

# Dirección General de Educación Superior Tecnológica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA



**CARACTERIZACIÓN Y VIABILIDAD DEL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*, EN EL  
LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM.**

**Informe final de residencia profesional que presenta el C:**

**ROLANDO ZAMNÁ BARRERA CHÁVEZ**

Número de control:

09870074

Asesor Interno:

M. en C. Laura Isabel Sansores Lara

Carrera:

Ingeniería en Agronomía

Juan Sarabia, Quintana Roo

Diciembre de 2013



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

**SEP**

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de INGENIERO AGRÓNOMO, Rolando Zamná Barrera Chávez; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno M en C. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el MC. Emilio Te Góngora y el revisor el MC. Jaime D. Sosa Madariaga, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo recepcional titulado: “Caracterización y Viabilidad del Hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el Laboratorio de Control Biológico del ITZM” que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

### ATENTAMENTE

Asesor Interno

  
M en C. Laura Isabel Sansores Lara

Asesor Externo

  
M en C. Emilio Te Góngora

Revisor

  
M en C. Jaime D. Sosa Madariaga

## RESUMEN

Para alcanzar los objetivos y resultados esperados, se investigaron previamente conceptos básicos sobre el manejo y producción del hongo *Metarhizium anisopliae*, del cual, se logro estimar la viabilidad del hongo mediante el conteo de esporas germinadas, y a su vez, conocer la caracterización biológica observando cada una de sus etapas de crecimiento en su morfología.

Su bajo costo de producción y su fácil manejo nos lleva a que este hongo sea una alternativa viable como método regulador de plagas, ya que los resultados a pruebas de viabilidad se encuentran en un 80 %, esto sugiere que es una muy buena alternativa para el remplazo de agroquímicos y que el uso del *Metarhizium anisopliae* podría tener un futuro prometedor en el control de insectos plaga, estamos conscientes de que aun existen problemas de estabilidad y almacenaje; por lo que se requiere un mayor esfuerzo en investigaciones en esta línea a fin de obtener formulaciones de mayor estabilidad, para que estos puedan ser utilizados ampliamente en la agricultura como una estrategia viable.

## INDICE

	Pagina
I INTRODUCCIÓN.....	6
II OBJETIVOS.....	7
III MARCO TEÓRICO .....	8
V METODOLOGÍA.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
VI RESULTADOS .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
VII CONCLUSIONES.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
VIII REFERENCIAS .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
IX GLOSARIO.....	44

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Preparación del medio de cultivo (AGAR).....	16
Figura 2. Esterilización del medio de cultivo en autoclave.....	17
Figura 3. Siembra en tubo de ensayo por el método de estrías.....	19
Figura 4. Siembra en cajas petri por el método de estrías.....	21
Figura 5. Tubos de ensayo con cepas de hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	22
Figura 6. Lavado y desinfectado del arroz.....	23
Figura 7. Preparación de las bolsas con arroz.....	24
Figura 8. Inoculación en bolsas de arroz.....	25
Figura 9. Bolsas de arroz inoculadas en la sala de maduración.....	26
Figura 10. Proceso de obtención de esporas de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	27
Figura 11. Caracterización del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	29
Figura 12. Preparación de la suspensión.....	31
Figura 13. Colocación de la suspensión sobre la cámara de Neubauer.....	32
Figura 14. Conteo de esporas con equipo de cómputo LA EZ y cámara digital LEIKA.....	33
Figura 15. Vista de las esporas en la cámara de Neubauer.....	34

## I. INTRODUCCIÓN

El hongo *Metarhizium anisopliae* ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Entre las plagas afectadas por este hongo se encuentran algunos lepidópteros y chinches plaga de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Sandino 2003). Debido a las características de la especie y/o de la cepa, ámbito de hospedantes, patogenicidad, virulencia y condiciones ambientales, existen cepas específicas utilizadas para el control de diferentes plagas. Es importante destacar que se ha descrito que cada aislado específico de *Metarhizium anisopliae* tiene un rango de hospederos cortos. Además, fue el primer hongo producido en masa en todo el mundo y utilizado en el control de plagas de insectos desde hace más de 100 años. Recientemente, la investigación científica enfocada a estudiar a este entomopatógeno, así como su empleo comercial se ha incrementado, debido en parte a la importancia que ha cobrado mundialmente en la preservación del ambiente y de los ecosistemas (Roberts y Leger 2004).

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Estudiar la caracterización y determinar la viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae*, en el laboratorio del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudiar la caracterización del hongo *Metharhizium anisopliae* para su mejor conocimiento tanto morfológica como estructuralmente.
- Evaluar la viabilidad de los conidios del hongo *Metharhizium anisopliae*, a fin de comprobar su viabilidad y pureza.

### III MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de los hongos entomopatógenos

Los entomopatógenos son microorganismos que provocan enfermedades en los insectos, y entre los agentes causales se encuentran virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos, entre otros. El uso de métodos biológicos de control representa ciertas ventajas como: especificidad sobre las plagas y enfermedades, bajo riesgo para el ser humano, animales benéficos y el ambiente, bajo costo gracias a su potencial de permanencia por largos periodos de tiempo en los cultivos al tiempo de permanencia ya que su en los cultivos es mayor si se compara con los productos químicos (Alves 1986). Son organismos de vida libre que pueden encontrarse en hábitats acuáticos, terrestres y subterráneos (Ferron, 1978), sin embargo también se han aislado de cadáveres de insectos. Los hongos entomopatógenos pueden sobrevivir en condiciones poco favorables o en ausencia de su hospedero mediante las esporas que son estructuras de resistencia (Kenneth et al., 1972; Wilding, 1973). Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar cualquiera de las etapas de desarrollo de un insecto y a una gran variedad de órdenes de éstos, algunos hongos son más virulentos hacia ciertos insectos, mientras que para otros no lo son (Freimoser et al., 2003). Algunos de los géneros de hongos entomopatógenos más importantes son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Entomophaga*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Aschersonia* y *Pandora* que pertenecen a

los órdenes *Entomophthorales*, *Moniliales* y *Sphaeropsidales* (García-Gutiérrez et al., 2009).

En general, *Metarhizium anisopliae* posee varias características que lo presentan como un agente microbiano de control muy interesante: causa alta mortalidad en poblaciones de larvas de laboratorio, el hongo se puede reproducir en cantidades masivas sobre medios artificiales muy económicos y los conidios se pueden almacenar fácilmente, además a diferencia de la *Bauberia*, su efecto no está limitado a periodos populares del hospedero (Scholte et al., 2004<sup>a</sup>).

