



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Evaluación de la actividad infectiva de *Metarhizium anisopliae* cultivada en sustrato sólido contra *Tenebrio molitor*

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de la Maestro en Ciencias

Presenta

Biol. Silvia Carolina Mendoza Sandoval

Dirigida por:

Dr. Juan Campos Guillén

Centro Universitario

Querétaro, Qro

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021

México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Biol. Silvia Carolina Mendoza Sandoval

Dirigida por:

Juan Campos Guillén

Con Tema de Tesis:

Evaluación de la actividad infectiva de *Metarhizium anisopliae* cultivada en sustrato sólido contra *Tenebrio molitor*

Dr. Juan Campos Guillén
Presidente

Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Secretario

Firma

Dr. Miguel Angel Ramos López
Vocal

Firma

Dr. Rodolfo Figueroa Brito
Suplente

Firma

Dra. Lourdes Soto Muñoz
Suplente

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional durante el curso de mi maestría, así como también a mis sinodales, Sergio Romero, Juan Campos, Miguel Ramos, Lourdes Soto y Rodolfo Figueroa, por su tiempo y dedicación. Gracias por formarme como Maestra en Ciencias.

Agradezco profundamente a los agricultores José y Lupita y al Lic. Esteban Layseca que me apoyaron accediendo a sus tierras de cultivo para poder obtener mis hongos, parte crucial para realizar mi tesis de maestría.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Plaga.....	6
4.1.1 Manejo de plagas	6
4.1.2 Manejo integrado de Plagas	7
4.2 Hongos entomopatógenos	7
4.2.1 Biología del orden Hipocreales.....	7
4.2.2 Ecología e interacción hospedero-patógeno.....	8
4.3 Género <i>Metarhizium</i>	9
4.3.1 Características fúngicas.....	9
4.3.2 Espectro de hospedero	10
4.3.3 <i>Metarhizium</i> spp. contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	10
4.3.4. Mecanismos de infección.....	13
4.3.5 Enzimas esenciales durante el desarrollo de la infección.....	14
4.4. Cultivo de <i>Metarhizium</i> spp.	16
4.5. Factores que afectan la virulencia de hongos entomopatógenos ...	17
4.6 <i>Tenebrio molitor</i>	18
4.6.1 Ciclo biológico de <i>Tenebrio molitor</i>	18
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS	23
6.1. GENERAL.....	23
6.2. ESPECÍFICOS	23
7. METODOLOGÍA	24
7.1. Obtención de <i>Metarhizium</i> spp.	24
7.1.1. Método de cebo con <i>Tenebrio molitor</i> para el aislamiento de hongos entomopatógenos.....	24

7.2.	Mantenimiento de los aislados.....	24
7.3.	Cosecha y obtención de solución de conidias	25
7.5.	Cultivo de <i>M. anisopliae</i> en sorgo y arroz.....	28
7.6.	Determinación de la producción de conidiosporas de <i>M. anisopliae</i> . 28	
7.7.	Determinación de la dinámica de <i>Metarhizium</i> sp. durante el cultivo 28	
7.7.1.	Determinación de curvas de pH.....	28
7.7.2.	Determinación de actividad proteolítica y curva de proteólisis	29
7.8.	Determinación del crecimiento de <i>M. anisopliae</i> en diferentes niveles de actividad de agua (α_w)	29
7.9.	Bioensayos de infectividad de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	29
7.10	Análisis estadístico	30
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1.	Aislamiento de <i>Metarhizium</i> spp entomopatógenas	31
8.2.	Identificación morfológica	32
8.3	Identificación molecular	33
8.3.	Mortalidad en <i>Tenebrio molitor</i>	35
8.4.	Relación de la actividad de Agua (α_w) con el crecimiento superficial y esporulación	37
8.5.	Producción de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> en sorgo y arroz 41	
8.6.	Actividad proteasa	48
8.8.	Efecto sobre la mortalidad en larvas de <i>T. molitor</i> de las conidias obtenidas en diferentes condiciones de cultivo sólido	55
8.8.1.	CL ₅₀ y TL ₅₀	56
9.	Conclusiones	63

1. RESUMEN

El control de insectos plagas se realiza con insecticidas químicos, estos presentan actividad residual contaminando agua, aire y suelo. Una alternativa al uso de insecticidas sintéticos es el manejo biológico que se basa en uso de organismos antagonistas del ciclo biológico del insecto plaga como hongos entomopatógenos. Los hongos que pertenecen al género *Metarhizium* infectan a insectos plagas y la especie *M. anisopliae* es producida industrialmente a nivel mundial con fines de control biológico en diversos cultivos. Un hongo entomopatógeno puede ser usado como organismo de control biológico siendo necesario reproducir conidias en grandes cantidades y a su vez que estas preserven la infectividad contra el hospedero, y por tanto es necesario desarrollar un sistema de cultivo que permita alta producción de conidias y mantenga la capacidad infectiva. Se sabe que el cultivo sólido permite obtener grandes cantidades de conidias y al mismo tiempo induce la expresión de una gran cantidad de proteínas fúngicas. El objetivo del presente trabajo fue obtener conidias de *M. anisopliae* empleando cultivo sólido sobre soportes sólidos de arroz y sorgo, y observar si estos producen un cambio en la infectividad de *M. anisopliae* sobre larvas de *Tenebrio molitor*. Para lo anterior se aislaron cepas de *M. anisopliae* de suelos de cultivo de maíz de Amealco y de huerto de manzano de San Joaquín, ambos ubicados en el estado de Querétaro. Se cultivaron dos cepas de *Metarhizium anisopliae* Am1 y SJ1 en soportes de sorgo y arroz. Se midió la cantidad de conidias obtenidas por gramo de sustrato obteniéndose en sustrato sorgo, sorgo + extracto de levadura (E.L.), sorgo + peptona + E.L., arroz, arroz + E.L. y arroz + peptona + E.L., obteniéndose como máximo 9.5×10^8 conidias gms^{-1} y se obtuvo el mayor porcentaje mortalidad con la cepa SJ1 con 83.3 %, y la CL_{50} de 3.8×10^7 conidias mL^{-1} y el TL_{50} menor de 11 días cuando se usó la cepa SJ1 cultivada en arroz peptona-E.L. También se evaluó el efecto del medio de cultivo sobre la actividad proteasa obteniéndose un máximo de 264 UI mL^{-1} UI a los ocho días el sustrato arroz. Y de esta manera comprobó el efecto del sustrato sobre la infectividad de *M. anisopliae* contra *T. molitor*. Se consiguió atribuir una mejora en la conidiación y en la mortalidad de las cepas usadas cuando se añadió peptona al sustrato.

