellonella*. Cada recipiente se tapó, se invirtió e incubó, durante siete días. Transcurrido ese tiempo, se extrajeron las larvas y pupas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio y se colocaron en una cámara húmeda durante 7 días, para favorecer el desarrollo de los hongos. Cuando se observó el desarrollo de algún hongo sobre la superficie de la larva o pupa muerta, se tomó una pequeña muestra y se sembró en PDA.

Para implementar la cría se utilizó una dieta artificial para la multiplicación de las larvas que contenía miel de abeja, glicerol, vitamina de pollo, 5 cereales, polen de abeja agua destilada. Con esta mezcla se llenaron botes de plástico de 1 Lt de capacidad a 1/3 parte, se taparon con una malla de acero inoxidable y se colocó una placa de cera. Una vez lista, la dieta se llevó a cabo la infestación colocando las larvas en el bote después los recipientes se colocan en una incubadora, para que completen su ciclo biológico. A los 60 días se realizó un recambio de las larvas a dieta nueva y se estableció la primera colonia a partir de larvas del último estadio de la polilla mayor de la cera *G. mellonella* como trampa cebo para la detección y multiplicación *in vivo* de los hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos se identificaron mediante la técnica tradicional, la identificación de género (fenotipificación) involucró su aislamiento en placas de cultivo, purificación y caracterización morfológica, identificando los elementos hifales (septación, estructura de pared, estructura de septos, etc.) y sus estructuras de reproducción (esporangióforo, conidióforo, ascomata, basidiomata ó zoosporangio). Esto se realizó a nivel microscópico. Posteriormente las cepas que resultaron ser hongos entomopatógenos, fueron identificadas genéticamente mediante técnicas moleculares, se les extrajo el DNA a partir del micelio, y se sometió a diferentes reacciones de PCR para

amplificar las secuencias de transcripción interna de los genes ribosomales y posteriormente, se realizó la digestión enzimática para la caracterización molecular de las cepas aisladas (PCR-RFLP). Se realizó la clonación y secuenciación de fragmentos de PCR amplificados para confirmar los patrones de restricción obtenidos y la homología con otras secuencias reportadas en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las cepas las cuales fueron identificadas se conservaron para uso posterior.



**Figura 1. Representación esquemática de la estrategia general.** Se muestra cada una de las etapas realizadas para el aislamiento e identificación de cepas de hongos entomopatógenos.

#### 6.4 Establecimiento de la cría de *Galleria mellonella* a nivel laboratorio

Con el propósito de establecer la cría y mantenimiento de la colonia de *Galleria mellonella* (Lineus) (Lepidóptera: Pyralidae), este procedimiento se efectuó de acuerdo a las especificaciones de Woodrig y Kaya (1988). Para ello se solicitaron larvas a la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, en Tecomán (Colima).

Para implementar la cría se utilizó una dieta artificial para la multiplicación de las larvas que contenía 100 ml de miel de abeja, 100 ml de glicerol, 5 g de vitamina de pollo, 1200 ml de 5 cereales Nestlé, polen de abeja y 100 ml de agua destilada. Se llenaron botes de plástico de 1 Lt de capacidad a 1/3 parte. Se taparon con una malla de acero inoxidable y se colocó una placa de cera. Una vez lista la dieta se llevó a cabo la infestación colocando aproximadamente 60 larvas por bote, después los recipientes se

colocan en una incubadora a  $30 \pm 2$  °C, para que completen su ciclo biológico. A los 60 días se realizó un recambio de las larvas a dieta nueva, debido a que se agotaron los nutrientes y al excremento que impide a las larvas seguir alimentándose.

Se estableció la primera colonia a partir de larvas del último estadio de la polilla mayor de la cera *G. mellonella* como trampa cebo para la detección y multiplicación *in vivo* de los hongos entomopatógenos.

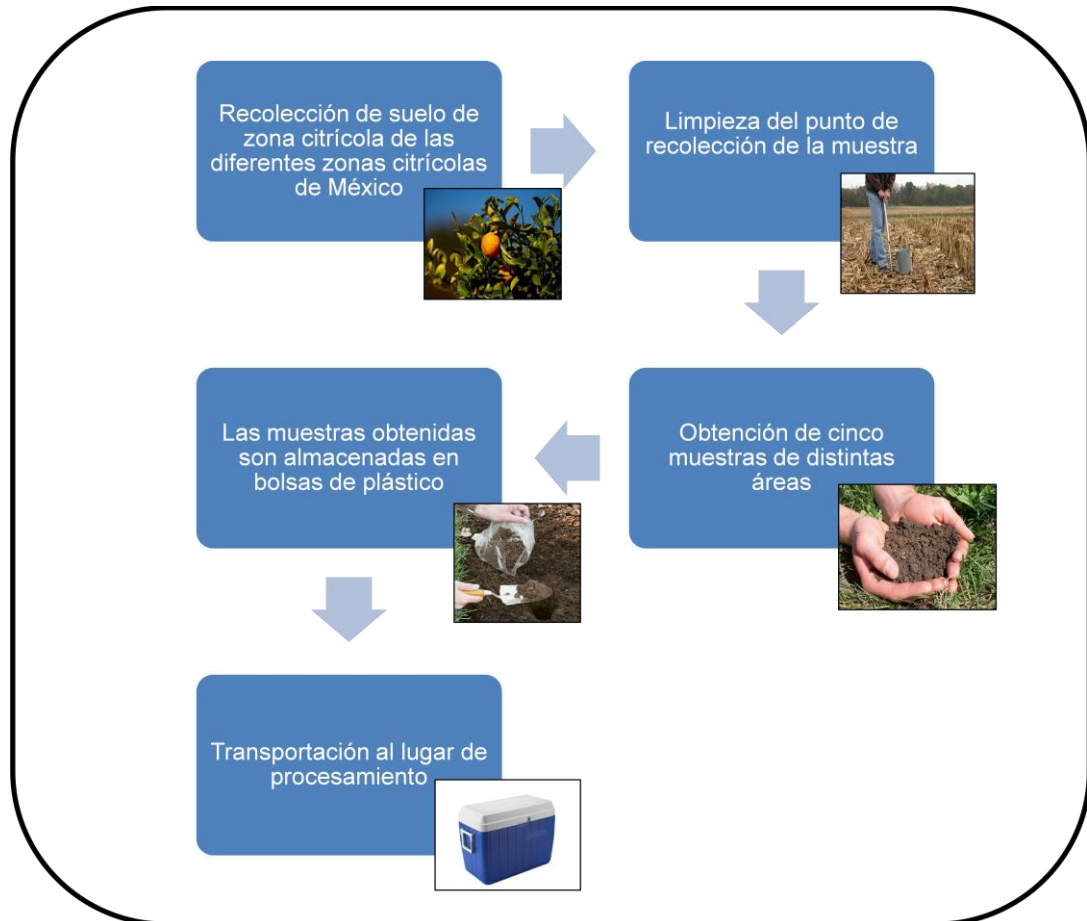
### 6.5 Obtención de muestras de suelo de las diferentes zonas citrícolas de México

Se colectaron muestras de suelo de cultivos agrícolas en diferentes estados de México (Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Nuevo León) (Figura 2). Una vez seleccionados los municipios se colectaron 5 muestras de suelo compuestas, para tomar la muestra el sitio se limpió, removiendo la hojarasca y las malezas; cerca de la rizósfera se tomaron 0.2 Kg de suelo de los primeros 10 cm; las cinco submuestras se mezclaron para obtener una sola muestra de 1 Kg; las muestras se colocaron en bolsas de plástico y llevadas en hieleras de unicel al laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL para realizar el aislamiento de los hongos (Molina *et al.*, 2003).



**Figura 2. Mapa de la República Mexicana.** Resaltan los Estados que conforman la región citrícola y de los cuales se recolectaron las muestras de suelo.

En la Figura 2 se presenta un mapa de la República Mexicana, donde se indican los estados citrícolas que fueron muestreados para la investigación y en la Figura 3 se muestra un diagrama para la recolección de las muestras de suelo.

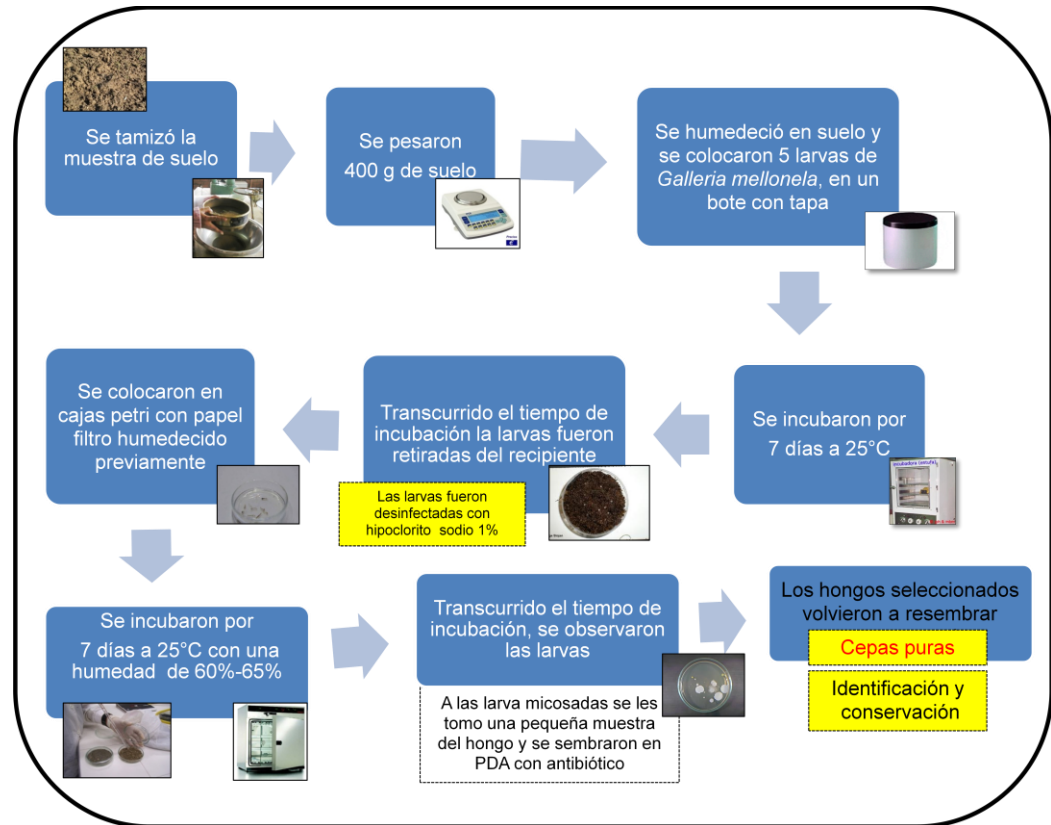


**Figura 3. Representación general de la obtención de suelo.** Se muestra el proceso de obtención de suelo de las diferentes zonas citrícolas de México.

### 6.6 Aislamiento y purificación de los hongos entomopatógenos a través de *Galleria mellonella*

En laboratorio se utilizaron larvas de sexto estadio de *G. mellonella* (L.) como insecto trampa (Fan y Hominick, 1991). De cada muestra se tomaron 400 g de suelo, se tamizaron, humedecieron y colocaron en recipientes de plástico de 1000 ml de capacidad, junto con cinco larvas de *G. mellonella*. Cada recipiente se tapó, se invirtió e incubó a 25°C, durante siete días. Transcurrido ese tiempo, se extrajeron las larvas y pupas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos y se colocaron en una cámara húmeda a 25°C durante 7 días, para favorecer el desarrollo de los hongos (Woodring y Kaya, 1988; Fan y Hominick, 1991). Cuando se observó el desarrollo de algún hongo sobre la superficie de la larva o pupa muerta, se tomó una pequeña muestra

y se sembró en agar dextrosa Sabouraud enriquecido con 1% de extracto de levadura y 500 ppm de cloramfenicol (Hatting *et al.*, 1999).



**Figura 4. Representación general del aislamiento y purificación de los hongos entomopatógenos.** Se muestra el proceso del suelo hasta la obtención de cepas puras de hongos entomopatógenos.

En la Figura 4 se muestra detalladamente la forma de como se trató el suelo para poder obtener cepas de hongos entomopatógenos mediante insectos trampa, para esto se implementó a nivel laboratorio la cría de *G. mellonella*.

### 6.7 Identificación fenotípica de los hongos entomopatógenos

La técnica tradicional de identificación de un género (fenotipificación) involucra su aislamiento en placas de cultivo, purificación y caracterización morfológica, tanto de los elementos hifales (septación, estructura de pared, estructura de septos, etc.) así como de sus estructuras de reproducción (esporangióforo, conidióforo, ascomata, basidiomata o zoosporangio) (Barnett y Hunter, 1972; Humber, 1997). Esto se realizó a nivel microscópico (cámara Evolution LC Color conectada a un microscopio Olympus BX 41).

## 6.8 Caracterización genética de los hongos entomopatógenos

El DNA se obtuvo a partir del micelio mediante la técnica siguiente: la muestra se centrifugó a 14000 rpm/1 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante. Se adicionó 500 µl de TE 1X y se centrifugó 14000 rpm/5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante. Se agregó 100 µl de buffer de lisis y adicionaron 3 perlas de vidrio a cada tubo. El tubo se sumergió en nitrógeno líquido por 20 seg. Se esperó a que deshiele un poco. Se usó vortex para descongelar por completo la muestra. Se adicionó 300 µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó a 65 °C toda la noche. Posteriormente, se transfirió todo el volumen (aprox. 400 µl) a un tubo nuevo. Se agregó igual volumen de fenol:cloroformo (200 µl c/u). Se centrifugó a 14000 rpm/10 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Se centrifugó a 14000 rpm/10 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionó un volumen igual de isopropanol. Los ácidos nucleicos se precipitaron y se lavaron con 1 ml de etanol 70%. Finalmente el DNA se resuspendió en 15 µl de TE 1X. Con el DNA se realizaron las reacciones de PCR para amplificar las secuencias de transcripción interna de los genes ribosomales (ITS1-5.8S-ITS2) y posteriormente se realizó la digestión enzimática con la endonucleasa *Hae* III para la caracterización molecular de las cepas aisladas (PCR-RFLP). Se realizó de algunos aislados de *B. bassiana* la clonación y secuenciación de fragmentos de PCR amplificados para confirmar los patrones de restricción obtenidos y la homología con otras secuencias reportadas en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

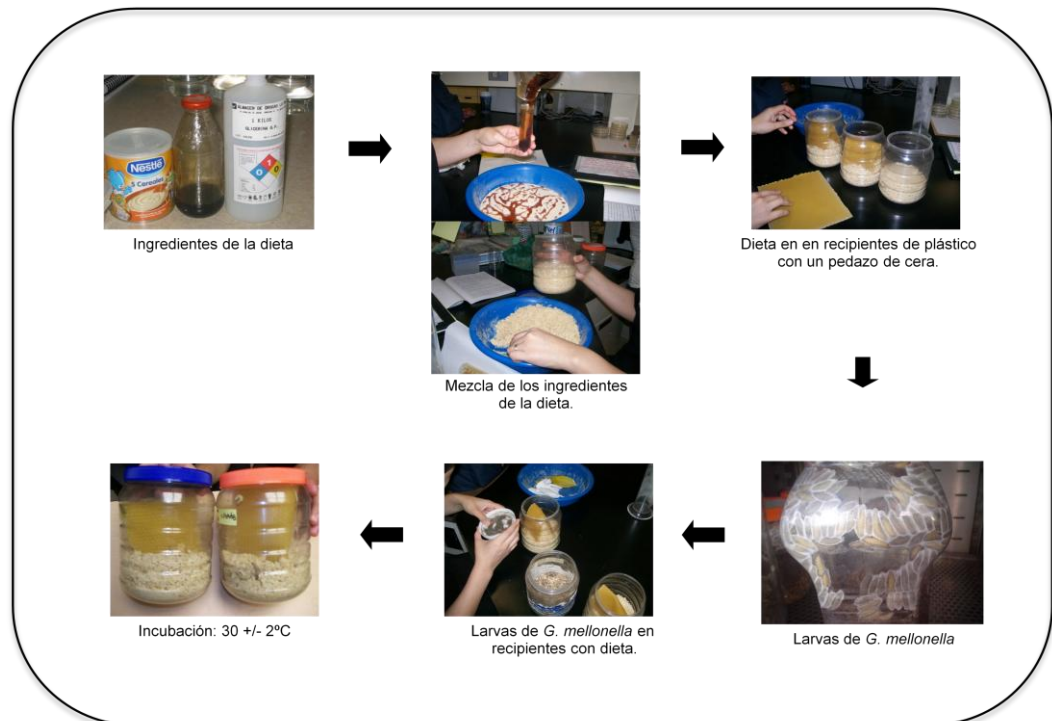
## 6.9 Conservación y mantenimiento de las cepas aisladas

La conservación de las cepas identificadas de hongos entomopatógenos se realizó partir de los cultivos purificados, los cuales se sembraron en PDA por extensión y luego incubados durante 21 días a temperatura ambiente. Posteriormente del cultivo anterior se realizaron cortes de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> y se almacenaron en viales con 1.0 ml de glicerol al 10% a una temperatura de -80 °C, hasta ser utilizados en experimentos posteriores.