### **3.2 Características del hongo *Metarhizium anisopliae***

Este hongo se caracteriza por presentar un micelio de color verde olivo, el conidióforo nace del micelio y está irregularmente ramificado con dos o tres ramas en cada septo, las conidias se observan ligeramente pigmentadas de color amarillo a verde olivo y con aspecto algodonoso a compacto, las conidias presentan formas ovoides o cilíndricas, producidas en cadenas muy largas de sucesión basipétala, (Coria-Avalos y Vidales-Fernández, 1997; Padilla-Melo et al., 2000; CIP, 2004).

### 3.3 Clasificación taxonómica

Reino	Fungi
División	Mycoza
Subdivisión	Eumycota
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Metarhizium anisopliae</i>

### 3.4 Historia

El primer trabajo sobre control de insectos con patógenos fue realizado por el ruso Metschenikoff en 1879, quien aplicó el hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de larvas del escarabajo *Anisoplia austriaca* y Krassiltsschick *Hbst* en 1988 con el picudo *Clonus punctiventris* Germ. (Berlanga, 2000). Después de estos intentos, otros trabajos de control microbiano fueron realizados, no siendo los resultados siempre favorables, debido a los errores en las aplicaciones y a la falta de conocimientos básicos sobre los patógenos y otros factores que afectan el control microbiano. Las primeras recomendaciones para

el control de una plaga fueron hechas en el año de 1664, por John Evelyn el cual utilizaba un macerado, para el control de larvas forestales.

Desde 1880 hasta principios del siglo XX espectaculares epizootias causadas por hongos entomopatógenos han conducido a estudios de su uso potencial para el control de plagas (Sandoval 2001), siendo que en el año de 1945, fue instalado el primer laboratorio de patología de insectos en la Universidad de California (Badilla, 1994). *Metarhizium anisopliae* fue aislado por Metschnikoff en 1879, a partir del coleóptero *Anisopliae austriaca* y fue descrito por Sorokin en 1883 (OMS, 1884).

### **3.5 Importancia económica**

La protección de cultivos contra plagas de insectos aun es dominada por los plaguicidas químicos, Las ventajas de insecticidas a escala mundial en 1995 alcanzaron \$8.75 billones de dólares, de los cuales únicamente 1.5 a 2 % correspondían a biopesticidas (Alatorre, 2006). Un informe de mercado Europeo revela que la tasa de crecimiento anual es del 10.1%, con tendencia a aumentar (González-Coloma *et al.*, 2007). Debido a la continua e intensa presión selectiva se ha propiciado la aparición de plagas resistentes que requieren dosis cada vez más elevadas de insecticidas. Más de 400 plagas de insectos han desarrollado resistencia a estos productos y además, aparece en un número aun mayor después de cada tratamiento, debido a que también son eliminados

sus enemigos naturales, así como los de plagas secundarias, que al quedar fuera de control pueden rebasar el umbral económico y producir pérdidas considerables (Mier *et al.*, 1994). Todo esto han asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas incluyendo los hongos entomopatógenos (Alatorre, 2006). El mercado principal de los bioplaguicidas lo constituye la agricultura ecológica, cultivos bajo plástico, parque y jardines. (González-Coloma *et al.*, 2007). Los productos formulados con hongos entomopatógenos, constituyen solo una pequeña fracción de los biopesticidas.

### **3.6 Identificación del hongo *Metarhizium anisopliae***

El conidióforo es ramificado, el conidio inicial es producido por el conidióforo en una abstricción simple en la parte distal. En cada conidióforo se forma una cadena de conidias basipetala, las cuales crecen densas y adheridas una con otras formando masas prismáticas de columnas. Las conidias de este género son blancas cuando son jóvenes, pero conforme maduran el color se torna verde oscuro. Tulloch citado por los mismos autores agrupa solamente a dos especies *M. anisopliae* y *M. flavoride*.

### 3.7 *Metarhizium anisopliae*

Fue uno de los primeros microorganismos en ser usado para el control biológico de insectos. Fue aislado por Metschnikoff de *Anisopliae austríaca* Herbst (1879) y fue descrito por Sorokin (1883). Este hongo es considerado cosmopolita, pues se reporta en distintos lugares del mundo, esto se debe a su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Berlangua y Hernández, 1999a). Es un parásito autónomo que puede crecer o bien como parásito de insectos o como saprofito, tiene un amplio rango natural de insectos huéspedes: 204 especies de 7 órdenes (ortópteros, hemípteros, dípteros, lepidópteros, dermápteros, himenópteros y coleópteros). El hongo es principalmente un parásito de los coleópteros en la naturaleza.

*Metarhizium anisopliae* forma conidióforos simples o agregados, posee conidias alargadas, ovoides o cilíndricas dispuestas en cadenas, originadas de conidióforos en forma de botella. Las conidias miden de 6 a 8 micras, son verde olivo, por lo que la enfermedad de los insectos se denomina “muscardina verde” (Berlangua y Hernández 1999a). Tiene dos variedades *M. anisopliae* var. *Anisopliae* con conidios de 3.5 - 9.0  $\mu\text{m}$  de largo usualmente 5.0 - 8.0  $\mu\text{m}$  y *M. anisopliae* var. *Mayor* (Johnston) *Tulloch* cuyos conidios miden 9.0 – 18.0  $\mu\text{m}$  de largo usualmente entre 10 – 14  $\mu\text{m}$  (Berlangua, 2004)

## IV METODOLOGÍA

### 4.1 Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales dentro del laboratorio de bromatología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Dichos medios de cultivo, nos servirán para la producción de hongos entomopatógenos y cultivo de cepas de *Metarizium anisopliae*.

Para preparar el medio de cultivo (AGAR), se pesaron 65 g. del medio en polvo para ser hidratado en un litro de agua purificada o destilada para su preparación en un matraz erlenmeyer de 1000ml., después de haber pesado y vaciado el medio de cultivo AGAR, con la ayuda de la parrilla de calentamiento y vibración y la mosca para una mejor agitación, se dejó calentar a unos 400 °C por unos 8 a 10 minutos con agitación suave hasta el punto de ebullición hasta alcanzar su completa disolución. Es importante evitar el sobrecalentamiento para que el medio de cultivo no se queme o cristalice evitando así pérdidas de material, finalmente a su preparación se esteriliza el medio de cultivo en autoclave a 121°C y a unas 15 libras de presión para que el medio de cultivo quede libre de cualquier contaminante, unas veces que el autoclave a sacado la presión de su interior se dejar enfriar a una temperatura ambiente el medio de cultivo para su

posterior manipulación y vaciado sobre las placas petri antes esterilizadas y libres de contaminantes.

Antes de servir en las cajas de petri y tubos de ensayo el medio de medio de cultivo, se realizó la asepsia del área limpiando meticulosamente la mesa de trabajo de la campana de flujo laminar y después eliminando impurezas restantes con alcohol prendido a manera de antorcha. Después se colocaron 2 mecheros (uno en cada lado, paralelamente) para por medio del calor eliminar cualquier impureza proveniente del aire, para servir el medio de cultivo en las cajas de petri se utilizaron 20ml. del medio y en los tubos de ensayo 10ml., el vaciado del medio de cultivo siempre se debe de realizar cerca de los mecheros y procurando toda vez flamear la boca de los tubos de ensayo, así aseguramos una menor contaminación de nuestro medio de cultivo.