31 **ABSTRACT**

32 The control of insect pests is made with chemical insecticides that requires an
33 alternative, due to its non-specificity that affects beneficial insects and natural
34 predators and residual activity polluting water, air, and soil. An alternative to the use
35 of synthetic insecticides, which is specific, is the biological management that is based
36 on the use of antagonistic organisms of the biological cycle of the pest insect such as
37 entomopathogenic fungi. An entomopathogenic fungus can be used as a biological
38 control organism, being necessary to reproduce conidia in large quantities and while
39 these preserve the infectivity against the host, and therefore it is necessary to develop
40 a culture system that allows high production of conidia and maintains the capacity.
41 infective. The fungi belonging to the genus *Metarhizium* infect insect pests and the
42 specie *M. anisopliae* is produced industrially worldwide for biological control purposes
43 in many crops. It is known that solid culture allows to obtain large numbers of conidia
44 and at the same time induces the expression of many fungal proteins. Therefore, we
45 proposed to obtain conidia of *M. anisopliae* by solid culture on solid supports, and to
46 observe if these have a change in the infectivity of *M. anisopliae* on *Tenebrio molitor*.
47 Thus, strains of *M. anisopliae* were isolated from Amealco corn cultivation soils and
48 from a San Joaquín apple orchard, both located in the state of Querétaro. Two strains
49 of *M. anisopliae* Am1 and SJ1 were grown on sorghum and rice supports. Conidia
50 production was obtained per gram of substrate, obtaining in substrate sorghum,
51 sorghum + yeast extract (E.L.), sorghum + peptone + E.L., rice, rice + E.L. and rice +
52 peptone + EL, obtaining a maximum 9.5×10^8 conidia gms⁻¹ and the highest mortality
53 percentage was obtained with SJ1 strain with 83.3%, and 3.8×10^7 conidia mL⁻¹ was
54 the least LC₅₀. and the least TL₅₀ was 11 days when the SJ1 strain grown in rice
55 peptone-EL was used. The effect of the culture medium on the protease activity was
56 also evaluated, obtaining a maximum of 264 IU mL⁻¹ IU at eight days the rice
57 substrate. We verified the effect of the substrate on the infectivity of *M. anisopliae*

Declaración de responsabilidad de estudiante: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

2. INTRODUCCIÓN

El término plaga hace referencia a cualquier organismo que bajo ciertas condiciones ambientales se reproduce descontroladamente y aumente su población causando alteración en su entorno. Una plaga agrícola es aquella que ataca a cultivos, siendo los insectos uno de los grupos más importantes ya que se estima que la pérdida de producción agrícola es de por lo menos 10 % a nivel mundial (Gutierrez-Ramírez *et al.*, 2013; Guevara y Brechelt, 2004; Kogan y Prokopy, 2009). Además, el control o manejo de insectos plaga se realizan principalmente mediante la aplicación desordenada de insecticidas químicos sintéticos, desencadenando problemas relacionados con el ambiente, salud humana y generando resistencia a estos insecticidas por parte de la población plaga (Simon-Yu *et al.*, 2003; Yu y McCord, 2007; Carvalho *et al.*, 2013; FAO, 2016).

Una alternativa viable al uso de estos compuestos es el manejo biológico que se basa en el uso de organismos antagonistas y/o parásitos para la plaga, estos disminuyen la presión de selección a insecticidas y no son contaminantes, además de ser selectivos contra la plaga objetivo como lo son depredadores, parasitoides y organismos entomopatógenos como virus, bacterias y hongos (Cañedo *et al.*, 2011; González-Maldonado *et al.*, 2018).

Los hongos entomopatógenos son agentes de control de diversas plagas insecto, entre ellos se encuentran las especies del género *Metarhizium*, los cuales se encuentran infectando de manera natural a diversas especies de insectos plaga (Cruz-Avalos *et al.*, 2018; Ibarra-Vázquez *et al.*, 2018 y Ordoñez-García *et al.*, 2018). Este género está distribuido globalmente, y cuenta con especies utilizadas como agentes de control biológico de insectos como *Metarhizium anisopliae* (Barra-Bucarei *et al.*, 2019). Para que un hongo entomopatógeno sea un potencial agente de control biológico (ACB) es necesario realizar cultivos que permitan obtener grandes cantidades de conidias y al mismo tiempo preserven la capacidad infectiva de este contra la plaga objetivo. Una

alternativa viable es la implementación de un sistema de cultivo en soporte sólido, ya que se sabe que este tipo de cultivo se puede conseguir una mayor cantidad de conidiosporas, se induce la producción de genes relacionados a la infección que normalmente no se producirían mediante otros sistemas de cultivo y se acortan los tiempos de fermentación (Devi y Chowdary, 2000; Viniegra-González *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2010). Una ventaja extra es la posibilidad de utilizar desechos agrícolas locales como parte del sustrato sólido. Para comprobar tal principio, las larvas del gusano de la harina, *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA, Linnaeus, 1758), se utilizan como modelo para el estudio de infección de hongos entomopatógeno, este coleóptero es útil para observar el efecto de las condiciones en las que se cultiva *Metarhizium* spp y como esto modula la virulencia de estas conidias sobre *T. molitor* (Oliveira y Rangel, 2018 y Oliveira *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el rendimiento de las conidias de *Metarhizium anisopliae* producidas por cultivo sólido y, su capacidad infectiva de la cepa contra *T. molitor*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los insecticidas de síntesis química han sido utilizados de manera descontrolada para el manejo de diferentes especies de plaga insecto, esto ha provocado el desarrollo de resistencia por parte de las poblaciones de insectos además de problemas de contaminación de agua y suelos, disminución de organismos antagonistas de los insectos plaga como son depredadores y parasitoides. Por lo anterior, existe la necesidad de buscar alternativas viables para el manejo de plagas tipo insecto. Una alternativa es el control biológico, en el cual se usan organismos que tienen la capacidad de interrumpir el ciclo biológico del organismo plaga, éste presenta ventajas como especificidad de hospedero, control a largo plazo, así como disminuir la población que es resistente a insecticidas. Existen especies de hongos entomopatógenos integrantes del género *Metarhizium* que tienen la capacidad de infectar a diferentes especies de insectos. La efectividad de este ACB dependerá del porcentaje de mortalidad que pueda ocasionar al hospedero, haciendo necesario reproducir conidias en grandes cantidades y a su vez sé que estas preserven la capacidad de infectar al insecto plaga y para esto se debe establecer un sistema de cultivo que mantenga tales características. Por lo anterior, se propone aislar cepas del género *Metarhizium*, cultivarlas en fermentación sólida para el mantenimiento de la capacidad infectiva, lo cual se probará utilizando el escarabajo *T. molitor*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Plaga

El término plaga hace referencia a cualquier organismo que se reproduce descontroladamente y causa desequilibrio en el ambiente en el que se encuentra. Una plaga agrícola es aquella que disminuye el rendimiento de los cultivos, estas plagas pueden ser plantas, insectos, roedores, aves y microorganismos, los cuales pueden causar pérdidas parciales o totales de la producción (Guevara y Brechelt, 2004; Kogan y Prokopy, 2009).