## 7. RESULTADOS

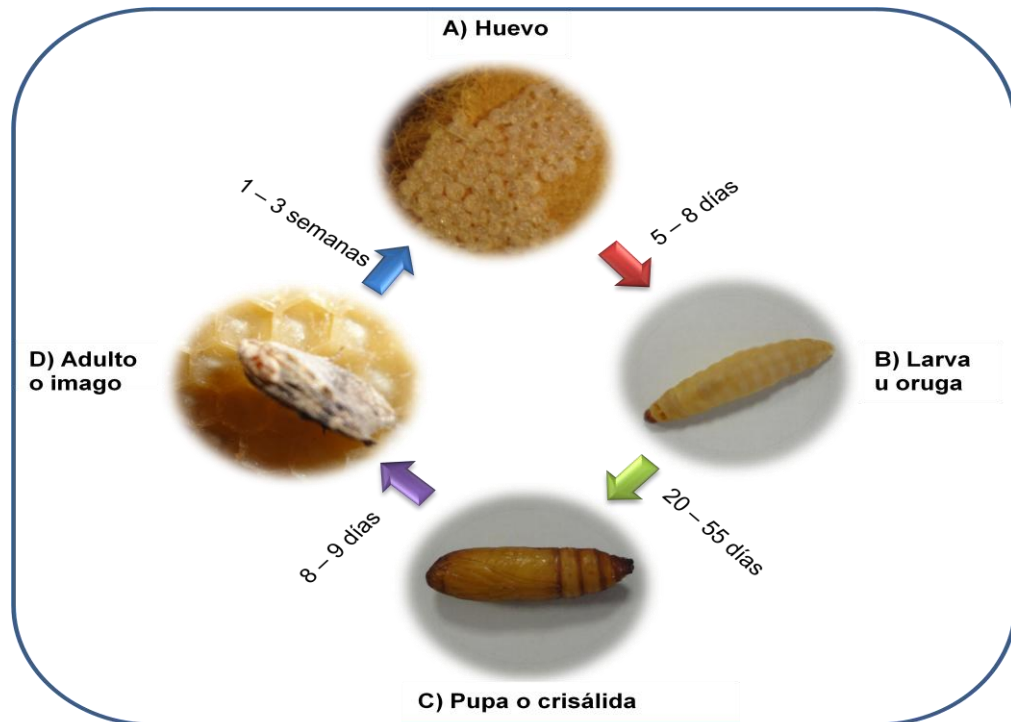
### 7.1. Cría de *G. mellonella* (L.) a nivel laboratorio.

Se estableció la cría de *G. mellonella* (Figura 5), para la detección y multiplicación *in vivo* de hongos entomopatógenos utilizando las larvas como trampa cebo, así como para la realización de bioensayos como insecto blanco. La cría se inició a partir de 80 larvas. La primera generación de adultos proporcionó alrededor de 500 larvas a partir de las cuales se continuó para lograr la segunda generación y así sucesivamente. Se observó que el ciclo de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) fue de 40-60 días bajo las siguientes condiciones de 26-30°C y 70-80 humedad relativa (Figura 6). De los cuales 5 a 8 días corresponden al estadio de huevo a larva, 20 a 25 días del paso de larva a pupa y de 8 a 9 días de pupa a adulto. Los adultos ovipositaron en hojas de cera.



**Figura 5. Preparación de la dieta para el establecimiento de *G. mellonella* (Lineus) (Lepidoptera: Pyralidae).**





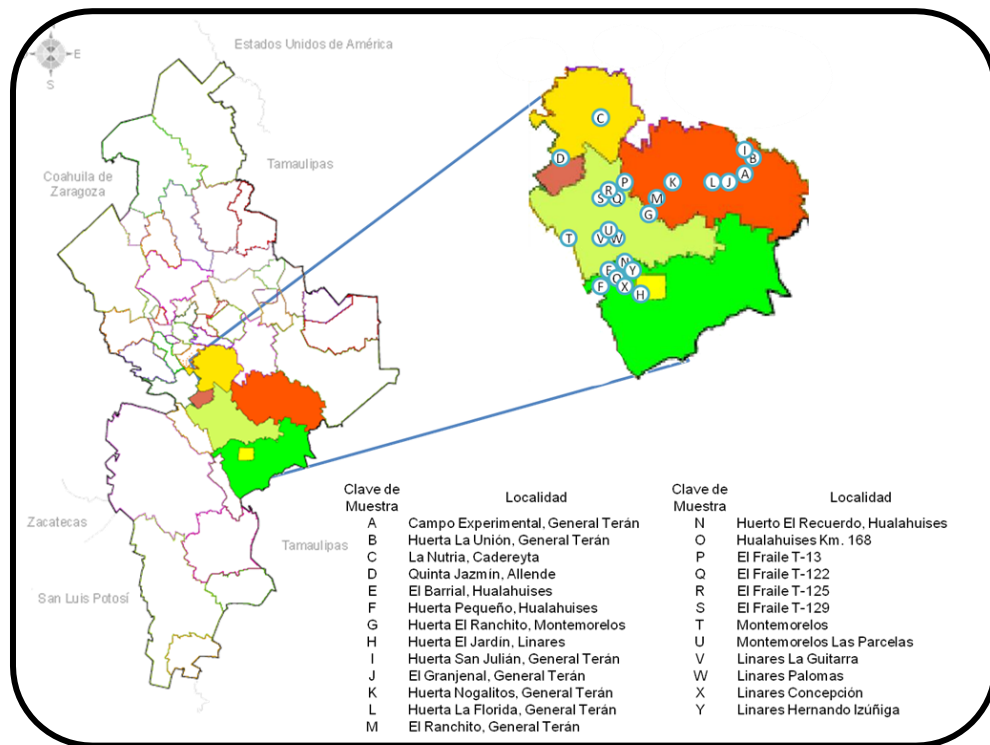
**Figura 6. Ciclo biológico de *G. mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) obtenido en el laboratorio. A) Huevo, B) Larva, C) Pupa y D) Adulto.**

## 7.2 Muestreo a nivel nacional en las zonas citrícolas

Se colectaron muestras de suelo de cultivos agrícolas en diferentes estados que constituyen la zona citrícola de México (Figura 2). Los estados que fueron sujetos de estudio son Nuevo León, Tamaulipas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Sinaloa, Sonora y San Luis Potosí.

### Nuevo León

El estado de Nuevo León se localiza en la zona noreste de país (Figura 7) y se colectaron muestras de los siguientes municipios: General Terán, Cadereyta, Allende, Hualahuises, Linares y Montemorelos, obteniendo 25 muestras de suelo de diferentes localidades mostradas (Tabla 4). Además en la Tabla 4 se indican las coordenadas digitales de cada una de éstas. Las coordenadas fueron obtenidas utilizando el programa de coordenadas "Map Source".



**Figura 7.** Mapa del estado de Nuevo León donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

En el mapa del estado de Nuevo León (Figura 7), se indican los municipios muestreados en diferentes colores: Cadereyta es de color amarillo fuerte, Allende de color rojo, General Terán de color naranja, Montemorelos de color verde claro, verde oscuro para Hualahuis y para el municipio de Linares de amarillo claro. En la Figura 7 se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada una de las lugares muestreados.

### Tamaulipas

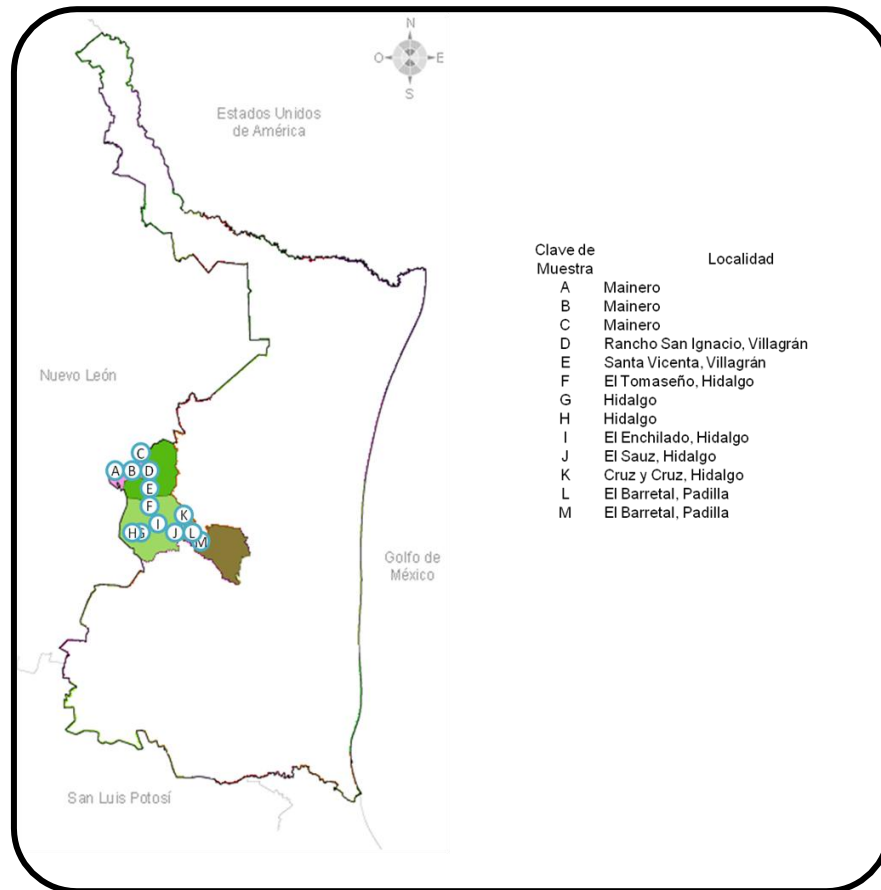
El estado de Tamaulipas se localiza al igual que el estado de Nuevo León en la zona noreste de país (Figura 8) y se colectaron 13 muestras de los siguientes municipios: Mainero, Villagrán, Hidalgo y Padilla.

En la Figura 8, se señalan los municipios muestreados en diferentes colores: Mainero, rosa; Villagrán, verde oscuro; Hidalgo, verde claro y Padilla de color café. En el mapa de la Figura 8 se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada una de las lugares muestreados.

**Tabla 4.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Nuevo León

NUEVO LEÓN					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Campo Experimental, General Terán	25.298056	-99.58528	25°17'53"	99°35'07"
B	Huerta La Unión, General Terán	25.326389	-99.585278	25°19'35"	99°35'07"
C	La Nutria, Cadereyta	25.47	-99.882222	25°28'12"	99°52'56"
D	Quinta Jazmín, Allende	25.409444	-99.988056	25°24'34"	99°59'17"
E	El Barrial, Hualahuises	24.893056	-99.708056	24°53'35"	99°42'29"
F	Huerta Pequeño, Hualahuises	24.885	-99.723056	24°53'06"	99°43'23"
G	Huerta El Ranchito, Montemorelos	25.23	-99.776667	25°13'48"	99°46'36"
H	Huerta El Jardín, Linares	24.763056	-99.672778	24°45'47"	99°40'22"
I	Huerta San Julián, General Terán	25.345833	-99.591389	25°20'45"	99°35'29"
J	El Granjenal, General Terán	25.2775	-99.614722	25°16'39"	99°36'53"
K	Huerta Nogalitos, General Terán	25.283611	-99.73	25°17'01"	99°43'48"
L	Huerta La Florida, General Terán	25.276111	-99.620278	25°16'34"	99°37'13"
M	El Ranchito, General Terán	25.263889	-99.771389	25°15'50"	99°46'17"
N	Huerto El Recuerdo, Hualahuises	24.884282	-99.634861	24°53'03"	99°38'55"
O	Hualahuises Km. 168	24.887449	-99.671185	24°53'14"	99°40'16"
P	El Fraile T-13	25.318417	-99.853472	25°19'06"	99°51'12"
Q	El Fraile T-122	25.3035	-99.887167	25°18'12"	99°53'13"
R	El Fraile T-125	25.3035	-99.902717	25°18'12"	99°54'09"
S	El Fraile T-129	25.319253	-99.902208	25°19'09"	99°54'07"
T	Montemorelos	25.167667	-99.953056	25°10'03"	99°57'11"
U	Montemorelos Las Parcelas	25.167667	-99.852917	25°10'03"	99°51'10"
V	Linares La Guitarra	25.15375	-99.852778	25°09'13"	99°51'10"
W	Linares Palomas	25.15375	-99.852917	25°09'13"	99°51'10"
X	Linares Concepción	24.885694	-99.617528	24°53'08"	99°37'03"
Y	Linares Hernando Izúñiga	24.884294	-99.617889	24°53'03"	99°37'04"

Las localidades muestreadas de la zona cítrica de Tamaulipas: Mainero, Rancho de San Ignacio, Tomaseño, El Sauz, Cruz y Cruz, El Enquilado, El Barretal, y Santa Vicenta se muestran en la Tabla 5. En dicha tabla indican las coordenadas digitales de cada una de ellas. Las coordenadas fueron obtenidas utilizando el programa de coordenadas "Map Source"



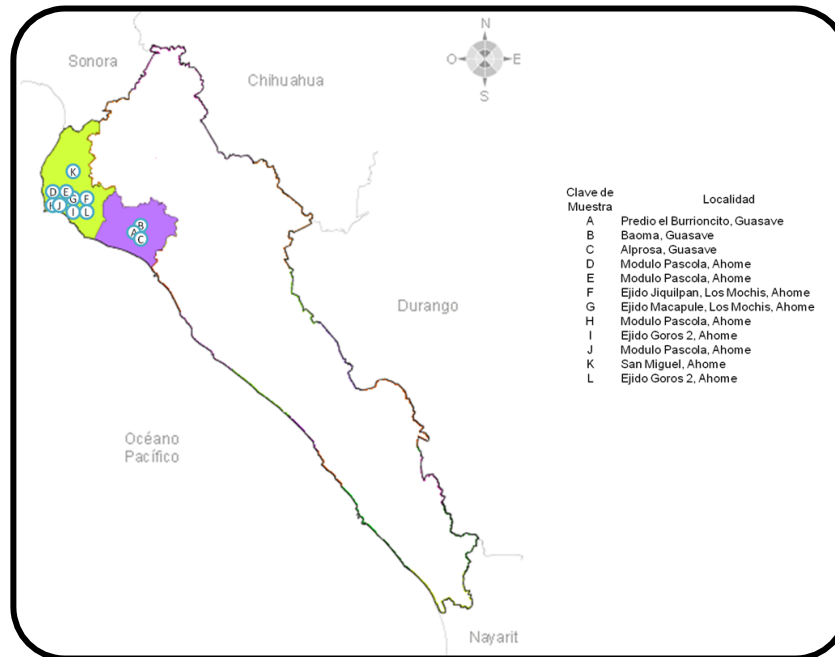
**Figura 8.** Mapa del estado de Tamaulipas donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región cítrica.

**Tabla 5.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Tamaulipas.

TAMAULIPAS					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		DIGITAL		Geográficas	
		NORTE	OESTE	NORTE	OESTE
A	Mainero	24.557116	-99.610291	24° 33' 25"	99° 36' 37"
B	Mainero	24.557116	-99.610291	24° 33' 25"	99° 36' 37"
C	Mainero	24.565235	-99.629517	24° 33' 54"	99° 37' 46"
D	Rancho San Ignacio, Villagrán	24.472463	-99.488411	24° 28' 20"	99° 29' 18"
E	Santa Vicenta, Villagrán	24.476994	-99.497509	24° 28' 37"	99° 29' 51"
F	El Tomaseño, Hidalgo	24.381178	-99.500127	24° 22' 52"	99° 30' 0"
G	Hidalgo	24.247904	-99.436398	24° 14' 52"	99° 26' 11"
H	Hidalgo	24.247904	-99.436398	24° 14' 52"	99° 26' 11"
I	El Enchilado, Hidalgo	24.186221	-99.291	24° 11' 10"	99° 17' 27"
J	El Sauz, Hidalgo	24.183208	-99.173692	24° 10' 59"	99° 10' 25"
K	Cruz Y Cruz, Hidalgo	24.098785	-99.188385	24° 5' 55"	99° 11' 18"
L	El Barretal, Padilla	24.083455	-99.12509	24° 5' 0"	99° 7' 30"
M	El Barretal, Padilla	24.083455	-99.12509	24° 5' 0"	99° 7' 30"

## Sinaloa

El estado de Sinaloa se localiza en la zona noroeste de país (Figura 9) y se colectaron muestras de las siguientes localidades: Predio El Burrionsito, Baoma, Alprosa Modulo Pascola, Ejido Jiquilpan, Ejido Macapule, Ejido Goros 2 y San Miguel, obteniendo 12 muestras de diferentes localidades, mostradas en la Tabla 6.



**Figura 9.** Mapa del estado de Sinaloa donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

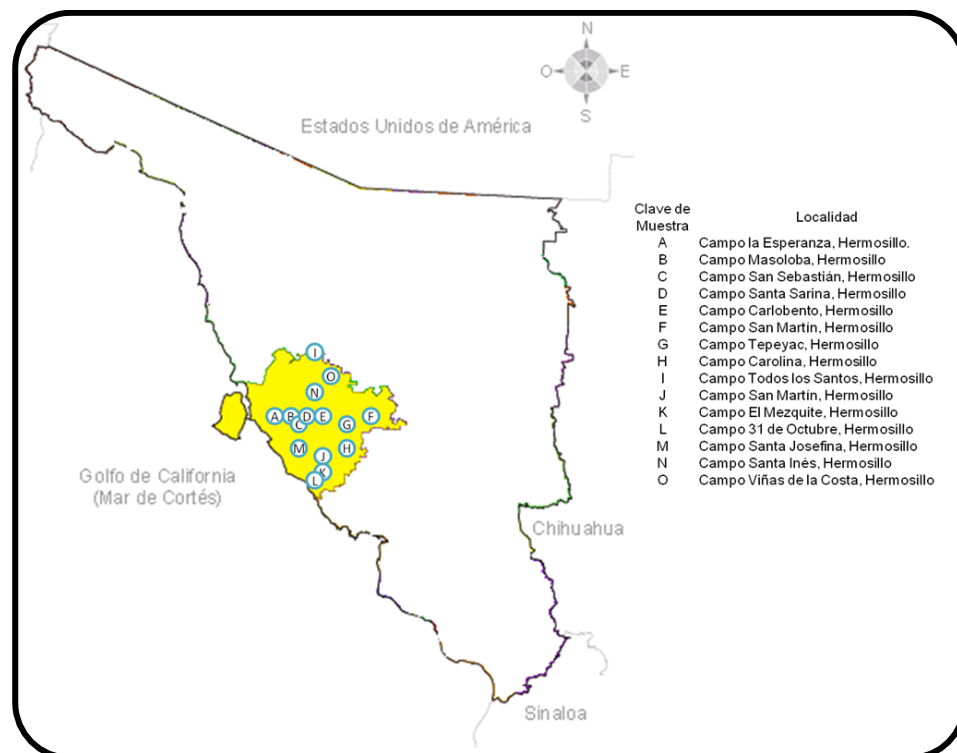
El municipio de Guasave se muestra de color morado y Ahome se muestran de color verde en el mapa de Sinaloa (Figura 9). En la Figura 9 se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada una de las lugares muestreados.