Después de 10 minutos se revisó que el medio de cultivo se haya solidificado para después acomodar las cajas petri de manera tal que queden volteadas boca abajo, para que si se llegara a evaporar el líquido lo hiciera hacia la misma muestra y de esta manera no quedaran gotas del líquido sobre la tapa ya que esto podría ocasionar una posible contaminación cuando se quisiera sembrar en la muestra y para evitar la deshidratación., también los tubos de ensayo son acomodados acostados de tal manera que se procure tener una película amplia del medio para ser utilizado en la siembra, y procurando no se derramen al inclinarlos.

El numero de cajas petri y tubos de ensaye preparados con el medio de cultivo “AGAR” es de 40 tubos de ensaye y 20 cajas petri, para la siembra y producción de cepas de hongo *Metarhizium anisoplie*, además de que estos sirvieron para la realización de pruebas para el perfeccionamiento de la técnica.



Figura 1. Preparación del medio de cultivo (AGAR)



Figura 2. Esterilización del medio de cultivo en autoclave.

#### **4.2 Siembra sobre medios de cultivo para la producción de cepas de *Metarhizium anisopliae*.**

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Al momento de efectuar la siembra en un medio de cultivo siempre es recomendable seguir las reglas fundamentales que exigen que se efectúe en un medio totalmente aséptico, que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar

estén totalmente esterilizados, que se realicen solo los manipuleos indispensables tanto de los instrumentos de trabajo como de los medios de cultivo a utilizar, que se trabaje fuera de toda corriente de aire ya que esta puede acarrear esporas de contaminantes externos y por ultimo utilizar en todo momento mecheros y campana de flujo laminar debidamente esterilizados.

Existen varios métodos de siembra con los que se pueden trabajar, para este trabajo de investigación el método de siembra que seleccionamos es por estrías ya que con éste procedimiento se puede conseguir una buena separación de las colonias y aislarlas fácilmente.

#### **4.2.1 Siembra en tubos de ensaye por estrías.**

Antes de sembrar en las cajas de petri y tubos de ensayo, se realizó la asepsia del área limpiando meticulosamente la mesa de trabajo y después eliminando impurezas restantes con alcohol prendido a manera de antorcha al rededor de la campana de flujo laminar. Después se colocaron 2 mecheros (uno en cada lado, paralelamente) para por medio del calor eliminar cualquier impureza proveniente del aire, se toma la muestra que contiene el hongo a sembrar (*Metarhizium anisopliae*), se retira la tapa del tubo, posteriormente se flamea la boca del tubo y con el asa previamente esterilizada se introduce en tubo sin tocar las paredes tomando una pequeña muestra de *Metarhizium anisopliae*, se flamea nuevamente la boca del tubo, se tapa y se deja en una gradilla. después Tomamos el tubo de ensaye previamente preparado con medio de cultivo y

estéril en el cual se va a colocar la muestra, lo destapamos y flameamos la boca el tubo con el mechero, se introduce el asa hasta el fondo con la muestra obtenida procurando no tocar las paredes y realizamos movimientos ondulados sobre el medio de cultivo subiendo lentamente y cuidando no romper el medio de cultivo, finalmente se retire el asa y se flamea la boca del tubo de ensayo nuevamente y se tapa con el algodón colocándolo en la gradilla, posteriormente se calienta el asa en el mechero nuevamente para después de usarla de nuevo repitiendo la técnica, que para este caso se repitió en 20 tubos de ensayo los cuales fueron marcados con la fecha y numerados para su control.



Figura 3. Siembra en tubo de ensayo por el método de estrías.

#### 4.2.2 Siembra en cajas petri por estrías.

La técnica para la siembra en cajas petri es muy similar a la siembra en tubos de ensaye, pero hay que tener mayor cuidado en la siembra debido a que las cajas petri son planas la tapa es más grande, por lo tanto existe mayor riesgo de contaminación, por eso se recomienda trabajar siempre cerca del mechero, de igual forma se toma el tubo que contiene la muestra a sembrar (*Metarhizium anisopliae*), se retira la tapa del tubo, posteriormente se flamea la boca del tubo y con el asa previamente esterilizada se introduce el asa en tubo sin tocar las paredes y se toma una pequeña muestra de *Metarhizium anisopliae*, se flamea nuevamente la boca del tubo, se tapa y se deja en una gradilla. Tomando la caja petri de con medio de cultivo AGAR estéril en el cual se va a colocar la muestra, lo destapamos ligeramente y flameamos la caja cerca del mechero, colocando el asa en la parte inferior con la muestra obtenida procurando no tocar otras partes de la placa, seguido realizamos movimientos en estrías sobre el medio de cultivo hasta llegar al otro extremo de la caja petri, siempre cuidando no romper el medio de cultivo, después retiramos el asa y se flamea la parte abierta de la caja petri nuevamente, se tapa y sella de nuevo con cinta auto adherible o parafina para evitar contaminación, finalmente se colocan las cajas sobre la mesa de trabajo, posteriormente se calienta el asa en el mechero nuevamente para después de usarla de nuevo repitiendo la técnica, que para este caso se repitió en 20 cajas petri las cuales fueron marcados con la fecha y numeradas para su control.



Figura 4. Siembra en cajas petri por el método de estrías.

#### **4.3 Producción del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.**

Una vez obtenidas las cepas de hongo en la fase de aislamiento e incremento del hongo se persigue obtener una cantidad adecuada de inóculo que permita mantener una producción constante de conidios además de ser viables, en condiciones totalmente asépticas. La cantidad de conidios producidos dependerá de la capacidad de las instalaciones, del rendimiento de la cepa

producida, del manejo del hongo durante la etapa de incubación y el control de factores como la iluminación y la temperatura (Alemán y Ovalle, 1998).

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas. En la presente trabajo de investigación se utilizó el método de cultivo sobre soportes sólidos en bolsas de arroz para su producción masiva, donde se consideraron aspectos como: Seleccionar el medio más económico y efectivo; evitar la complicación de la técnica de producción del patógeno; que el patógeno conserve su potencialidad de germinación; desarrollo óptimo del medio sintético; optimización de la esporulación y que la elaboración del biopreparado, no pierda su virulencia (Berlanga y Hernández, 1996).



Figura 5. Tubos de ensayo con cepas de hongo *Metarhizium anisopliae*.

#### 4.4 Lavado y secado del arroz

El arroz antes de ser embolsado se lavo y se desinfecto preparando en una tina 10 litros de agua destilada con 5ml de antibiótico enrofloxacina al 10% y 2.5 ml. de cloro, sumergiendo el arroz varias veces con una pequeña agitación con ayuda de una maya, para que quede totalmente desinfectado y libre de contaminantes.



