



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL

EVALUACIÓN DE MORTALIDAD DE GUSANO COGOLLERO

(*Spodoptera frugiperda* L.) MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium* spp. *IN VITRO*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

PRESENTA:

EUGENIA CABRERA HUERTA

DIRECTOR DE TESIS

DR. OMAR ROMERO ARENAS

Tetela de Ocampo, Puebla, México. Diciembre de 2013



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL

EVALUACIÓN DE MORTALIDAD DE GUSANO COGOLLERO

(*Spodoptera frugiperda* L.) MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium* spp. *IN VITRO*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

PRESENTA:

EUGENIA CABRERA HUERTA

DIRECTOR DE TESIS

DR. OMAR ROMERO ARENAS

ASESORES

DR. JOSÉ FILOMENO CONRADO PARRAGUIRRE LEZAMA

M.C. ALFREDO BÁEZ SIMÓN

Tetela de Ocampo, Puebla, México. Diciembre de 2013

La presente tesis titulada: “EVALUACIÓN DE MORTALIDAD DE GUSANO COGOLLERO (*Spodoptera frugiperda* L.) MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium* spp. *IN VITRO*”, realizada por Eugenia Cabrera Huerta, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

Facultad de Ingeniería Agrohidráulica.

Consejo Particular Integrado por:

Firma.

Director: Dr. Omar Romero Arenas

Asesor: Dr. José Filomeno Conrado Parraguirre Lezama

Asesor: M.C. Alfredo Báez Simón

Tetela de Ocampo, Puebla, México. Diciembre de 2013

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico denominado **“Recursos Naturales y Sistemas Agroforestales”** en la línea de investigación: **Los Sistemas Agroforestales para la Transformación Industrial y el Desarrollo Socioeconómico de Comunidades Rurales**. Con número de clave BUAP-CA-265.

La presente tesis, fue financiada por el proyecto “VIEP” con una vigencia a partir del 01/Enero/2012 al 31/Diciembre/2013.

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la bendición y la oportunidad de concluir satisfactoriamente mis estudios de licenciatura.

A MIS PADRES

Plutarco Cabrera y Teresa Huerta

Por motivarme a seguir adelante y brindarme su apoyo para mi superación profesional.

A MIS HERMANOS

Rocío, Grisel y Oscar

Quienes me han brindado su afecto y compañía durante todo este tiempo.

A MIS AMIGOS

*Rodolfo, Javier, Abraham, Esther, Eliza, José Luis, Miriam, Flor, Juan Manuel, Liz, Gaby, Paula,
Jorge Luis, Ma. De Jesús, Jimena, Susy, Wendy, Trino y Andrés.*

Gracias por compartir momentos de alegría y tristeza, por motivarme a seguir estudiando y por brindarme su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios dentro de sus instalaciones.

A todos los profesores de Ingeniería Agroforestal, por transmitirme su conocimiento, tiempo y dedicación.

A todo el personal administrativo del Campus BUAP-Tetela de Ocampo, por la paciencia, apoyo y facilidades otorgadas durante mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la Facultad de Ciencias Forestales, por aceptarme y recibirme de manera generosa dentro de sus instalaciones; además de compartir conocimientos y experiencias durante mi estancia.

Al Dr. José Concepción Rodríguez Maciel, Profesor Investigador Adjunto del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo-Estado de México, por otorgarme el material necesario para la realización de la presente tesis.

Con gran énfasis y respeto agradezco al Dr. Omar Romero Arenas, quien además de ser mi maestro y tutor de tesis, ha sido mi amigo, me ha motivado a seguir superándome académicamente; asimismo, por brindarme su tiempo y apoyo incondicional.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por el apoyo financiero para la ejecución de este proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pag.
LISTA DE CUADROS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
I- INTRODUCCIÓN.....	1
II-OBJETIVO GENERAL Y PARTICULAR.....	3
III-HIPÓTESIS.....	4
IV-REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>) J. E . SMITH; (Lepidoptera: Noctuidae).....	5
4.2 Clasificación taxonómica.....	5
4.3 Distribución geográfica.....	6
4.4 Biología y hábitos.....	6
4.5 Caracteres distintivos.....	7
4.6 Ciclo biológico.....	7
4.7 Control.....	9
4.8 Generalidades de los hongos entomopatógenos.....	10
4.9 <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
4.10 Clasificación taxonómica.....	11
4.10.1 Características macroscópicas y microscópicas.....	12
4.11 Efecto entomopatógeno.....	12
4.12 Producción de enzimas.....	14
4.12.1 Lipasas.....	15
4.12.2 Quitinasas.....	15
4.13 Producción de toxinas.....	16

4.14 Factores que afectan el desarrollo de los hongos entomopatógenos.....	16
4.14.1 La temperatura.....	16
4.14.2 Humedad relativa.....	17
4.14.3 Precipitación, radiación solar y suelo.....	17
4.14.4 Insecto huésped.....	18
4.14.5 Nutrición.....	18
4.14.6 Edad.....	18
4.14.7 Densidad de población.....	18
4.14.8 Composición del medio de cultivo.....	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Localización.....	20
5.2 Recolección de material biológico (insectos).....	21
5.3 Aislamiento y purificación de <i>Metarhizium</i> spp.....	21
5.4 Identificación de <i>Metarhizium</i> spp.....	22
5.5 Identificación del insecto.....	23
5.6 Preparación de la dieta.....	23
5.7 Preparación de suspensiones.....	24
5.8 Conteo de conidios.....	24
5.9 Inoculación.....	25
5.10 Diseño experimental.....	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Aislamiento de <i>Metarhizium</i> spp.....	28
6.2 Identificación del hongo.....	28
6.3 Identificación taxonómica del insecto micosado por <i>Metarhizium</i> spp.....	31

6.4 Concentración de conidios de <i>Metarhizium</i> spp.....	32
6.5 Colonización de <i>Metarhizium</i> spp., nativo sobre larvas de gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).....	34
6.6 Mortalidad de larvas.....	35
6.7 Larvas que pasaron al estado de pupas.....	39
6.8 Emergencia de adultos.....	39
6.9 Tiempo letal (TL ₅₀) entre cepa nativa y cepa comercial de <i>Metarhizium</i> spp., sobre larvas de gusano cogollero.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	44
IX. ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i> L.).....	5
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Alexopoulos, 2010).	12
Cuadro 3. Aislamiento de hongos entomopatógenos en insectos del orden coleóptera en el municipio de Tetela de Ocampo, Puebla.....	28
Cuadro 4. Identificación taxonómica de <i>Phyllophaga</i> spp.....	32
Cuadro 5. Prueba de rangos múltiples de concentraciones (Tukey).....	33
Cuadro 6. Prueba de rangos múltiples en mortalidad (Tukey).....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Ciclo biológico de gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i> L).....	9
Figura 2. Ciclo patogénico de <i>Metarhizium</i> spp. Alves (1998).....	13
Figura 3. Localización del municipio de Tetela de Ocampo, Puebla-México.....	20
Figura 4. Purificación de la cepa nativa de <i>Metarhizium</i> spp.....	22
Figura 5. Identificación de <i>Metarhizium</i> spp.....	22
Figura 6. Preparación de la dieta artificial.....	23
Figura 7. Preparación de suspensiones.....	24
Figura 8. Conteo de conidios en cámara de Neubauer.....	25
Figura 9. Inoculación de larvas de gusano cogollero con <i>Metarhizium</i> spp.....	26
Figura 10. Crecimiento de <i>Metarhizium</i> spp., nativa en medio de cultivo PDA.....	29
Figura 11. Identificación microscópica de cepa nativa de <i>Metarhizium</i> spp.....	29
Figura 12. <i>Phyllophaga</i> spp., infectado por <i>Metarhizium</i> spp.....	31
Figura 13. Concentración de conidios/mL de cepa nativa y cepa comercial de <i>Metarhizium</i>	33
Figura 14. Colonización de <i>Metarhizium</i> spp., nativo, sobre larvas de gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>).....	35
Figura 15. Mortalidad de larvas a diferentes concentraciones de con/mL de cepa nativa y comercial de <i>Metarhizium</i> spp.....	36
Figura 16. Porcentaje de larvas muertas a diferentes concentraciones de con/mL de <i>Metarhizium</i> nativo y comercial.....	36
Figura 17. Número de larvas que llegaron al estado de pupa.....	39
Figura 18. Emergencia de adultos en cada uno de los tratamientos a diferentes concentraciones.....	40
Figura 19. Porcentaje de emergencia de adultos de gusano cogollero a diferentes concentraciones entre cepa nativa y comercial de <i>Metarhizium</i> spp.....	41
Figura 20. Tiempo de mortalidad de larvas de 72-168 hrs. post-infección.....	42

EVALUACIÓN DE MORTALIDAD DE GUSANO COGOLLERO
(*Spodoptera frugiperda* L.) MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium* spp. *IN VITRO*

RESUMEN

Se realizó la evaluación de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) en condiciones de laboratorio, mediante el empleo de seis concentraciones de conidios entre cepa nativa y una cepa comercial de *Metarhizium*. La cepa nativa de *Metarhizium* spp. fue aislada del adulto de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) en la comunidad de San Nicolás, Tetela de Ocampo, Puebla. La identificación del género *Metarhizium*, previamente aislado, se realizó mediante las características macro y microscópicas relevantes de este género.

Se realizaron suspensiones de conidios 10-10, en donde se obtuvieron concentraciones de 53×10^4 , 9×10^4 , y 5×10^4 conidios/mL de cepa nativa de *Metarhizium* spp., y 36×10^4 , 7×10^4 , y 4×10^4 conidios/mL de cepa comercial de *Metarhizium*. La concentración de 53×10^4 conidios/mL de la cepa nativa, reportó una mortalidad del 72.5% y la más baja se obtuvo de la cepa de *Metarhizium* comercial bajo la concentración de 4×10^4 conidios/mL, equivalente al 32.5%. El mayor índice de mortalidad para ambas cepas, ocurrió a las 72 hrs post-infección, con 11 larvas en promedio de las tres concentraciones de *Metarhizium* nativo y 6 larvas de la cepa comercial de *Metarhizium*. Estos resultados demostraron la factibilidad del uso de cepas de *Metarhizium* spp., para el control biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) *in vitro*.

Palabras clave: cepas de *Metarhizium* spp., conidios, control biológico, gusano cogollero, y mortalidad.

EVALUATION OF MORTALITY OF FALL ARMYWORM
(*Spodoptera frugiperda* L.) THROUGH THE USE OF *Metarhizium* spp. *IN VITRO*.

ABSTRACT

The evaluation was conducted of mortality of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* L.) in laboratory conditions, through the use of six concentrations of conidia among native strain and commercial strain of *Metarhizium*. The native strain of *Metarhizium* spp. was isolated from the adult of white grubs (*Phyllophaga* spp.) in the community of San Nicolás, Tetela de Ocampo, Puebla. The identification of the genus *Metarhizium*, previously isolated, was carried out using the macro and microscopic features relevant to this genre.

Suspensions were made of conidia 10-10, where were obtained concentrations of 53×10^4 , 9×10^4 and 5×10^4 conidia/mL of native strain of *Metarhizium* spp; and 36×10^4 , 7×10^4 and 4×10^4 conidia/mL of commercial strain of *Metarhizium*. The concentration of 53×10^4 conidia/mL of the native strain, reported a mortality rate of 72.5% and the lowest was obtained from the strain of *Metarhizium* commercial under the concentration of 4×10^4 conidia/mL, equivalent to 32.5%. The highest mortality rate for both strains, occurred at 72 hrs post-infection, with 11 larvae on the average of three concentrations of *Metarhizium* native and 6 larvae of the commercial strain of *Metarhizium*. These results demonstrate the feasibility of the use of native strains of *Metarhizium* spp. for biological control of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* L.) *in vitro*.

Key words: native strain of *Metarhizium* spp., conidia, biological control, fall armyworm, and mortality.

I.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción de alimentos enfrenta el reto de mantener un alto nivel de calidad, considerando aspectos de inocuidad alimentaria y sistemas de producción con retribución más justa para los productores (García y González, 2010). En México son frecuentes e importantes los daños que causan las plagas en los cultivos agrícolas, entre las más importantes se encuentran: el gusano cogollero del maíz, la mosca de la fruta, el picudo de algodón y de manzano, las arañas rojas, las mosquitas blancas, las chicharritas o los pulgones (Alatorre *et al.*, 2000).

El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* L.), puede ocasionar una reducción en la producción, que va desde un 20% hasta la pérdida total del cultivo, ataca las primeras etapas del desarrollo de la planta e incluso en épocas de floración (Del Rincón *et al.*, 2006). En México se encuentra en todas las regiones donde se cultiva maíz, aunque los daños son más severos en el trópico y el subtropico, se considera la plaga más voraz y dañina del cultivo (Rodríguez y Marín, 2008). Este insecto hace raspaduras sobre las partes tiernas de las hojas, el cual, posteriormente aparecen como pequeñas áreas traslúcidas y una vez que la larva alcanza su desarrollo, empieza a comer follaje preferentemente en el cogollo; de ahí su denominación (Soto, 2008).

En los últimos años el empleo de sustancias tóxicas en México se ha multiplicado y el empleo de plaguicidas se incrementa anualmente en un 10%, por lo que es necesario modificar estas prácticas agrícolas, para reducir el riesgo en la salud de los productores y de los consumidores (Ávila, 2004). Sin embargo, su uso excesivo ha provocado resistencia de las plagas, además su acumulación en el medio ambiente afecta la flora y fauna silvestre benéfica (Jiménez, 1998). Con el fin de minimizar estas consecuencias desfavorables, se ha propuesto disminuir el uso de los plaguicidas convencionales y desarrollar nuevas estrategias para un Manejo Integrado de Plagas (MIP), principalmente por medio del control biológico; siendo este un método de control de plagas más racional y respetuoso con el medio ambiente (Badii y Abreu, 2006). El uso de organismos benéficos como una alternativa sostenible de control de insectos, es recomendable dentro de un manejo

integrado de plagas, ya que no tiene efectos nocivos para el medio ambiente, la salud del hombre y los animales (Jiménez, 1998).