4.1.1 Manejo de plagas

Comenzando con la síntesis de DDT (dicloro difenil tricloroetano) hasta la fecha, se han utilizado plaguicidas químicos sintéticos para el control de plagas. Debido a la toxicidad de estos plaguicidas y su permanencia en el ambiente su uso ha generado contaminación ambiental, pérdida de biodiversidad e incluso pérdida de vidas humanas. Asimismo, el uso de plaguicidas sintéticos ha provocado que las poblaciones de insectos desarrollen resistencia, además de la disminución de las poblaciones de insectos benéficos como depredadores naturales de estas, de manera que en los campos agrícolas se disminuye la regulación natural de insectos plaga (Hoddle y Van Driesche, 2009). A pesar de esto, el uso de plaguicidas químicos de síntesis sigue siendo el principal método de control que utilizan los agricultores para combatir plagas debido a su amplio espectro y TL_{50} cortos, sin embargo, es un control temporal que requiere de aplicaciones periódicas al registrarse infestaciones en los cultivos (Santos, 2014). Existe registro en diferentes noctuidos plagas que presentan resistencia a insecticidas que pertenecen a los grupos químicos de los piretroides, carbamatos y organofosforados (Bernardi *et al.* 2015; Carvalho *et al.*, 2013 y Yu y McCord, 2007).

4.1.2 Manejo integrado de Plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), consiste en el empleo de las diferentes técnicas disponibles para combatir plagas y posteriormente se integran medidas que disminuyan el desarrollo de las poblaciones de organismos plaga tomando en cuenta el contexto ecológico y biológico de la especie, donde se justifica el empleo de plaguicidas químicos solo si su omisión compromete la producción y existe el riesgo potencial de pérdidas económicas, esto siempre y cuando no resulte nocivo para la salud humana y el ambiente. En el MIP se pretende garantizar además que sean de bajo impacto ambiental, económicamente viables y que los resultados sean a largo plazo. Uno de los métodos utilizados para el MIP incluye la aplicación de organismos vivos que son antagonistas de los insectos plaga, es decir, control biológico (Prokopy y Kogan, 2009).

4.2 Hongos entomopatógenos

Un hongo entomopatógeno es cualquier especie perteneciente al reino Fungi, capaz de causar infección que deriva en una enfermedad observable en una o varias especies de insectos (Chandler, 2017). Provocan disminución en la densidad de población, ya que se registran epizootias naturales ocasionadas por estos hongos, donde destacan dos órdenes: Entomofitoromicetos e Hipocreales, este último orden es conocido por poseer representantes entomopatógenos comúnmente utilizados en control biológico de insectos. A diferencia de las especies de Entomofitoromicetos, las especies entomopatógenas de hipocreales se caracterizan por ser más fáciles de cultivar (Steinkraus, 2007).

4.2.1 Biología del orden Hipocreales

Los hongos entomopatógenos hipocreales infectan a sus hospederos penetrando directamente el tegumento, iniciando con la adhesión de la conidia a la epícuticula, donde germinan y finalmente atraviesan la procutícula usando diferentes estrategias de penetración: presión mediante las puntas hifales y secreción de enzimas proteolíticas (St. Leger *et al.*, 1991). Presentan altas tasas de crecimiento dentro del hospedero y también altas tasas de infección a otros hospederos susceptibles, por lo

que no es raro encontrar tasas de mortalidad del 100% provocadas por hongos entomopatógenos del orden hipocreales. Por lo anterior, es que estos hongos son utilizados tradicionalmente como agentes de control biológico, y sobre todo los hongos anamorfos, los cuales son considerados adecuados para ser producidos a gran escala (Steinkraus, 2007). Los principales géneros entomopatógenos se dividen en tres familias hipocrealeanas (Humber, 2008):

- Clavicipitaceae:
Teleomorfos entomopatógenicos: *Hipocrella*, *Metacordyceps*, *Regiocrella*, *Torrubiella*.
Anamorfos entomopatógenicos: *Achersonia*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, algunos hongos parecidos a *Paecilomyces*, excluyendo a *Isaria sensu stricto*.
- Cordycipitaceae:
Teleomorfos entomopatógenicos: *Cordyceps*, *Torrubiella*.
Anamorfos entomopatógenicos: *Beauveria*, *Microhilum*, *Engyodontium*, *Isaria*, especies parecidas a *Mariannaea*, *Lecanicillium*, *Simplicillium*.
- Ophiocordycipitaceae:
Teleomorfos entomopatógenicos: *Ophiocordyceps*, *Elaphocordyceps*.
Anamorfos entomopatógenicos: *Haptocillium*, *Harposporium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, algunas especies parecidas a *Paecilomyces*, *Paraisaria*, *Sorospora*, *Syngliocladium*, *Tolypocladium*.

De los cuales los géneros más utilizados como ACB de insectos plaga son: *Isaria*, *Lecanicillium*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Faria y Wraight, 2007; Grijalba *et al.*, 2018).

4.2.2 Ecología e interacción hospedero-patógeno

La presencia natural de hongos entomopatógenos depende de la disponibilidad y densidad del hospedero, la presencia de fuentes alternativas de nutrición, tipo de hábitat y condiciones ambientales (Zare y Gams, 2001). Las especies hipocrealeanas teleomórficas se encuentran en hábitats no perturbados por actividad humana, como bosques (Sung *et al.*, 2007). Al contrario, los hongos hipocrealeanos anamorfos son

componentes ubicuos del microbiota del suelo en agroecosistemas, sin embargo, es posible encontrarlos en zonas boscosas no perturbadas (Keller *et al.*, 2003). Debido a que los hongos se encuentran en suelo, esto les confiere la ventaja de acceder a un número amplio de potenciales artrópodos hospederos, a su vez que aprovechan los nutrientes liberados de los exudados de las raíces de las plantas, además el suelo protege al micelio fúngico y da resguardo a las conidias contra el daño producido por la radiación UV, así como protección de condiciones extremas de frío y calor (Vega *et al.*, 2009).

El rango de hospedero varía según el género y la especie. Por ejemplo, los hongos entomopatógenos anamórficos como *Metarhizium* (como continuo de especies) pueden ser tanto especialistas como generalistas o tienen rango de hospederos intermedio (Hu *et al.*, 2014).

Respecto a la conidiación, una vez que se completa el ciclo dentro del hospedero, los hongos anamórficos producen una cantidad de conidias haploides generadas asexualmente que se dispersan pasivamente desde el cadáver del insecto por un periodo corto de tiempo y a menudo caen al suelo, lo que les facilita el acceso a otros hospederos (Goettel *et al.*, 2005).

4.3 Género *Metarhizium*

El género *Metarhizium* pertenece al Filo de hongos ascomicetos. Este género se caracteriza por tener representantes de especies entomopatógenas (Goettel *et al.*, 2005). Se han identificado alrededor de 30 especies de hongos entomopatógenos gracias a estudios de secuenciación. Los nichos ocupados por estas especies son variados, encontrándose representantes saprófitos, habitantes de rizosfera, endófitos y también muestran simbiosis complejas como patógenos de insectos, y antagonistas de hongos patógenos de plantas (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018).