## Sonora

El estado de Sonora se localiza en la zona noroeste de país al igual que el estado de Sinaloa (Figura 10) y se colectaron muestras del municipio de Hermosillo, representado de color amarillo de la figura antes mencionada. En el mapa (Figura 10) se identifica el municipio de Hermosillo y se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada uno de los lugares muestreados.

**Tabla 6.** Localidades de las diferentes áreas citricolas muestreadas del estado de Sinaloa.

SINALOA					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Predio el Burriñoncito, Guasave	25.566127	-108.4458	25° 33' 58"	108° 26' 44"
B	Bamoa, Guasave	25.705833	-108.346667	25° 42' 20"	108° 20' 48"
C	Alprosa, Guasave	25.575278	-108.471667	25°34'31"	108°28'18"
D	Modulo Pascola, Ahome	25.923607	-109.173621	25° 55' 24"	109° 10' 25"
E	Modulo Pascola, Ahome	25.923607	-109.173621	25° 55' 24"	109° 10' 25"
F	Ejido Jiquilpan, Los Mochis, Ahome	25.806073	-108.997078	25° 48' 21"	108° 59' 49"
G	Ejido Macapule, Los Mochis, Ahome	25.813336	-108.99107	25° 48' 48"	108° 59' 27"
H	Modulo Pascola, Ahome	25.923607	-109.173621	25° 55' 24"	109° 10' 25"
I	Ejido Goros 2, Ahome	25.917021	-109.178567	25° 55' 1"	109° 10' 42"
J	Modulo Pascola, Ahome	25.923607	-109.173621	25° 55' 24"	109° 10' 25"
K	San Miguel, Ahome	25.91264	-109.173288	25° 54' 45"	109° 10' 23"
L	Ejido Goros 2, Ahome	25.917021	-109.178567	25° 55' 1"	109° 10' 42"

**Figura 10.** Mapa del estado de Sonora donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

En las siguientes localidades de Hermosillo: La Esperanza, Masoloba, San Sebastian, Santa Sarina, Carlobento, San Martín, Tepeyac, Carolina, Todos los Santos, El Mezquite, 31 de Octubre, Santa Josefina, Santa Ines y Viñas de la Costa, se recolectaron

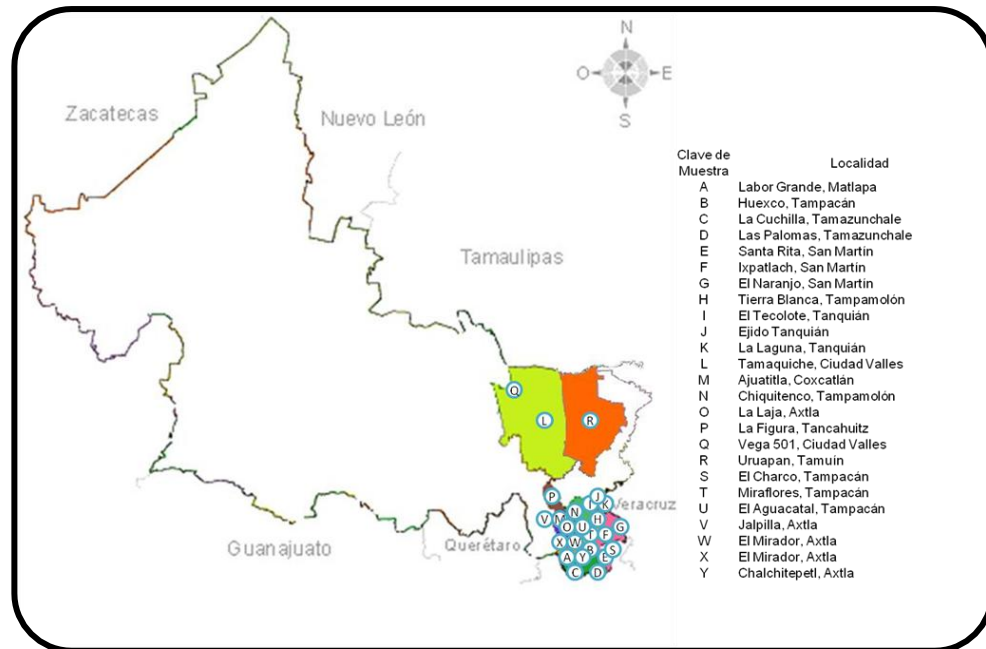
15 muestras. En la Tabla 7 se presentan las coordenadas digitales de cada una de ellas. Las coordenadas fueron obtenidas utilizando el programa de coordenadas "Map Source".

**Tabla 7.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas citrícolas muestreadas del estado de Sonora

SONORA					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Campo la Esperanza, Hermosillo.	28.784722	-111.579722	28°47'04"	111°34'46"
B	Campo Masoloba, Hermosillo	28.770556	-111.558889	28°46'14"	111°33'32"
C	Campo San Sebastián, Hermosillo	28.74515	-111.53871	28°44'42"	111°32'19"
D	Campo Santa Sarina, Hermosillo	28.75621	-111.52051	28°45'22"	111°31'13"
E	Campo Carlobento, Hermosillo	28.75373	-111.48015	28° 45' 13"	111° 28' 48"
F	Campo San Martín, Hermosillo	28.77798	-111.30229	28° 46' 40"	111°18' 8"
G	Campo Tepeyac, Hermosillo	28.75563	-111.40086	28° 45' 20"	111° 24' 3"
H	Campo Carolina, Hermosillo	28.7182	-111.39495	28° 43' 5"	111° 23' 41"
I	Campo Todos los Santos, Hermosillo	28.680278	-111.391389	28° 40' 49"	111° 23' 29"
J	Campo San Martín, Hermosillo	28.70093	-111.48331	28° 42' 3"	111° 28' 59"
K	Campo El Mezquite, Hermosillo	28.67702	-111.48909	28° 40' 37"	111° 29' 20"
L	Campo 31 de Octubre, Hermosillo	28.66682	-111.52841	28° 40' 0"	111° 31' 42"
M	Campo Santa Josefina, Hermosillo	28.72444	-111.55396	28° 43' 27"	111° 33' 14"
N	Campo Santa Inés, Hermosillo	28.8935	-111.32928	28° 53' 36"	111° 19' 45"
O	Campo Viñas de la Costa, Hermosillo	28.93022	-111.29182	28° 55' 48"	111° 17' 30"

### San Luis Potosí

Los municipios Ciudad Valles, Tamuín, Tancahuite, San Martín, Coxcatlán y Matlapa, pertenecen al estado de San Luis Potosí, localizado en la zona centro norte del País, (Figura 11). En el mapa de la Figura 11, los municipios se identifican por colores, para Ciudad Valles verde claro; Tamuín, naranja; Tancahuite, café; San Martín, rosa; Coxcatlán, morado y Matlapa de color amarillo y además se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada uno de los lugares muestreados.



**Figura 11.** Mapa del estado de San Luis Potosí donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

En la Tabla 8 se muestra la ubicación geográfica de las siguientes localidades del estado de San Luis Potosí: Labor Grande, Huexco, La Cuchilla, Las Palomas, Sta. Rita, Ixpatlach, El Naranjo, Tierra Blanca, El Tecolote, Ejido Tanquián, La Laguna, Tamaquiche, Ajuatitla, Chiquitenco, La Laja, La Figura, Vega 501, Uruapan, El Charco, Miraflores, El Aguacatal, Jalpilla, El Mirador y Chalchitepetl, obteniendo 25 muestras, las cuales en la Tabla 8, se muestra su ubicación geográfica, indicando sus coordenadas digitales.

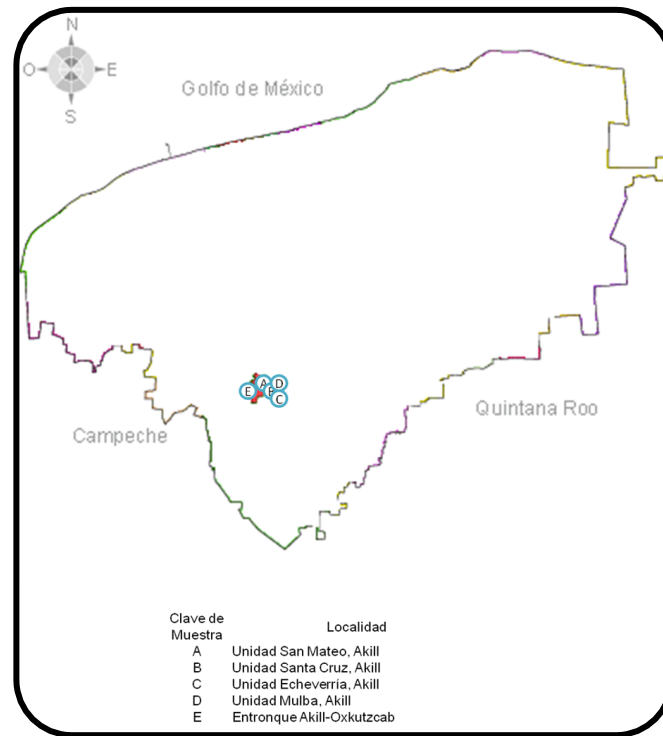
## Yucatán

El estado de Yucatán se localiza en la zona sureste de país al igual que los estados de Campeche y Tabasco (mapa de la Figura 12) y se colectaron muestras del municipio de Akill, representado de color rojo en el mapa de la Figura 12. En el mapa del estado de Yucatán se señalan con una clave, la localización de cada uno de los lugares muestreados.



**Tabla 8.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de San Luis Potosí.

SAN LUIS POTOSI					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Labor Grande, Matlapa	21.368056	-98.779167	21°22'05"	98°46'04"
B	Huexco, Tampacán	21.359444	-98.760278	21°21'34"	98°45'36"
C	La Cuchilla, Tamazunchale	21.2875	-98.7275	21°17'15"	98°43'38"
D	Las Palomas, Tamazunchale	21.293056	-98.708333	21°17'34"	98°42'13"
E	Santa Rita, San Martín	21.308333	-98.708333	21°18'29"	98°42'30"
F	Ixpatlach, San Martín	21.351944	-98.7	21°21'07"	98°41'59"
G	El Naranjo, San Martín	21.463333	-98.601389	21°27'48"	98°36'05"
H	Tierra Blanca, Tampamolón	21.528333	-98.703889	21°31'41"	98°42'14"
I	El Tecolote, Tanquián	21.586667	-98.663333	21°35'12"	98°39'47"
J	Ejido Tanquián	21.594444	-98.645833	21°35'40"	98°38'45"
K	La Laguna, Tanquián	21.604722	-98.641667	21°36'16"	98°38'29"
L	Tamaquiche, Ciudad Valles	21.937778	-98.979722	21°56'16"	98°58'47"
M	Ajuatitla, Coxcatlán	21.509722	-98.905278	21°30'35"	98°54'19"
N	Chiquitenco, Tampamolón	21.513611	-98.799722	21°30'49"	98°47'59"
O	La Laja, Axtla	21.484722	-98.869167	21°29'05"	98°52'09"
P	La Figura, Tancahuiz	21.626944	-98.985556	21°37'37"	98°59'08"
Q	Vega 501, Ciudad Valles	22.053889	-99.095556	22°03'14"	99°05'44"
R	Uruapan, Tamuín	21.124444	-98.605278	21°07'28"	98°36'19"
S	El Charco, Tampacán	21.418056	-98.895556	21°25'05"	98°53'44"
T	Miraflores, Tampacán	21.496944	-98.681389	21°29'49"	98°40'53"
U	El Aguacatal, Tampacán	21.458333	-98.792222	21°27'30"	98°47'32"
V	Jalpilla, Axtla	21.399444	-98.877778	21°23'58"	98°52'40"
W	El Mirador, Axtla	21.454167	-98.822222	21°27'15"	98°49'20"
X	El Mirador, Axtla	21.458056	-98.824444	21°27'29"	98°49'28"
Y	Chalchitepetl, Axtla	21.3525	-98.839444	21°21'09"	98°50'22"



**Figura 12.** Mapa del estado de Yucatán donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

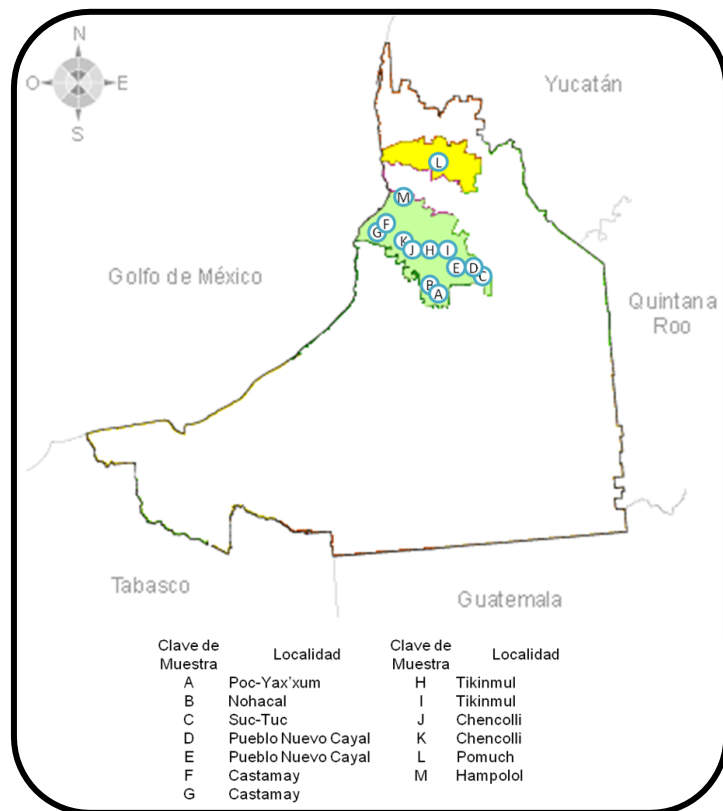
En las siguientes unidades de Akill: San Mateo, Santa Cruz, Echeverría, Mulba y el entronque Akill-Oxkutzcab, se recolectaron 5 muestras, mostradas en la Tabla 9. En la tabla mencionada se indican las coordenadas digitales de cada una de ellas. Las coordenadas fueron obtenidas utilizando el programa de coordenadas “Map Source”.

**Tabla 9.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas citricolas muestreadas del estado de Yucatán

YUCATÁN					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Unidad San Mateo, Akill	20.286111	-89.346111	20°17'02"	89°21'06"
B	Unidad Santa Cruz, Akill	20.275556	-89.338056	20°17'10"	89°20'46"
C	Unidad Echeverría, Akill	20.283889	-89.351667	20°16'32"	89°20'17"
D	Unidad Mulba, Akill	20.267222	-89.320833	20°19'15"	89°19'15"
E	Entronque Akill-Oxkutzcab	20.271389	-89.371389	20°16'17"	89°22'17"

## Campeche

El estado de Campeche se localiza en la zona sureste de país al igual que los estados de Yucatán y Tabasco (Figura 13), se colectaron muestras del municipio de Hecelchakán, representado de color amarillo y Campeche de color verde en el mapa de la Figura 13.



**Figura 13.** Mapa del estado de Campeche donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

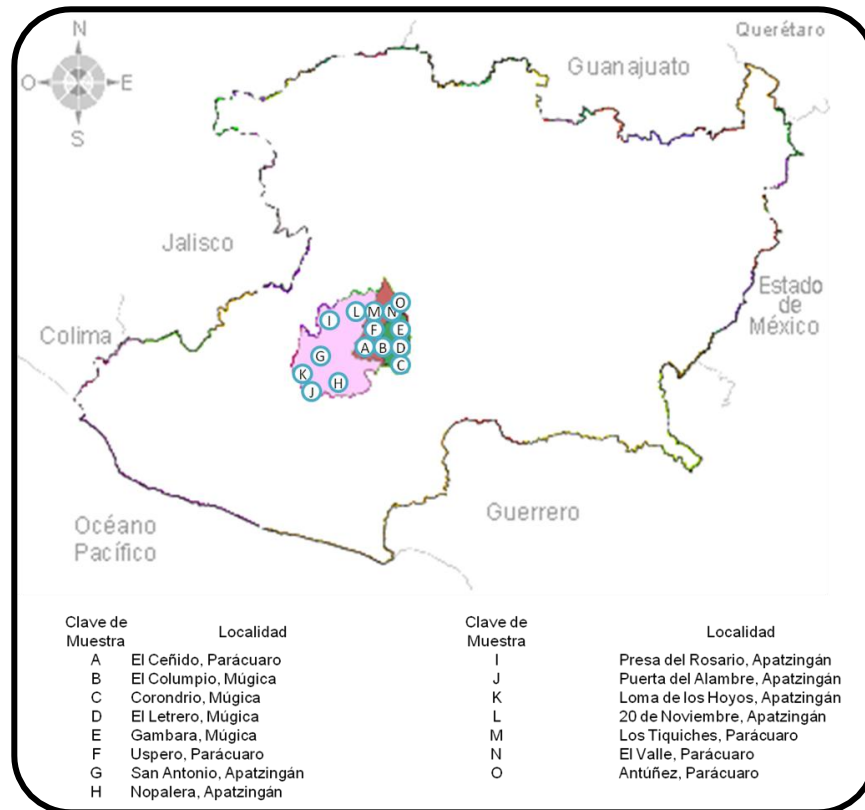
En el municipio de Hecelchakán, se tomó una muestra de suelo de la localidad de Pomuch y en el municipio de Campeche se tomaron muestras de suelo de diferentes localidades: Poc-Yax'xum, Nohacal, Suc-Tuc, Pueblo Nuevo Cayal, Castamay, Tikinmul, Chencolli y Hampolol, obteniendo un total de 13 muestras de suelo, Tabla 10. En la tabla anterior se muestra la ubicación geográfica de estas localidades, indicando sus coordenadas digitales. Las coordenadas fueron obtenidas utilizando el programa de coordenadas "Map Source."