Particularmente, los hongos han sido una de las mejores alternativas para el control de plagas en los últimos años; asimismo, presentan un amplio espectro de huéspedes (De Faria y Wraight, 2007). Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos con más de 700 especies (Goettel *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006) dentro de 90 géneros que pueden infectar insectos (Goettel *et al.*, 2005). Las enfermedades causadas por hongos en insectos comúnmente reducen significativamente las poblaciones (Alatorre, 2000), demostrando así, que los bioinsecticidas pueden ser una alternativa viable para resolver los problemas de plagas en la agricultura (Barajas *et al.*, 2009). Entre los hongos más utilizados como insecticidas biológicos se incluye a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Monzón, 2001; Rodríguez y Arredondo, 2007). *M. anisopliae* ataca más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros, en los órdenes Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera, Coleoptera, entre otros (Polar *et al.*, 2008).

La presente investigación tiene como propósito, identificar y caracterizar cepas nativas de *Metarhizium* spp., en el municipio de Tetela de Ocampo-Puebla, además de evaluar su efecto patogénico en gusano cogollero *in vitro*.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar la mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.), mediante el uso de conidios de *Metarhizium* spp., a diferentes concentraciones.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar *Metarhizium* spp., en insectos del orden coleóptera en el municipio de Tetela de Ocampo, Puebla.
- Determinar el mayor porcentaje de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.), a través de diferentes concentraciones de conidios entre una cepa nativa y una cepa comercial de *Metarhizium*.
- Cuantificar la concentración óptima de conidios de una cepa nativa de *Metarhizium* spp., que provoque en el menor tiempo, el mayor índice de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.).

III. HIPÓTESIS

- El porcentaje de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) será mayor en la presencia de conidios de la cepa nativa de *Metarhizium* spp., en comparación a la cepa comercial.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) J. E. SMITH; (Lepidoptera: Noctuidae)

El gusano cogollero del maíz (GC) *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH; (Lepidoptera: Noctuidae), fue descrito por primera vez por J. E. Smith en el año de 1852. Esta plaga puede ocasionar una reducción en la producción y/o pérdida total del cultivo, si la plaga ataca en periodos cercanos a la etapa de floración. En México se ha reportado la presencia de esta plaga en las distintas regiones del país (López *et al.*, 1999), donde se han reportado pérdidas de hasta un 60% (SAGARPA, 2006).

4.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del gusano cogollero de acuerdo a Ángulo (2000), se describe en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.)

Reino	Animal
Phylum	Artrópoda
Subphylum	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Endopterygota
División	Pterygota
Orden	Lepidoptera
Suborden	Frenatae
Super familia	Noctuoidea
Familia	Noctuidae
Subfamilia	Amphipyirinae
Tribu	Prodeniini
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>S. frugiperda</i>

4.3 Distribución geográfica

Esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones agrícolas tropicales y subtropicales del continente americano. En México se encuentra prácticamente en todas las regiones donde se cultiva maíz, aunque los daños son más severos en el sureste del país. Las larvas se localizan en el cogollo de las plantas, donde se alimentan de las hojas en formación, las cuales, al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas; en ataque prematuro causa el retraso y muerte de plántulas (Rodríguez y Marín, 2008).

En el estado de Puebla se reporta que el gusano cogollero del maíz es uno de los principales problemas entomológicos en la zona de Amatlán, perteneciente al municipio de Zoquiapan. Investigaciones pasadas, reportan que esta plaga afecta un 28% de las plantas en las localidades (Aragón, 1987; López-Olguín y Aragón, 1987), ocasionando pérdidas de 319, 358 y 604 kg/ha, equivalentes al 10.8, 12.5 y 21.1% de la producción con niveles de daño leve, moderado y severo, respectivamente (Hernández, 1988).

4.4 Biología y hábitos

Esta plaga ataca un amplio rango de cultivos, entre los que destaca: maíz, sorgo, chile y cebolla; aunque tiene alrededor de 200 hospedantes (Bautista, 2006). Las hembras ovipositan varias masas de huevecillos, generalmente en el envés de las hojas. Los huevecillos son esféricos, de color verdoso o pardo y las masas son cubiertas con las escamas de las palomillas. Las larvas al eclosionar, tienen hábitos gregarios y se alimentan de un área foliar muy reducida; a los pocos días se dispersan a las plantas vecinas, en las que se establecen en el cogollo, la temperatura predominante es de 30 °C. Tienen hábitos canibalísticos, por lo que a partir del tercer instar larvario rara vez se observa más de una larva por cogollo. Se presentan seis instares larvarios, el último representa un mayor tamaño delongitud, que pueden alcanzar hasta 35 mm entre los 14- 22 días aproximadamente (Rodríguez y Marín, 2008).

4.5 Caracteres distintivos

De acuerdo a Bautista (2006), los caracteres más distintivos del gusano cogollero son los siguientes:

- a) En el macho, el área costal de las alas anteriores son de color pálida; además, poseen una mancha elíptica blanquecina cerca del centro y, a un lado de esta, una franja diagonal clara dirigida del margen costal al centro del ala.
- b) Presenta una pequeña mancha blanquecina en el margen apical.
- c) La hembra presenta una mancha elíptica en el margen costal delimitado por una línea clara.
- d) Como larva, en el octavo segmento abdominal (vista dorsal), presenta cuatro puntos negros en forma de cuadrado que corresponden a los pináculos setígeros dorsales; son prominentes y carecen de microespinas.
- e) La cabeza presenta áreas frontales de color blanco-amarillo, en forma de “Y” invertida.

4.6 Ciclo biológico

Según Ángulo (2000), el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) pasa por diferentes etapas durante su vida (**Figura 1**). Estas etapas son:

- 1. Huevo o postura.** Individualmente son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión. Las hembras depositan los huevos corrientemente durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escomas de su cuerpo que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos.

- 2. Larva o gusano.** Las larvas al nacer se alimentan del coreon, más tarde se trasladan a diferentes partes de las plantas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Su color varía según el alimento, pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negra más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo. Las larvas pasan por 6 ó 7 estadios o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros; el primero mide de 2-3 milímetros y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 milímetros y la cabeza es carmelita claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 milímetros en su último estadio. A partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciadas cuando la hoja se abre o desenvuelve.
- 3. Pupa.** Son de color caoba y miden de 14-17 milímetros de longitud, con su extremo abdominal (cremaster) terminando en dos pinas o ganchos en forma de "U" invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta los 8 o 10 días en que emerge el adulto o mariposa.
- 4. Adulto o mariposa.** La mariposa vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen arabescos o figuras irregulares llamativas en las alas delanteras, y las traseras son blancas. En reposo doblan sus alas sobre el cuerpo, formando un ángulo agudo que permite la observación de una prominencia ubicada en el tórax. Permanecen escondidas dentro de las hojarascas, entre las malezas o en otros sitios sombreados durante el día, son activas al atardecer y/o durante la noche, son capaces de desplazarse a varios kilómetros de distancia, especialmente cuando soplan vientos fuertes.

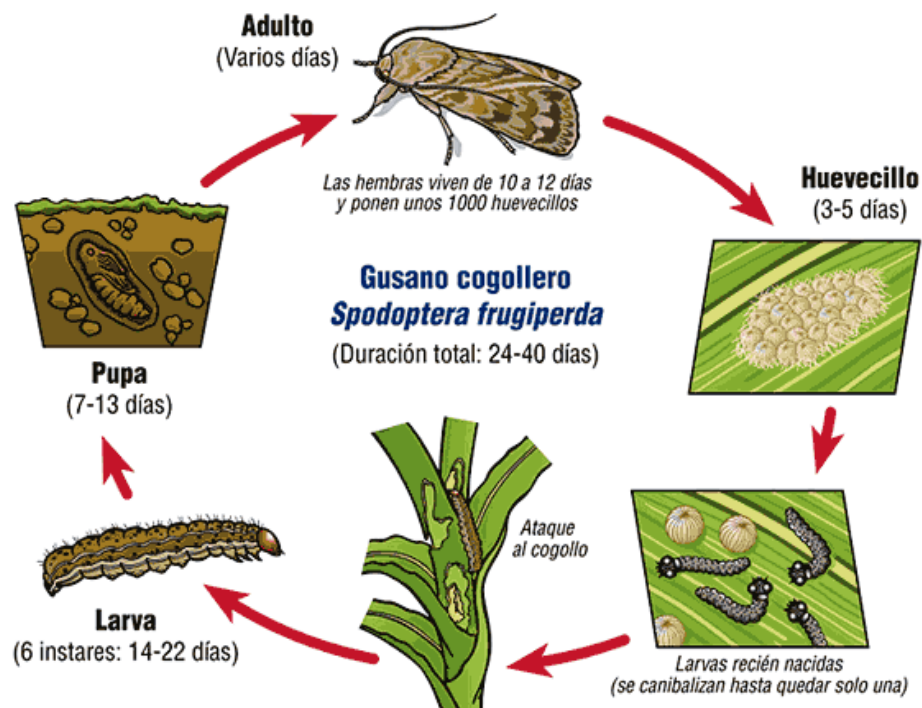


Figura 1. Ciclo biológico de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L).

4.7 Control

Las prácticas de control químico para este tipo de plaga, es utilizar insecticidas líquidos y aplicarlo cuando el cultivo del maíz se encuentre en estado de plántula o jiloteo, también se puede utilizar productos granulados (Rodríguez y Marín, 2008). Se necesita aplicar insecticidas, como Clorpirifos, Carbaril y Paratión metílico, todos estos químicos deben aplicarse hacia el punto de crecimiento de la planta cuando la presencia de las larvas no rebasen el tercer instar de desarrollo (Cortez *et al.*, 2002).

También se ha recurrido al uso de enemigos naturales como una alternativa al control químico, el cual, se define como la manipulación deliberada por el hombre de entomopatógenos (bacterias, hongos, nematodos y virus) y entomófagos (depredadores y parasitoides) para reducir la población de *Spodoptera frugiperda* a nivel que no produzca daños económicamente importantes (Ruíz, 2001).

4.8 Generalidades de los hongos entomopatógenos

Existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos y alrededor de 100 géneros (López y Hans, 2001). Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (López y Hans, 2001). La FAO (2003), resalta a los géneros de mayor uso comercial, entre los que destaca: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

Estos microorganismos infectan a los artrópodos, principalmente a los órdenes: Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Tanada y Kaya, 1993; Humber, 1997), a través de la penetración de la cutícula y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Motta y Murcia, 2011). Producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, químicamente diversos; algunos de ellos, son muy potentes desde el punto de vista biológico, causan severas reacciones adversas en otros organismos, eliminan la competencia de los nutrientes y facilitan el establecimiento del patógeno (Pucheta *et al.*, 2006). Asimismo, contribuyen a la integridad estructural del hospedero al inhibir el proceso selectivo de sus enzimas y a interferir con su sistema regulador, además, de realizar funciones completamente diferentes dentro de la célula antes de ser secretada y facilitar el movimiento de los iones a través de las membranas (St Legar, 1997).

Los estados de ninfa y larva son más susceptibles a los ataques de hongos entomopatógenos que los adultos, en otros ocurre lo contrario; los estados de huevo y pupa frecuentemente no son infectados (Tanada y Kaya, 1993). Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial para ser empleados como biocontroladores (Cañedo y Ames, 2004). Por ejemplo, los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, tienen un amplio uso y aceptación por su especificidad y efectividad como insecticidas biológicos (Cañedo y Ames, 2004; Morales *et al.*, 2009; García y González, 2010) y suelen comercializarse en preparados a base de esporas (Giraldo, 2009).

4.9 *Metarhizium anisopliae*

Es un hongo imperfecto (Hyphomycete) que presenta reproducción asexual, perteneciente a la división Deuteromycetes, fue uno de los primeros microorganismos que se usaron para el control de insectos plaga. Este hongo fue aislado por primera vez por Metschnikoff en 1879, del escarabajo gallo del trigo; dicho aislado fue el *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae) descrito por Sorokin (Lezama, 1995). Esta especie presenta un alto potencial de uso en la regulación de plagas en todos los agroecosistemas del mundo, tanto en aplicaciones inundativas, como en estrategias de conservación (Faria *et al.*, 2007; Meyling, 2007; Jabbour, 2009). Ha sido recomendado en muchos cultivos y se aplica en diversas regiones contra una gran diversidad de insectos fitófagos; de diferentes órdenes y familias, así como ácaros (Shi, 2008). Presenta carácter cosmopolita y gran diversidad genética (Inglis, 2008), además, de ser un agente seguro sin riesgos para el hombre y el medio ambiente (Zimmermann, 2007; Torriello, 2009).

En estudios se ha demostrado que el uso de *Metarhizium anisopliae* infecta a más de 200 especies de insectos, dentro de los ordenes Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera y Coleoptera, en este último se ha reportado 134 especies de hospederos, principalmente en las familias Curculionidae, Elateridae y Scarabaeidae (Zimmermann, 1993). 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 (Monzón, 2001). Es una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo, en relación con su producción masiva y comercialización como bioplaguicida (Kabaluk, 2005; Faria *et al.*, 2007).

4.10 Clasificación taxonómica

La mayoría de los hongos entomopatógenos se clasifican dentro de la división Eumycota, que se caracterizan por no formar plasmodio o pseudoplasmodio y por no presentar una fase asimilativa típicamente filamentosa. La subdivisión Deuteromycotina (**Cuadro 2**), se caracteriza por no presentar un estado sexual, por lo que se conocen como hongos imperfectos y están integrados en tres clases: Hyphomycetes, Blastomycetes y

Coelomycetes. La más importante es Hyphomycetes, porque abarca la mayoría de las especies conocidas como patógenos de insectos (Ignoffo *et al.*, 1996).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae* (Alexopoulos, 2010).

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

4.10.1 Características macroscópicas y microscópicas

Metarhizium anisopliae presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino. Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro. Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 μ de longitud y de 2 a 4 μ de diámetro. Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3.5 a 9 μ de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Cañedo y Ames, 2004).

4.11 Efecto entomopatógeno

El ciclo patogénico de *Metarhizium anisopliae* se divide en seis etapas que son: adhesión de esporas, penetración, invasión, colonización, muerte y emergencia de estructuras del hongo sobre la epicutícula (**Figura 2**) (Ojeda *et al.*, 2011).