4.3.1 Características fúngicas

El género *Metarhizium* contiene especies anamórficas que no producen sinema y especies teleomórficas (Sung *et al.*, 2007). Los conidióforos son estructuras

especializadas en la producción de conidias, pueden ser ramificados o simples. Las conidias suelen ser distintivas entre las especies del género *Metarhizium*. La coloración de las conidias puede ser hialina, lila, marrón o verde. Sin embargo, no es posible guiarse solo de estas características morfológicas para determinar la especie, debido a que existen especies estrechamente relacionadas. Las características del género son imprecisas, ya que existe la posibilidad de solapamiento de éstas entre especies (Kepler y Rehner, 2013). En medio agar, las colonias presentan coloración verde oscura, verde brillante, blanca o castaña, e incluso pueden ser bicolors. La morfología y coloración de una especie del género *Metarhizium* cambia según el medio en el que se cultive (Kamp y Bidochka, 2002). Las especies de este género son mesófilas, es decir que crecen a temperaturas entre los 25 °C y 30 °C (Roberts y Hajek, 1992), y presentan una muerte térmica a los 50 °C, sin embargo, existen especies termorresistentes (Bidochka *et al.*, 1998).

4.3.2 Espectro de hospedero

El espectro de hospedero puede variar según la especie de entomopatógeno. Existen especies anamórficas del género de *Metarhizium* que tienen un amplio rango de hospederos. Algunas especies son capaces de infectar más de 200 especies de insectos representados por los órdenes Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Coleoptera (Zimmermann, 2007). El género *Metarhizium* tiene una amplia diversidad relacionada al hábitat, condiciones climáticas, hospederos. Existe evidencia de divergencia del género *Metarhizium*, como especies especialistas y especies generalistas (Hu *et al.*, 2014). Se han encontrado especies de *Metarhizium* en suelos agrícolas de México, que infectan a distintas especies de insectos y existe mayor diversidad del género *Metarhizium* que otros géneros de entomopatógenos relacionados a los agroecosistemas en México (Carrillo-Benítez *et al.*, 2013). Sin embargo, según otro estudio la presencia de este género es menos abundante a consideración del género *Beauveria* (Pérez-González *et al.*, 2014).

4.3.3 *Metarhizium* spp. contra *Spodoptera frugiperda*

Existen diferentes especies del género *Metarhizium* que infectan naturalmente poblaciones de *S. frugiperda* como *M. robertsii*, *M. rileyi* y *M. anisopliae* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; Grijalba *et al.*, 2018; Ordóñez-García *et al.*, 2018).

Se han reportado altas tasas de mortalidad en estudios *in vitro* en *S. frugiperda* provocadas por el hongo entomopatógeno *M. rileyi*, por ejemplo, Villamizar *et al.* (2004), logró una mortalidad del 85% en larvas del segundo instar en 14 días utilizando una concentración de 1×10^6 conidias mL^{-1} . Lo anterior superado por Pavone, *et al.* (2009) quienes observaron 100% de mortalidad en larvas del segundo instar con diferentes soluciones de conidias y una TL_{50} de 5.4 días. Bosa *et al.* (2004), utilizaron la cepa Nr-007, la cual ocasionó 100% de mortalidad en larvas del segundo instar de *S. frugiperda*, bajo condiciones controladas de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ y 65% de temperatura y humedad relativa, respectivamente; las larvas fueron colocadas en hojas de *R. communis* que se asperjaron con una solución de 1×10^7 conidios mL^{-1} de la cepa Nr-007. También se reportaron en este mismo estudio Dosis Letal Media (DL_{50}) de 44 conidias por larva en 10 días, y una Dosis Letal 90 (DL_{90}) de 3.3 conidias por larva a los 6.2 días; Tiempo Letal Medio (TL_{50}) y Tiempo Letal 90 (TL_{90}) de 7.9 días y 11 días, respectivamente y por último Concentración Letal Media (CL_{50}) y Tiempo Letal 90 (CL_{90}) 9.8×10^3 conidias mL^{-1} a los 11 días y 2.2×10^5 conidias mL^{-1} , respectivamente. Méndez *et al.* (2007), realizaron pruebas de virulencia en larvas del tercer instar *S. frugiperda* colocándoles unas gotas de solución de conidias de la cepa Nr-003, obteniéndose una DL_{50} de 9.7×10^5 conidios mL^{-1} , por lo que se requieren más conidias de esta cepa de *M. rileyi* para matar a la mitad de la población de gusano cogollero que en el estudio realizado por Bosa *et al.* (2004), sin embargo, presentan una TL_{50} menor que en el anterior estudio. Es probable que la DL_{50} fue mayor en el estudio de Méndez (2007), debido a que se utilizó el tercer instar. De acuerdo con Ignoffo *et al.* (1976) la aplicación de conidias debe de realizarse cuando las larvas se encuentren en sus primeras etapas de desarrollo. En otro estudio se realizaron pruebas en condiciones de invernadero ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR) aplicando por planta de maíz 2 mL de solución a distintas concentraciones de la cepa Nm06 y después colocaron larvas del

segundo instar de *S. frugiperda* sobre las plantas de maíz, donde se obtuvo una Concentración Letal Media (CL₅₀) de 1.17×10^4 conidias mL⁻¹ y una Concentración Letal 90 (CL₉₀) de 4.03×10^6 conidias mL⁻¹.

M. anisopliae ha sido probada contra *S. frugiperda* en combinación con el insecticida spinosad ocasionando una mortalidad del 47% de larvas de este lepidóptero, y se reporta una esporulación en un 96% de estos individuos (Rivero-Borja *et al.*, 2018). A su vez, se reportó que una cepa nativa de *M. anisopliae* causó 72.5% de mortalidad en larvas de *S. frugiperda*, mortalidad mayor en comparación con una cepa comercial a una concentración de 5.3×10^4 conidias mL⁻¹ 72 horas después de la infección (Romero-Arenas *et al.*, 2014). A su vez se obtuvo una mortalidad de 78% en larvas de *S. frugiperda* cuando se aplicó una concentración de 1×10^9 conidias mL⁻¹ de *M. anisopliae* y una CL₅₀ de $8,18 \times 10^6$ conidias mL⁻¹, sin embargo, un aislado de *B. bassiana* ocasionó una mortalidad del 96.6% en larvas del gusano cogollero a 1×10^9 conidias mL⁻¹ y una CL₅₀ de 5.9×10^3 conidias mL⁻¹ y un TL₅₀ de 3.6 días (García *et al.*, 2014). Se ha utilizado a *M. robertsii*, un aislado nativo del estado de Tamaulipas, en campos experimentales de maíz el cual redujo la incidencia de *S. frugiperda* en 80% (Hernández-Trejo *et al.*, 2019). Un aislado comercial de *M. anisopliae*, Ma-30, se utilizó a una concentración de 1×10^8 conidias mL⁻¹ en el segundo estadio de larvas de *S. frugiperda*, registrándose una mortalidad del 100% y a su vez esta cepa presentó altas tasas de esporulación (Ramos *et al.*, 2020).