**Tabla 10.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas cítricas muestreadas del estado de Campeche.

CAMPECHE					
Clave De Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Poc-Yax'xum	19.675	-90.341667	19° 40' 30"	90° 20' 30"
B	Nohacal	19.715	-90.349444	19° 42' 54"	90° 20' 58"
C	Suc-Tuc	19.709167	-90.024722	19° 42' 33"	90° 01' 29"
D	Pueblo Nuevo Cayal	19.741667	-90.113889	19° 44' 30"	90° 06' 50"
E	Pueblo Nuevo Cayal	19.751667	-90.135833	19° 45' 06"	90° 08' 09"
F	Castamay	19.817778	-90.421389	19° 49' 04"	90° 25' 17"
G	Castamay	19.809722	-90.434444	19° 48' 35"	90° 26' 04"
H	Tikinmul	19.767222	-90.2075	19° 46' 02"	90° 12' 27"
I	Tikinmul	19.772222	-90.202778	19° 46' 20"	90° 12' 10"
J	Chencolli	19.790556	-90.253889	19° 47' 26"	90° 15' 14"
K	Chencolli	19.813333	-90.273611	19° 48' 48"	90° 16' 25"
L	Pomuch	20.123333	-90.134167	20° 07' 24"	90° 08' 03"
M	Hampolol	19.923611	-90.390556	19° 55' 25"	90° 23' 26"

### Michoacán

Los municipios Apatzingán, Parácuaro y Múgica, pertenecen al estado de Michoacán, localizado en la zona occidente del país, (Figura 14). En el mapa de la Figura 14, los municipios se identifican por colores, Apatzingán, rosa; Parácuaro, rojo y Múgica de color verde, además se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada una de las lugares muestreados.



**Figura 14.** Mapa del estado de Michoacán donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

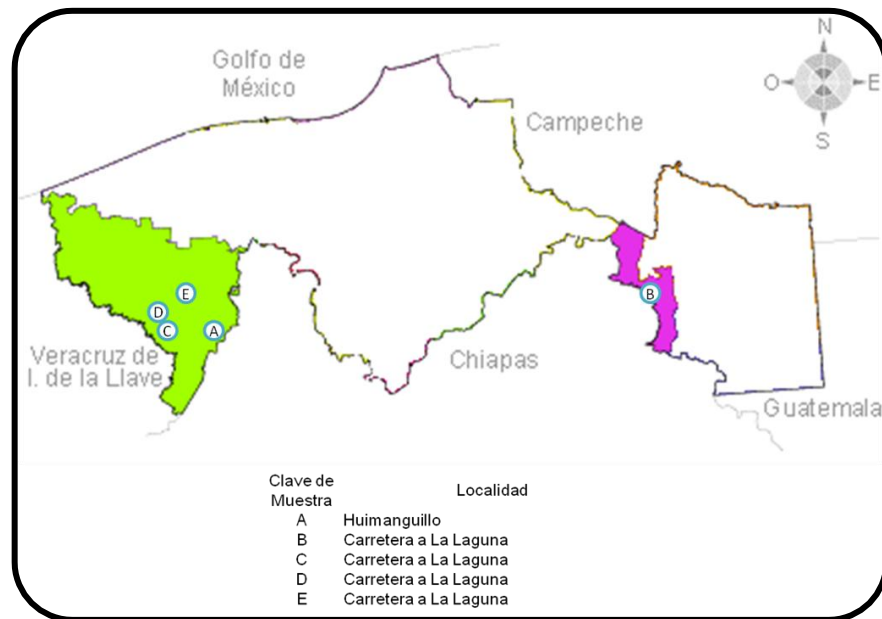
En la Tabla 11 se muestra la ubicación geográfica de 3 municipios del estado de Michoacán, de los cuales se obtuvieron 15 muestras de suelo de las siguientes localidades: El Ceñido, Uspero, Los Tiquiches, El Valle, Antúñez, Gambara, El Columpio, Corondrio, El Letrero, San Antonio, Nopalera, Presa del Rosario, Puerta del Alambre, Loma de los Hoyos y 20 de Noviembre. Las coordenadas digitales de estas localidades se muestran en dicha tabla.

### Tabasco

El estado de Tabasco se localiza en la zona sureste de país al igual que los estados de Yucatán y Tabasco (Figura 15) y se colectaron muestras del municipio de Huimanguillo, representado de color verde y de Emiliano Zapata de color rosa fuerte en el mapa de la Figura 15, también se señala a través de una clave de muestra, la localización de cada una de las lugares muestreados.

**Tabla 11.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas citrícolas muestreadas del estado de Michoacán.

MICHOCÁN					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	El Ceñido, Parácuaro	19.146506	-102.218728	19° 8' 47"	102° 13' 7"
B	El Columpio, Múgica	19.032586	-102.090797	19° 1' 57"	102° 5' 26"
C	Corondrio, Múgica	19.715	-100.552368	19° 42' 53"	100° 33' 8"
D	El Letrero, Múgica	19.453644	-102.052002	19° 27' 13"	102° 3' 7"
E	Gambara, Múgica	18.950454	-102.119293	18° 57' 1"	102° 7' 9"
F	Uspero, Parácuaro	19.028367	-102.282715	19° 1' 42"	102° 16' 57"
G	San Antonio, Apatzingán	19.092618	-102.375755	19° 5' 33"	102° 22' 32"
H	Nopalera, Apatzingán	19.01863	-102.568016	19° 1' 7"	102° 34' 4"
I	Presa del Rosario, Apatzingán	19.396011	-102.174911	19° 23' 45"	102° 10' 29"
J	Puerta del Alambre, Apatzingán	19.048488	-102.323914	19° 2' 54"	102° 19' 26"
K	Loma de los Hoyos, Apatzingán	19.097809	-102.375069	19° 5' 52"	102° 22' 30"
L	20 de Noviembre, Apatzingán	19.065687	-102.252846	19° 3' 56"	102° 15' 10"
M	Los Tiquiches, Parácuaro	19.090022	-102.233276	19° 5' 24"	102° 13' 59"
N	El Valle, Parácuaro	19.10527	-102.217312	19° 6' 18"	102° 13' 2"
O	Antúñez, Parácuaro	19.012787	-102.206497	19° 0' 46"	102° 12' 23"



**Figura 15.** Mapa del estado de Tabasco donde se resaltan los municipios muestreados que conforman la región citrícola.

Se recolectaron 5 muestras, una de ella es del municipio de Huimanguillo y las otras 4 se tomaron en el municipio Emiliano Zapata por la carretera a la Laguna. En este caso las coordenadas son aproximadas por que las muestras se tomaron durante el trayecto de regreso y se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Ubicación geográfica de las diferentes zonas citrícolas muestreadas del estado de Tabasco

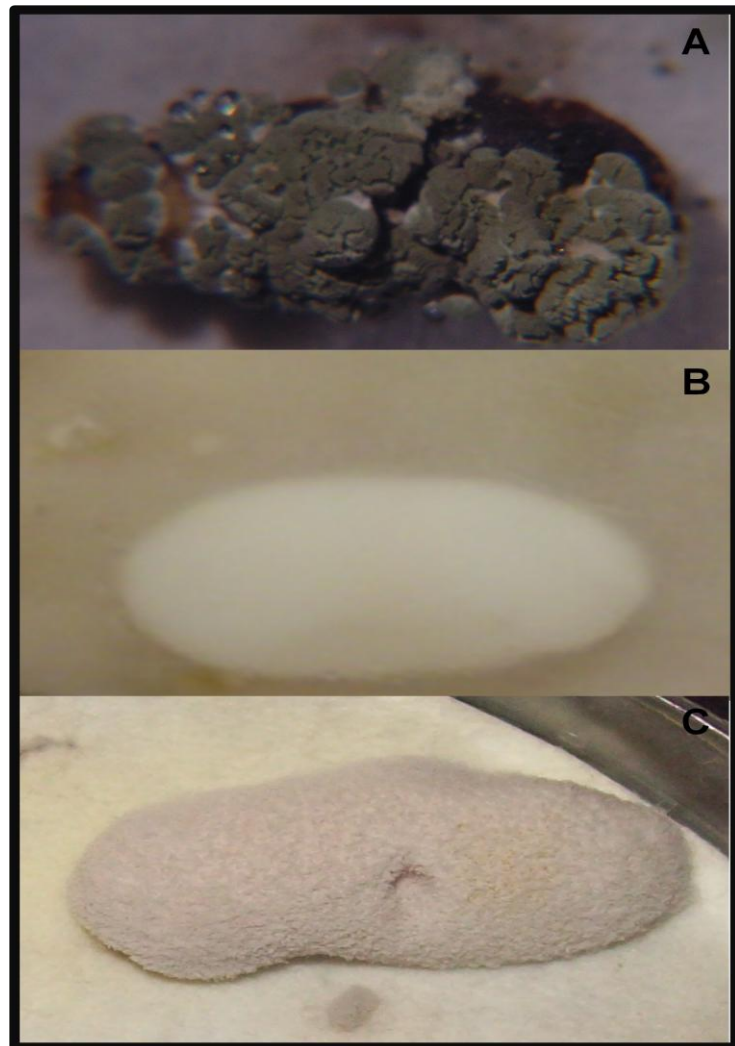
TABASCO					
Clave de Muestra	Localidad	Coordenadas			
		Digital		Geográficas	
		Norte	Oeste	Norte	Oeste
A	Huimanguillo	17.714444	-93.460833	17° 42' 52"	93° 27' 39"
B	Carretera a La Laguna	17.748333	-91.673611	17° 44' 54"	93° 40' 25"
C	Carretera a La Laguna	17.753056	-93.661667	17° 45' 11"	93° 39' 42"
D	Carretera a La Laguna	17.775278	-93.640833	17° 46' 31"	93° 38' 27"
E	Carretera a La Laguna	17.853056	-93.576667	17° 51' 11"	93° 34' 36"

### 7.3. Aislamiento y purificación de hongos

La multiplicación *in vivo* de los hongos entomopatógenos aislados fue detectada en un rango de 20 - 60% en las larvas evaluadas de *G. mellonella*: *Metarhizium* sp. (Figura 16A), *Beauveria* sp. (Figura 16B) e *Isaria* sp. (= *Paecilomyces* sp.) (Figura 16C). Se observó la presencia de nemátodos entomopatógenos en un rango del 20% de las larvas evaluadas de *G. mellonella*.

### Nuevo León

Se colectaron un total de 25 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos en el estado de Nuevo León, de las cuales el 60% de las muestras resultaron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. De los diferentes hongos aislados *Beauveria* spp. fue detectada en el 24% (6 aislados) de las muestras, *Metarhizium* spp. en el 8% (2 aislados) y *Isaria* spp. en el 25% (7 aislados), en la tabla 13 se muestran estos aislados, y en que localidad fueron encontrados.



**Figura 16.** Larvas de *G. mellonella* infectadas por: A) *Metarhizium*, B) *Beauveria* y C) *Isaria* (= *Paecilomyces*).



**Tabla 13.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de Nuevo León

NUEVO LEÓN		
Clave muestra	Localidad	Aisamiento
A	Campo experimental General Terán N.L	Negativo
B	Huerta La Unión General Terán N.L	Negativo
C	La Nutria, Caderetya N.L	Negativo
D	Quinta Jazmín, Allende N.L	<i>Beauveria</i> spp., <i>Metarhizium</i> spp.
E	El Barrial, Hualahuises N.L	<i>Beauveria</i> spp., <i>Metarhizium</i> spp.
F	Huerta Pequeño Hualahuises N.L	<i>Beauveria</i> sp
G	Huerta El Ranchito, Montemorelos, N.L	Negativo
H	Huerta El Jardín, Linares N.L	<i>Beauveria</i> spp.
I	Huerta San Julián General Terán, N.L	Negativo
J	El Granjenal General Terán, N.L	<i>Beauveria</i> spp.
K	Huerta Nogalitos General Terán, N.L	Negativo
L	Huerta La Florida General Terán, N.L	Negativo
M	El Ranchito General Terán, N.L	Negativo
N	Huerto El Recuerdo Hualahuises N.L	<i>Isaria</i> spp.
O	Hualahuises Km 168	<i>Isaria</i> spp.
P	El Fraile T-13	<i>Isaria</i> spp.
Q	El Fraile T-122	<i>Isaria</i> spp.
R	El Fraile T-125	Negativo
S	El Fraile T-129	<i>Beauveria</i> spp.
T	Montemorelos desviación Linares-Montemorelos	<i>Isaria</i> spp.
U	Montemorelos Las Parcelas	<i>Isaria</i> spp.
V	Linares La Guitarra	Negativo
W	Linares Palomas	<i>Isaria</i> spp.
X	Linares Concepción	Negativo
Y	Linares Hernando Izuñiga	Negativo

### Tamaulipas

Se colectaron un total de 13 muestras de suelo de áreas cultivadas con cítricos en el estado de Tamaulipas, de las cuales el 38% de las muestras resultaron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. De los diferentes hongos aislados *Beauveria* spp. fue detectada en el 31% (4 aislados) de las muestras e *Isaria* spp. en el 8% (1 aislados) de las muestras, en la Tabla 14 se muestran los aislados y la localidad en que fueron encontrados.

**Tabla 14.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de Tamaulipas.

Tamaulipas		
Clave muestra	Localidad	Aislamiento
A	Mainero	Negativo
B	Mainero	Negativo
C	Mainero	Negativo
D	Rancho San Ignacio, Villagrán	Negativo
E	Santa Vicenta, Villagrán	Negativo
F	El Tomaseño, Hidalgo	Negativo
G	Hidalgo	<i>Beauverian</i> spp.
H	Hidalgo	<i>Beauveria</i> spp.
I	El Enchilado, Hidalgo	Negativo
J	El Sauz, Hidalgo	Negativo
K	Cruz y Cruz, Hidalgo	Negativo
L	El Barretal, Padilla	<i>Beauveria</i> spp.
M	El Barretal, Padilla	<i>Isaria</i> spp.

## Sinaloa

En el estado de Sinaloa se colectaron un total de 12 muestras de suelo de áreas cultivadas con cítricos, de las cuales el 75% de las muestras resultaron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. Este 75% de cepas encontradas pertenecen al género de *Beauveria* spp. con 9 aislados, en la Tabla 15 se muestran estos aislados, así como la localidad en que fueron encontrados.

**Tabla 15.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de Sinaloa.

SINALOA		
Clave muestra	Localidad	Aislamiento
A	Predio el Burrionsito, Campo Santa Eduvigés	<i>Beauveria</i> spp.
B	Baoma, Guasave	<i>Beauveria</i> spp.
C	Alprosa, Guasave	<i>Beauveria</i> spp.
D	Modulo Pascola, Ahome	<i>Beauveria</i> spp.
E	Modulo de pascola, Ahome	<i>Beauveria</i> spp.
F	Ejido Jiquilpan, Los Mochis, Ahome	<i>Beauveria</i> spp.
G	Ejido Macapule, Los Mochis, Ahome	<i>Beauveria</i> spp.
H	Modulo Pascola	<i>Beauveria</i> spp.
I	Ejido goros 2, Ahome	<i>Beauveria</i> spp.
J	Modulo Pascola	Negativo
K	San Miguel, Ahome	Negativo
L	Ejido Goros 2, Ahome	Negativo

## Sonora

Se colectaron un total de 15 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos en el estado de Sonora, de las cuales solamente una (6.7%) resultó positiva a la presencia de hongos entomopatógenos. El hongo entomopatógeno aislado corresponde al género *Isaria* spp., en la Tabla 16 se muestra el aislado, así como la localidad donde fueron encontrados.

**Tabla 16.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de Sonora.

SONORA		
Clave muestra	Localidad	Aislamiento
A	Costa de Hermosillo, Campo la Esperanza	Negativo
B	Costa de Hermosillo, Campo Masoloba	Negativo
C	Costa de Hermosillo, Campo San Sebastian	Negativo
D	Costa de Hermosillo, Campo Santa Sarina	Negativo
E	Costa de Hermosillo, Campo Carlobento	Negativo
F	Costa de Hermosillo, Campo San Martin	Negativo
G	Costa de Hermosillo, Campo Tepeyac	Negativo
H	Costa de Hermosillo, Campo Carolina	Negativo
I	Costa de Hermosillo, Campo Todos los Santos	Negativo
J	Costa de Hermosillo, Campo San Martín (Laborin)	Negativo
K	Costa de Hermosillo, Campo el Mezquite	Negativo
L	Costa de Hermosillo, Campo 31 de Octubre	Negativo
M	Costa de Hermosillo, Campo Santa Josefina	Negativo
N	Costa de Hermosillo, Campo Santa Ines	<i>Isaria</i> spp.
O	Costa de Hermosillo, Campo Viñas de la Costa	Negativo

## San Luis Potosí

En San Luis Potosí se colectaron un total de 25 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos, de las cuales el 8% de las muestras resultaron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. El porcentaje corresponde a 2 aislados, uno de ellos del género *Beauveria* spp. (4%) y el segundo aislado del genero *Isaria* spp.(4%), en la Tabla 17 se muestran estos aislados y en que localidad fueron encontrados.