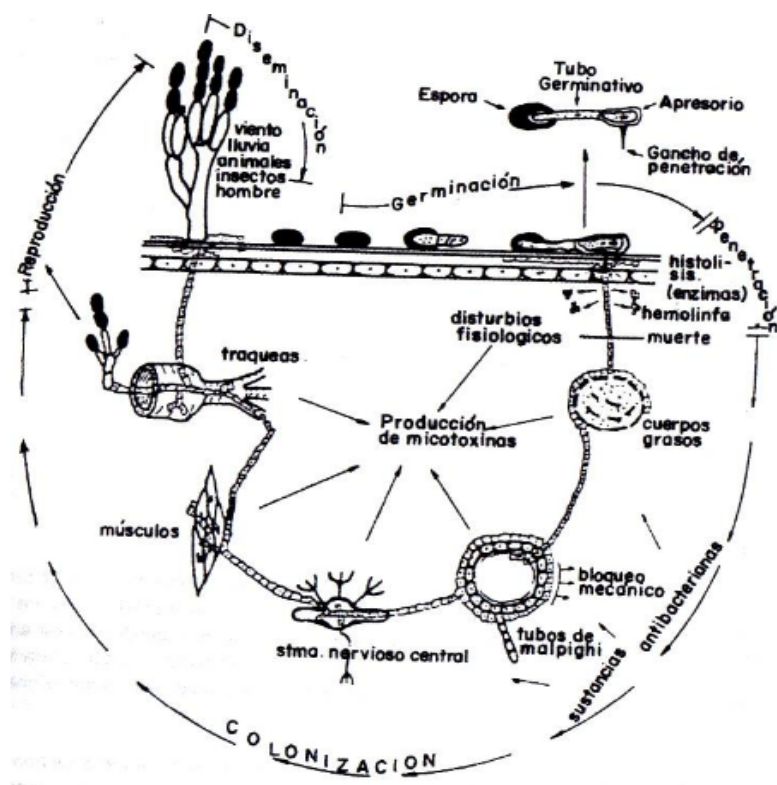


Figura 2. Ciclo patogénico de *Metarhizium* spp. Alves (1998).

a) Adhesión de los conidios. Los conidios se adhieren a la superficie del insecto a las 24 hrs. después de la infección, iniciando el hongo el proceso patogénico (Arruda *et al.*, 2005; Kurtti y Keyhani, 2008).

b) Penetración. La principal vía de penetración se lleva a cabo a través del tegumento. Una vez que los conidios se adhieren a la cutícula del artrópodo, germinan y forman tubos germinativos que invaden la cutícula, forman estructuras denominadas apresorios y penetran la superficie de la cutícula y en casos especiales, por el aparato bucal, orificio anal y genitales (Bittencourt *et al.*, 1999; Arruda *et al.*, 2005); por medio de la combinación de procesos físicos y enzimáticos, *Metarhizium anisopliae* tiene la capacidad para sintetizar enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas, proceso que ocurre a 48 hrs. post-infección. La primera barrera para la penetración es la epicutícula para la acción de las lipasas específicas (enzimas producidas por *Metarhizium anisopliae*) relacionadas con la pre-penetración y crecimiento en la cutícula del hospedero (Silva *et al.*, 2009). Además, posee la proteína quitinasa A, importante para la diferenciación de las

estructuras apresoras, penetración y degradación de la cutícula, adquisición de nutrientes, regulación de pH, síntesis de lípidos, control del ciclo celular y del citoesqueleto (Fang *et al.*, 2009).

c) Invasión. A las 96 hrs. post-infección las hifas colonizan el huésped y emergen de la cutícula. Una vez dentro del insecto, el hongo se disemina vía hemolinfa y produce blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero y se multiplican rápidamente en los tejidos (Kaaya *et al.*, 1993; Asaf *et al.*, 2002; Kurtti y Keyhani, 2008).

d) Colonización. La colonización del hongo en los órganos del artrópodo se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malpigio, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea. Bittencourt *et al.*, (1999) mencionan que la penetración del hongo en los órganos ocurre a los cuatro días post-infección invadiendo también los órganos reproductivo y digestivo.

e) Muerte. Esta etapa se caracteriza por la producción de micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas (Rath *et al.*, 1995).

f) Emergencia. Se produce después de la muerte del insecto y cuando las condiciones de humedad relativa son adecuadas. La emergencia del micelio se realiza a través del tegumento, crece en la superficie y esporula después entre las 48 a 60 hrs. de la muerte del hospedero (Smith *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2005).

4.12 Producción de enzimas

Los hongos entomopatógenos producen un gran número de enzimas las que son de utilidad relevante para su acción sobre el hospedero, pues le permite convertir los tejidos de los insectos en nutrientes para su crecimiento. Las enzimas son las que determinan la virulencia, porque permiten al patógeno coexistir con los procesos metabólicos cambiantes asociados a los estados de las enfermedades del hospedero (Pucheta *et al.*, 2006).

Las cutículas son muy poco utilizadas por la mayoría de los hongos, pero es indispensable su penetración para la completa invasión, por lo cual, han desarrollado un poderoso sistema enzimático; dentro de los que se encuentra un amplio espectro de proteasas muy activas para la penetración de la epicutícula hidrofóbica (Saksirirat y Hoppe, 1991). La variación en la virulencia se puede relacionar con la producción y actividad enzimática de las especies de este género, durante la penetración en la cutícula del hospedero (Borges *et al.*, 2010).

4.12.1 Lipasas

La producción de lipasa por un hongo entomopatógeno contribuye significativamente en la penetración y provisión de nutrientes *in vivo*. Las lipasas actúan sobre los lípidos antes que las quitinasas. Una vez que la superficie lipídica de la epicutícula es degradada por las lipasas, el hongo produce grandes cantidades de proteasas (Pr1), para degradar el material proteínico de la procutícula que se encuentra adherida como una cubierta de la quitina. Sólo a través de la acción coordinada y combinada de las tres principales enzimas hidrolíticas, (proteasa, quitinasa y lipasa) se puede llevar a cabo la desintegración completa de la cutícula del insecto hospedero (Hegedus y Khachatourians, 1995).

4.12.2 Quitinasas

Es el principal componente estructural en las paredes celulares de los hongos y de exoesqueletos de invertebrados (Warren, 1996). Están ampliamente distribuidas en plantas, así como también en bacterias, hongos, insectos y vertebrados (Xiang *et al.*, 2005). La principal función de estas enzimas es hidrolizar quitina; en el caso de los hongos esta enzima participa en la modificación de la morfogénesis de su pared celular (Sahai y Manocha, 1993). Estas enzimas modulan el crecimiento y la autólisis de paredes celulares de hongos que contienen quitina y también están involucradas en micoparasitismo (Lorito *et al.*, 1998), así como en actividades de hongos entomopatógenos y hongos nematófagos hacia sus hospederos (Tikhonov *et al.*, 2002). Los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* producen varias quitinasas (St. Leger *et al.*, 1986; Kang *et al.*, 1999), las cuales pueden tener una gran variedad de funciones. Algunas de ellas son

importantes enzimáticas que participan en la degradación de la cutícula y actúan en forma coordinada con proteasas para hidrolizar la cutícula del insecto hospedero (St. Leger *et al.*, 1986).

4.13 Producción de toxinas

Los hongos entomopatógenos poseen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedero. El estudio de estas toxinas (dextruxinas, demetildestruxina y protodextruxina) es de suma importancia ya que se pueden sintetizar productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acaricida y nematocida (Hall, 1981 ; Wang *et al.*, 2005). Las toxinas son importantes para microorganismos parásitos, ya que facilitan la infección por debilitamiento del hospedero. Algunas especies de hongos entomopatógenos son capaces de producir ácidos orgánicos y algunos de ellos han sido implicados en el proceso infeccioso. Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *B. bassiana*, *L. lecanii*, *P. fumosoroseus* y *M. anisopliae*, este último produce toxinas llamadas dextruxinas que pueden matar insectos. Las dextruxinas son los compuestos mejor caracterizados, y a que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos (Pucheta-Díaz, 2006).

4.14 Factores que afectan el desarrollo de los hongos entomopatógenos

Entre los factores abióticos y bióticos que afectan la estabilidad y persistencia de los hongos entomopatógenos, se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los fungicidas (Hajek y St. Leger, 1994; Pucheta-Díaz, 2006). El huésped es un factor biótico importante que afecta la propagación, dispersión y persistencia, mismo que se relaciona con los nutrientes presentes y la etapa de desarrollo más susceptible a los hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2001).

4.14.1 La temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que influye en la germinación, crecimiento vegetativo (Rath, 2000; Inglis *et al.*, 2001), además en el proceso de infección, así como en la persistencia en campo (Ouedraogo *et al.*, 1997). Se ha reportado que la

temperatura óptima para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de los hongos Hyphomycetes oscila entre 20 y 30 °C (Goettel e Inglis, 1997; Inglis *et al.*, 2001). Este factor ambiental es relevante para la eficacia de agentes microbianos fúngicos por incidir en su crecimiento vegetativo, además, ser considerada como un punto de partida para la selección de cepas nativas con potencial para el control biológico (Luz y Fargues, 1997).

4.14.2 Humedad relativa

La humedad relativa es el segundo factor ambiental más importante relacionado con la formación de epizootias en las poblaciones de insectos y muerte de los mismos (Fuxa y Tanada, 1987), así como de terminante en su desarrollo y propagación (Rath, 2000). Usualmente, la germinación de la conidia de los hongos entomopatógenos ocurre en un rango de humedad relativa entre el 90-100%, sin embargo, Tanada y Kaya (1993), mencionan que en este rango de humedad relativa, ayuda a la germinación de la espore y induce a la esporulación. Por lo tanto, el potencial epizootico de los hongos depende también de la producción de conidios del cadáver del insecto (Luz y Fargues, 1998). El micelio normalmente permanece en el suelo en una atmósfera cercana al 99% de humedad relativa (Zimmermann, 1986). Los hongos entomopatógenos que se utilizan en el control de insectos plaga en la agricultura, también pueden ser afectados por agroquímicos, como los fungicidas, insecticidas o herbicidas (Zimmermann, 1986). Por otro lado, las prácticas culturales también influyen en la densidad de propágulos de los hongos entomopatógenos en los agroecosistemas.

4.14.3 Precipitación, radiación solar y suelo

La lluvia juega un papel importante en la dispersión de los conidios (Inglis *et al.*, 2001); que le permite al hongo entomopatógeno dispersarse (Inyang *et al.*, 2000). Por otra parte, la radiación solar es el factor ambiental más destructivo que afecta la persistencia de los hongos entomopatógenos, siendo su espectro dañino entre 290 y 315 nm (Inglis *et al.*, 2001). La alta incidencia de este factor puede estimular o dañar el desarrollo de los hongos, dependiendo de la especie (Moore *et al.*, 1993). Se estima que el periodo de vida media para los conidios expuestos a la radiación solar directa, varía de unas 96 hrs (Ignoffo,

1992). La persistencia y eficacia de los hongos entomopatógenos es afectado por el tipo de suelo (textura, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica y pH) además de la humedad y la presencia de microflora (Inglis *et al.*, 2001).

4.14.4 Insecto huésped

La relación que existe entre huésped-hongo entomopatógeno está influenciada por los factores fisiológicos y morfológicos, entre los más importantes son: densidad poblacional, el comportamiento, edad, nutrición, lesiones causadas por agentes mecánicos, químicos, depredadores y parasitoides (Inglis *et al.*, 2001).

4.14.5 Nutrición

La nutrición es un factor importante que regula la susceptibilidad del insecto huésped al entomopatógeno (Urrutia *et al.*, 2006). Una nutrición inadecuada a menudo incrementa la susceptibilidad del insecto, lo que predispone a las infecciones microbianas (Sikorowski y Lawrence, 1994). Por otra parte, una buena nutrición puede disminuir la susceptibilidad del insecto hacia los hongos entomopatógenos (Ekesi *et al.*, 2000).

4.14.6 Edad

La edad se ha considerado como uno de los factores que determina la mortalidad del hospedero (Sikorowski y Lawrence, 1994), debido a que existe una edad de maduración de la respuesta inmune. Los primeros instares de desarrollo de las larvas son más susceptibles a las infecciones causadas por los entomopatógenos, al poseer un sistema inmunológico poco desarrollado (Boucias y Pendland, 1984).

4.14.7 Densidad de población

Tiene importancia en la epizootia de la enfermedad. Cuando la densidad de la población aumenta, hay una probabilidad mayor de que el insecto tenga contacto con el patógeno a través de individuos infectados o directamente con el patógeno (Inglis *et al.*, 2001). La

competencia por recursos puede ser un factor de estrés en sí mismo que favorece la susceptibilidad a determinados patógenos (Sikorowski y Lawrence, 1994).

4.14.8 Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo, así como el «estrés hídrico» y el «estrés osmótico» tienen un efecto sobre la germinación, crecimiento, virulencia y características de la superficie de los propágulos de *Metarhizium anisopliae* (Ypsilos y Magan, 2004; Rangel *et al.*, 2008).

En general, el desarrollo de los patógenos fúngicos dentro de los hospederos, puede ser afectado no sólo por las reacciones de inmunidad de los hospederos (Feldhaar y Gross, 2008); sino también, indirectamente por la composición del alimento del hospedero (Hajek y St. Leger, 1994).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

La recolecta de insectos del orden coleóptera se realizó en las comunidades de La Cañada, San Nicolás y Zoyatitla, pertenecientes al municipio de Tetela de Ocampo, Puebla (**Figura 3**). El municipio de Tetela de Ocampo se localiza en la Sierra Norte del estado de Puebla, dentro de la zona de climas templados, conforme se avanza de sur a norte se incrementa la humedad, identificándose climas que varían desde templado subhúmedo hasta el semicálido, pasando por el templado húmedo primordialmente, la temperatura del mes más frío se encuentra entre -3 y 18°C ; una precipitación media anual de 750 mm y la del mes más seco es mayor de 40 milímetros, el tipo de vegetación predominante es bosque de pino, mezclado con algunas especies de encino “bosque de pino-encino” (INEGI, 2010).