Considerando lo anterior, los resultados demuestran que *M. rileyi* es un agente potencialmente más eficiente que las cepas de *M. anisopliae*, esto puede deberse a que *M. rileyi* tiene mayor afinidad por noctuidos a diferencia de *M. anisopliae* y *M. robertsii* considerados generalistas (Kumar *et al.*, 1997; Zimmermann, 2007; Aw y Hue, 2017).

4.3.4. Mecanismos de infección

Los mecanismos de infección implican la adhesión de la conidias con el hospedero susceptible (Hesketh *et al.*, 2010). Las conidias se adhieren a la cutícula mediante interacciones hidrofóbicas, para lo cual se necesita la producción de proteínas como las hidrofobinas de superficie conidial (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Otras proteínas involucradas en la adhesión son las adhesinas, entre ellas la adhesina *Mad 1* (*Metarhizium adhesión 1*) contribuye a la unión de la espora a la superficie del hospedero (Wang y St. Leger, 2007). Sin embargo, la adherencia está condicionada por factores abióticos como la composición de la cutícula del insecto y factores ambientales (Boucias y Pendland, 1991). La mayoría de los hongos entomopatógenos necesitan alta humedad (>90%) para germinar (Okuno *et al.*, 2012). Después de la adhesión de la conidia, la cutícula debe de ser penetrada, este proceso depende de la producción de enzimas proteasas, quitinasas y lipasas. Contrario a lo que se considera, la cutícula del insecto se compone principalmente de proteínas, mientras que la quitina se encuentra en menor proporción (Pedrini, 2018). El género *Metarhizium* produce una variedad de proteasas, y se considera que la proteasa similar a subtilisina (Pr1) es la más importante en patogénesis de insectos. Existen otras proteínas importantes como las metaloproteinasas, serin-proteasas y peptidasas que son capaces de degradar las proteínas presentes en la cutícula (St. Leger *et al.*, 1998), de tal manera que las enzimas degradadores de esta juegan un papel esencial en la adquisición de nutrientes a la vez que se evita la defensa inmune del hospedero por medio de degradar proteínas antimicóticas del hospedero y regulando el pH microambiental (St. Leger *et al.*, 1999).

El mecanismo de penetración sigue hasta llegar al hemocele del insecto, donde este reacciona con mecanismos de defensa inmune, llevando a cabo mecanismos de fagocitosis, encapsulación o nodulación para combatir la infección (Butt *et al.*, 2016). Una vez que el hongo se encuentra en el hemocele cambia su morfología de micelio filamentoso a formas celulares parecidas a levadura llamadas blastoesporas, estas últimas se multiplican en el hemocele para invadir otros tejidos (Schrank y Vainstein, 2010). Cuando el hongo se encuentra en el hemocele produce destruxinas que

colaboran en la patogénesis (Samuels *et al.*, 1988) e inducen parálisis flácidas en los hospederos, generando mal funcionamiento del intestino medio, túbulos malpighianos y tejidos musculares (Dumas *et al.*, 1994). Algunas destruxinas se encuentran relacionadas con la virulencia y especificidad del hospedador, sin embargo, no son suficientes por sí mismas para ocasionar la muerte. Las cepas aisladas de *Metarhizium* que producen altas cantidades de destruxinas son más virulentas (Sowjanya y Vadlamani, 2008) y se debe a que suprimen el sistema inmune del hospedero (Pal *et al.*, 2007). Respecto al tejido muscular aquí el hongo acumula masa celular y crece hasta que el micelio se ramifica a través del insecto y una vez que se han consumido los recursos se desarrollan las conidias, las cuales emergen del cadáver del hospedador (Butt *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos artrópodos han desarrollado estrategias para evitar el contacto con el inóculo fúngico, entre estas estrategias se encuentra el hábito de acicalarse o exponerse a la radiación solar para elevar la temperatura corporal, proceso llamado fiebre conductual, la cual tiene la finalidad de eliminar hongos que no sobreviven a ciertas temperaturas (Okuno *et al.*, 2012).

4.3.5 Enzimas esenciales durante el desarrollo de la infección

Los hongos entomopatógenos secretan enzimas hidrolíticas como proteasas, quitinasas y lipasas para poder invadir a sus hospederos, con el fin de degradar los componentes cuticulares a su vez que obtienen nutrientes para que el hongo logre invadir hasta completar su ciclo de vida. La secreción de estas enzimas dependerá de la cutícula del insecto y la forma de invasión del entomopatógeno (Shah y Pell, 2003).

Lipasas

La cutícula del insecto contiene quitina y proteínas, así como capas de lipoproteínas, ácidos grasos y esteroides, estos elementos son necesarios para proteger al insecto de desecación en condiciones extremas e impiden la penetración de insecticidas químicos. De forma que las lipasas y lipoxigenasas participan en la degradación y penetración de la cutícula del hospedero (Santos, 2014). Sin embargo; existen reportes que demuestran que el hospedero inhibe la actividad de estas enzimas afectando su

germinación, y se considera que se debe a que los ácidos grasos disminuyen hidrofobicidad y carga eléctrica de los conidios de forma que se dificulta la adhesión a la cutícula del insecto (Khachatourians y Qazi, 2008). Cuando las lipasas logran intervenir e hidrolizar los lípidos de la cutícula es posible que se logre la germinación y aumenta la virulencia del hongo (Supakdamrongkul *et al*, 2010), En condiciones naturales, las primeras enzimas hidrolíticas expresadas son las lipasas, seguido de las proteasas y por último las quitinasas, así la combinación de estas desintegra la cutícula (Ali *et al.*, 2009).

Proteasas y peptidasas

Las enzimas proteolíticas al momento de infectar al insecto cumplen con dos funciones: contribuir en la degradación de la cutícula y actuar como factores de virulencia. Anteriormente se mencionó que las enzimas producidas por los hongos entomopatógenos se encuentran en un complejo de proteasas tipo serina, tripsinas, metaloproteasa y diversas exopeptidasas que son importantes en la degradación de la cutícula (Smith *et al.*, 1981). De las familias de enzimas proteasas que contribuye a la infección, la principal proteasa es miembro de la familia de las subtilisinas proteasas K y se le conoce como quimoelastasa proteasa (Pr1), la expresión de esta proteína está involucrada directamente con la composición cuticular del insecto (Ali *et al.*, 2009). También la enzima tipo tripsina (Pr2) es importante para el proceso de infección, esta se expresa en las primeras etapas y se sugiere que posee un papel complementario al desempeñado por la Pr1 en la degradación de proteínas de cutícula (Fonseca *et al.*, 2010).