Figura 6. Lavado y desinfectado del arroz.

##### 4.4.1 Preparación de las bolsas con arroz.

se colocaron 200 g. aproximadamente de arroz en cada bolsa, las cuales se amarran, para evitar que entren contaminantes, dejando la mitad del volumen de aire. Estas bolsas con el arroz se esterizaron en autoclave a una presión constante de 15 libras de presión por 20 minutos. Posteriormente se dejan enfriar y reposar por 24horas.



Figura 7. Preparación de las bolsas con arroz.

#### **4.4.2 Inoculación de las bolsas.**

Una vez preparadas y esterilizadas las bolsas con arroz se inocularon utilizando una jeringa estéril inyectándoles 20 ml de la suspensión del inóculo por cada una de las bolsas con arroz, dicha suspensión se preparó con 400 ml. de agua destilada, 0.5 ml de antibiótico y 0.1ml de dispersante (tween) en un matraz de 500 ml., posteriormente se tomaron 10 ml de la suspensión para ser vaciados en un tubo de ensayo que contiene el hongo, posteriormente se tapó y removi6 con el fin de homogeneizar la suspensión y las cepas del hongo contenidas en el tubo de ensayo, después de inocular las bolsas se sella el orificio de entrada con cinta adhesiva y se mueven las bolsas para distribuir homogéneamente el inóculo. es importante mencionar que estos pasos se realizaron en un área completamente estéril y dentro de la campana de flujo laminar después de

haberla esterilizado usando algodón impregnado de alcohol puro a manera de antorcha, pasándola por toda la campana de flujo laminar y rociándola con alcohol.



Figura 8. Inoculación en bolsas de arroz.

#### 4.4.3 Traslado a sala de maduración.

La sala de maduración debe de tener un fotoperiodo de 14 horas luz, con temperaturas promedio de  $27 \pm 2$  °C las cuales son las condiciones apropiadas

para el *Metarhizium anisopliae*, Las bolsas se colocaron sobre papel estraza alineadas sobre una mesa, el arroz se removido cada 96 horas para romper las estructuras de micelio en los primeros 12 días de la siembra y con ello obtener la mayor cantidad de esporas libres. El tiempo requerido para tener una máxima cantidad de esporas es de 15 a 20 días.



Figura 9. Bolsas de arroz inoculadas en la sala de maduración.

#### **4.4.4 Secado del arroz.**

El objetivo del secado es la eliminación de la humedad del hongo, el contenido de las bolsas es depositado en bandejas de plástico que se dejan a temperatura ambiente para que se sequen. El hongo está listo para cosechar cuando el arroz tiene una humedad de 4 y 6 %.

#### 4.4.5 Obtención de esporas.

Cuando las esporas ya alcanzaron su madurez se encuentran listas para ser extraídas del arroz. El polvo que se obtiene contiene conidios y micelio más las partículas de arroz. La extracción se realizó de forma manual por tamizado y frotación, haciendo pasar el arroz sobre una malla para que este suelte las esporas cayendo sobre la tina y estas puedan ser recolectadas, cabe mencionar que para la primera colecta se obtuvo un peso de 306.74 gr. Cosechado de 24 bolsas de arroz, con un peso aproximado de 200 gr. cada una, dando un promedio de producción de 12.78 gr. por bolsa.



Figura 10. Proceso de obtención de esporas de *Metarhizium anisopliae*.

## **4.5 Toma de datos sobre la caracterización y viabilidad del hongo**

### **4.5.1 Caracterización del hongo *Metarhizium anisopliae*.**

Para llevar a cabo la caracterización del hongo se tomaron 10 cajas petri con cultivo donde se observó a través del microscopio utilizando la lente de 40X y equipo de cómputo, su crecimiento y características que presentó en intervalos de tiempo de 2 horas observando el momento en que el micelio empieza a desarrollarse para posteriormente presentar una serie de ramificaciones las cuales empiezan a empatarse entre sí, también presentó hifas cenocíticas, lisas, con conidias de diferentes matices de colores desde el verde oliva hasta verde oscuro, las conidias poseen extremos redondeados, lisas y agrupadas en cadenas regulares debido a la agregación por elongación de las mismas conidias, lo anterior coincide como lo descrito por Domsch (1993). El crecimiento fue de manera circular, lenta, con colonias de 25 mm dato que no coincide con lo reportado por Domsch (1993), aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana.

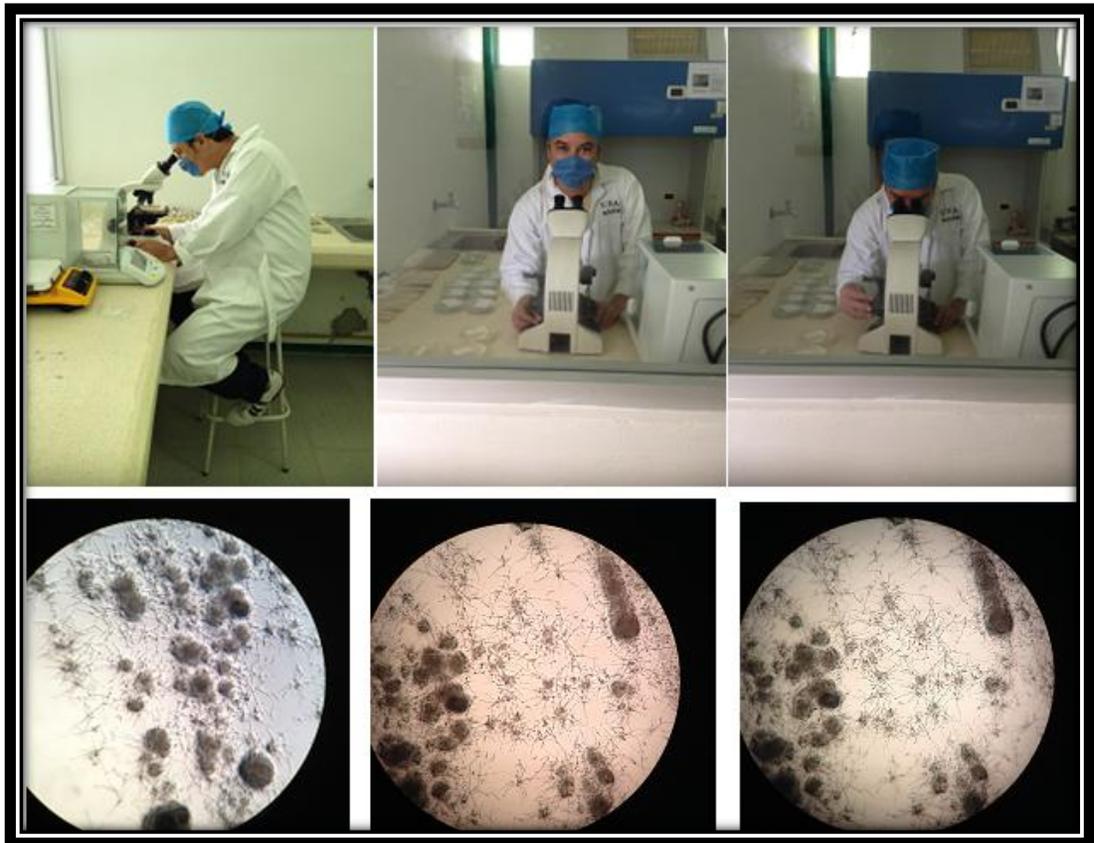


Figura 11. Caracterización del hongo *Metarhizium anisopliae*.