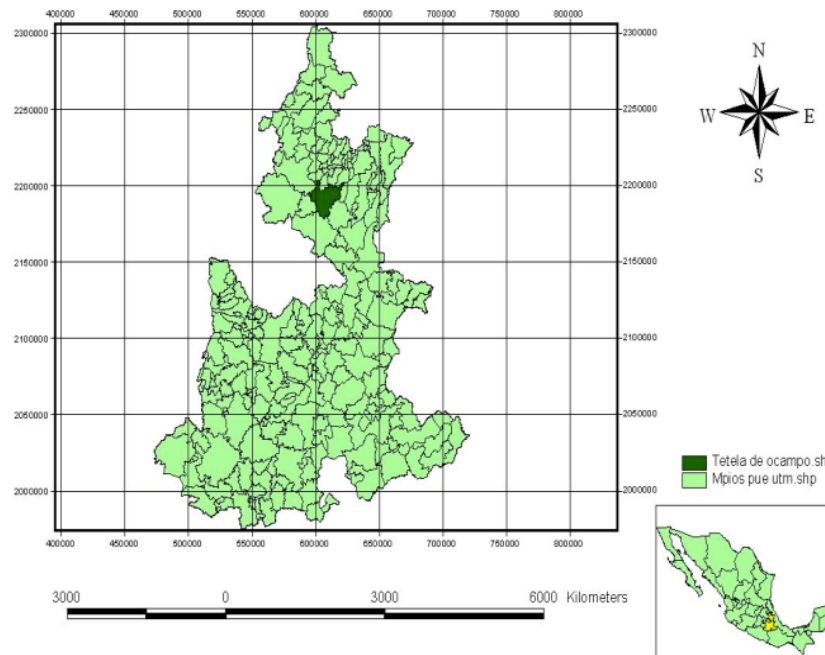


Figura 3. Localización del municipio de Tetela de Ocampo, Puebla-México.

El experimento de la presente investigación se realizó en el laboratorio de la escuela de Ingeniería Agroforestal, de la Unidad Regional Tetela de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicada en Av. Universidad S/N, Barrio Benito Juárez, Tetela de Ocampo, Puebla.

5.2 Recolecta de material biológico (insectos)

Durante los meses de mayo y junio de 2012, se realizó la recolección de material biológico, “insectos del orden coleoptera” en las comunidades antes mencionadas, donde se establecieron parcelas, mediante un muestreo dirigido. Para facilitar la captura de los insectos, se utilizó la técnica directa, que incluyó la búsqueda en hojarasca (materia orgánica) y directamente de insectos micosados y/o sospechosos.

5.3 Aislamiento y purificación de *Metarhizium* spp

Los insectos recolectados en campo que presentaron síntomas de infección (micosis) en campo, se trasladaron al laboratorio de Micología de la Unidad Regional Tetela-BUAP, donde se observó la presencia de estructuras microscópicas (micelio). Para los individuos sospechosos de la enfermedad, se realizaron lavados con agua estéril y desinfecciones con NaHClO a 0,5% durante 1 min. Seguidamente se realizaron lavados con agua estéril y se colocaron en cámaras húmedas para estimular la esporulación del hongo, lo cual se incubaron a 28°C por 7-9 días. A partir del decimo día, se observó micelio vigoroso con estructuras reproductivas sobre los insectos, posteriormente se realizaron transferencias bajo condiciones asépticas, con siembras por agotamiento en placas de petri de 9 cm de diámetro, utilizando como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), en presencia de antibióticos (estreptomycin), según el método descrito por Rhodes y Smith (1992). Las placas se depositaron en una incubadora (VWR®) durante 7 días a 28 °C. Las colonias diferenciales se transferirán a nuevas placas con medio PDA hasta lograr su purificación (**Figura 4**).

La cepa comercial de *Metarhizium*, se adquirió en la ciudad de Puebla en la empresa “Agrobionsa de México”, donde se adquirió el producto Meta-BLAS. Posteriormente se realizó una activación del micelio en placas de Petri de 9 cm de diámetro, utilizando como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a temperatura ambiente.

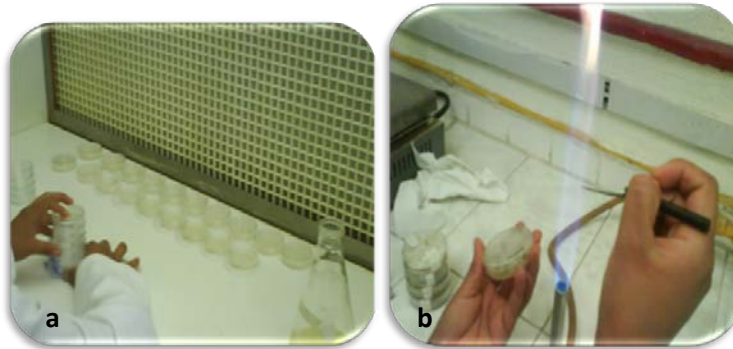


Figura 4. Purificación de la cepa nativa de *Metarhizium* spp.; a: vaciado de medio de cultivo sólido (PDA); b: transferencia de de conidios.

5.4 Identificación de *Metarhizium* spp

Una vez teniendo la cepa pura, se prepararon muestras de micelio con estructuras reproductivas del hongo, se depositaron en un portaobjetos y se le adicionó una gota de colorante de contraste (azul de lactofenol) y se realizó un barrido con una aguja de disección para distribuir la muestra y lograr la mayor visibilidad posible. Las muestras se visualizaron bajo un microscopio compuesto a diferentes aumentos (40x y 100x) identificando estructuras microscópicas (conidios, conidióforo, fiálides y esporas) tomando como base las claves propuestas por Barnett y Hunter (1998) y Carrillo (2003) (**Figura 5**) características del género *Metarhizium* y se tomaron fotografías con una cámara binocular para microscopio a 40x para su posterior digitalización (Pedraza *et al.*, 2011).



Figura 5. Identificación de *Metarhizium* spp.

5.5 Identificación del insecto

Para identificar el insecto en donde se aisló el hongo entomopatógeno (*Metarhizium* spp), se realizó a través del uso de la guía rápida para la identificación de insectos de McGavin (2000); en donde se observó la taxonomía del insecto y se comparó con las características descritas en la guía.

5.6 Preparación de la dieta

Se preparó la dieta artificial de S O U T H L A N D P R O D U C T S I N C (870 -265-3747) que incluyó una serie de sustancias sintéticas a base de harinas de soya y de trigo, conservadores y complejos vitamínicos (Montes *et al.*, 2001).

La dieta artificial fue elaborada en base a una modificación realizada por Dilcia *et al.*, (1989). Para lo cual, se realizó 1, 420.00 mL de dieta en dos etapas. Primero se midió 710 mL de agua destilada estéril en una probeta, luego se colocó en un recipiente de aluminio y se puso a hervir durante 5 minutos, inmediatamente se retiró del fuego y se colocó 150 grs de dieta S O U T H L A N D y se disolvió con un agitador electrónico hasta homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se colocó a baño María y con una micropipeta se colocó 5 mL de dieta sobre vasos transparentes de plástico y se dejó solidificar (**Figura 6**).



Figura 6. Preparación de la dieta artificial

5.7 Preparación de suspensiones

Se tomaron preparaciones de medio de cultivo (PDA) con aislados monospóricos de cepas de *Metarhizium* spp (una comercial y otra nativa), de 25 días de desarrollo, posteriormente se agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) para suspender y remover esporas y conidios. Después de 15 minutos se realizó la recuperación y aforación de la mezcla a 10 mL en una probeta graduada, de esta forma que dó preparada la suspensión madre (**Figura 7**); de la cual, se tomó un 1 mL y se depositó en tubos de ensayo con 9 mL de (ADE), quedando de esta manera preparada la dilución 10-1; se repitió el procedimiento llevando 1 mL de esta dilución (10-1) a tubos con 9 mL de ADE, hasta obtener una dilución de 10-10 (Benítez, 2002). Para el ensayo de mortalidad en la presente investigación, se tomaron las diluciones 10-1, 10-5 y 10-10 para ambas cepas de *Metarhizium* spp.



Figura 7. Preparación de suspensiones

5.8 Conteo de conidios

A partir de las diluciones que se realizaron anteriormente, se determinó la concentración de conidios, tomando una muestra de 60µ con una micropipeta, posteriormente se depositó en la placa de la cámara de Neubauer y se observó al microscopio a 10x y 40x (**Figura 8**). El proceso de recuento de conidios (Benítez, 2002), se realizó tres veces con la siguiente fórmula:

$$\text{Totales Esporas} = \frac{\text{No. de esporas}}{8} \left[10^4 \right]$$



Figura 8. Conteo de conidios en cámara de Neubauer

5.9 Inoculación

Las larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) de tercer instar utilizados en la presente investigación, provienen de un criadero del departamento de fitosanidad del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, Estado de México. La metodología para la inoculación de los tratamientos consistió en colocar 20 larvas en inmersión en una caja petri (**Figura 9**), posteriormente se retiró el exceso de inóculo sobre las larvas (Lucero *et al.*, 2004) y se colocó cada una de ellas en recipientes de plástico con tapa semitransparente de 25 mL de capacidad con tapa, la cual, posee una ventana circular en el centro facilitando el intercambio gaseoso con 5 mL de dieta (Arévalo y Zenner, 2009) y se incubaron a 28 °C.



Figura 9. Inoculación de larvas de gusano cogollero con *Metarhizium* spp.

5.10 Diseño experimental

El diseño para la presente investigación fue de bloques al azar, donde se compararon tres concentraciones de conidios (10-1, 10-5 y 10-10) con dos cepas de *Metarhizium* spp. En total se evaluaron 6 tratamientos, cada tratamiento tuvo 40 repeticiones; teniendo así, un total de 240 larvas de tercer instar de gusano cogollero.

Las larvas se evaluaron cada 24 horas, a partir del tercer día de haber iniciado el experimento. La mortalidad se determinó visualmente; las larvas vivas tendieron a moverse cuando estuvieron expuestas a la luz, asimismo cuando se agitaron los vasos de plástico transparente. La sospecha de muerte, se confirmó por la ausencia de movimiento de la larva al ser tocada la superficie ventral del tórax con unas pinzas esterilizadas. Las larvas muertas se seleccionaron en bandejas por separado y estuvieron en observación hasta cuando se detectó la esporulación de *Metarhizium* spp. Durante el periodo de monitoreo, se registró el número de larvas vivas y el de cadáveres con esporulación debido al efecto del hongo entomopatógeno (Nájera *et al.*, 2005).

La mortalidad expresada en porcentaje, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% M = \frac{L_v \times 100}{P_o}$$

Donde:

%M = Porcentaje de mortalidad larval

P_o = Población inicial

L_v= larvas muertas por el tratamiento

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de separación de medias por Tukey ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 (Statistical Package for Social Sciences) para determinar diferencias entre los tratamientos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de *Metarhizium* spp

Se recolectaron un total de 58 insectos del orden coleóptera de las comunidades de San Nicolás, La Cañada y Zoyatitla, pertenecientes al municipio de Tetela de Ocampo Puebla. Los insectos sospechosos de micosis se colocaron en cámaras húmedas, al término de 7 días no se observó infección por micosis. Sin embargo, se observó un insecto infectado en campo, correspondiente a la comunidad de San Nicolás (**Cuadro 3**), donde a los diez días en cámara húmeda, se observó micelio vigoroso que posteriormente se aisló en medio de cultivo sólido PDA.

Cuadro 3. Aislamiento de hongos entomopatógenos en insectos del orden coleóptera en el municipio de Tetela de Ocampo, Puebla.

Comunidad	Insectos infectados por hongos entomopatógenos	
	Sospechosos	Esporulación en cámara húmeda
La Cañada	24	0
San Nicolás	18	1
Zoyatitla	16	0

6.2 Identificación del hongo

El género *Metarhizium* durante su desarrollo pasa por dos etapas, la primera corresponde al crecimiento de micelio, que se caracterizó por presentar micelio blanco de textura lanosa y la etapa de esporulación; en la cual, aparecieron discos concéntricos delimitando las zonas de esporulación y mostraron una coloración verde olivo (Barajas *et al.*, 2009). Tiene la capacidad de colonizar sustratos y producir una gran cantidad de enzimas.

Se identificó morfológicamente una cepa de *Metarhizium* spp., localizada en San Nicolás, Tetela de Ocampo, Puebla; cuyas características macroscópicas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) incubadas a 28°C, incluían colonias concéntricas con crecimiento radial en un lapso de siete a diez días y una coloración verdosa (**Figura 10**).



Figura 10. Crecimiento de *Metarhizium* spp., nativa en medio de cultivo PDA.

La cepa pura con características macroscópicas relevantes del género *Metarhizium*, se identificaron taxonómicamente mediante la prueba de tinción, realizado por medio de una coloración de azul de lactofenol, donde presentó hifas y micelio ramificado, conidióforo de 12μ de longitud, fiálides cilíndricas y adelgazadas en el ápice, con una longitud de 5μ de longitud x 2.5μ de diámetro, conidias cilíndricas y truncadas en el ápice con 3.9μ de longitud y 1.8μ de diámetro (**Figura 11**). Estas características microscópicas permiten una identificación fácil y relativa del género *Metarhizium*.

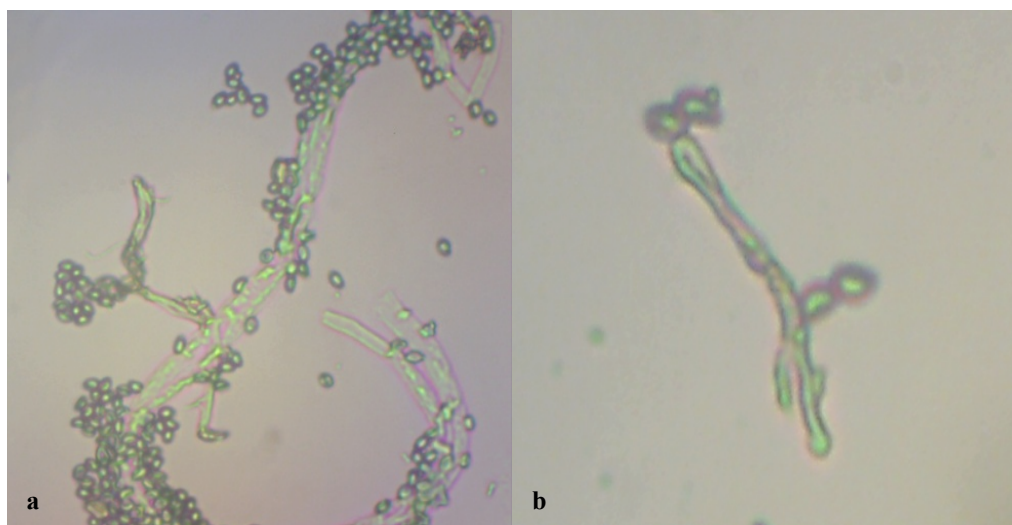


Figura 11. Identificación microscópica de cepa nativa de *Metarhizium* spp.; **a:** hifas y micelio ramificado, **b:** características del conidióforo, fiálide y conidio. Resolución a. x1300; b x1600.