Se ha determinado que la cutícula del insecto se compone de quitina-proteína, donde no pueden ingresar las hifas sin el auxilio de enzimas proteolíticas y posteriormente quitinasas. Por tanto, la regulación de proteasas es un proceso complejo de tipo catabólico (St. Leger *et al.*, 1991).

Quitinasas

St. Leger *et al.* (1998), reportaron la producción de varias quitinasas con funciones distintas. Existen quitinasas que se coordinan con proteasas para degradar la cutícula, la cual tiene una composición media entre 20-40% de quitina. La hidrólisis de la quitina está regulada por enzimas como las exo (N acetilglucosamidasa y quitobiasa) quitinasas y las endoquitinasas. La expresión de las anteriores quitinasas está regulada por monómeros solubles de quitina, glucosamina, N-acetilglucosamina y quitobiosa, que se encuentran en pequeñas proporciones en la cutícula del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995). Las quitinasas también contribuyen en las últimas etapas del ciclo de infección cuando el hongo conidia y auxilian en la defensa para inhibir el desarrollo de otros hongos (Wattanalai *et al.*, 2005)

4.4. Cultivo de *Metarhizium* spp.

El cultivo de especies de *Metarhizium* puede realizarse tanto en líquido como en sólido. Esta última también llamada fermentación en estado sólido o cultivo de estado sólido es una tecnología adecuada para la producción de conidias infectivas y a su vez poder aprovechar residuos agroindustriales de fácil acceso, por lo que presenta ventajas económicas respecto al cultivo sumergido (Bhanu-Prakash *et al.*, 2008).

Se han realizado diferentes estudios de producción de conidiosporas de *Metarhizium* spp en cultivo sólido en sustratos viables que han probado tener alto rendimiento de conidias obtenidos sobre granos de arroz, sorgo y trigo o incluso frituras de plátano y papa (Devi, 1994; Thakre *et al.*, 2011). Según los anteriores resultados el rendimiento más alto de conidias de *M. rileyi* se logró en sorgo con una producción de 10^{11} conidias (Devi y Chowdary, 2000). En el caso *M. anisopliae*, se considera que una producción de 1×10^9 conidias por gramo de materia seca (gms^{-1}) es la esperada en sustrato de arroz (Barajas *et al.*, 2010), sin embargo, se ha reportado una producción de 2.67×10^9 conidias gms^{-1} en granos de arroz sancochados reciclados cultivados en bolsa (Barra-Bucarei *et al.*, 2016). Por otro lado, Van-Breukelen *et al.*, (2011), reportan en biorreactor empleando cáñamo como sustrato una producción de $5.5 \times 10^{14} \text{ m}^{-3}$ de

conidias de *M. anisopliae*. Asimismo, se obtuvo una producción de 1.09×10^9 conidias gms^{-1} de *M. anisopliae* en biorreactor de lecho empacado utilizando como sustrato arroz (Mendez-González *et al.*, 2018), rendimiento equivalente a lo esperado en bolsas (Barajas *et al.*, 2010).

4.5. Factores que afectan la virulencia de hongos entomopatógenos

Otro problema aunado a la producción de conidias infectivas es mantener la infectividad. Los conidios pueden ser mantenidos en medios que no contengan agar, sin embargo, la consecuencia es la pérdida de la virulencia. En el caso de la especie *M. rileyi* es aconsejable utilizar medio Sabouraud maltosa agar adicionado con 1% o 2% de extracto de levadura, este medio es llamado SMAY (Sabouraud-Maltose-Agar-Yeast), y es utilizado comúnmente en laboratorio para conservación de distintos hongos entomopatógenos (Pendland y Boucias, 1997). Cuando las cepas de *M. rileyi* son conservadas en condiciones de laboratorio se ha observado que su virulencia se ve comprometida con cada transferencia de medio. Esta virulencia puede restaurarse con la exposición al hospedero (El-Sayed *et al.*, 1993), sin embargo, se ha observado que la capacidad para esporular en cadáveres también se ve afectada por el número de generaciones producidas en medio de cultivo (Morrow *et al.*, 1989). Además, según Ignoffo *et al.*, 1982, la disminución de la capacidad infectiva solo se ve comprometida si la cepa de hongo es inestable o esta se ve sometida a condiciones de estrés, probablemente debido a la represión de genes involucrados en la virulencia como el gen que codifica para la proteasa Pr1 en condiciones de inanición y por tanto se considera que la capacidad infectiva está asociada a la expresión de proteína Pr1 (Shah *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2009). Sin embargo, también se ha reportado la disminución de esta proteasa en subcultivos sucesivos de *M. anisopliae* (Shah *et al.*, 2007).

A pesar del potencial de ciertas especies de *Metarhizium* como agentes de control, existen problemas asociados a su cultivo, ya que muchas veces los medios como SMAY son inadecuados para escalar o no mantienen la producción de conidias

infectivas a pesar del rendimiento y escalabilidad del sistema de cultivo (Fronza *et al.*, 2017). Para poder comprobar como impacta el medio y sustrato de cultivo en la infectividad, es necesario el utilizar un organismo fácil de reproducir como modelo, en este caso *Tenebrio molitor*, el gusano de la harina es un modelo de insecto/coleóptero viable para comprobar la relación entre medio de cultivo e infectividad.

4.6 *Tenebrio molitor*

El escarabajo de los granos, *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: Linnaeus), es uno de los “bichos oscuros” pertenecientes a la familia Tenebrionidae. Las especies del género de *Tenebrio* poseen tonalidades oscuras, con antenas moniliformes (en forma de collar, compuesto de segmentos redondeados y seriado), con las partes bucales algunas veces reducidas en tamaño, El tórax está finamente puntuado y las alas delanteras son longitudinalmente estriadas. En condición silvestre, comúnmente se alimentan de hongos. Sin embargo, *T. molitor* es una especie introducida que desarrolla su ciclo biológico en cereales y granos almacenados y se asocian a este coleóptero pérdidas de hasta 15% de las pérdidas de productos amiláceos en todo el mundo y por lo tanto se le considero un insecto plaga, considerándose una de las especies más importantes que infestan granos durante su almacenamiento (Kavallieratos *et al*, 2019; Vigneron *et al*, 2019 y Howard, 1995). Los gusanos de la harina normalmente pasan en estados larvales durante el invierno. Los adultos emergen en la primavera y los meses primeros del verano, viven alrededor de 2 meses. En estado natural, el periodo larval dura entre 1.5 años a 2 años. Cuando se crecen en condiciones de temperatura, humedad y comidas, se obtiene cría ininterrumpidamente todo el año y todas las etapas se desarrollan (Cotton, 1927 y Robinson, 2005).