#### 4.5.2 Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae*.

La viabilidad de un producto es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar expresada en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano es una viabilidad >80%.

La viabilidad de los hongos es fácilmente medida; muchos laboratorios que trabajan con estos agentes de control tienen un método establecido para evaluar la viabilidad de sus productos. Para evaluar productos a base de conidios de hongos formulados en polvo o aceites, un método sencillo y probablemente el más común para determinar el porcentaje de germinación, es usando una suspensión diluida de conidios sembrada sobre medio de cultivo, la cual es inoculada a una temperatura y tiempo determinados, para contabilizar bajo el microscopio las esporas viables y no viables. Esta prueba se realiza bajo condiciones estériles para evitar el crecimiento de contaminantes.

#### **4.5.3 Preparación de la suspensión para el conteo de esporas**

Para cuantificar el número de conidios por gramo de polvo seco, se peso 1 gr. de polvo de *Metarhizium anisopliae* y se vació en un matraz con 10,000 ml de agua más tween (0.05 ml. O 5 gotas aproximadamente) que se utiliza como separador y las esporas puedan ser contadas fácilmente, posteriormente se coloco en el agitador dejándolo hasta observar que se haya diluido y homogeneizado completamente obteniendo un color oscuro.

La suspensión así preparada contiene el número adecuado de esporas que es entre 20 y 100 por celda.

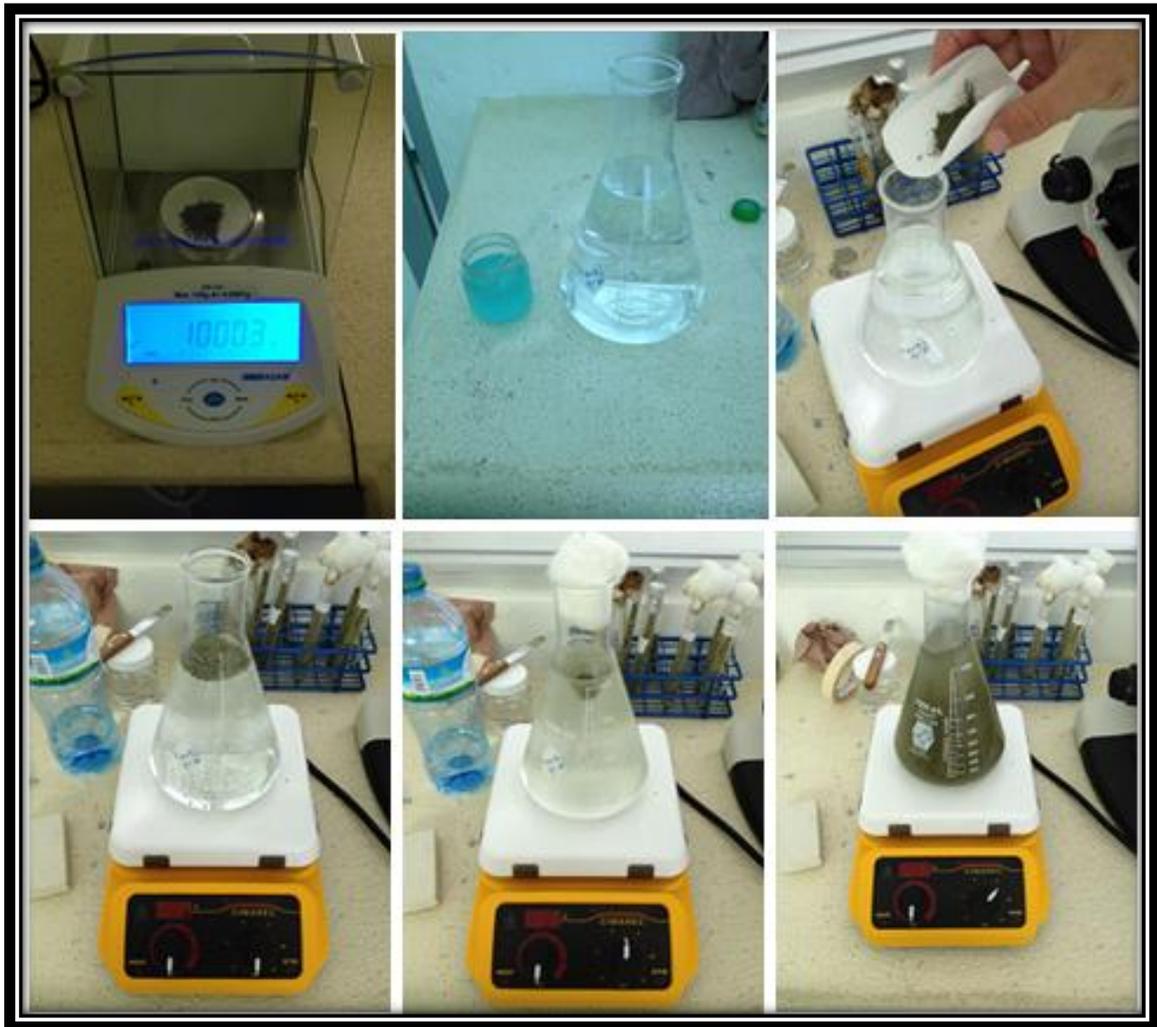


Figura 12. Preparación de la suspensión

#### 4.5.4 Conteo de esporas

Para cuantificar el número de esporas por unidad de volumen o peso, se utilizó el equipo de cómputo, la cámara digital LEICA y la cámara de Neubauer el cual está conformado por dos áreas de conteo. La suspensión es vertida usando una pipeta transfiriendo 1 o 2 gotas en el portaobjetos de la cámara cubierta con el

cubreobjetos de la misma. Cuando las esporas están suspendidas en agua rápidamente se precipitan (5 min.) y se puede iniciar el conteo de las mismas.