Estos datos son semejantes a los obtenidos por Elósegui *et al.*, (2006), donde realizaron un trabajo de aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitospóricos y reportaron que el aislado correspondiente a *Metarhizium anisopliae* con clave Ma-30, presenta características macroculturales en medio PDA: colonias blancas y algodonosas al inicio que se tornan amarillo verdoso y finalmente verde olivo oscuro y costroso con zonas con micelio aéreo abundante blanquecino y el reverso amarillo intenso; asimismo, presenta conidioforo con verticilos de 2-3 ramas cada uno, con tonos verde olivo oscuro que aclara alápice, células conidiógenas 6,0-10,0 (8,1 μ) x 2,0-2,5 (2,1 μ), conidios subhialinos a ligeramente verdes, cilíndricos a ligeramente elipsoidales, 5,0-8,5 (6,6 μ) x 2,0-3,0 (2,4 μ).

Trabajos realizados por Elósegui *et al.*, (2006) obtuvieron un aislado de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin aislado de una muestra de suelo del insecto *Galleria mellonella* y otro de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) de un total de 17 muestras. Por su parte, Sun (2002), logró 6,7% de éxito para *Metarhizium* y 10% de éxito para *Beauveria* spp., en *Coptotermes formosanus* a partir de 90 muestras de suelo e insectos muertos sospechosos de micosis. Este comportamiento se puede atribuir a la efectividad del método de trampeo con insectos susceptibles, donde se requiere de una cantidad de propágulos viables que garantice la infección, los que deben ser de l orden de 1×10^4 unidades por insecto como mínimo según Bateman *et al.*, (1996) También existe la posibilidad de que los microorganismos competidores con su producción de metabolitos activos afecten la viabilidad de estos propágulos fúngicos de seados (Jenkins y G rzywacz, 2000). Sin embargo, Jackson *et al.*, (2000) plantean que aunque este método de aislamiento directo conlleva mucho tiempo de muestreo en campo y experiencia, la realidad es que entre los más exitosos agentes de control con microorganismos se encuentran aquellos aislados obtenidos directamente de los insectos hospederos, y no de las colecciones de cultivos o de métodos indirectos a través de medios de cultivo selectivos (Moore y Caudwell, 1997).

6.3 Identificación taxonómica del insecto micosado por *Metarhizium* spp

El insecto del cual se aisló *Metarhizium* spp., fue identificado como *Phyllophaga* spp; teniendo como características morfológicas: 3 cm de largo, color rojizo a pardo oscuro, frente con abundantes sedas medianas o cortas y erectas, pronoto brillante con puntos irregularmente distribuidos y con sedas erectas, largas y esparcidas, élitros glabros y brillantes, maza antenal 1.5 veces más larga que el funículo, pigidio brillante con sedas cortas irregularmente distribuidas. Todas las uñas tarsales dentadas, el denticulo es grande y esta blanqueado por escotaduras estrechas y profundas, presentó pelos sobre el cuerpo, élitros duros y resistentes que protegen a las alas posteriores. Este insecto presentó colonias en el exoesqueleto del insecto, principalmente en las alas anteriores que conforman el abdomen y cabeza del escarabajo; asimismo, se observó micelio en el tórax, con una consistencia blanquecina que representa el estado de crecimiento micelial (**Figura 12**), el cual, posteriormente se identificó como *Metarhizium* spp.

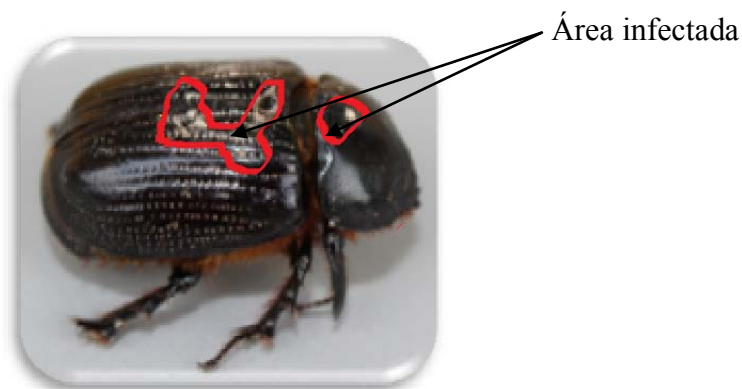


Figura 12. *Phyllophaga* spp. infectado por *Metarhizium* spp.

De acuerdo a las claves taxonómicas y siguiendo metodología por McGavin (2000), se determinó la clasificación del insecto infectado por *Metarhizium* spp (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Identificación taxonómica de *Phyllophaga* spp.

Reino	Animal
Phylum	Atrópoda
Clase	Insecta
Orden	Coleóptera
Familia	Scarabaeidae
Género	<i>Phyllophaga</i>
Especie	spp.

En trabajos realizados por Hernández *et al.*, (2011), se reportan en el estado de Morelos, el aislamiento e identificación de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Phyllophaga* spp., con síntomas de infección de enfermedad lechosa y micelio abundante, resultados parecidos a los encontrados en este trabajo de investigación.

6.4 Concentración de conidios de *Metarhizium* spp

Mediante el conteo de conidios en cámara Neubauer, se determinó la concentración de conidios de cada una de las concentraciones utilizadas. La mayor concentración de conidios se obtuvo en *Metarhizium* nativo 1/10 con 53×10^4 con/mL y *Metarhizium* comercial 1/10 con 36×10^4 con/mL (**Figura 13**). Las concentraciones más bajas se obtuvieron con *Metarhizium* nativo 5/10, *Metarhizium* comercial 5/10, *Metarhizium* nativo 10/10 y *Metarhizium* comercial 10/10; con 9×10^4 , 7×10^4 , 5×10^4 y 4×10^4 con/mL respectivamente. No se observó diferencias significativas de concentraciones entre *Metarhizium* comercial 10/10 y *Metarhizium* nativo 10/10 y de esta última concentración con *Metarhizium* comercial 5/10. Por su parte, las concentraciones de *Metarhizium* nativo 5/10, *Metarhizium* comercial 1/10 y *Metarhizium* spp., nativo 1/10, mostraron diferencia significativa (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Prueba de rangos múltiples de concentraciones (Tukey).

Variable	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		e	d	c	b	a
<i>Metarhizium</i> Comercial 10/10	3	4,5033				
<i>Metarhizium</i> Nativo 10/10	3	5,9567	5,9567			
<i>Metarhizium</i> Comercial 5/10	3		7,3367			
<i>Metarhizium</i> Nativo 5/10	3			9,7533		
<i>Metarhizium</i> Comercial 1/10	3				36,9200	
<i>Metarhizium</i> Nativo 1/10	3					53,1700

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

*Datos ubicados en columnas iguales significan que no hay diferencia estadística entre la concentración de conidios entre cepa nativa y cepa comercial de *Metarhizium* spp.

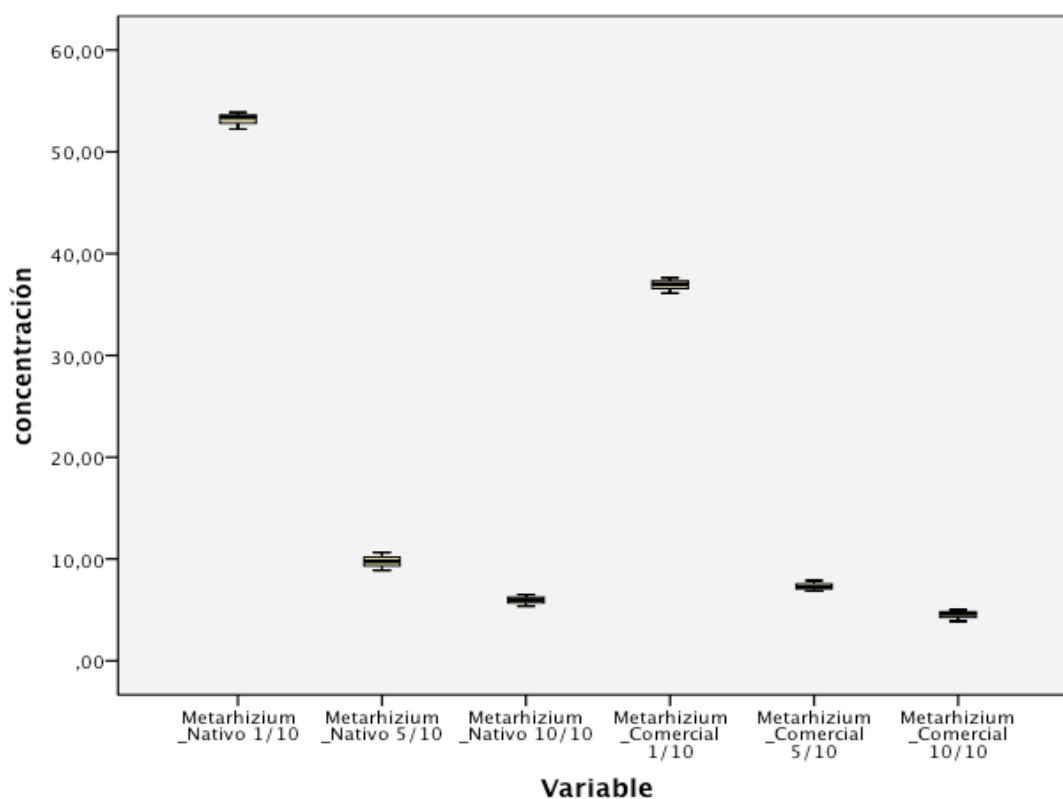


Figura 13. Concentración de conidios/mL de cepa nativa y cepa comercial de *Metarhizium*.

6.5 Colonización de *Metarhizium* spp., nativo sobre larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*)

La esporulación de *Metarhizium* spp, sobre larvas, se realizó de 5 a 6 días después de su muerte. Inicialmente aparecieron colonias blancas algodonosas, características del estado de crecimiento del micelio (**Figura 14**). La emergencia del hongo se realizó por diferentes vías, tales como el aparato bucal y abdomen. En la **Figura 14a** se observa que la emergencia del hongo se realizó en la parte inferior de la cabeza, colonizando el aparato bucal e invadiendo el cuerpo de la larva mediante la producción de enzimas; por su parte en la **Figura 14b**, se observan dos colonias de *Metarhizium* spp., en diferentes zonas, la primera está ubicada en la parte lateral del tórax y la segunda en el abdomen; así mismo en la **Figura 14c**, se observa la esporulación del hongo en la parte inferior del abdomen y por último en la **Figura 14d**, se observa la esporulación de hongo con coloración verdosa, característico de este género. Estas imágenes nos muestran la habilidad que tiene *Metarhizium* spp., para colonizar a su hospedero mediante los mecanismos de acción de este hongo; el cual, invade el cuerpo del artrópodo hospedero a través de la cutícula y posteriormente se reproduce en él, favoreciendo así la transmisión horizontal del hongo y además puede tener efecto sobre la reproducción del organismo que está siendo atacado (Quesada *et al.*, 2004). De manera general, la muerte del insecto se debe a una combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, desnutrición y por la acción de los metabolitos secundarios o toxinas que el hongo produce (Chul *et al.*, 1999).

La presencia de *Metarhizium* spp., se observó también sobre pupas (**Figura 14f**), ya que la infección puede ocurrir si hay entrada de esporas a las células, antes de que éstas sean operculadas, pero una vez que esto ha ocurrido, la pupas en desarrollo están en un ambiente cerrado, de alta humedad y al parecer muy propicio para el desarrollo de los hongos entomopatógenos, ocasionando la muerte del hospedero e impidiendo la emergencia del adulto (Espinosa *et al.*, 2011).



Figura 14. Colonización de *Metarhizium* spp., nativo, sobre larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*); **a**, **b** y **c**: colonización de *Metarhizium* spp., en estado de crecimiento sobre el cuerpo de la larva; **d**: esporulación del hongo con crecimiento radial y coloración verdosa; **e**: conidias de *Metarhizium* spp., observadas en microscopio (resolución 40X) y **f**: emergencia y colonización de *Metarhizium* spp., sobre pupa de gusano cogollero.

6.6 Mortalidad de larvas

Las concentraciones evaluadas durante las 72-168 hrs. post-infección, *Metarhizium* nativo 1/10 (53×10^4 con/mL) causó mayor mortalidad con 29 larvas, equivalentes al 72.5% del total de la población correspondiente a este tratamiento; teniendo diferencias significativas con las demás concentraciones, posteriormente *Metarhizium* nativo 5/10 (9×10^4 con/mL) con un total de 22 larvas (55%), inmediatamente *Metarhizium* comercial 1/10 (36×10^4 con/mL) con 21 larvas (52.5%), luego *Metarhizium* nativo 10/10 (5×10^4 con/mL) con 19 larvas (47.5%), *Metarhizium* comercial 5/10 (7×10^4 con/mL) con 17 larvas (42.5%) y finalmente *Metarhizium* comercial 10/10 (4×10^4 con/mL) con 13 larvas (32.5%) (Figura 15 y 16).