4.6.1 Ciclo biológico de *Tenebrio molitor*

Eclosión

El proceso de eclosión, o la emergencia del adulto del capullo pupal, presenta una situación crítica para *Tenebrio*. Aparentemente desde el número de eclosiones imperfectas que pueden ser encontrados en cualquier cultivo de *Tenebrio* que algunas dificultades son frecuentemente encontradas por los animales durante el proceso. El proceso entero dura aproximadamente trece minutos. Varias etapas ocurren en la siguiente secuencia: A. contracciones rítmicas del tarso; extensión del abdomen; B. contracciones violentas del abdomen; movimiento asincrónico de los pies; C. contracción y expansión alternas de los segmentos abdominales; cabeza y piernas protorácicas libres; las antenas y las partes de la boca se mueven; D. patas mesotorácicas libres a excepción del tarso; E. Patas metatorácicas libres, excepto el tarso; F. patas metatorácicas completamente libres; la exuvia expulsada es clara; G. las piernas se mueven en sincronía al caminar; después de descansar por un corto período en su superficie ventral, el escarabajo se pone de pie y comienza a caminar (Howard, 1995).

Adulto

Según Cotton (1927) *T. molitor* es de un negro brillante de hábitos nocturnos y pueden ocasionalmente ser vistos por la noche atraídos por las luces brillantes. En comparación con muchos de las plagas de granos almacenados, los adultos de las harinas viven relativamente poco. Cuando se crece a *T. molitor* en harina de Graham y residuos de carne alcanza la fase adulta entre 105-675 días (Robinson, 2005 y Cotten, 1927).

Oviposición

El apareamiento se lleva a cabo en unos pocos días después de emerger y una vez fertilizado, las hembras escarabajo son capaces de producir huevos fértiles prácticamente a través del periodo de ovoposición. El periodo pre ovoposición es de entre una a tres semanas, siendo influenciada por la temperatura. Los gusanos de la

harina son relativamente ovopositores prolíficos. Las hembras de *T. molitor* depositan en promedio 276 huevos cada vez. El número más pequeño de ovoposición por una hembra ha sido de 77, y el mayor 576. El periodo de oviposición del gusano de la harina es comparativamente corto cuando se contrasta con otros escarabajos que infestan productos almacenados. El periodo de oviposición de hembras *T. molitor* va desde 21 días hasta 67. La tasa y frecuencia de oviposición varía considerablemente. Los escarabajos criados en el laboratorio realizaron oviposiciones diarias hasta por 17 días consecutivos, o en intervalos de uno a nueve días entre cada oviposición. Ocasionalmente un huevo fue puesto durante un periodo de 24 horas, mientras que otras ocasiones se ponen 60 huevos durante un periodo similar. El mayor número de huevos ovopositados durante un periodo similar fue de 40 para una hembra de *T. molitor* (Cotten, 1927).

Fase de huevo

El huevo es blanco, oblongo oval, se depositan solos o en pequeños clústeres, usualmente están flojos en la harina o el alimento en los cuales los insectos son criados. Cuando recién se ovopositan estos están cubiertos con una secreción pegajosa que se cubre rápidamente por partículas de comida en las cuales se han depositado. El periodo de incubación varía considerablemente en ambas especies y se influencia por el cambio de temperatura. Con una temperatura media promedio de 22 °C a 31 °C, la etapa de huevo dura de cuatro días a una semana, mientras que con una temperatura media de 18 °C y 21 °C el periodo se retrasa tanto como 19 días (Cotten, 1927).

Fase larval

El tiempo de duración de la fase larval varía considerablemente y se ve influenciado por varios factores. El periodo de duración corto normal para *T. molitor* es de 281 días, que cubre de julio a mayo; el periodo larval más largo se ha registrado de 629 días, cubre desde junio a marzo. De todos los especímenes que se criaron en laboratorio,

más de la mitad necesitó una temporada para completar su crecimiento (Robinson, 2005). Los especímenes criados en condiciones favorables de temperatura, humedad y comida completaron la fase en seis meses. El número menor de mudas registradas en promedio fue de 17, 18 y 19 veces. Las larvas totalmente desarrolladas con capaces de capaces de permanecer meses con poco cambio en el tamaño o apariencia y durante invierno permanecen como larvas. El gusano de la harina puede sobrevivir periodos largos sin comida y humedad (Cotten, 1927).

Pupación

Después de convertirse aparentemente en larvas totalmente grandes se puede transformar a la forma pupal o permanecer por muchas mudas con un poco de cambio en el tamaño o apariencia exterior. Cuando están a punto de pupar, las larvas de *T. molitor* salen a la superficie del alimento en el que viven y pasan por un breve período pre pupal durante el cual son lentas y exhiben pocos signos de vida. El tiempo que pasan en fase pupal depende principalmente de las condiciones de temperatura. La fase pupal ronda de máximo 18 días a temperatura media de 18 °C y 6 días a temperatura media de 28 °C (Cotten, 1927).

4.6.2 Modelo de infección en *T. molitor*

El gusano de la harina, *T. molitor*, es considerado insecto modelo debido a su facilidad de crianza además de conocerse la biología, genoma y sistema inmune de este (Eriksson *et al*, 2020 y Vigneron *et al*, 2019). *T. molitor* ha sido utilizado como modelo de estudios de infecciones ocasionadas por hongos de importancia en salud humana, así como también ha sido utilizado como modelo para probar infectividad de cepas de hongos hospederos de insectos del género *Metarhizium* (Aguilera *et al*, 2017 y Souza *et al*, 2015). Las larvas de esta especie han servido para medir la diversidad en suelo de comunidades entomopatógenas de hongos como *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lavendulum*, *Cordyceps cicadae*, y diferentes especies del género *Metarhizium* como *M. brunneum*, *M. robertsii* y *M. anisopliae*, por medio de la

incubación de estas larvas con el suelo que se desea estudiar (Sant *et al*, 2018 y Sharma *et al*, 2018).

Por otro lado, las larvas del gusano de la harina se utilizan para el estudio de infección de cepas de hongos hospederos de insectos, donde estas mismas son usadas para aislar hongos entomopatógenos y a su vez probar infectividad. En el 2020, Alcántara *et al*. (2020), realizaron estudios de aislamiento de *Metarhizium*, obteniendo cepas virulentas de *Ml anisopliae*. Además, se ha utilizado a este coleóptero para observar el efecto de las condiciones en las que se cultiva *M. robertsii* y como esto modula la virulencia de esta sobre *T. molitor* obteniendo diferencias en el porcentaje de infección según sea el origen de estas (Olivera y Rangel, 2018 y Oliveira *et al*, 2017).

Con la información anterior se resalta la necesidad de explorar sustratos capaces de generar conidias de *M. anisopliae* con capacidad infectiva contra el hospedero insecto.

5. HIPÓTESIS

El empleo de cultivo sólido en mezclas de arroz y peptona permite la producción de al menos 1×10^9 conidias de *Metarhizium* sp. y la presencia de proteínas completas en el sustrato incentiva la producción de proteasas necesarias para preservar la infectividad contra el tercer instar larval de *Tenebrio molitor*

6. OBJETIVOS

6.1. GENERAL

Evaluar la actividad infectiva de *Metarhizium anisopliae* cultivada en sustrato sólido de arroz y peptona contra *Tenebrio molitor*

6.2. ESPECÍFICOS

Aislar e identificar cepas de *Metarhizium* obtenidas de suelos agrícolas

Determinar el efecto del cultivo en arroz y peptona sobre el crecimiento y la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae*.