**Tabla 17.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de San Luis Potosí

SAN LUIS POTOSÍ		
Clave muestra	Localidad	Aislamiento
A	Labor Grande, Matlapa	Negativo
B	Huexco, Tampacan	Negativo
C	La Cuchilla, Tamazunchale	Negativo
D	Las Palomas, Tamazunchale	<i>Beauveria</i> spp.
E	Sta Rita, San Martín	Negativo
F	Ixpatlach, San Martín	Negativo
G	El Naranjo, San Martín	Negativo
H	Tierra Blanca, Tampamolón	Negativo
I	El Tecolote, Tanquian	<i>Isaria</i> spp.
J	Ej. Tanquian	Negativo
K	La Laguna, Tanquian	Negativo
L	Tamaquiche, Cd Valles	Negativo
M	Coxcatlan, Ajuatitla	Negativo
N	Chiquitenco, Tampamolón	Negativo
O	La Laja, Axtla, Tancanhuitz	Negativo
P	La Figura, Tancanhuitz	Negativo
Q	Vega 501, Cd Valles	Negativo
R	Uruapan, Tamuín	Negativo
S	El Charco, Tampacan	Negativo
T	Miraflores, Tampacan	Negativo
U	El Aguacatal (Imdecit), Tampacan	Negativo
V	Jalpilla, Axtla	Negativo
W	El Mirador(Imdecit), Axtla	Negativo
X	El Mirador(Imdecit), Axtla	Negativo
Y	Chalchitepetl, Axtla	Negativo

### Yucatán

Se colectaron un total de 5 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos en el estado de Yucatán, las muestras resultaron negativas a la presencia de hongos entomopatógenos

### Campeche

Se colectaron un total de 13 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos en el estado de Campeche, de las cuales el 23% de las muestras resultaron positivas a la

presencia de hongos entomopatógenos. Este 23% corresponde a tres aislados de *Isaria* spp. en la tabla 18 se muestran estos aislados.

**Tabla 18.** Géneros de hongos encontrados en suelos cultivados con cítricos en diferentes lugares del estado de Campeche

CAMPECHE		
Clave muestra	Localidad	Aislamiento
A	Poc-Yax'xum Campeche	<i>Isaria</i> spp.
B	Nohacal Campeche.	Negativo
C	Suc-Tuc Hopelchen Camp.	Negativo
D	Pueblo Nuevo Cayal Camp.	Negativo
E	Pueblo Nuevo Cayal Camp.	Negativo
F	Castamay Campeche	Negativo
G	Castamay Campeche	Negativo
H	Tikinmul Campeche	Negativo
I	Tikinmul Campeche	<i>Isaria</i> spp.
J	Chencolli, Campeche	Negativo
K	Chencolli, Campeche	<i>Isaria</i> spp.
L	Pomuch, Campeche	Negativo
M	Hampolol, Campeche	Negativo

### Michoacán

Se colectaron un total de 15 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos en el estado de Michoacán, todas las muestras resultaron negativas a la presencia de hongos entomopatógenos.

### Tabasco

En el estado de Tabasco se colectaron un total de 5 muestras de suelo de áreas cultivadas de cítricos, de las cuales el 100% de las muestras resultaron negativas a la presencia de hongos entomopatógenos.

Se recolectaron un total de 128 muestras de suelos de áreas cultivadas de cítricos de los diferentes estados de la República Mexicana, de los cuales el 24% (35 aislados) de las muestras resultaron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. De los diferentes hongos aislados *Beauveria* spp. fue detectada en el 15% (19 aislados) de las muestras, *Metarhizium* spp. en el 1.5% (2 aislados) e *Isaria* spp. en el 11% (14 aislados). A cada uno de los aislados de hongos entomopatógenos (*Beauveria*, *Isaria* y

*Metarhizium*), se les asignó una clave de identificación alfa numérica, que se observa en las tablas 19, 20 y 21, respectivamente para los géneros *Beauveria* spp., *Isaria* spp. y *Metarhizium* spp.

**Tabla 19.** Resumen de cepas aisladas del género *Beauveria* spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.

<b><i>Beauveria</i> spp.</b>		
<b>Estado</b>	<b>Localidad</b>	<b>Clave alfa numérica</b>
Nuevo León	Quinta Jazmín, Allende N.L	HIN -10
	El Barrial, Hualahuises N.L	HIB-11
	Huerta Pequeño Hualahuises N.L	HIB-20
	Huerta El Jardín, Linares N.L	HIB-28
	El Granjenal General Terán, N.L	HIB 29
	El Fraile T-129	HIB-24
Tamaulipas	Hidalgo	HIB-14
	Hidalgo	HIB15
	El Barretal, Padilla	HIB-18
Sinaloa	Predio el Burrionsito, Campo Santa Eduvigis	HIB-3
	Baoma, Guasave	HIB-1
	Alprosa, Guasave	HIB-6
	Modulo Pascola, Ahome	HIB-17
	Modulo de pascola, Ahome	HIB-16
	Ejido Jiquilpan, Los Mochis, Ahome	HIB-5
	Ejido Macapule, Los Mochis, Ahome	HIB-7
	Modulo Pascola	HIB-4
	Ejido goros 2, Ahome	HIB-2
San Luis Potosí	Las Palomas, Tamazunchale	HIB-8

**Tabla 20.** Resumen de cepas aisladas del género *Isaria* spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.

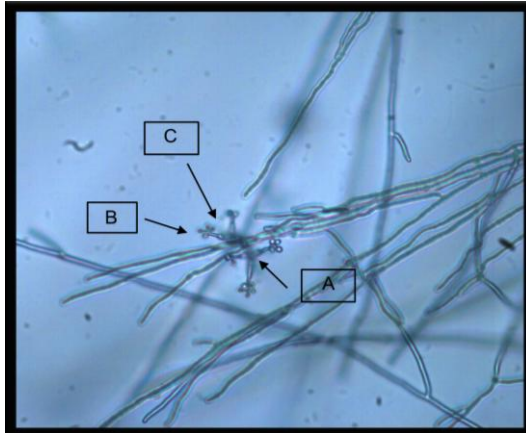
<i>Isaria</i> spp.		
Estado	Localidad	Clave alfa numérica
Nuevo León	Huerto El Recuerdo Hualahuises N.L.	HIB-34
	Hualahuises Km 168	HIB-20
	El Fraile T-13	HIB-28
	El Fraile T-122	HIB-29
	Montemorelos desviación Linares-Montemorelos	HIB-30
	Montemorelos Las Parcelas	HIB-23
	Linares Palomas	HIB-19
Tamaulipas	El Barretal, Padilla	HIB-32
Sonora	Costa de Hermosillo, Campo Santa Ines	HIB-27
San Luis Potosí	El Tecolote, Tanquian	HIB-9
Campeche	Poc-Yax'xum Campeche	HIB-33
	Tikinmul Campeche	HIB-21
	Chencolli, Campeche	HIB-31
	Hampolol, Campeche	HIB-26

**Tabla 21.** Resumen de cepas aisladas del género *Metarhizium* spp. encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.

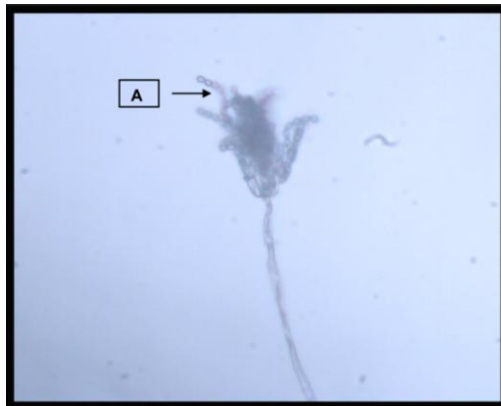
<i>Metarhizium</i> spp.		
Estado	Localidad	Clave alfa numérica
Nuevo León	Quinta Jazmín, Allende N.L	HIB-12
	El Barrial, Hualahuises N.L	HIB-11

#### 7.4. Caracterización microscópica de los diferentes hongos purificados

La identificación de los hongos aislados se realizó mediante las claves de Barnett H. L. y Hunter, B. B. 1998, tomando como base sus estructuras de reproducción, que en este caso fueron los conidióforos, para la identificación de *B. bassiana* (Figura 17), *I. fumosorosea* (Figura 18) y de *M. anisopliae* (Figura 19).



**Figura 17.** Microfotografía a 100x de *B. bassiana* donde se puede apreciar la presencia de (A) conidioforos, (B) esporas, (C) nótese el arreglo característico en zigzag que distingue a este género.



**Figura 18.** Microfotografía a 100x de *I. fumosorosea*, donde se puede apreciar (A) los conidioforos con cadenas de conidias.

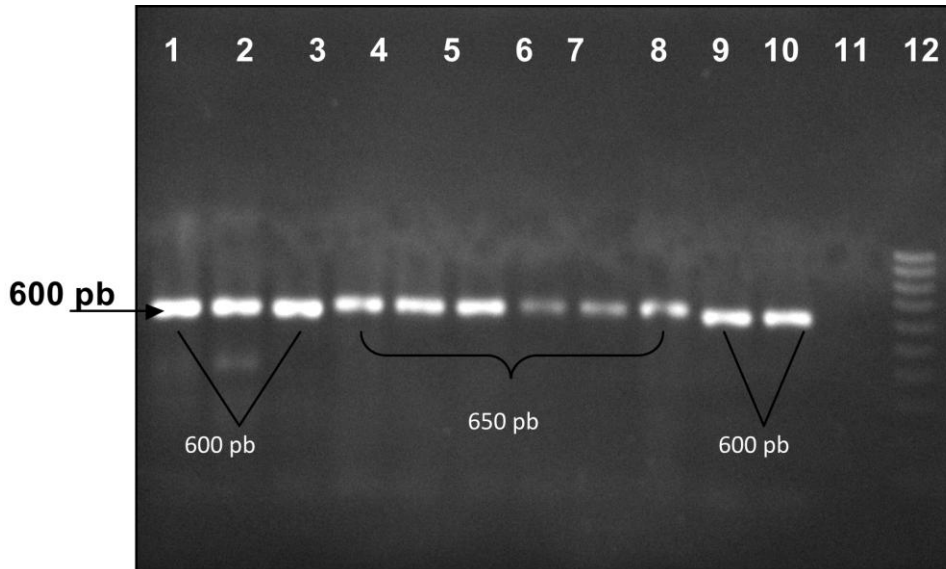


**Figura 19.** Microfotografía a 100x de *M. anisopliae* (A) que muestra la forma característica de sus conidias.



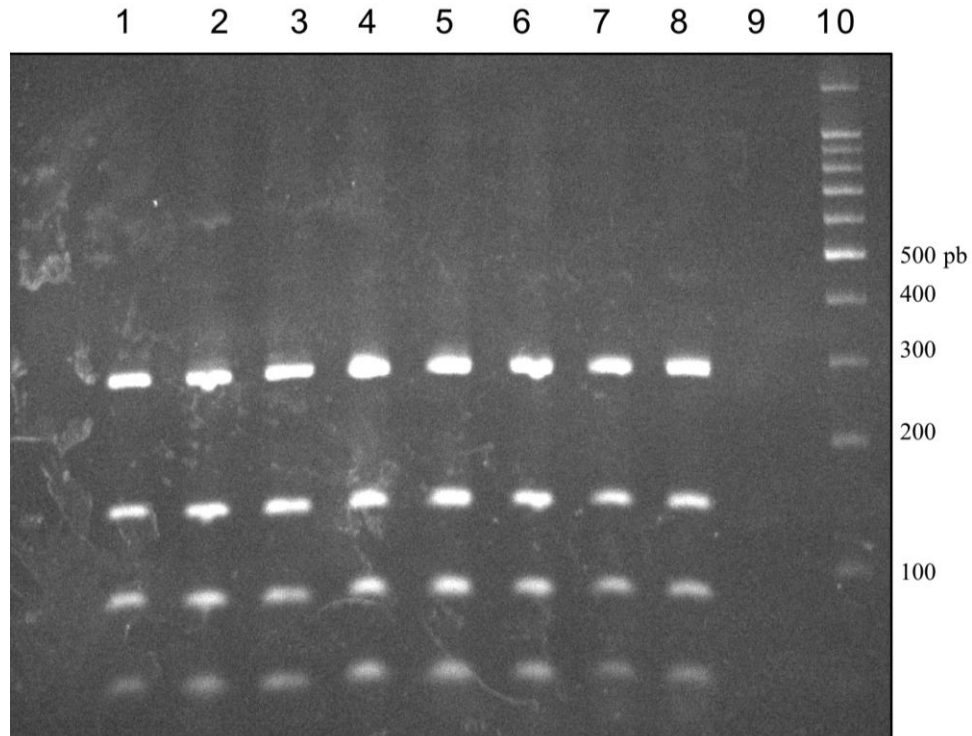
## 7.5. Identificación de los aislamientos mediante métodos moleculares basados en DNA

Los resultados de la PCR generaron fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases (pb), las diferencias en tamaño fueron indistinguibles en geles de agarosa entre los géneros *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. En el caso de *Isaria* spp, se amplificó un fragmento superior a 600 pb (Figura 20). Mediante la simulación del PCR con el programa computacional el fragmento de *Metarhizium* es de 581 pb, para *Isaria* es de 612 pb y para *Beauveria* 593 pb, los cuales fueron similares entre las cepas aisladas de campo y cepas de colección. Con los productos de PCR virtual generados por el programa Amplify 2.0, se realizaron simulaciones de análisis de restricción con el programa DNASTrider-1.1.



**Figura 20.** Productos de amplificación de muestras aisladas de campo. Carril 1-3 = *Beauveria* sp (HIB-1, HIB-2 y HIB-3); carriles 4-9 = *Isaria* sp (HIB-19, HIB-20, HIB-23, HIB-28, HIB-29 y HIB-30); carriles 10 y 11 = *Metarhizium* sp (HIB-11 y HIB-12); carril = 12 control negativo y carril = 13 marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

El análisis de restricción para *Isaria* spp. con *Hae* III mostró 7 fragmentos, de los cuales fueron visibles en gel de agarosa los de 257, 133, 87, 56 pb. Para *Metarhizium* spp., se obtuvieron los fragmentos de 404 y 141 pb y para el caso de *Beauveria* spp. de 257, 133, 87, 56, 27, 22, 19 y 11 pb (Figura 21). Tanto en cepas de colección como en aislados de campo se obtuvieron patrones de restricción similares para los aislados de *Beauveria* spp. (HIB-6, HIB-5, HIB-4, HIB-3, HIB-2, HIB-16 y HIB-1).



**Figura 21.** Productos de digestión enzimática de muestras aisladas de campo. Carril 1 = GHA, carriles 2 a 8 = HIB-6, HIB-5, HIB-4, HIB-3, HIB-2, HIB-16, HIB-1 respectivamente. Carril 9 = Control negativo y carril 10 = Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.

A partir de la secuencia de bases obtenidas de los fragmentos amplificados por PCR, se realizó una comparación mediante el programa computacional MegaAlign y se encontraron valores de similitud. La determinación de secuencias de ADN de los fragmentos ITS fueron realizadas en el Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional (Anexo 1). Se encontró una similitud entre *Beauveria* HIB-5 y *Metharizium* HIB-12 de 76.0 y *Beauveria* HIB-2 y *Metharizium* HIB-12 de 57.0. Al comparar *Beauveria* HIB-5 con secuencias de *Beauveria bassiana* reportadas en el banco de genes del NCBI, se encontró que las similitudes de 355/390 (91%), espacios de 19/390 (4%). El aislado HIB-2 presentó homología con *Beauveria bassiana* cepa EABb 04/01-Tip del banco de genes con identidades de 564/571 (98%) y espacios de 3/571 (0%), por lo que se confirma el género y la especie.

## 8. DISCUSIÓN

México es un país mega-diverso y tiene gran variedad de ecosistemas, el aislar hongos entomopatógenos nativos para ser utilizados en el control biológico, es importante para conservar el ecosistema, explotar la biodiversidad y tener un manejo de plagas más eficiente (Torres *et al.*, 2004).

Los hongos entomopatógenos son considerados como los patógenos más promisorios contra insectos como el caso de los áfidos, escamas y moscas blancas, ya que pueden infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula (Hayek y Leger 1994).

Las especies más comunes como controladores de estos insectos son los hongos Deureromycetes: *Isaria fumosorosea*, *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*. En general *Metarhizium* y *Beauveria* actúan sobre varios órdenes de insectos que agrupan varias especies de lepidópteros, coleópteros, ortópteros, *I. fumosorosea* actúa sobre lepidópteros (*Spodoptera* y especies de áfidos) y mosca blanca (*Bemisia*).

A nivel mundial, las dos especies más frecuentes y estudiadas de hongos entomopatógenos son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, (Allendes, 2007). El aislamiento de los hongos entomopatógenos puede hacerse de diferentes maneras: dilución seriada, aislamiento directo (Monzon, 2001) o utilizando insectos como cebo o trampa.

Con el fin de aislar cepas de hongos entomopatógenos y poder caracterizar molecularmente, en este proyecto se realizó la implementación de la cría de *G. Mellonella*, utilizando una dieta artificial a base de miel de abeja y cereales, de acuerdo a la comunicación personal con el Dr. Roberto Lezama. Con respecto a los ingredientes de la dieta no se realizó ninguna modificación debido a que *G. mellonella* la aceptó perfectamente sin afectar su ciclo biológico. Éste se completó sin presentar malformaciones o una mortalidad elevada de las larvas. En investigaciones anteriores se menciona que el establecer un insecto en dieta artificial facilita el crecimiento larval, reduce la probabilidad de contaminación por enfermedades y puede obtenerse una producción continua de insectos independiente de la temporada, localización geográfica o la fuente de los insectos (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001).