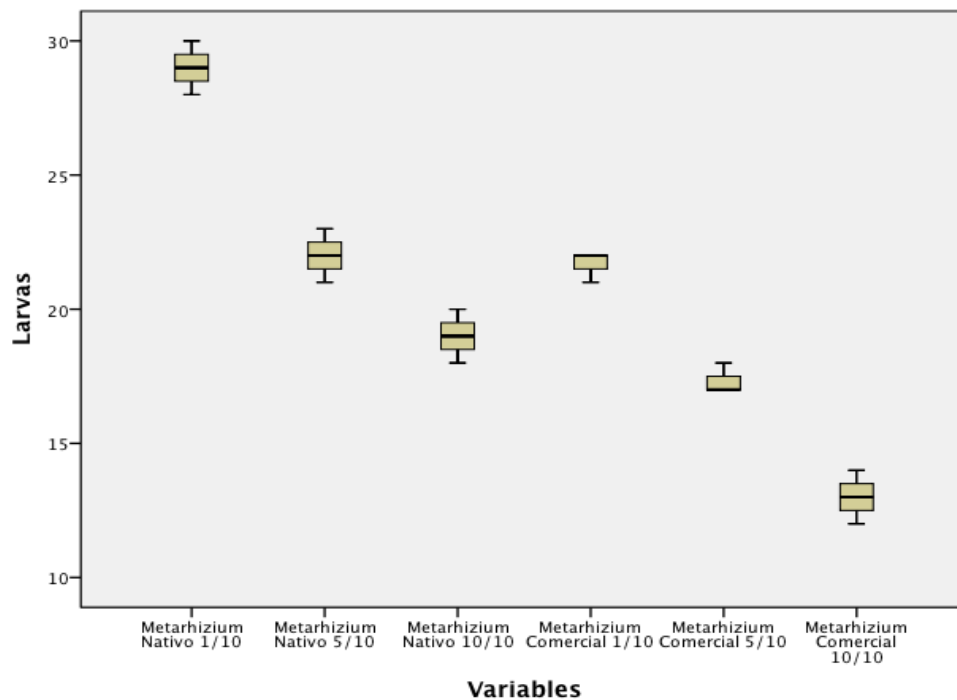


Figura 15. Mortalidad de larvas a diferentes concentraciones de con/mL de cepa nativa y comercial de *Metarhizium* spp.

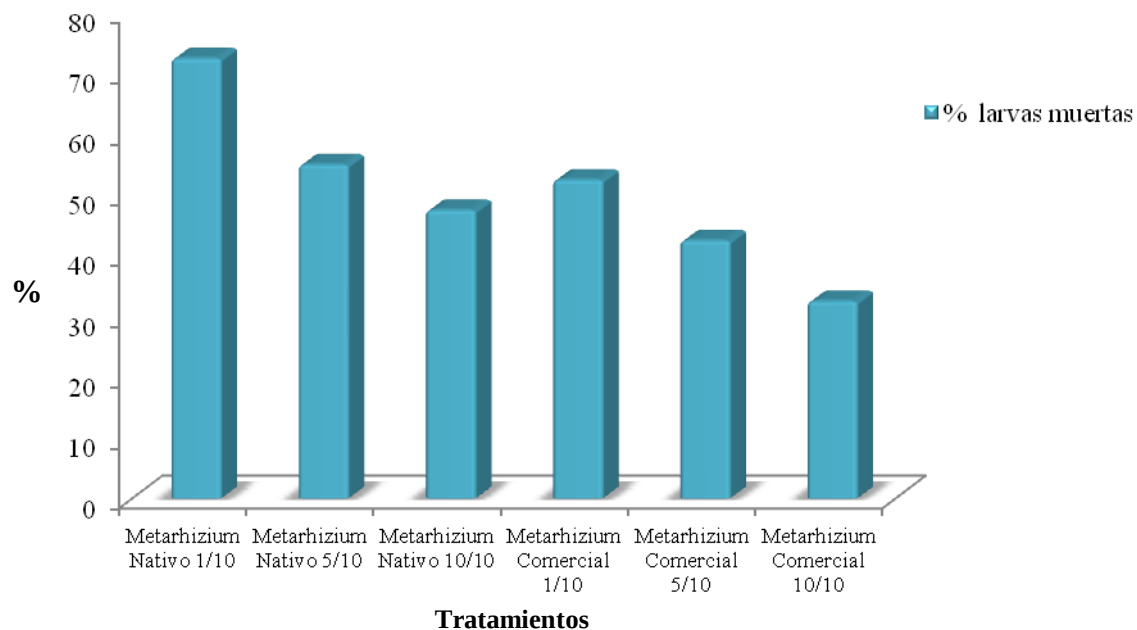


Figura 16. Porcentaje de larvas muertas a diferentes concentraciones de con/mL de *Metarhizium* nativo y comercial.

Estos datos son parecidos a los reportados por Soto (2008), donde reportó una mortalidad del 68% de larvas neonatas de gusano cogollero bajo una concentración de 1.2×10^5 conidias/mL adicionada con una gota de tween 80 y observadas a las 72 hrs. después de haber realizado el experimento en laboratorio. Por su parte García *et al.*, (2011) reportaron un alto rango de mortalidad de larvas de *Epilachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda* del 93.2 al 100% a las 72 hrs. después de haber iniciado el experimento a una concentración de 1×10^9 esporas mL^{-1} , utilizando dos aislamientos de Bb18 y Bb42 de *Beauveria bassiana* y Ma91 de *Metarhizium anisopliae* en laboratorio.

Sin embargo Pérez *et al.*, (2001) mencionan que las cepas de *Metarhizium anisopliae* causaron una mortalidad superior al 50% sobre *A. insularis* a las 72 hrs. después de la aplicación. Así mismo Nájera *et al.*, (2005) reportan que la cepa nativa de *Metarhizium anisopliae* originario del estado de Jalisco-México, provocó el 80% de mortalidad a los 30 días de haber iniciado el experimento sobre larvas de *Phyllophaga* spp., a una concentración de 2×10^8 con/g. Este último dato está relacionado con el resultado de mortalidad obtenido mediante la utilización de la cepa nativa de *Metarhizium* 1/10 bajo la concentración de 53×10^4 con/mL.

Los datos obtenidos en este experimento, indican que la concentración de *Metarhizium* comercial 10/10 y *Metarhizium* nativo 1/10 mostraron diferencias significativas (**Cuadro 6**) además, se observó que las concentraciones de *Metarhizium* nativo 5/10 (9×10^4 con/mL) y *Metarhizium* comercial 1/10 (36×10^4 con/mL), tienen el mismo efecto respecto a la mortalidad de larvas, ya que no muestran diferencias significativas. Lo mismo sucede entre la concentración de *Metarhizium* nativo 10/10 (5×10^4 con/mL) y *Metarhizium* comercial 5/10 (5×10^4 con/mL).

Cuadro 6. Prueba de rangos múltiples en mortalidad (Tukey).

Variables	Subconjunto para alfa = 0.05			
	d	c	b	a
<i>Metarhizium</i> Comercial 10/10	13,00			
<i>Metarhizium</i> Comercial 5/10		17,00		
<i>Metarhizium</i> Nativo 10/10		19,00		
<i>Metarhizium</i> Comercial 1/10			21,00	
<i>Metarhizium</i> Nativo 5/10			22,00	
<i>Metarhizium</i> Nativo 1/10				29,00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

*Datos ubicados en columnas iguales significan que no hay diferencia estadística entre la mortalidad de larvas bajo diferentes concentraciones de conidios entre cepa nativa y cepa comercial de *Metarhizium*.

Las concentraciones de la cepa de *Metarhizium* comercial, a excepción de la concentración 1/10 (36×10^4 con/mL), mostraron menor virulencia en comparación a la cepa nativa, ya que la virulencia está determinada por factores que dependen de su información genética, lo que influye en la producción de enzimas y toxinas para la infección. Por tal razón, una posible causa de disminución de la patogenicidad del aislamiento podría deberse a la supresión de genes determinantes en el desarrollo de las diferentes etapas del mecanismo de infección (Riba *et al.*, 1985; Riba *et al.*, 1986). Por otra parte, los porcentajes bajos de mortalidad obtenidos en este experimento, están relacionados a la no utilización de aceite Tween durante la preparación de las suspensiones, ya que Vélez *et al.*, (2001) señalan que este aceite mejora la penetración gracias a las propiedades cutinofílicas, permitiendo mayor adhesión de las esporas a la cutícula del insecto. Esta mezcla emulsiva (conidias, agua y Tween) cubre mejor al insecto, debido que el aceite funciona como adherente, cumpliendo una función sinergista, permitiendo la germinación del hongo en menor tiempo (Contreras *et al.*, 1997). Además, también pudieron estar influenciados por el método de inmersión utilizado para la inoculación de las larvas, ya que esta metodología presenta una desventaja frente a otros métodos, ya que por efecto de lavado, se pudo afectar la adherencia de las esporas y así, su virulencia (Rodríguez *et al.*, 2002).

6.7 Larvas que pasaron al estado de pupas

De cada una de las dosis aplicadas, la concentración donde se obtuvo el mayor número de de pupas, fue *Metarhizium* comercial 10/10 (4×10^4 con/mL) con 27 pupas, seguida de la concentración de *Metarhizium* comercial 5/10 (7×10^4 con/mL) con 23 pupas. Sin embargo, cabe señalar que la cepa nativa de *Metarhizium* spp en la concentración 1/10 (53×10^4 con/mL) solo representó 11 pupas teniendo diferencias significativas con los demás tratamientos (**Figura 17**).

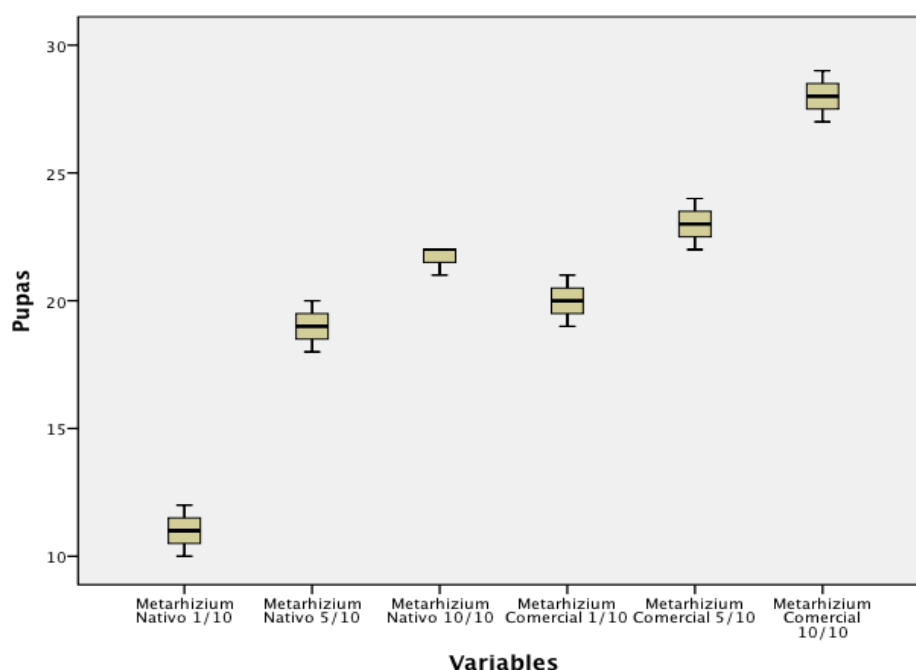


Figura 17. Número de larvas que llegaron al estado de pupa.

6.8 Emergencia de adultos

La concentración donde se logro la menor emergencia de adultos de gusano cogollero, fue *Metarhizium* nativo 1/10 con 6 adultos, equivalentes al 15% del total de la población de este tratamiento. Por su parte, las concentraciones donde hubo mayor emergencia de adultos fue *Metarhizium* comercial 5/10 y *Metarhizium* comercial 10/10; con 17 (42.5%) y 18 (45%) larvas respectivamente (**Figura 18 y 19**). Estos datos guardan relación a los

reportados por Ángel-Sahagún *et al.*, (2005) quienes evaluaron la sensibilidad de huevos, pupas y adultos de *Haematobia irritans* en tres aislados de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroserus* utilizados a una concentración (con/mL) de 1×10^6 para huevos, 1×10^8 para pupas y las dos para adultos, hallando que todos los estadios son susceptibles a la acción de los hongos entomopatógenos con una reducción en la eclosión de 3,8 a 6,3% respecto a un 72% de eclosión del tratamiento testigo, mortalidad entre 50 y 71,3% en pupas y 90% en adultos. De manera general, se demostró que la concentración más alta de *Metarhizium* ssp. na tivo $1/10$ (53×10^4 con/mL), hubo un mejor control en la emergencia de adultos de *Spodoptera frugiperda*.

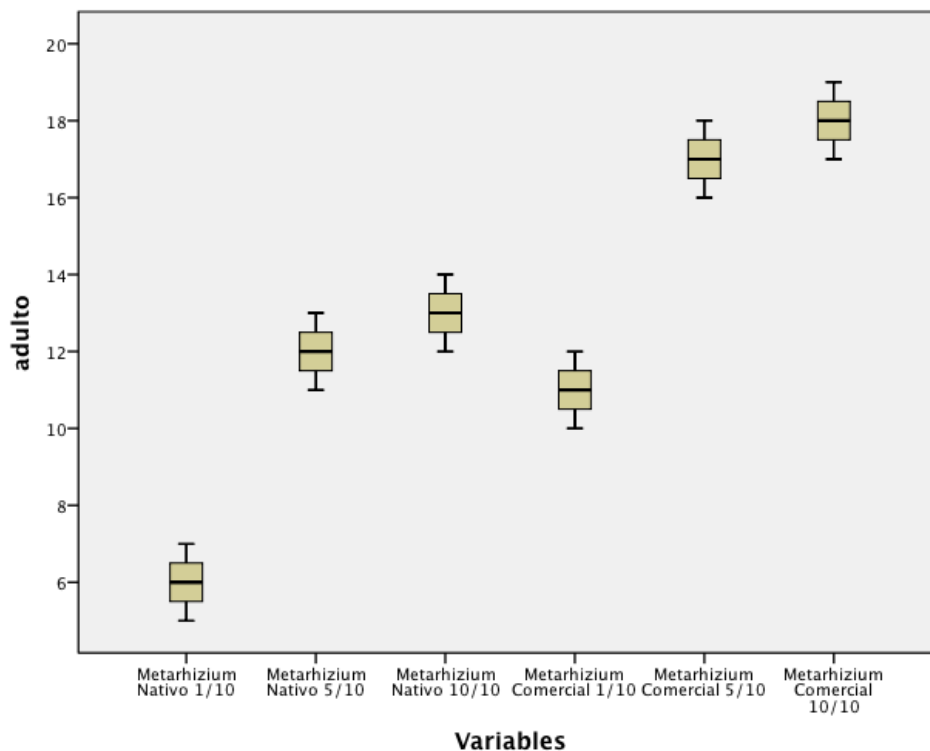


Figura 18. Emergencia de adultos en cada uno de los tratamientos a diferentes concentraciones.