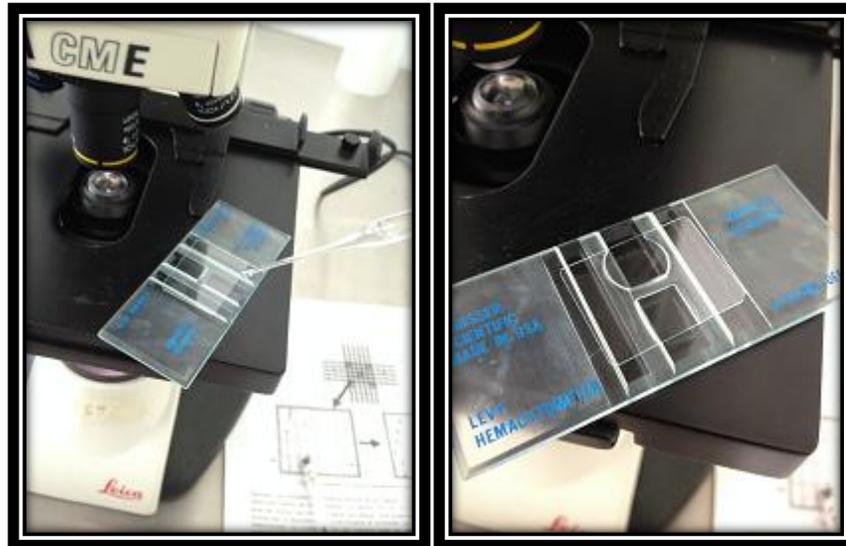


Figura 13. Colocación de la suspensión sobre la cámara de Neubauer.

Se utilizaron cinco celdas por área, las cuatro esquinas y el centro; en total se cuentan el número total de 10 celdas, cinco del área superior y cinco de la inferior. Debido a que se cuenta el número de esporas contenido en un volumen de agua, es necesario seguir un criterio uniforme, así por ejemplo, se inicia el conteo por la parte inferior izquierda y se considera que las esporas que estén tocando la línea en la parte interior o en la parte exterior por el lado izquierdo se consideran en el conteo, en cambio aún y cuando la espora este por dentro pero en la parte superior o en el lado derecho no se consideran en el conteo.

Los conteos fueron los siguientes: Se suman las 10 lecturas (619) y se obtiene el promedio por celda (61.8); el número de esporas, así determinado, se multiplica por 25 y obtenemos el número total de esporas (1,547.5) Si consideramos que se estimó el número es esporas contenidas en la diezmilésima parte de un mililitro, debemos multiplicar por 10,000 el número de esporas (1,547.5) para obtener la cantidad de esporas por mililitro (5, 750, 000 =  $1.54 \times 10^6$ ). O bien Determinar el número de conidias por ml. y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula:

Conidias / ml = # de conidias contadas x 25,000 x factor de dilución

Conidias total = conidias / ml x Vol. de la suspensión original de conidias.

(Cañedo y Ames, 2004)



Figura 14. Conteo de esporas con equipo de computo LA EZ y cámara digital LEIKA.

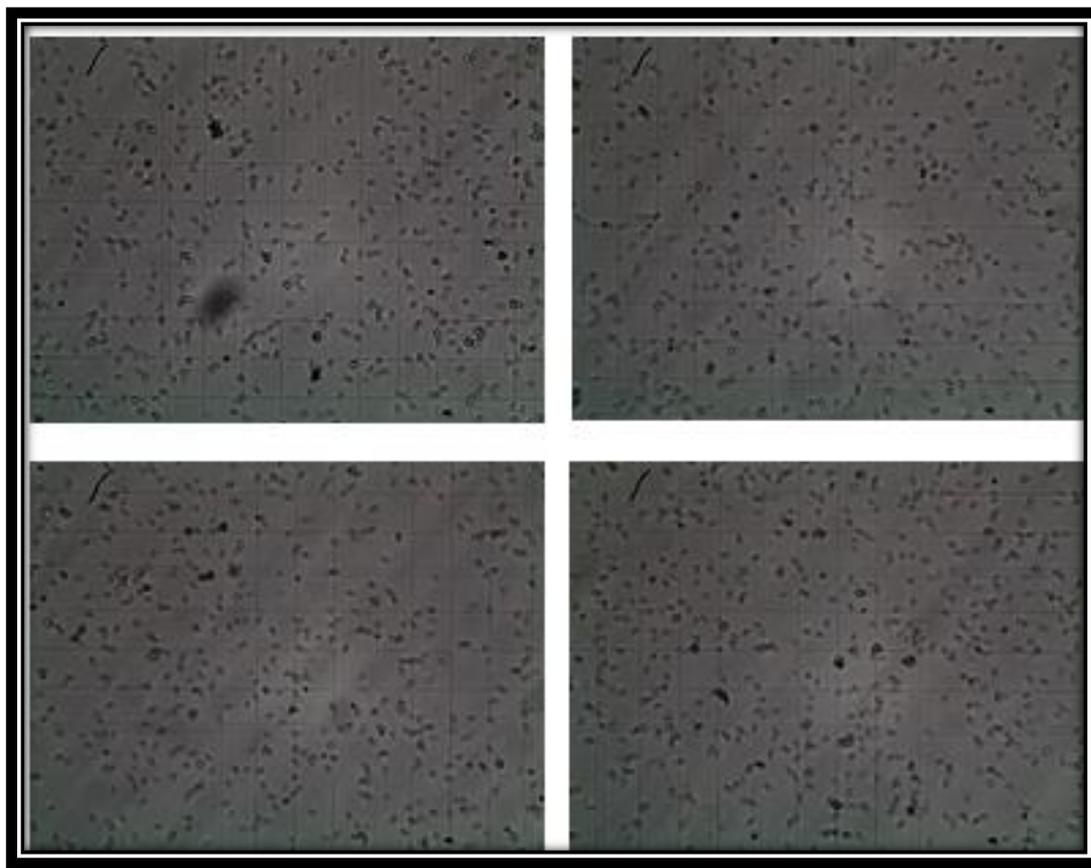


Figura 15. Vista de las esporas en la cámara de Neubauer.

## V RESULTADOS

Gracias al trabajo realizado en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya pudimos obtener como resultado tres puntos importantes para la producción comercial y el uso exitoso de hongos entomopatógenos como agentes de control de insectos.

Primero el aislamiento del hongo seleccionado (*Metarhizium anisopliae*) para producción masiva presento un crecimiento rápido y abundante esporulación debido a las condiciones favorables que se mantienen en el laboratorio, también bajo pruebas de viabilidad se estimo que el hongo producido en el laboratorio presento patogenicidad suficientemente alta 80%.

Segundo, los costos de producción fueron mínimos lo que lo hace una alternativa viable muy importante económicamente, esto se logra gracias a que se desarrolla en un medio simple, barato y disponible en cantidades suficientes, a la vez que requiere un procedimiento de producción fácil y con un mínimo de labor.