La cría del insecto *G. mellonella* se mantuvo por 5 generaciones, lo cual es tiempo considerable para probar la acción de algún microorganismo entomopatógeno o para la detección y multiplicación *in vivo* de hongos o nemátodos entomopatógenos.

En la Tabla 22 se observa la cantidad de muestras recolectadas en los diferentes estados, (Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Sonora, San Luis Potosí, Yucatán, Campeche, Michoacán y Tabasco) que constituyen la zona citrícola de México. Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, para realizar el aislamiento de los hongos.

Una vez establecida la cría de *G. mellonella* se realizó el procedimiento para aislar los hongos entomopatógenos en el laboratorio utilizando al insecto como cebador. De las 128 muestras obtenidas de los huertos de cítricos de los diferentes estados: Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Sonora San Luis Potosí, Yucatán, Campeche, Michoacán y Tabasco, el 24% de éstas se encontraron positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. El 15% de los aislamientos fueron positivos para el hongo entomopatógeno *Beauveria* spp., el 11% para *Isaria* spp. y para *Metarhizium* spp. se encontró el 1.5% de las muestras (Tablas 19, 20 y 21, éstas se encuentran en el apartado de resultados).

En la Tabla 22 se muestra, un resumen de las cepas aisladas de los diferentes géneros de hongos entomopatógenos (*Beauveria* sp, *Isaria* sp y *Metharizium* spp.), encontrados en las muestras de suelo de los diferentes estados citrícolas en estudio, también se menciona por estado la cantidad de aislados encontrados de *Beauveria* sp, *Isaria* sp y *Metharizium* spp.

Del estado de Nuevo León se obtuvieron 25 muestras, al igual que San Luis Potosí, ambos estados obtuvieron la mayor cantidad de muestras de suelo. Nuevo León fue el estado del cual se obtuvieron la mayor cantidad de cepas de hongos entomopatógenos, 7 cepas de *Isaria* spp., 6 cepas de *Beauveria* sp y 2 cepas de *Metharizium* spp., siendo Nuevo León el único estado en el cual se obtuvo éste hongo, mientras que en las muestras de suelo de los estados de Michoacán, Yucatán y Tabasco no se obtuvieron cepas de hongos entomopatógenos. Es posible que el muestreo realizado en campo de estos dos estados fuera muy reducido para obtener hongos entomopatógenos.

**Tabla 22.** Resumen de cepas aisladas de los tres géneros de hongos entomopatógenos encontradas en los diferentes estados de la República Mexicana.

Estado	Número de muestras	<i>Isaria</i> spp.	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metharizium</i> spp.
Nuevo León	25	7	6	2
Tamaulipas	13	1	3	0
Sinaloa	12	0	9	0
Sonora	15	1	0	0
San Luis Potosí	25	1	1	0
Yucatán	5	0	0	0
Campeche	13	4	0	0
Michoacán	15	0	0	0
Tabasco	5	0	0	0

Estos géneros de hongos entomopatógenos han sido encontrados en suelos bajo diversos cultivos (Bidochka *et al.*, 1998; Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001). En México, (Lezama *et al.*, 2001) se aislaron de muestras de suelo de diferentes estados del país, las siguientes especies: *M. anisopliae* en Colima y Jalisco, *B. bassiana* en Colima, Michoacán y Jalisco, y *I. fumosoroseus* en Colima, las cuales mostraron patogenicidad hacia *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae).

En Nuevo León, durante el 2007 se informó también del aislamiento de estos géneros de hongos entomopatógenos de los suelos de los huertos citrícolas de la región (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2006; Galán-Franco *et al.*, 2007). En el estudio de Lezama-Gutiérrez *et al.*, (2001), así como en la presente investigación no se han aislado especies del género *Lecanicillium* (= *Verticillium*), las cuales poseen la capacidad reportada de infectar a *G. mellonella* (López-Llorca y Carbonell, 1999), el insecto indicador utilizado, y aún cuando han sido detectadas en insectos infectados asociados a los cítricos (Berlanga y Núñez, 2006).

Es posible que el muestreo realizado en campo fue muy reducido para obtener al hongo, o que las condiciones para el crecimiento en medio no favorecieran el desarrollo de alguna posible especie de *Lecanicillium*; además como se conoce existen diversos factores ambientales que pueden afectar el aislamiento y la eficiencia de estos hongos como agentes de control biológico, entre estos factores pueden encontrarse la baja humedad relativa, temperatura y brillo solar (Leucona, 1996), así como la presencia de

funguicidas en el suelo. Por ejemplo se requiere de una alta humedad relativa para la germinación del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*. Así como el estudio de Walstad y colaboradores, indica que la mayor germinación ocurre al 100% de humedad relativa y disminuye a 0 al 85% de HR (Walstad *et al.* 1970).

Se logró identificar todos los aislados de hongos entomopatógenos a nivel microscópico, mediante las claves de Barnett H. L. y Hunter, B. B. 1998, tomando como base sus estructuras de reproducción, que en este caso fueron los conidióforos. Se identificaron los géneros *B. bassiana*, *I. fumosorosea* y de *M. anisopliae*.

Se confirmó la identificación mediante los métodos moleculares, mediante PCR-RFLPS de las secuencias ITS, el género y la especie de los aislados obtenidos en los tres géneros.

Se logró determinar homologías 91% y del 98% para *B. bassiana*, confirmando nuevamente el género y especie mediante secuenciación de los fragmentos ITS de los aislados y comparando éstas con lo reportado en el banco del NCBI.

Sin embargo, los géneros de hongos entomopatógenos encontrados generalmente albergan especies con capacidad para infectar insectos que son plagas de los cultivos, por lo que es necesario continuar con la determinación de las especies y su capacidad de infección, y de esta forma contar en el futuro, con referencias mínimas de sus características como agentes efectivos de control de plagas. Asimismo, será necesario determinar las estrategias de producción masiva para una aplicación extensiva en los programas de manejo de plagas en la región o el país. La presente investigación continúa y contempla ampliar la exploración en búsqueda de especies de hongos entomopatógenos de las zonas citrícolas más importantes del país, ya que esto contribuirá a establecer las bases para el aprovechamiento potencial de agentes de control biológico adaptados a las condiciones agroecológicas que imperan en el país.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se estableció la cría de *G. mellonella*, óptima para la detección y multiplicación *In vivo* de hongos entomopatógenos utilizando las larvas como trampa cebo.
2. Se observó que el ciclo de *G. mellonella* fue de 40-60 días bajo las siguientes condiciones de 26-30°C y 70-80 H. R.
3. *G. mellonella* aceptó favorablemente la dieta artificial, desarrollando su ciclo de manera normal, sin malformaciones ni mortalidad elevada.
4. Los hongos entomopatógenos aislados en huertos de cítricos de los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, San Luis Potosí, Yucatán, Campeche, Michoacán y Tabasco fueron: *B. bassiana*, *I. fumosoroseus* y *M. anisopliae*.
5. El más abundante de los hongos entomopatógenos aislados fue *Beauveria* spp. detectado en un 15% de todas las muestras procesadas en la zona citrícola de México.
6. Se obtuvieron en total 35 cepas de hongos entomopatógenos aisladas de las diferentes muestras de suelo de los estados de la zona citrícola de México, 19 cepas se identificaron como *B. bassiana*, 14 cepas de *I. fumosorosea* y 2 cepas de *M. anisopliae*.
7. Se confirmaron, mediante PCR-RFLPS de las secuencias ITS, el género y la especie de los aislados obtenidos en los tres géneros.
8. Mediante secuenciación de los fragmentos ITS de los aislados y comparando éstas con lo reportado en el banco del NCBI, se logró determinar homologías del 91% y del 98% para *Beauveria bassiana*, confirmando nuevamente el género y especie.

## APENDICE 1

### Secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2

#### HIB-1 (Morfológico: *Beauveria*)

cgcgttctgcgtccccAaCGCCGgcCtcCCCaaagGGGgGGtCGtGGGTTGaAATGACGctCGAACAGGCATgCC  
CGCCAGAATgTGGCGGGCGaATGTGCGTTCAAAGATtcGATGATtcACTGGAtTCTGcAATTCAcATTACTTA  
TCGCGTTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCaAGAGATCcGTTGTTGAAAGTTTTgaTTcATTTGTTT  
TccTTGcGGcGTTTTcAGttGATGcTGGTcgGTTTTGaGGTcccGGcGGGccGccGGTccAGTcctcGTccGGgc  
TggGGcGAGtccGccGcaGcAAcGATGGTcGGTTcccgGGGTTAtGGcGTTGccccTcGGTAaTGTcccTcc  
GGccGGTTcAcTAcGGAtATcAcTAGTGAAtTcGcGGcCGccTgcaGGTcGaccATATGGGAGAGCTCCCaAC  
CGTTGGaTGCATaGCTTgAGTtTCTATAGTGTcACCTGaaTAGCTTGGCGTaatgatGgtcatgct

Hongos con los que tiene similitud:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">DQ153037.1</a>	Cordyceps brongniartii isolate CNPMS78 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	514	514	73%	1e-142	91%
<a href="#">AY531995.1</a>	Beauveria bassiana isolate 1848 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	73%	6e-141	91%

#### HIB-2 (Morfológico: *Beauveria*)

AATATGTAATACGCCTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCGCCATGGCGCCGGGG  
AATTCAATTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTTCAACTCCCTAACCTTCTGTGAACC  
TACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGGACCTCAA  
ACTCTTGTATTCCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATC  
TCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGAATC  
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGACCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC  
TCGACCTCCCCTTGGGGAGGTCGGCGTTGGGGGACCGGCAGCACACCGACGGCCCTGAAATGGAGTGGCGGCC  
CGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAATACAGCTCGCACCGGAACCCCGACGCGGCCACGCCGTAACACCCCA  
ACTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAACGGAGGAAATCA  
CTAGTGAATTGCGGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGT  
ATTCTATAGTGTcACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA



Hongos con los que tiene similitud:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">DQ364698.1</a>	Beauveria bassiana strain EABb 04/01-Tip 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1013</a>	1013	73%	0.0	98%
<a href="#">DQ153037.1</a>	Cordyceps brongniartii isolate CNPMS78 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1013</a>	1013	73%	0.0	98%

### HIB-12 (Morfológico: *Metarhizium*)

CGTCGATATATGAGCATAACAGTATGCTCATGACGATACAGTAttGgATGtgtGgGGgaAATAgAGAAATAGGT  
 CCcCgcCTTATTGATATgCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTCGAGgCAACTATAAAAAGTTGGGGG  
 TTTTACGGCAGTGGACgCGCCGGCtCCTGTGCGAGTGTACTatGCGCAGAGGAGGGCCACGCGAGACCGCc  
 AATTAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTG  
 AGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCGAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGA  
 TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA  
 GATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTTTAACCACTCAGAAGATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTT  
 TGGGTCCCCGGGCGGGCGGAAGTCCCGCCGAAGCAACAATTAAGGTATGATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGA  
 TAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACTACGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGAC  
 CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGt  
 AatCaTGgtcATA

Hongos con los que tiene similitud:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">EF113341.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain Mb7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">950</a>	950	72%	0.0	98%
<a href="#">EF113340.1</a>	Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain Mb5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">944</a>	944	72%	0.0	98%

## LITERATURA CITADA

Ainsworth M. 1973. The development of infant-mother attachment. In B. Caldwell & H. Ricciuti (Eds.), Review of child development research. Vol. 3. Chicago: University of Chicago Press.

Allendes GL. 2007. Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch) Sorokin para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. Pontificia Universidad Católica De Valparaíso. Facultad Agrónoma.

Altieri M, Trujillo J, Klein-Koch C, Gold C, Quezada J. 1989. El control biológico en América Latina en su contexto histórico. Manejo Integrado de Plagas: 12: 82-107.

Alves SB, Alves LFA, Lopes RB, Pereira RM, Vieira SA. 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinque fuscatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Applied Entomology, 126: 504-509.

Arredondo H. 2006. Casos de control biológico en México. Mundi-Prensa. México. 423pp.

Asaff A, Reyes Y, López E, De la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva 21:291-295.

Bansal R, Walia R, Bathi D. 1988. Evaluation of some agroindustrial waste for mass propagation of the nematode parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus*. Nematol Medit. 16:135-138.

Barnet HL, Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota.

Barnett HL, Hunter B. 1998. Illustrate genera of imperfect fungi. 13va. Edition. MacMillan Publ.Co., New York. pp: 94, 95, 100,101.

Batista FA, Alves S, Alves L, Pereira R, Augusto N. 1998. Formulção de entomopatógenos. In Alves, S.B. Ed. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Brasil, FEALQ.

Bedding RA, Akhurst RJ. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil. *Nematología*. 21:109-110

Berlanga P, Núñez C. 2006. Susceptibilidad de *Toxoptera citricida* (Homoptera: *Aphididae*) a hongos entomopatógenos. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, México. pp: 349-352.

Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metharizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* (76):1198-1204.

Bolckmans K, Steck G, Eyal J, Seles B, Stepman W. 1995. PreFeRal, (*Paecilomyces fumosoroseus* strain Apopka 97), A new microbial insecticide for the biological control of whiteflies in greenhouses. *Med. Fac. Land. Toeg. Biol. Weten. Univ. Gent.* 60: 707-711.

Boucias DR, Pendland JC. 1998. Entomopathogenic fungi; Fungi Imperfect. In: Boucias DR, Pendland JC, editors. *Principles of Insect Pathology*, 10:321-359. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Bulat SA, Lübeck M, Alekhina IA, Funck JD, Knudsen IMB, Lübeck PS. 2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. *App. Environ. Microbiol.* 66(11): 4758-4763.

Burgues HD, Hussey NW. 1971. Formulation of microbial insecticides in microbial control of insects and mites. Ed. Acad Press London. Ed. Acad.Press London pp: 623-636.

Bustillo A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. pp: 30-53.

Carrillo-Sánchez JL. 1985. Evolución del control biológico de insectos en México. *Folia Entomol. Mex.*, 65:139-146.

Cenicafé. 1996. Metodología para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Disciplina de Entomología. Chinchiná, Caldas.

Cermeli M, Morales P, Godoy F. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae) en Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, 15: 235-243

Charnley AK. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Anderson JM, Rayner AND, Walton DWH. (eds.) *Invertebrate-microbial Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp: 229-276.

Charnley AK, Collins SA. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek. CP, IS. Druzhinina (eds). *Environmental and microbial relationship. The Mycota IV*. Springer-Verlag Belin Heidelberg. pp: 159-187.

Chet J. 1987. *Trichoderma*. applications, mode of action and potential as biological control agents of soilborne pathogen fungi. Cap 6. Ed. Viley Interscience Pub., pp: 46.

Clark TB, Kellen W, Fukuda T, Lindegren JE. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 1-7.

Daoust RA, Roberts DW. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 161-170.

De Garcia MCC, Arboleda ML, Barraquer F, Grose E. 1997. Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 35: 361-363.

Devotto LM, Gerding A, France. 2000. Hongos Entomopatógenos: Una Alternativa para la obtención de biopesticidas. *Bioleche*. 23: 30-33.

Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104: 134-150.

Étienne J, Burckhardt D, Rapin CG. 1998. *Diaphorina citri* Kuwayama) [sic] en Guadeloupe, premier signalement pour les Caraïbes (Hem., Psyllidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 103: 32.

Fan X, Hominick WM. 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic Rhabditids (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from sand and soil. *Nematology*. 14: 381-387.

Ferron P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: *Annual review of Entomology of United States* (23). USA: Annual Reviews, pp: 409-442.

Ferron P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burgess HD. (ed.) *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, London, Academic Press. 24: 465-482.

Galán JL, Morales LH, Medrano H. 1992. Tecnologías de control microbiano. *Manual Facultad de Ciencias Biológicas, Inst. Tecnológico de Durango, Durango, México*. pp: 90-95.

Galán-Franco L, Morales-Loredo A, Morales-Ramos L, López-Arroyo I, Martínez-Vázquez I, Sandoval-Coronado C, Álvarez-Ojeda G, Quintero-Zapata I. 2007. Caracterización molecular de hongos entomopatógenos provenientes del estado de Nuevo León. In: *Memorias del XXX Congreso de la Sociedad Mexicana de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Mérida, Yuc., Méx. pp: 460-461

Gandarilla-Pacheco F, Larralde-Corona CP, López-Arroyo JI, Lezama-Gutiérrez R, Galán-Franco LA, Sandoval-Coronado CF, Quintero-Zapata I. 2006. Presencia de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con cítricos en el estado de Nuevo León. En: *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico*, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Manzanillo, Col., Méx. pp: 512-514.

Geetha I, Balaraman K. 1999. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. Indian Journal of Experimental Biology 37: 1148-1150.

Genthner FJ, Chancy CA, Couch JA, Foss SS, Middaugh DP, George SE, Warren MA, Bantle JA. 1998. Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35: 317-324.

Genthner FJ, Foss SS, Fischer WS. 1994. Testing of the insect pest control fungus *Beauveria bassiana* in grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Diseases of Aquatic Organisms 20: 49-57.

Gillespie A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.

Goettel MS, English DG. 1997. Fungi: *Hyphomycetes*. p. 213-249. In Lacey, L.A. (ed.) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, London, UK.

Grove JF, Pople M. 1980. The insecticidal activity of Beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia, 70: 103-105.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. 1999. Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 12(3): 454-500.

Gupta S, Montllor C, Hwang YS. 1995. Isolation of novel Beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Natural Products, 58: 733-738.

Halbert SE, Brown LG, Dixon. 1998. Asian citrus psyllid update: Fla. Dep. Agric. Consumer. Serv. Div. Plant Industry 18 Nov.