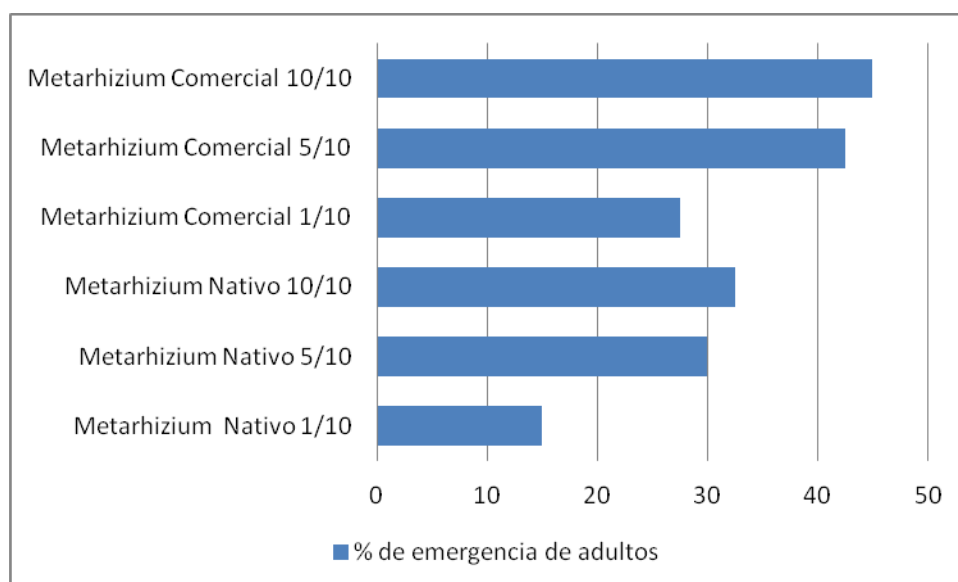


Figura 19. Porcentaje de emergencia de adultos de gusano cogollero a diferentes concentraciones entre cepa nativa y comercial de *Metarhizium* spp.

6.9 Tiempo letal (TL₅₀) entre cepa nativa y cepa comercial de *Metarhizium* spp., sobre larvas de gusano cogollero

La mortalidad de larvas de gusano cogollero, mediante la utilización de *Metarhizium* nativo, ocurrió a las 72 hrs. donde se registró el mayor índice de mortalidad para cada uno de los tratamientos (TL₅₀). Respecto al índice de mortalidad producida por la cepa comercial de *Metarhizium* spp., ocurrió entre 72-96 hrs. donde se registró el mayor índice de mortalidad para cada uno de los tratamientos (TL₅₀), **Figura 20**.

De manera general, la mayor mortalidad de larvas para ambas cepas, ocurrió a las 72-96 hrs; es decir, a los 3-4 días post-infección. Estudios en laboratorio realizados por Lezama *et al.*, (1996) han demostrado que *S. frugiperda* es susceptible al hongo *M. anisopliae* en los estados biológicos de huevo y larva, con porcentajes de mortalidad de 100% y valores de TL₅₀ de 2.5 A 2.9 días en huevo y 1.3 a 3.1 días en larva, bajo una concentración de 1×10^8 conidias por mL, semejantes a los obtenidos en esta investigación. Luna y Lecuona (2002), mencionan que las cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* provocaron mortalidad de tucuras (*Rhammatocerus pictus*) entre los 5.4 y 7.9 días, siendo el tiempo de sobrevivencia

media de 7 días frente a los 10.4 días de *B. bassiana*; demostrando así su mayor agresividad frente a *B. bassiana*. Así mismo, Ibarra *et al.*, (2005) mencionan que las cepas de *Metarhizium anisopliae* (M362 y M379) colectados en la república mexicana, mataron significativamente más rápido a los adultos de la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*), con promedios de 10.5 y 10.3 días a comparación de la cepa de *Beauveria bassiana* con 12.0 hasta 14.8 días.

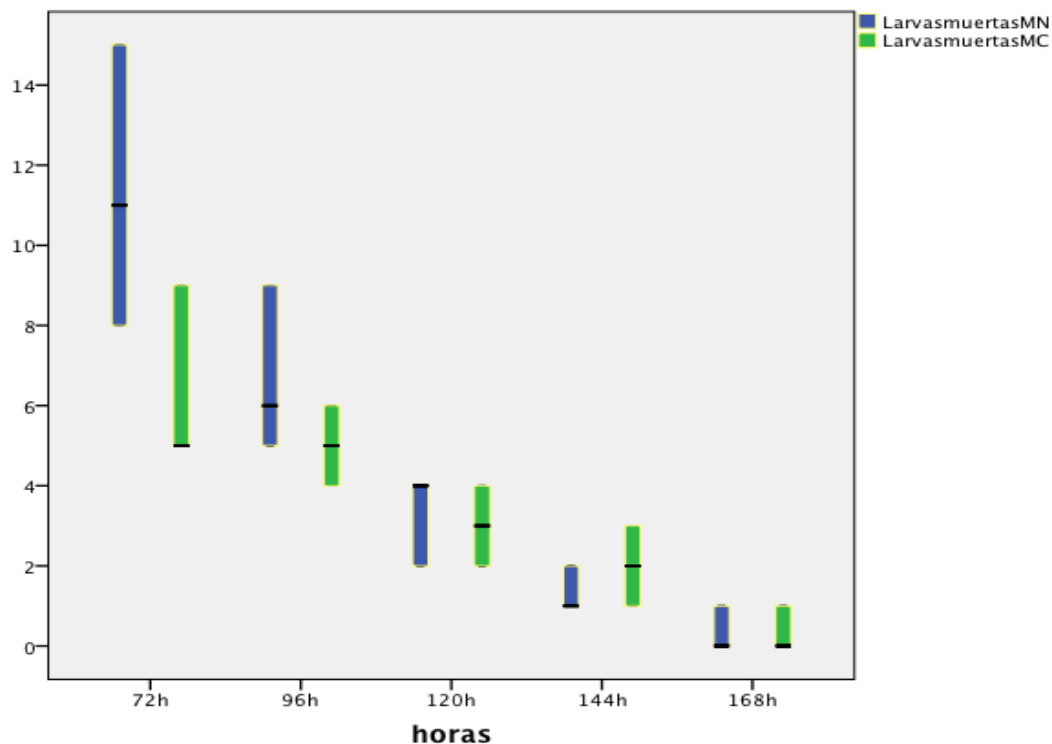


Figura 20. Tiempo de mortalidad de larvas de 72-168 hrs. post-infección.

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos de investigación y reportados por los autores anteriores, permiten demostrar el potencial de *Metarhizium* para el control biológico de insectos plaga de diferentes órdenes.

VII. CONCLUSIONES

- Los insectos del género *Phillophaga* son susceptibles a la infección causada por el hongo *Metarhizium* spp., en el municipio de Tetela de Ocampo-Puebla.
- La mayor producción de conidios se presentó en la cepa nativa de *Metarhizium* spp., con 53×10^4 con/mL en medio de cultivo PDA, representando así mayor producción de estructuras reproductivas en comparación a la cepa comercial.
- La concentración 10^{-1} de cepa nativa de *Metarhizium* spp., presentó mayor porcentaje de mortalidad 72.5 a las 72 hrs post-infección, en comparación a la cepa comercial 10/10 con el 32.5% que fue el resultado más bajo obtenido en la presente investigación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alatorre R.; Bravo H.; Leyva J y Huerta A. 2000. Manejo Integrado de Plagas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. 12 p.

Alves S. 1998. Fungos entomopatogênicos. p. 289-381. In B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. 2nd ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.

Ángel-Sahagún C. A.; Lezama-Gutiérrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; López-Edwards, M.; Rebolledo-Domínguez, O. 2005. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*. 5(50): 8-20.

Ángulo J. M. 2000. Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas. En línea. Consultado 12 de septiembre de 2013. Disponible en <http://www.turipana.org>.

Aragón G. A. 1987. Entomofauna presente en el cultivo de maíz durante el ciclo agrícola primavera-verano de 1986 en la comunidad de Amatlán, municipio de Zoquiapan, Puebla. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Puebla, México. 14 p.

Arévalo M. H. y Zenner de P. I. 2009. Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Actualidad y Divulgación Científica* 12(1): 79-90.

Arrunda W.; Lübeck, I. and Achrant I. A. 2005. Henning M. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol* 37(1): 231-244.

Asaff A. T.; Reyes V. Y.; López E. V y De la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*. 21(1): 291-295.

Ávila Q. G . 2004. Inocuidad alimentaria y Control biológico de plagas y enfermedades de hortalizas con énfasis en control biológico. Cd. Delicias, Chihuahua, México. 39-43 pp.

Badii M. H. y Abreu J. L. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.

Barajas O. C.G.; Morales R. M. D.; Del Pozo N. E. M.; Rodríguez A. M de L y Nuñez L. J. J. 2009. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. *Revista Tecnociencia Chihuahua*. 3(1): 33-38.

Barnett H. L .; Hunter B. B . 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 218.

Bateman R.; Carey M.; Batt D.; Prior C.; Abraham Y.; Moore D.; Jenkins N. E y Fenlon J. 1996. Screening for Virulent Isolates of Entomopathogenic Fungi Against the Dessert Locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biocontrol Science and Technology*. 6(1): 549-60.

Bautista M. N . 2006. Insectos plaga: Una guía ilustrada para su identificación. Bayer CropScience. México. 113 p.

Benítez N. 2002 . Manual de laboratorio de Microbiología. Dpto. de Biología. Universidad del Valle. Cali. Colombia. 147 p.

Bittencourt V. R. ; Mascarenhas A y Horacio J. 1999. Mecanismo de l hongo *Metarhizium anisopliae* en garrapatas *Boophilus microplus* en condiciones experimentales. *Ciencia Rural*. 29(1): 351-354.

Borges D.; Díaz A. O.; Nelis S. J. A y Gómez E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 44(3): 49-55.

Boucias D .G. y Pendland J .C. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 43(1): 288-292.

Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina. 128 p.

Cañedo V. y Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 62 p.

Chul Kang, S.; Park S y Gyu L. D. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73(1): 276-281.

Contreras T., M. Carballo, E. Hidalgo y E. Bustamante. 1997. Evaluación de trampas de pseudotallo y formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals.) en el combate del picudo del Plátano *Coasmopolites sordidus* en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 46(1): 44-49.

De Faria M. R. y Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and micoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and internacional classification of formulation types. *Biological Control*. 43(1): 237-256.

Del Rincón M. C.; Méndez J e Ibarra J. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 45(2): 157-164.

Dilcia H.; Ferrer F y Linares B. 1989. Introduccion de Telenomas reusnixon (hym.: scelionidae) para controlar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Yaritagua Venezuela. *Agronomía tropical*. 39(1-3): 45-61.

Elósegui O.; Jiménez J y Aidanet C arr. 2006. Aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plagas. *Fitosanidad*. 10(4): 265-272.

Espinosa E. O.; Lara J. R.; Otero C. G.; Alatorre R. R y Valdez C. J. 2011. Susceptibilidad de larvas, pupas y abejas adultas a aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) *Interciencia*. 36(2): 148-152.

Fang W.; Wang S and Leger R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol*. 46(1): 277-285.

Feldhaar H, Gross R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualist. *Microbiology* 154: 1-7. Article in press. Immermann G (1986) Insect pathogenic fungi as pest control agents. En: *Biological Plant and Health Protection*. (Franz, J. M., Ed.) G. Fischer Verlag Stuttgart pp. 217- 231.

Fuxa J. R. and Tanada, Y. 1987. Epizootiology of insect diseases. A Wiley-Interscience Publication United States of America. New York. 188-180 p.

García C y González M. 2010. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai*. 6(1): 17-22.

García C . G .; González M . M . B y Bautista M . N. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 37(2): 217-222.

Giraldo J . 2009. Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, Revista Ganadero. Tolima, Colombia. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/uso-hongos-entomopatogenos-controlt2540/p0.htm>

Goettel M.S. y Inglis, G . D. 1997. Fungi: Hyphomycetes, In: L . Lacey (ed.). Manual of Techniques in insect Pathology. Academic Press, San Diego. Pp 213-249.

Goettel M. S.; Eilenberg, J y Glare. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, in: Gilbert, L. I., K. Latrou, and S. Gill, (eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. 6(1): 361-406.

Hajek A. E. y St. Leger R. J. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39(1): 293-322.

Hall R. 1981. Laboratory studies on the effect of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *V. lecanii*. *Entomol Exper Applic*. 29(1): 39-48.

Hegedus D . and Khachatourians G. 1995. The impact of biotechnology on hypomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol Adv*. 13(1): 455-490.

Hernández E. M. P. 1988. Estimación de las pérdidas ocasionadas por el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith), en la comunidad de Amatlán Sierra Norte de Puebla, Siembra temporal de 1987. Tesis de licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas. Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla. 18-23 pp.

Hernández V. V.; Cervantes E.Z.; Villalobos F. J.; García L. L. y Peña C. G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en Agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*. 27(3): 591-599.

Humber R. A. 1997. Fungi: Identification. En: Lacey L, ed. Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, California : Academic Press.

Ibarra A. G.; Moya R. G y Berlanga P, A. 2005. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 44(1): 1-6.

Ignoffo C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens Florida. *Entomologist* 75(1): 616-525.

Ignoffo M. R.; Queiroz M. V.; Silva D. M.; Giménez M. P.; Azevedo J. L y Schrank. 1996. Double stranded and isometric virus like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Micological Research*. 100(12): 1468-1472.

INEGI, 2010. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información. Consultado en: <http://www.inegi.org.mx> (Septiembre de 2013).

Inglis G D, Duke G M, Goettel MS, Kabaluk J T. 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *J. Invertebr Pathol*. 298(1):101-113.