Tercero, el producto puede ser conservado para su almacenamiento por largo tiempo sin pérdida significativa de su viabilidad, por lo que puede ser convenientemente formulado para su aplicación como agente regulador de plagas.

## VI. CONCLUSIONES

Actualmente los biopesticidas son productos que pueden integrarse a las estrategias de manejo de insectos plaga, debido a que son seguros desde el punto de vista de protección ambiental, porque no son contaminantes y además tienen un bajo impacto sobre otros insectos no blancos y sobre el ambiente. Estos pueden favorecer la biodiversidad en áreas naturales o seminaturales, pueden evitar la presión del público en ciertos cultivos que deben cumplir con altos estándares ecológicos y toxicológicos, pueden ser utilizados en sustitución de aplicaciones de insecticidas no satisfactorios, en situaciones donde baja toxicidad a mamíferos es crucial, donde la preservación de otros enemigos naturales es importante.

En México ha crecido el interés, y la tendencia actual por el control biológico debido a factores como encarecimiento de los insecticidas, resistencia de los insectos plagas a los productos químicos, residualidad en los productos agrícolas de exportación, ideas conservacionistas del medio ambiente y profesionistas especializados en esta tecnología han influido en este cambio. Otro factor que ha impactado es el crecimiento de áreas de cultivos orgánicos, pero aun se necesita de una mayor promoción de sus bondades para fomentar su empleo.

Los avances sobre aspectos epizootiológicos, producción masiva por métodos alternativos, que son fáciles de implementar y que implican bajos costos de inversión, los métodos de aplicación, formulación y mecanismos de patogénesis sugieren un futuro prometedor para los hongos entomopatógenos en el control de plagas insectiles, sin embargo, difieren de los agroquímicos en diversos aspectos; en primer lugar estos están formulados con organismos vivos, por lo que aún existen problemas estabilidad y almacenaje, las formas granulados y polvo humectable son las que mayor éxito han tenido en la presentación de este tipo de producto, pero se necesita un mayor esfuerzo en investigaciones en esta línea a fin de obtener formulaciones de mayor estabilidad, porque para que estos puedan ser utilizados ampliamente en la agricultura como una estrategia viable, deben ser productos, estandarizados, tener alta persistencia en almacén, alta eficacia y fáciles de usar, además, su uso como agentes de control puede ser totalmente diferente de los agroquímicos que pretenden reemplazar. La aplicación de conidias produce una respuesta que es diferente a los insecticidas, ya que todas las dosis parecen matar; por lo que es más conveniente medir el tiempo que tarda en matar que los niveles de dosis letal.

Es muy probable que los micoinsecticidas tengan éxito si se desarrollan como productos para mercados pequeños o como para resolver problemas específicos de plagas, más bien que como plaguicidas de amplio espectro que compitan directamente con los plaguicidas establecidos en el mercado.

Es necesario para llevar a cabo programas de control de insectos con hongos entomopatógenos, tener un buen conocimiento sobre la selección de los aislamientos y técnicas de bioensayos, para seleccionar razas patogénicas y virulentas adaptadas a condiciones ecológicas específicas.

La utilización masiva de los entomopatógenos requiere aún de muchos esfuerzos, si bien es cierto, que existen productos comerciales y la investigación ha avanzado con relación al mejor conocimiento de la bioactividad controladora de estos microorganismos, el desarrollo de estos agentes e investigaciones de su uso está empezando a asumir un papel importante en el campo de la agricultura sostenible.

La aplicación de los biocontroles junto a otros métodos alternativos permitirá lograr buenos rendimientos de las cosechas sin perjudicar al ecosistema, desde hace mucho tiempo, quienes fomentan los programas MIP, han creído en la utilidad de los entomopatógenos en una línea de control microbial, por lo que las preocupaciones sobre los entomopatógenos y su empleo en el MIP, deben cubrir no sólo la posibilidad de acceder a las formulaciones comerciales y su adecuado manejo, tiene que considerarse que en forma natural los patógenos de insectos actúan y deben preservarse.

Los avances de la ingeniería genética podrán además en el futuro, mejorar los entomopatógenos y crear razas de mayor impacto en las poblaciones plagas.

## VII REFERENCIAS

- ✓ Berlanga y Hernández, 1996 b, Identificación y Producción masiva de Hongos Entomopatógenos de Mosquita Blanca. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico DGSV-SAGDR. Memorias de aprobación y actualización fitosanitaria en la campaña contra Mosquita Blanca p 217-226.
- ✓ Bracho y Vega J. 1995. Sinopsis Histórica de plagas en caña de azúcar en Venezuela: Problemas de Candelilla (*Aeneolamia spp.*) P.192-194.
- ✓ Bustillo A. y Patricia Marín. 2002. ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana*? Manejo integrado de Plagas (Costa Rica). CATIE. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, Caldas, Colombia. No. 63 p.i-iv, Hoja técnica No. 40
- ✓ Cañedo V. y T. Ames, 2004. Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima Perú Centro Internacional de la Papa (CIP) 62p ISBN 92-9060-238-4.
- ✓ Castillo S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de

*Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. En: Tesis de maestría. Centro Agronomico Tropical de investigación y enseñanza. 55p

- ✓ Cibrian, T. 1998. Manejo Integrado de plagas y control biológico. Antología, Subsecretaria de educación e investigación tecnológicas, Dirección general de educación tecnológica agropecuaria. P.111-116.
- ✓ Elosegui, C. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Habana Cuba. 43 p.
- ✓ González-Coloma A., M. Reina, B.M. Fraga, C.E. Díaz y R. Cabrera, 2007, Bioplaguicidas Naturales para la protección de cultivos, En: Bioplaguicidas y control biológico: Biocompuestos con actividad antimicrobial, Centro de Investigaciones en Química aplicada, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2:30-41
- ✓ Godoy, J.C. R.E. Valera, C. Guédez, L.M. Cañizalez y C. Castillo, 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico "Dr Carlos Diaz Polanco", Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Universidad de los Andes. Rev. Fac. Agron. (LUZ).24: 415-425

- ✓ Guerrero C, Jaime, Carrillo LL., Roberto y Aguilera P., Alfonso. 1999. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. *Agro sur*, jul. 1999, vol.27, no.2, p.23-34. issn 0304-8802.
  