Halbert SE, Niblet CL, Manjunath KL, Lee RF, Brown LG. 2003. Establishment of two new vectors of citrus pathogens in Florida, In Proceedings of the International Society of Citriculture IX Congress. ASHS Press, Alexandria VA, USA. pp: 1016-1017.

Hajek AE. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.*, 15: 193-249.

Hatting L, Humber RA, Poprawski MTJ, Miller RM. 1999. A survey of fungal pathogens of aphids from south Africa with special reference to cereal aphids. *Biological control*, 16: 1-12.

Haugland RA, Hechman JL, Wymer L J. 1999. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J. Microbiol. Methods*, 37: 165-176.

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton B, Pegler DN. 1995. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. 8th edition, International Mycological Institute, CAB International. UK.

Hawksworth DL, Sutton BC, Ainsworth, GC. 1983. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungus*. Commonwealth Mycological Institute. pp: 153-155.

Hayek A, Leger R. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. In: *Annual Review of Entomology United States (39)*. USA: Annual Reviews. pp: 293-322.

Hernández VM. 1996. *Formulaciones y Control de Calidad*. Memoria Curso-Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano. pp: 42-48.

[http://www.fororeptiles.org/foros/showthread.php?66293-cria-de-gusano-de-la-cera-\(Gallería mellonella\)](http://www.fororeptiles.org/foros/showthread.php?66293-cria-de-gusano-de-la-cera-(Gallería mellonella)). [Revisado 2011]

Humber RA. 1989. Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales (zygomycotina). *Mycotaxon* 34 (2). USA: Mycotaxon. pp: 441-460.

Humber RA. 1997. *Fungi: Identification*. In: Lacey L. (ed.), *Editorial Manual Of Techniques In Insect Pathology*. San Diego, California. Academic Press.

Jiménez Jiménez E. 1958. El empleo de enemigos naturales para el control de insectos que constituyen plagas agrícolas en la República Mexicana. *Fitófilo*, 11: 5-24.

Keller S, Kessler P, Schweizer C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48: 307-319.

Khachatourians GG. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG. (eds.). *Handbook of Applied Mycology*, Vol.2. Humans, Animals, and Insects, New York, Marcel Dekker, Inc. 17: 613-663.

Kononova E. 1981. Selection of comercial strains of the fungus *Beauveria bassiana*. *Proceeding First Join US/URSS Conference Kiju*, pp: 173-191.

Kuno G, Mulett, J, De Hernandez M. 1982. Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico. Universidad del Valle. Facultad de Biología. Cali: Univalle, pp: 212.

Leucona E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires. Argentina. pp: 337.

Lezama-Gutiérrez R, Hamm JJ, Molina-Ochoa J, López-Edwards M, Pescador-Rubio A, González-Ramírez M, Styer EL. 2001 Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*. (84) 1:23-30.

Lima AM, DA C. 1942. *Insectos do Brazil: Homopteros*, Río de Janeiro (Impreso Nacional), pp: 101.

López M. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa de control biológico. San José, Costa Rica. pp: 68.

Lopez-Llorca LV, Carbonell T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 16: 136-142.

Tikhonov, Lozano MM, Rodríguez N, Vásquez, Gutiérrez G. 2000. Efecto de *Metarhizium anisopliae* sobre plagas rizófagas de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 56:58-64.



Lübeck M, Poulsen SK, Lübeck PS, Funck Jensen D, Thrane U. 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. FEMS Microbiology Letters. 185: 129-134

Maceda A, Gonzalez I. 2008. Polillas de la cera. Disponible en el sitio de red: [http://www.alaquairum.net/polilla\\_de\\_la\\_cera.htm](http://www.alaquairum.net/polilla_de_la_cera.htm) [Revisado 2011].

Madrigal A. 2001. Fundamentos de Control Biológico. Universidad Nacional de Medellín, Facultad de Ciencias. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 2001. pp: 453.

Martin RR, James D, Lévesque CA. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Ann. Rev. Phytopathol. 38:207-239.

Miranpuri GS. Khachatourians GG. 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 59: 19-27.

Molina-Ochoa J, Lezama-Gutierrez R, Gonzalez-Ramirez M, López-Edwards M, Rodriguez-Vega MA, Arceo-Palacios F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. Florida entomologist. 86 (3): 244-253.

Monzon A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. (63): 95-103.

Morales L. 1993. Formulación de Bioinsecticidas, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp: 85-89.

Muñoz R, Rendón M, Aguilar A, García M, Altamirano C. 2004. Redes de Innovación: Un acercamiento a su identificación, análisis y gestión para el desarrollo rural. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 23.

Orozco M, Farías J, López J, Ramírez N. 2000. Uso de *Beauveria bassiana* para el control de *Bemisia argentifolii* en melón. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 56:45-51.

Osborne L, Landa Z. 1993. Biological control of whiteflies en enthomopathogenic fungi. Florida Entomologist (USA), 75(4): 457- 471

Páez A, Hyrsi P. 2010. Investigaciones recientes en *Gallería mellonella* como uno de los organismos modelo mas importantes. En: XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Mexico. pp: 503-506.

Paterson RRM, Bridge PD. 1994 Biochemical techniques for filamentous fungi. International Mycological Institute, CAB International, UK.

Pérez JA. 2011. Polilla de cera. Disponible en el sitio de red: [http://www.infobee.com.ar/files/docs/Polilla\\_Cera.pdf](http://www.infobee.com.ar/files/docs/Polilla_Cera.pdf) [Revisado 2011].

Pinnock DE, Garcia R, Cubbin CM. 1973. *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 22: 143-147.

Ramos E, Alves S, Manzini M, López R. 2000. Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 56:65-69.

Rath AC, Carr CJ, Graham BR. 1995. Characterization of *Metarhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (AP150CH). Journal of Invertebrate Pathology, 65: 152-161.

Rehner SA, Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897. Mycologia, 97(1), pp. 84-98.

Riba G, Bouvier-Fourcade I, Caudal A. 1986. Isozyme polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. Mycopathologia, 96:161-169.

Roberts DW. 1970. *Coelomomyces, Entomophthora, Beauveria, and Metarrhizium* as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of América*, 7:140-155.

Roberts DW. 1974. Fungal infections of mosquitoes. In: Aubin A, Belloncik S, Bourassa JP, LaCoursière E, Pélissier M, editors. *Le contrôle des moustiques/Mosquito control*. Presses de l'Université du Québec, pp: 143-193.

Robles-García P. 2007. Manual técnico para la detección y manejo del huanglongbing de los cítricos Senasica Dirección General de Sanidad Vegetal, pp: 1-26.

Samsinakova A, Kalova V. 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Inv. Pathology*, 38:169-179.

Samson R, Evans H, Latgé J. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin. 300p.

Sánchez A, Robles G, Delgado C. 2005. Programa Nacional de Certificación de Cítricos en México: Antecedentes, resultados y perspectivas. Memoria del Primer Simposio Internacional sobre Certificación de Cítricos y Quinto Congreso Nacional de Citricultores. Pereira, Colombia.

Sandhu SS, Rajak RC, Sharma M. 1993. Bioactivity of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* as pathogens of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes aegypti*: effect of instar, dosages and time. *Indian Journal of Microbiology*, 33: 191-194.

Schaerffenberg B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarrhizium*. *Journal of Insect Pathology*, 6: 8-20.

Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera. 2006. Sistema Agropecuaria De Consulta (SIACON). Disponible en el sitio de red: [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comdeanuadin.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeanuadin.html) [Revisado Junio 2007]

Smith H, Maltby H, Jiménez-Jiménez E. 1964. Biological control of the citrus blackfly in Mexico. US Dept. Agric. Tech. Bull. 1311: 30.

Smith JW Jr, Wiedenman RN, Overholt WA. 1993. Parasites Of Lepidopteran Stem-borers Of Tropical Gramineous Plants. Icipe Science Press Nairobi Kenya. pp: 89

Spardo D, Gullino L. 2004. State of the art future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91: 185-194.

Strasser H, Vey A, Butt, TM. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species. Biocontrol Science and Technology, 10: 717-735.

Taborsky V. 1992. Small scale processing of microbial pesticides. FAO Agricultural Services Bulletin, 96: 35-45.

Tamez GP, Galán WLJ, Medrano RH, García GC, Rodríguez PC, Gómez FRA, Tamez GRS. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. 4: 2.

Tanada Y, Kaya H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). pp:666.

Torres AA, Reyes-Vidal Y, López y López E, De la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: Una estrategia natural para el control de plagas. Avance y perspectiva. 21:291-295.

Torres R, Vargas M, Mayo J, Zúñiga-Dávila D. 2004. Caracterización de nódulos y rizobios aislados de garbanzo (*Cicer arietinum*) en el Departamento de Ica (Perú). 34 Congreso Nacional de Microbiología: 27-29 Agosto. Cancún, México.

Valle M, Solís J, Morales J, Johansen R. 2003. Efectividad biológica de productos no convencionales contra trips en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill. CV. Hass) en Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México Investigaciones Científicas. Málaga, España. V Congreso Mundial del Aguacate. Granada, Málaga, España. pp: 735-740.

Vänninen I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.* 100: 93-101.

Vergara RR. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. pp:34.

Volcy C, Pardo V. 1994. Principios de Micología. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. pp:141.

Walstad JD, Anderson RF, Stambaugh WJ. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). *Journal Invertebrate Pathology*, 16: 221-226.

Woodrig JL, Kaya HK. 1988. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes: A handbook of biology and techniques. Fayetteville AR. USA, Arkansas experiment station, Southern Cooperatives Series Bull. No. 331. pp 28-32.

Yip H, Rath A, Koen T. 1992. Characterization of *Metarrhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity on the redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae) *Adoryphorus couloni*. *Mycological Research*, 96:92-96.

Zapater MC. 1996. El control biológico en América Latina. International Organization for Biological Control, Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

*Lucila Adriana Galán Franco*

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis: **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLA DE MÉXICO.**

**Campo de Estudio:** Biotecnología y Calidad Alimentaria.

**Datos Personales:** Nacido en Monterrey Nuevo León, el 21 de Junio de 1977, hija del Dr. Luis J. Galán Wong y Sra. Nelly Franco de Galán.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo 1995-2001.

### **Experiencia Profesional:**

**Participación en el Proyecto:** Análisis de la variabilidad genética de hongos entomopatógenos aislados de zonas citrícolas de México (Área VI, No. 46198). SEP-CONACYT 2004-01. 30 de junio de 2005 – 30 junio de 2009.

**Realización de tesis Doctoral:** Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México. (Febrero 2004-Julio 2012)

### **Producción científica**

#### **Publicaciones**

**Lucila Adriana Galán-Franco**, Alberto Morales-Loredo, Genoveva Alvarez-Ojeda, José Isabel López-Arroyo, Katiushka Arévalo-Niño, Carlos Sandoval-Coronad and Isela Quintero-Zapata. 2011. Isolation and Characterization of Entomopathogenic Fungi Obtained from Citrus-Growing Areas of Mexico. Southwestern Entomologist. 36(4):443-449. doi: <http://dx.doi.org/10.3958/059.036.0406>.

#### **Capítulos de libro**

L.J. Galán Wong, K. Arévalo Niño, R. Quintero Ramírez, J. Guadiana Escamilla y **L.A. Galán Franco**. 2007. Industria Biotecnológica Mundial. pp: 106-182. In: L.J. Galán Wong, K. Arévalo Niño, H.A. Luna Olvera y L.A. Galán Franco (eds.) Compañías de Biotecnología Públicas y Privadas a nivel mundial: su poder, éxito y futuro. Ediciones del Instituto de Biotecnología. Primera edición. ISBN 970-694-408-7.

L.J. Galán Wong, B. Pereyra Alferez, K. Arévalo Niño, L.D. Valdez Chapa, **L.A. Galán Franco**, E. Falcón Dávalos y Luna Olvera, H.A. 2009. Aplicaciones de la biotecnología contra el cáncer. pp:15-142. En: L.J. Galán Wong, H.A. Luna Olvera, B. Pereyra Alferez, K. Arévalo Niño, L. Morales Ramos, L.A. Galán Franco (eds.) Aplicaciones de la Biotecnología contra el cáncer: Empresas y medicamentos. Ediciones del Instituto de Biotecnología. Primera edición. ISBN 978-607-433-125-7.

### **Libros**

Galán Wong, L.J., Arévalo Niño, K., Luna Olvera H.A. y **Galán Franco L.A.** 2007. Compañías de Biotecnología Públicas y Privadas a nivel mundial: su poder, éxito y futuro. Ediciones del Instituto de Biotecnología. Primera edición. Tiraje: 1000 ejemplares. ISBN 970-694-408-7. 182p

L.J. Galán Wong, H.A. Luna Olvera, B. Pereyra Alferez, K. Arévalo Niño, L. Morales Ramos, **L.A. Galán Franco**. 2009. Aplicaciones de la Biotecnología contra el cáncer: Empresas y medicamentos. Ediciones del Instituto de Biotecnología. Primera edición. Tiraje: 1000 ejemplares. ISBN 978-607-433-125-7. 380p

### **Memorias in extenso**

**Galán Franco, Lucila A.**, Carreón Treviño Gerardo, Morales Ramos Lilia H., Galán Wong Luis J. y Quintero Zapata Isela. 2003. Producción de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* en diferentes medio de cultivo. pp: 383-386. En: M. Vázquez García, J.F. Pérez Domínguez, K.H. Ibarra Cortéz, C.I. Balpuesta León, J.R. Vázquez Reyes, J. Cervantes Ríos y N. Ibarra Frías (eds). Memoria: XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Guadalajara, Jalisco, México. 3-8 de noviembre del 2003. Sociedad Mexicana de Control Biológico. ISBN 970-27-0415-4.

Quintero Zapata, I., **L. Galán Franco**, E. J. de Luna Santillana y L. J. Galán Wong. 2006. Blastospores production of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana* in a culture media from corn steep liquor and sucrose. pp: O-020. In: 106<sup>th</sup> General Meeting, Orlando Florida. May 21-25, 2006. American Society for Microbiology. ISBN 1-55581-389-5.

F. Gandarilla-Pacheco, A. Morales-Loredo, **L. Galán-Franco**, C. Sandoval-Coronado, I. Quintero-Zapata. 2007. Actividad de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). 6(1):513-516. En: E.G. Estrada Venegas, A. Equihua Martínez, C. Luna León y J.L. Rosas Acevedo (eds). Entomología Mexicana 2007. VII Congreso Latinoamericano de Entomología. XLII Congreso Nacional de la SME. Acapulco, Guerrero, México. 17-21 de Junio de 2007. Soc. Mex. de Entomología A.C. ISBN 968839517-X.

**L. Galán-Franco**, A. Morales-Loredo, L. Morales-Ramos, I. López-Arroyo, I. Martínez-Vazquez, C. Sandoval Coronado, G. Alvarez-Ojeda e I. Quintero-Zapata. 2007. Caracterización molecular de hongos entomopatógenos provenientes del estado de Nuevo León. pp: 460-461. En: XXX Congreso Nacional de Control Biológico y Simposio de IOBC. Mérida, Yucatán. 13-15 de noviembre del 2007. ISBN 978-968-5384-11-7

Quintero Zapata, **L. Galán Franco**, L.H. Morales Ramos, I. Vázquez Martínez, C.P. Larralde Corona, E. J. de Luna Santillana, A. Morales Loredo. 2008. Molecular Characterization of Entomopathogenic Fungi of the Citric Zones of Nuevo León, México. pp: R-029. In: 108<sup>th</sup> General Meeting, Boston, Massachusetts. June 1– 5, 2008. American Society for Microbiology. ISBN 1555814913.

**L. Galán-Franco**, K. Arévalo-Niño, M. Elías-Santos, A. Morales-Loredo, G. Alvarez-Ojeda, I. Quintero-Zapata. Genetic Variability Analysis of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of Mexico. pp: 55-58. En: Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products. Antonio Mendez-Vilas (ed). Publisher: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. ISBN-13: 978-981-4322-10-2.

### Isolation and Characterization of Entomopathogenic Fungi Obtained from Citrus-growing Areas of Mexico

Lucila Adriana Galán-Franco<sup>1</sup>, Alberto Morales-Loredo<sup>2</sup>, Genoveva Alvarez-Ojeda<sup>3</sup>, José Isabel López-Arroyo<sup>3</sup>, Katiushka Arévalo-Niño<sup>1</sup>, Carlos Sandoval-Coronado<sup>1</sup>, and Isela Quintero-Zapata<sup>1</sup>

**Resumen.** Se colectaron 142 muestras de suelo de diferentes estados de la República Mexicana: Campeche (13), Michoacán (15), Nuevo León (25), San Luis Potosí (25), Sinaloa (17), Sonora (17), Tabasco (5), Tamaulipas (20), y Yucatán (5). Las larvas de *Galleria mellonella* (L.) fueron utilizadas como cebo para detectar, atrapar y multiplicar hongos entomopatogénicos *in vivo*. Con base a las características macroscópicas y microscópicas se obtuvo un 23% de las muestras de suelo positivas a la presencia de hongos entomopatógenos. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. fue detectado en un 12% (17 aislados), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin en 1% (2 aislados) e *Isaria fumosorosea* (Wize) en un 10% (14 aislados). La variabilidad genética de los hongos se analizó mediante la amplificación por PCR de las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS-5.8S-ITS2) de los genes ribosomales y posterior digestión enzimática con *Hae* III. Como producto de la PCR se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 600 pb para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Para el caso de *I. fumosorosea*, se amplificó un fragmento por arriba de 600 pb. Tanto en cepas de referencia como en aislados se generaron patrones de restricción similares. Los géneros de hongos entomopatógenos fueron encontrados en las diferentes áreas citrícolas de México; lo que abre el campo para el control biológico de plagas que afectan los cítricos en cada región.