Inglis G. D.; Goettel M. S.; Butt T. M y Strasser H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds.). CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK. Pp. 23–69.

Inyang E. N.; McCartney H. A.; Oyejola B.; Ibrahim L.; Pye B and Archer S.A. 2000. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research*. 104(1): 653-661.

Jabbour R. a nd Barbercheck M. 2009. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biol Control*. 51(3):435-443.

Jackson T. A.; Alves S. B y Pereira R. M. 2000. Success in Biological Control of Soil-Dwelling Insects by Pathogens and Nematodes. *Biological Control: Measures of Success*, Kluwer Academic Public Publishers, Boston, EE.UU. Pp. 271-296.

Jenkins N. E.y Grzywacz D. 2000. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents-Assurance of Product Performance. *Biocontrol Science and Technology*. 10(1) : 753-777.

Jiménez Z. J. 1998. Control de calidad en hongos entomopatógenos. In: Memoria de artículos e n resumen y e n extenso, X XI Congreso Nacional de Control Biológico. Río Bravo, Tamaulipas, México. Pp. 113-114.

Kaaya G . P.; Kokwaro E. D .; Seshu-Reddy K. V a nd Munyinyi D. M . 1993. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Serratia marcescens* to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Biocontrol Sci Technol*. 3(1): 177-183.

Kabaluk T. 2005. Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Agriculture and Agri-Food Canada. (En l ínea). Disponible en: http://www.agr.gc.ca/env/pest/index_e.php?s1=pub&page=micro. (Consultado: 12 octubre 2013)

Kang S. C.; Park, S and Lee D. G. 1999. Purification and characterization of a novel chi-tinase from the entomopathogenic fungus, *M. anisopliae*. *J. Invertebr Pathol*. 73(1): 276-281.

Kurtti T. a nd Keyhani N. 2008. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol*. 154(1):1700-1709.

Lezama G. R.; Galindo, V. E. y Cruz, C. F. 1995. Effectiveness of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the biological control of ticks in bovine livestock in the field conditions. En Tercer seminario internacional de parasitología animal. Acapulco, Guerrero, México, 11 de octubre de 1995. 145 p.

Lezama G. R.; Alatorre R. R.; Bojalil J. L. F.; Molina O. J.; Arenas V. M.; Gonzales R. M y Rebolledo D. O. 1996. Virulence of the entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*. 3(1): 35-39.

Lezama G. R.; Molina J.; Pescador A.; Galindo E.; Ángel C. A y Michel C. A. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 9(1): 1-5.

López E. M.; Hernández M. A. Pescador R. J. Molina O. R and Lezama G. J. J. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist*. 82(2): 254-262.

López L. L. V and Hans B. J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad*. 3(6): 12-15.

López-Olgún J. F. y Aragón A.G. 1987. Entomofauna presente en el cultivo del maíz durante el ciclo agrícola primavera-verano de 1986 de la comunidad de Amatlán, Sierra Norte de Puebla. Resúmenes del XXII Congreso Nacional de Entomología. Cd. Juárez, Chihuahua, México.

Lorito M.; Woo, S. L.; García, F. I.; Colucci, G. and Harman, G. E. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(1): 7860-7865.

Lucero M. A. M.; Peña V. L. A y Bacca I. T. 2005. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Scarabaeidae). *REVISTA CORPOICA*. 5(1): 43-48.

Luna R. J. A y Lecuona R. E. 2002. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 31(1): 67-83.

Luz C. and Fargues J. 1998. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *B. bassiana*, pathogenic to *R. prolixus*. *Mycopathologia* 138(1): 117-125.

Luz C. and Fargues J. 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72(1): 56-63.

McGavin G. C. 2000. Manuales de identificación: insectos, arañas y otros artrópodos terrestres. Ediciones Omega. 226 p.

Meyling N. V and Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control*. 43(2):145-155.

Montes M. J. A.; Espinoza P. N.; Garrido R. E y Gutiérrez M. F. A. 2001. Reproducción de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) del maíz (*Zea maíz*) bajo condiciones de laboratorio. INIFAP. 1 p.

Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 63(1): 95-103.

Moore N. Y.; Pegg K.; Allen A. R e Irvin J. A. G. 1993. Vegetative Compatibility and Distribution of *Fusarium oxysporum* cubense in Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 33(1): 797-802.

Moore D y Caudwell R. W. 1997. Formulation of Entomopathogens for the Control of Grasshoppers and Locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada.* 171(1): 49-67.

Morales V.; Garay B.; Romero A y Sánchez J. 2009. Insecticidas biológicos en el control de insectos plaga: agrícolas, forestales, de almacén y urbanas en México. Artículo científico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 1-5 p.

Motta D. P. A y Murcia O. B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science.* 6(2): 77-90.

Nájera R. M. B. M.; García M. M.; Crocker L. R.; Hernández, V. V y Rodríguez del Bosque. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (coleoptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad.* 9(1): 33-36.

Ojeda B. W. E.; Sifuentes I.; Iñiguez C. M y Montero M. M. J. 2011. Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimientos hídricos de los cultivos. *Agrociencia* 45(1): 1-11.

Ouedraogo A.; Fargues, J.; Goettel M.S y Lomer C. J. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia.* 137(1): 37-4.

Pedraza P. W.; Orozco A. M.; Esquivel H. A.; Rivera C. G y Chaverri, F. F. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana.* 22(2): 233-245.

Pérez R. P.; Trujillo Z. G.; López M.; Nieves C.; Ocano C y Márquez M. 2001. Efectividad de *Metarhizium anisopliae* (Metc) Sor en el combate de *Atta insularis* Guerin en Cuba. *Fitosanidad*. 5(2): 11-14.

Polar P , Moore D , Kairo M , Ramsubhag A. 2008. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol*. 46(1): 119-148.

Pucheta D. M.; Flores M. A.; Rodríguez N. S y De la Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31(12): 856-860.

Quesada M. E.; Santos Q. R.; Valverde G. P y Santiago A. C. 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungus) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 87(1): 51-58.

Rangel D. E.; Alston D. G y Roberts D. W. 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol Res*. 112(11): 1355-1361.

Rath A. C. 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Science y Technology*. 10(1): 563-581.

Rath A. C.; Worledge D.; Koen T. B and Rowe, B. A. 1995. Long term field efficacy of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* against the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. *Biocontr Sci Technol*. 5(1): 439-451.

Riba G.; Azevedo L. J.; Messias C.; Dasilverira D.W y Tuveson R. 1985. Estudios de interacción de virulencia con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. *Journal de patología de invertebrados*. 46(1): 20-25.

Riba G.; Keita, A.; Soares G. G. y Ferron P. 1986. Comparación de estudios con *Metarhizium anisopliae* y *Tolypocladium cylindrosporum* como patógenos de las larvas de mosquitos. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2(1): 469-473.

Rhodes D. J. y Smith J. D. 1992. Techniques for Quantifying the Ecological and Pathological Characteristics of Entomopathogenic Fungal Strains. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases. Pp. 351-356.

Rodríguez S., J. Rodríguez, D. Riestra, J. Villanueva y D. Rodríguez. 2002. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica). 64(1): 34-40.

Rodríguez L. A. y Arredondo H. C. 2007. Libro: Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.

Rodríguez L. A. y Marín J. A. 2008. Insectos plaga y su control. In El cultivo del maíz: Temas selectos. Aedos. S. A. Pp. 33-34.

Roy H. E.; Steinkraus D. C.; Eilenberg A. E.; Hajek and Pell J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*. 51(1): 331-357.

SAGARPA. 2006. Secretaría de agricultura ganadería, desarrollo rural pesca y alimentación. Consultado en: www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/potencialproductivo/especificos/problemas_fitosanitarios.pdf

Sahai A. S. y Manocha M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev*. 11(1): 317-338.

Saksirirat W y Hoppe H. H. 1991. Secretion of Extracellular Enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zeium) viegas during growth on uredospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachirhizi* syb.) in liquid cultures. *Nematropica*. 131(2): 161-173.

Shi W. B.; Zhang L. L and Feng M. G. 2008. Field trials of four formulations of *Beauveria Bassiana* and *Metarhizium anisoplae* for control of cotton spider mites (Acari: Tetranychidae) in the Tarim Basin of China. *Biol. Control*. 45(1): 48-55.

Sikorowski P. P y Lawrence A. M. 1994. Microbiological contamination and insect rearing. *Am. Entomol.* 40(1): 240-253.

Silva W.; Santi L.; Berger M.; Pinto A.; Guimaraes J.; Schrank A. M. 2009. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisoplae*. *Proc Biochem*. 34(1): 829-834.

Smith K. E.; Wall R.; Berriatua E and French, N. P. 2000. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites *P sorotes* spp. *Vet Parasitol*. 92(1): 97-105.

Soto J. 2008. Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae* y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz *Sodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente. I PN. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa. 87:22-30.

St. Leger R. J. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends in Biotechnology*. 15 (1): 83-87.

St. Leger R. J.; Cooper R. and Charnley A. J. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen Microbiol*. 32(1): 1509-1517.

Sun J. 2002. Screening and Characterization of Pathogenic Fungi for Possible Control of *Coptotermes formosanus*. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Entomology.

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

Tikhonov V. E.; López L. L. V.; Salinas J. and Jansson H. B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *V. chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet Biol.* 35: 67-78.

Torriello C.; Pérez, A.; Vega F.; Navarro H.; Pérez A and Lorenzana M. 2009. Lack of pathogenicity and toxicity of the hemmycoinsecticide *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* following acute gastric exposure in mice. *Ecotoxicology and Environ.* 72(8):2153-2157.

Vélez P ; Estrada M; González M., Valderrama A y Bustillo A. 2001 . Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica). 62(1). 38-53.

Wang L.; Huang J and Liu B. 2005. Effects of toxins from two strains of *V. lecanii* (Hypomycetes) on bioattributes of predatory ladybeetle, *Delphastus catenulatus* (Col. Coccinellidae). *J. Appl Entomol* 129(1): 32-38.

Warren R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 50(1): 183-212.

Xiang Lu, Laroche A and Huang H. C. 2005. Isolation and characterization of chitinases from *V. lecanii*. *Canadian Journal of Microbiology.* 51(1): 1045-1055.

Ypsilos L. K and Magan N. 2004. Impact of water stress and washing treatments on production, synthesis and retention of endogenous sugars and germinability of *Metarhizium anisopliae* blastospores. *Mycol Res.* 108(11): 1337-1345.

Zimmermann 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomol.* 102(1): 213-215.

Zimmerman D y Zumbo B . 1993 . Relative power of the Wilcoxon test, the Friedman test and the repeated measures ANOVA on ranks. *Journal of Experimental Education.* 62 (1): 75-86.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol.* 17(9): 879-920.

IX. ANEXOS

Evidencia fotográfica



Colecta de insectos sobre cultivos



Colecta de insectos sobre malezas



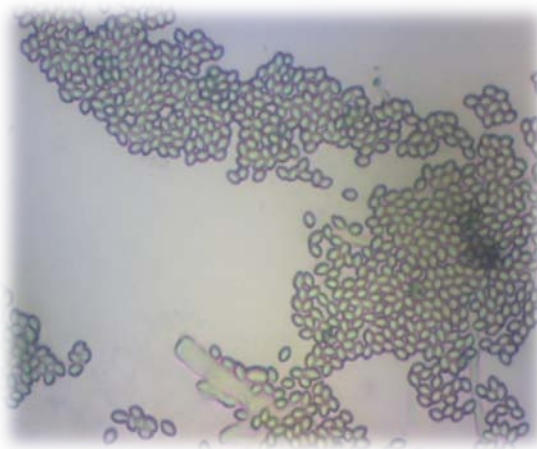
Colecta de insectos sobre malezas



Phyllophaga spp. micosado



Identificación de *Metarhizium* spp.



Conidios de *Metarhizium* spp.



Preparación de la dieta



Preparación de la dieta



Vaciado de la dieta sobre vasos



Solidificación de la dieta sobre vasos



Preparación de suspensiones



Inoculación de *Metarhizium* spp. sobre larvas de gusano cogollero



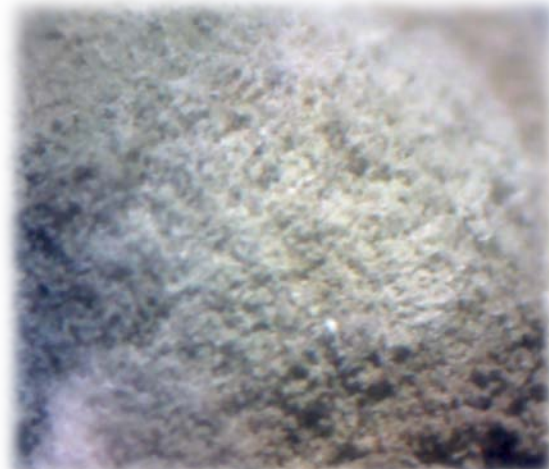
Conteo de conidios en cámara Neubauer



Incubación rústica de gusano cogollero



Micelio de *Metarhizium* spp. nativo



Micelio aéreo de *Metarhizium* spp. nativo



Colonización de *Metarhizium* spp. nativo



Pupas muertas donde no emergió el adulto



OFICIO No. 881/IAH/2013

Asunto: Impresión de tesis.

C. EUGENIA CABRERA HUERTA
EGRESADO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA AGROFORESTAL
BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
P R E S E N T E

Con base en el dictamen emitido por el Dr. Omar Romero Arenas (Director de Tesis), Dr. José Filomeno Conrado Parraguirre Lezama (Asesor) y M.C. Alfredo Báez Simón (Asesor) en su calidad de Consejo Particular, se autoriza la impresión de la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE MORTALIDAD DE GUSANO COGOLLERO (*Spodoptera frugiperda* L.) MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium* spp *IN VITRO*.

Correspondiente a la Licenciatura en Ingeniería Agroforestal.

Sin otro particular por el momento, me despido reiterando a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
SAN JUAN ACATENO TEZIUTLÁN, PUE., 22 DE NOVIEMBRE DE 2013


M.C. FABIAN ENRIQUEZ GARCIA
DIRECTOR



c.c.p.- Archivo y Minutario
**/mlsm