- ✓ Hernández, V. A. Berlanga Y M. Carillo, 2004. Formulación y Parámetros de Calidad de Hongos Entomopatógenos, en: Taller de calidad de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación, Tecomán Colima, pp. 13-28
  
- ✓ Hernández-Torres, I. J. Isabel López-Arroyo, Angélica Berlanga-Padilla, Jesús Loera-gallardo & Efran Acosta-Díaz, 2006. Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *toxoptera citricida* kirkaldy (homoptera: aphididae) *Vedalia* 13 (1): 17-26 (2006) artículo científico issn 1405-0420 17
  
- ✓ Hernández V. y A. Berlanga, 2007. Formulación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum*, Taller sobre control biológico y manejo de la langosta Centro Americana (*Schistocerca piceifrons*, Walker) ISBN 978-968-5384-09-4 p. 127-137

- ✓ Hernandez, V. y A. Berlanga, 2004. Tamaño de partícula y Contenido de Humedad en Formulación de Hongos Entomopatogenos, en: Taller de Calidad de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Pp.53-58.
- ✓ Hernández, V. 2003. Efecto del contenido de humedad de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Hypomycete) sobre la Viabilidad y Producción de exudados en Almacenamiento y Virulencia sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae), Tesis de Doctorado, Universidad de Colima, 91p.
- ✓ Hernández-Mendez, J. Esteban Barranco-Florido, Alejandro Azaola-Espinoza, 2007, Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* Y *Lecanicillium lecanii* (Moniliales: Moniliaceae) por su esporulación en cultivo sólido y su crecimiento en cutícula de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: pyrgomorphidae), en: XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán. Pp.136-140.
- ✓ Lecuona, E. R. 2002. Situación actual y perspectivas de uso de bioplaguicidas en Latino América. In: Manual del curso Internacional de producción y uso de agentes microbianos `para el control de plagas en la agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. p. 9-16.

- ✓ Alatorre, R. 2006. Hongos entomopatógenos como insecticidas microbianos en: XVII Curso Nacional de Control Biológico, Manzanillo Colima, ISBN: 968-5384-02-9 pp. 83-97.
  
- ✓ Alatorre, R. 2007, Producción masiva de hongos entomopatógenos, En: Técnicas de cría y reproducción de insectos, ácaros, y entomopatógenos, Colegio de posgraduados, Campus Montecillo. p. 35
  
- ✓ Alatorre R, 2007. Hongos Entomopatógenos, en: Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Rodríguez-del-Bosque, L. A. y H. C. Arredondo-Bernal (eds.) México. 303 p.
  
- ✓ Alemán, M y W. Ovalle. 1998. Producción y manejo del Hongo *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Guatemala, CENGICAÑA 18p.
  
- ✓ Alves, B.S. 1986. Controle microbiano de insectos. Primera edicao. Ed. Manole. 409 pp.
  
- ✓ Asaff, A. Yolanda Reyes Vidal, V. López y López y M. de la Torre. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas, en: Avance y Perspectiva vol. 21p.291-295.

## VIII GLOSARIO

1. Abiótico (Abiotic) No viviente.
2. Anamorfo.- es el estado asexual, conidial o imperfecto de un hongo, que produce sus esporas por mitosis, no incluye cariogamia o meiosis.
3. Asca o asco.- (Ascus) célula en forma de saco o bolsa que generalmente contiene un numero definido de ascosporas (típicamente ocho) que se forman por común después de la cariogamia y la meiosis, las ascas son características de los ascomicentes, originan esporas endógenas.
4. Asexual.- (Asexual) en los hongos el tipo de reproducción que no involucra la cariogamia y meiosis; también se denomina multiplicación vegetativa.
5. Basipeta.- (Basipetal) se refiere a lo que se desarrolla a partir del ápice dirigiéndose hacia la base es decir, que el grado de crecimiento es tanto mayor cuando más alejado se encuentra de la base, por ejemplo: en una cadena de conidios con sucesión basípeta, el conidio que está en la base es el más joven, y el de reciente formación.
6. Catenulado.- (Catenuate) que forman una cadena o semejan a ella.
7. Colonia.- (Colony) grupo de individuos de la misma especie que viven en estrecha asociación; en hongos, el termino se refiere, generalmente, al conjunto de hifas o células que en gran numero crecen, con manifiestas relación entre si, a partir de un punto, para formar un talo que presenta una morfología característica de la especie.

8. Conidio.- (Conidium pl. Conidia) también se le llama conidiospora; espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o periodo, como sucede con las esporangiosporas. Los conidios son las estructuras asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes y se pueden generar de novo (la mayoría) a partir de células hifales preexistentes.
9. Conidióforo.- (Conidiophore) hifa simple o ramificada, que se diferencia de una somática y produce y sustenta conidios; estos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas, que pueden disponerse de manera muy diversa.
10. Deuteromicetes.- también denominados Fungi Imperfecti u hongos imperfectos por carecer de reproducción sexual típica; en las clasificaciones modernas, este grupo de hongos, antes considerados como una sola clase taxonómica, corresponde a la subdivisión Deuteromycotina.
11. Entomopatógeno.- Capaz de causar una enfermedad a un insecto.
12. Espora.- (spore) pequeña unidad de propagación, unicelular o pluricelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que funciona como una semilla, aunque difiere de esta última porque una espora no contiene un embrión preformado.

13. Esporulación.- es el método más frecuente de reproducción de los hongos, que constituyen en la producción de esporas asexuales de muy diversos tipos.
14. Estroma.- (Stroma) masa compactada de hifas somáticas, constituidas de plecténquima, sobre la cual o dentro de la cual se producen comúnmente hifas fértiles que generan órganos reproductores.
15. Hialino.- (Hyaline) transparente o incoloro, como si fuera de cristal o al menos diáfano.
16. Hifa.- (Hypha) filamento tubular que presenta la unidad estructural de la mayoría de los hongos; puede ser cenocítico o septado.
17. Hongo.- (Fungi) organismo eucariótico, acrorófilo, heterotrófico y casi siempre productor de esporas; su talo varía de ameboide o plasmodial a unicelular o filamentoso.
18. Medio de cultivo: Composición nutritiva empleada para el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (hongos, bacterias).
19. Microconidios.- (Microconidium) conidios pequeños, generalmente unicelulares, que en algunos Hyphomycetes funcionan como esporas asexuales y en ciertos Euascomycetes, además de esta función, puede comportarse como espermacios en la reproducción sexual.
20. Patogenicidad.- Capacidad de producir una enfermedad; virulencia.
21. Patógeno.- Microorganismo capaz de causar una enfermedad a otro organismo.
22. Patotipo.- Variedad, cepa o seriotipo de un patógeno

23. Peridio.- Cubierta sobre la masa de esporas de un cuerpo fructífero.
24. Septicemia.- Multiplicación de un microorganismo en la sangre o hemolinfa.
25. Septo.- (Septum) pared transversal en una célula o en una hifa; los ceptos o tabiques se forman por crecimiento centrípeto de la pared celular, y se presentan con cierta regularidad espacial en los micelios septados.
26. Sinema.- (Synnema) conjunto de hifas que forman un cordón miceliano, o haz de conidióforos que constituye una estructura erguida productora de esporas.
27. Zoospora.- (Zoospore) espora de origen asexual, Flageladas y, por consiguiente, móviles; característicos de los hongos acuáticos.