**Abstract.** A total of 142 soil samples was collected from different Mexican states: Campeche (13), Michoacán (15), Nuevo León (25), San Luis Potosí (25), Sinaloa (17), Sonora (17), Tabasco (5), Tamaulipas (20), and Yucatán (5). Larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.), were used as bait to detect, trap, and multiply entomopathogenic fungi *in vivo*. Twenty-three percent of the soil samples processed were positive for the presence of entomopathogenic fungi according to the macroscopic and microscopic characteristics: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. was detected in 12% (17 isolates), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin in 1% (2 isolates), and *Isaria fumosorosea* (Wize) in 10% (14 isolates).

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Manuel L. Barragán Esq. Pedro de Alba S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. México C. P. 66450.

To whom correspondence should be addressed: isela.quinterozp@uanl.edu.mx.

<sup>2</sup>Consortio Técnico del Noreste de México-UANL, Km 4.5 carretera a Reynosa, Guadalupe, Nuevo León.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, Campo Experimental Río Bravo, Carretera Matamoros-Reynosa Km 61, Río Bravo, Tamaulipas.



Genetic variability of the fungi was analyzed using the sequences of internal transcribed ribosomal genes (ITS-5.8S-ITS2) and digested with the enzyme *Hae*III. PCR results generated fragments of 600 bp for *B. bassiana* and *M. anisopliae*, and more than 600 bp for *I. fumosorosea*. Both reference strains and field isolates produced similar restriction patterns. Genera of native entomopathogenic fungi were found in the diverse citrus areas of Mexico, opening the possibility for biological control of pests affecting citrus in each region.

### Introduction

In Mexico, there are 523,505 ha of citrus, mainly of orange and lime (FAOSTAT 2009). Citrus are of great socioeconomic importance in the country. Annually the established citrus farms are attacked by at least 107 species of detrimental arthropods. The citrus red spider, *Panonychus citri* (McGregor), Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew), black fly *Aleurocanthus woglumi* (Ashby), whiteflies *Tetraleurodes ursorum* (Cockerell) and *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), and citrus thrips *Scirtothrips citri* (Moulton) commonly represent the main pest species (López and Loera 2009). Presently, the citrus industry in Mexico is at high risk of damage by the occurrence of the disease Huanglongbing and the extended presence of its vector, the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Biological control is an alternative to reduce the problems caused by the diverse citrus pests and by the excessive use of insecticide (Landis and Orr 1996). Documented biological control programs have been successfully applied against diverse pests in Mexico (Rodríguez and Arredondo 2008). Entomopathogenic fungi are considered biological control agents with potential to be used in the control of pests in diverse agricultural settings (Roberts and Hajek 1992, Shah and Pell 2003). These microorganisms infect directly through penetration of the cuticle and exert multiple mechanisms of action, avoiding developing resistance from the host (Carruthers and Soper 1987, Alves 1998). The isolation of strains of entomopathogenic fungi with greater virulence has been obtained from ill insects in environmental samples (Hajek 1997, Bidochka et al. 1998). The present study was intended to isolate and characterize genetically native fungi from the soil of diverse citrus regions in Mexico. The intention was to establish a collection of entomopathogenic fungi that could be used in the future as potential biological control agents of citrus pests.

### Material and Methods

Soil samples were collected in citrus areas in the Mexican states of Campeche, Michoacán, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, and Yucatán. The samples were taken in representative orchards where five trees per hectare were selected randomly. A surface of 30 x 30 cm was selected and weeds were removed. A garden trowel was used to obtain 300 g of soil from the first 8-10 cm depth of ground deposited into plastic bags. After obtaining five samples per orchard, the soil samples were mixed to form a compound sample. All the samples were kept at room temperature. The processing of the soil samples was done in the L6 laboratory of the Institute of Biotechnology at the University of Nuevo Leon, Mexico. In the process, 400 g of sieved soil were placed in a 1-liter plastic container and dampened with distilled water until 60% humidity was achieved. Five greater wax moth, *Galleria mellonella*

(L.) larvae (Lepidoptera: Pyralidae), as an indicator insect, were placed on the surface of the soil. Each container was covered and turned upside down. The samples were incubated at room temperature for 7 days. All larvae were taken from the containers, superficially disinfected using sodium hypochlorite 1% for 3 minutes, placed in a Petri dish with a dampened paper filter, and incubated at 25°C for 7 days to promote the development of fungi (Woodring and Kaya 1988, Fan and Hominick 1991). A sample was taken from fungi developed on the surface of dead larvae incubated in a culture medium of potato, dextrose, agar, and 500 ppm of chloramphenicol (Hatting et al. 1999, Lezama-Gutiérrez et al. 2001). The isolated fungi were incubated in the medium for the observation of fruiting bodies and fast sporulation. A microscope (Camera Evolution LC color connected to a microscope Olympus BX-41) and taxonomic keys (Samson et al. 1988; Humber 1998a,b) were used to aid in identifying the fungi obtained. The fungi obtained were conserved in 10% glycerol at -80°C in the collection of the UANL's Institute of Biotechnology and used for molecular identification. Reference strains GHA of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., Pfr-612 of *Isaria fumosorosea* (Wize), and Ma of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin were used. DNA was obtained from the mycelium by using the following technique: the sample was centrifuged at 14,000 rpm for 1 minute at 4°C and the supernatant discarded. Five hundred TE 1X was added and centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes at 4°C, and the supernatant was discarded. One hundred µl of lysis buffer and three glass pearls were added to each tube. The tube was submerged in liquid nitrogen for 20 seconds. A vortex was used to defrost the sample. Three hundred µl of lysis buffer and 10 µl proteinasa K (10 mg/ml) were added. The sample was incubated overnight at 65°C. All was transferred to a new tube (400 µl). Phenol (200 µl) was added to each tube. The tube was mixed for 1 minute at 4°C at 14,000 rpm in a centrifuge. The aqueous phase was transferred to a new tube and the same volume of SEVAG (chloroform:isoamyl alcohol 24:1) was added. The mixture was centrifuged with the same parameters as before. The supernatant was transferred to a new tube and an equal volume of isopropanol was added. The nucleic acids were precipitated and washed with 1 ml of 70% ethanol. The DNA was resuspended on 15 µl of TE 1X. The internal transcription sequences (ITS) from the ribosome genes (ITS1-5.8S-ITS2) were amplified by using PCR. The endonuclease *Hae*III was used to digest enzymes for the molecular characterization of the isolated strains (PCR-RFLP). The PCR fragments were cloned and sequenced to confirm the restriction patterns obtained and the homology with other reported sequences in the National Center for Biotechnology Information.

## Results

According to macroscopic and microscopic characteristics, 23% of the samples were positive for the presence of entomopathogenic fungi. *B. bassiana* was detected in 12% of the positive samples (17 isolates), *M. anisopliae* was found in 1% (two isolates), and *I. fumosorosea* was found in 10% (14 isolates). *B. bassiana* was detected in the states of Nuevo León (two isolated strains), San Luis Potosí (one isolated strain), Sinaloa (nine isolated strains), Tabasco (one isolated strain), and Tamaulipas (four isolated strains). *I. fumosorosea* was found in the states of Nuevo León (six isolated strains), Tamaulipas (one isolated strain), San Luis Potosí (one isolated strain), Sonora (one isolated strain), Campeche (two isolated strains), and Tabasco (three isolated strains). *M. anisopliae* was detected

only in the state of Nuevo León (two isolated strains). The pathogenicity caused by each of the isolated fungi in the greater wax moth larvae ranged from 1.2-35.2% (Table 1).

PCR generated fragments of approximately 600 base pairs (bp). The size differences between *B. bassiana* and *M. anisopliae* genera were indistinguishable on agarose gel. In *I. fumosorosea*, a fragment larger than 600 bp was amplified (Fig. 1).

Table 1. Percentage of Larvae of *Galleria mellonella* Infected by Entomopathogenic Fungi Obtained from Different Citrus Areas of Mexico

Locality	No. of samples		% of infected larvae		
	Collected	Positives	<i>B. bassiana</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>M. anisopliae</i>
Nuevo León	25	10	6.4	6.4	1.6
Sinaloa	17	9	35.2	0	0
Yucatán	5	0	0	0	0
Campeche	13	2	0	4.6	0
Tabasco	5	4	4.0	20.0	0
Tamaulipas	20	5	4.0	3.0	0
San Luis Potosí	25	2	2.4	1.6	0
Michoacán	15	0	0	0	0
Sonora	17	1	0	1.2	0

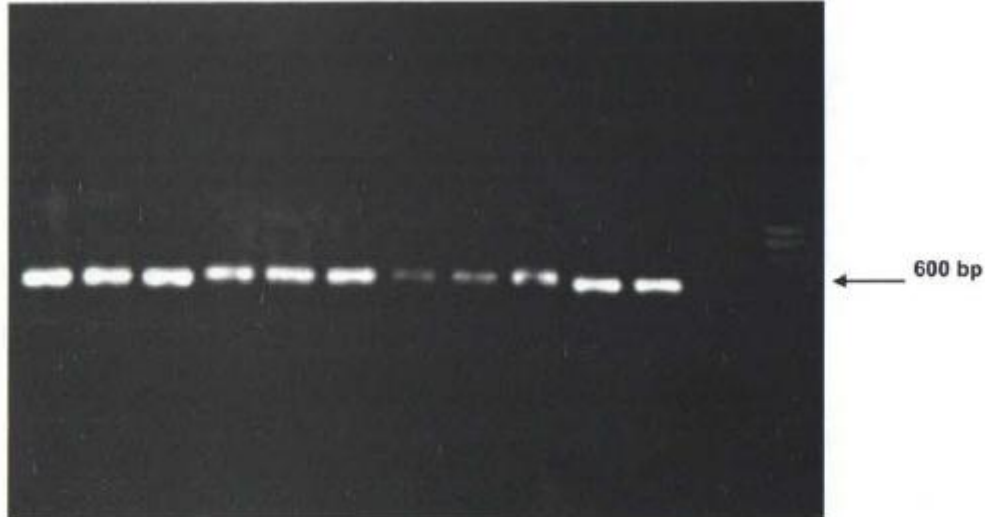


Fig. 1. Amplification of fungal isolates from soil of citrus orchards. Lanes 1-3 = *B. bassiana*, Lanes 4-9 = *I. fumosorosea*, Lanes 10-11 = *M. anisopliae*, Lane 12 = negative check, Lane 13 = Molecular Weight Marker Ladder 100 bp.

Using a PCR simulation with the software Amplify 2.0, the *M. anisopliae* fragment obtained was 581 bp, 612 bp for *I. fumosorosea*, and 593 bp for *B. bassiana*. These fragments were similar to those isolated from the field and to the reference strains. With the virtual PCR fragments, restriction was simulated using the application DNASTrider-1.1. The *I. fumosorosea* restriction analysis with *Hae*III showed seven fragments, while only the 257, 133, 87, and 56 bp were visible on the agarose gel (Fig. 2). For *M. anisopliae*, 404 and 141 bp fragments were obtained, and for *B. bassiana*, fragments of 257, 133, 87, 56, 27, 22, 19, and 11 bp were obtained. In the reference strains and field isolates similar restriction patterns were obtained for the isolates of *B. bassiana* (A1-A6) and the GHA *B. bassiana*.

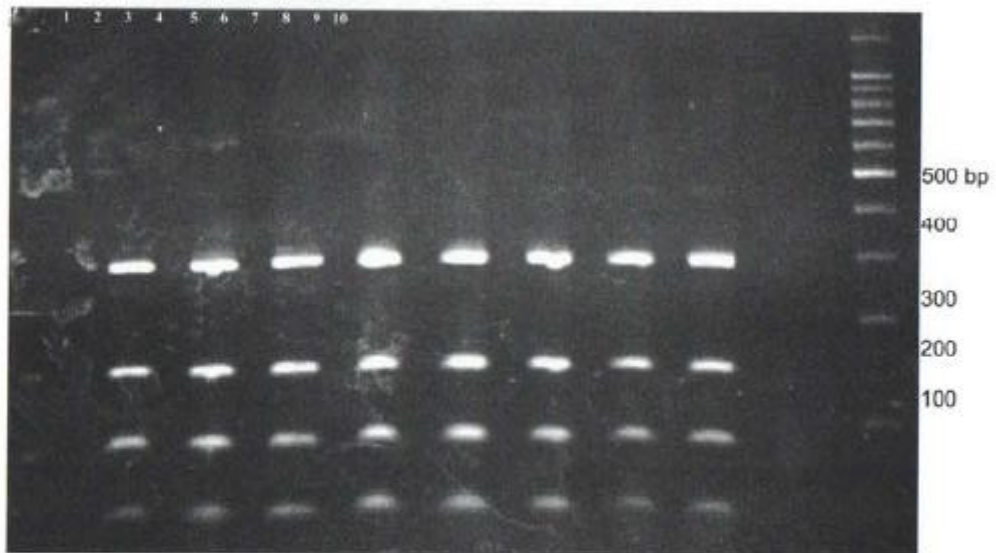


Fig. 2. Enzymatic digestion products of fungi isolated from soil of citrus orchards. Lane 1 = GHA; Lanes 2-8 = A7, A6, A5, A4, A3, A2, and A1, respectively; Lane 9 = negative check; and Lane 10 = Molecular Weight Marker Ladder 100 bp.

### Discussion

Entomopathogenic fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae*, and *I. fumosorosea* were found. In Mexico, Lezama et al. (2001) isolated from soil samples the following species: *M. anisopliae*, *B. bassiana*, and *P. fumosoroseus* that showed pathogenicity toward fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). In the study by Lezama-Gutiérrez et al. (2001) as well as in the present investigation, the isolation of species of *Lecanicillium* (*Verticillium*) has not been obtained, which has the capacity to infect greater wax moth (Lopez-Llorca and Carbonell 1999), even though they have been detected in infected insects associated with citrus (Berlanga and Núñez 2006). This is probably

because of less sampling and that conditions for the growth of *Lecanicillium* in culture medium were not favorable for their development.

With the sequence obtained from the PCR fragments, the software MegaAlign was used for comparisons, and similar values between *B. bassiana* A1 and *M. anisopliae* 21 of 76.0 and between *B. bassiana* A3 and *M. anisopliae* 21 of 57.0 were found. Comparing sequences from *B. bassiana* A1 with *B. bassiana* reported in the NCBI GenBank were similarities of 355/390 (91%) and gaps of 19/390 (4%). The A3 isolate presented homology with *B. bassiana* strain EABb 04/01-Tip from GenBank with identities of 564/571 (98%) and gaps of 3/357 (0%), thus confirming genus and species.

Entomopathogenic fungi found in this investigation have the capacity to infect other insect species that frequently are pests of crops (Bidochka et al. 1998, Lezama-Gutiérrez et al. 2001). It is necessary to determine the species of pests affected and their ability to infect. Also, it will be necessary to determine massive production strategies for their application in pest management programs in Mexico. This study will contribute to establishing the basis for the use of specific microbiological control agents adapted to the diverse conditions of Mexico.

#### Acknowledgment

Fondo Sectorial SEP-CONACYT provided the research funds, project number SEP-2004-CO1-46198.

#### References Cited

- Alves, S. 1998. Fungos entomopatogénicos, pp. 289-381. In S. B. Alves [ed.], Controle Microbiano de Insectos. 2nd ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ). Piracicaba, San Paulo, Brazil.
- Berlanga-Padilla, A. M., and M. C. Núñez-Camargo. 2006. Susceptibilidad de *Toxoptera citricida* (Homoptera:Aphididae) a hongos entomopatogénicos, pp. 349-352. In Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, México.
- Bidochka, M., J. Kasperski, and G. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Can. J. Bot. 76: 1198-1204.
- Carruthers, R. I., and R. S. Soper. 1987. Fungal diseases, pp. 359-416. In Y. Tanada and H. K. Kaya [eds.], Epizootiology of Insect Diseases. Wiley-Interscience Publications, New York.
- Fan, X., and W. M. Hominick. 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. Revue Nematol. 14: 381-387.
- FAOSTAT. 2009. <http://faostat.fao.org>. Accessed 15 December 2009.
- Hajek, A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. Advances in Microbial Ecology 15: 193-249.
- Hatting, L., R. A. Humber, M. T. J. Poprawski, and R. M. Miller. 1999. A survey of fungal pathogens of aphids from south Africa, with special reference to cereal aphids. Biological Control 16: 1-12.
- Humber, R. A. 1998a. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Joint Meeting 8-12 November 1998, Las Vegas, NV.

- Humber, R. A. 1998b. Synopsed of a revised classification for the Entomophthorales Zygomycotina. *Mycotaxon* 34: 441-460.
- Landis, D. A., and D. B. Orr. 1996. Biological control: approaches and application. *In* E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison [eds.], *Radcliffe's IPM World Textbook*, URL: <http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Lezama-Gutiérrez, R., J. J. Hamm, J. Molina-Ochoa, M. Lopez-Edwards, A. Pescador-Rubio, M. González Martín, and E. Styer. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomol.* 84: 23-30.
- López-Arroyo, J. I., y J. Loera-Gallardo. 2009. Manejo integrado de insectos y ácaros plaga de los cítricos, pp. 260-323. *In* M. A. Rocha y J. E. Padrón [eds.], *El Cultivo de los Cítricos en el Estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental Gral, Terán, México.
- Lopez-Llorca, L. V., and T. Carbonell. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana Micología* 16: 136-142.
- Roberts, D. W., and A. E. Hajek. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, 1992, pp. 144-159. *In* G. F. Leatham [ed.], *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman and Hill, New York.
- Rodríguez, L. A., y H. C. Arredondo [eds.]. 2008. *Casos de Control Biológico en México*. Mundi-Prensa, México D.F.
- Samson, R., H. Evans, and J. Latgé. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin.
- Shah, P. A., and J. K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413-423.
- Woodring, J. L., and H. K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Fayetteville, AR, Arkansas Experiment Station, Southern Cooperatives Series Bull. No. 331: 28-32.