Analizar el efecto de los soportes a base de arroz y peptona sobre la producción de proteasas extracelulares.

Determinar el efecto del cultivo sólido de arroz y peptona sobre la infectividad conidial contra el tercer instar larval.

7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención de *Metarhizium* spp.

Se tomaron muestras de 400 g del suelo radicular de cultivos de maíz, en tres comunidades diferentes, obteniéndose muestras en Amealco (13) (20° 16' 14" N, 100° 02' 91" O), San Cristóbal (15) (20° 55' 00" N, 99° 97' 25" O) y San Joaquín (17) (20° 91' 72" N, 99° 97' 25" O) respectivamente, dando un total de 45 muestras. Se eligieron aleatoriamente tres transectos de 50 m c/u y tomando una muestra cada 10 m, depositándose en una bolsa plástica sellada herméticamente, las cuales se colocaron en un contenedor a ± 10 °C, se trasladaron al Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

7.1.1. Método de cebo con *Tenebrio molitor* para el aislamiento de hongos entomopatógenos

Se colocaron diez larvas de *T. molitor* de tercer y cuarto estadio en recipientes de 190 mL con 80 gramos de muestra de suelo. Los recipientes se mezclaron a diario para mejorar el contacto con el suelo y se roció agua destilada estéril para garantizar la humedad del suelo. Una vez que se observó la infección por hongos, se hicieron frotis dérmicos de larvas y se inocularon en placas de Petri con medio PDA BD® suplementadas con cloranfenicol ($5 \mu \text{mL}^{-1}$) y se incubaron a 25 ± 2 °C (Devi y Chowdary, 2000). Se aislaron colonias morfológicamente diferentes y se sembraron en el mismo medio hasta obtener colonias fúngicas aisladas morfológicamente uniformes.

7.2. Mantenimiento de los aislados

El mantenimiento de las cepas se hizo realizó sembrando a los aislados de *Metarhizium* sp. en medio PDA (39 g L^{-1}) incubando a 25 ± 2 °C. El medio se esterilizó

29 en autoclave a 121 °C por 15 min. Las conidias fueron inoculadas en medio PDA
30 usando el asa bacteriológica (Barra-Bucarei *et al.*, 2016).

31 **7.3. Cosecha y obtención de solución de conidias**

32 La cosecha de conidias se realizó de acuerdo con Méndez *et al.* (2010). Se añadieron
33 25 mL de una solución de 0.2% de Tween 20 a un matraz Erlenmeyer de 125 mL
34 junto a un agitador magnético de 1 cm, se selló con torunda y papel aluminio para
35 posterior esterilización en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se cosecharon las
36 esporas añadiendo 25 mL de solución de 0.2% Tween 20 al matraz con conidias, se
37 colocó el agitador magnético a baja velocidad, el matraz se mantuvo en movimiento
38 hasta barrer todas las conidias de la superficie. Posteriormente, se devolvió la
39 solución de conidias al matraz y se aumentó la velocidad de agitación. Para la
40 cuantificación de conidias se diluyó 1 mL en 25 mL con agua destilada en matraz
41 aforado, se tomaron 250 µL de la solución y se colocaron en cámara de Neubauer .
42 El conteo de esporas se realizó en microscopio óptico Velab® localizando la zona de
43 lectura con el objetivo de 4X a 10X. Se revisó el cuadro central para verificar que no
44 hubiera agregados de conidias. Después se realizó la visualización en 20X o 40X, se
45 contaron las conidias encontradas en líneas superiores y a la derecha de cada
46 cuadro. Cuando la cantidad de conidias observadas fueron iguales o menores a 15
47 esporas por cuadro pequeño, se contaron 25 cuadros del cuadrado central y en el
48 caso de ser mayor a 15 esporas por cuadro pequeño, se contaron solo 5 cuadros. El
49 cálculo de esporas mL⁻¹ se realizó mediante la siguiente formula:

$$50 \quad \frac{\text{Esporas}}{\text{mL}} = \# \text{ de cuadros contados} * 25 * \text{factor de dilución} * 1 \times 10^4$$

51

52 **7.4. Identificación de *Metarhizium* spp.**

53 Para determinar el género de los hongos aislados se utilizó el atlas de identificación
54 de Samson *et al.* (1998) y posteriormente se realizó la identificación molecular
55 mediante secuencias Internal Transcribed Sequence (ITS) para su identificación a

56 nivel de similitud de su secuencia usando la base de datos de NCBI (National Center
57 for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés).

58

59 **Identificación morfológica**

60 La identificación morfológica se realizó con la guía antes mencionada. Se tomaron
61 muestras del cultivo en caja Petri, se utilizó una cinta adhesiva presionando
62 suavemente sobre el medio esporulado para ser fijada en portaobjetos y así observar
63 estructuras y características mediante microscopía óptica (magnificación 40X), tales
64 como la apariencia de la colonia, morfología, color de hifas y esporas.

65

66 **Identificación molecular de *Metarhizium* spp.**

67 **Extracción de ADN**

68 Se realizaron extracciones de ADN mediante la técnica de CTAB utilizando micelio
69 de *Metarhizium*. Se cortaron 4 cm² de tejido micelial de cajas de Petri de cultivo PDA
70 usando un bisturí estéril y se pesaron 200 mg de muestra de tejido. Cada muestra se
71 sumergió en nitrógeno líquido en un mortero y se maceró hasta que se obtuvo un
72 polvo fino. Se transfirió la muestra hecha polvo a un microtubo de 2 mL, mantenido
73 en condiciones de congelación, se agregó 1 mL de buffer CTAB (CTAB 2%, TRIS-
74 HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, pH 8, NaCl 1.4, β-mercaptoetanol 2%) al tubo y se
75 sometió a vortex durante de 1 minuto. Se centrifugó a 12,000 RCF (Campo centrifugo
76 relativo por sus siglas en inglés) por 15 min. El sobrenadante de cada muestra se
77 recuperó y transfirió a nuevos tubos que contenían 1 mL de solución de alcohol
78 cloroformo-isoamílico y se mezcló por inmersión, para después centrifugar por 10 mi
79 a 12,000 RCF. La fase acuosa se recuperó y transfirió a un nuevo tubo y se agregó
80 un volumen 1/10 de acetato de sodio 3 M junto con 1 mL de alcohol isopropílico y
81 manteniéndola a -20 °C por 20 minutos. Después de la incubación fría, la muestra se
82 centrifugó a la misma a 12,000 RCF por 15 min. Se decantó el sobrenadante
83 cuidadosamente evitando la pérdida de la pastilla de precipitación, añadiendo 1 mL
84 de etanol al 70%. Se centrifugó por 3 min a 12,000 RCF y se retiró el sobrenadante

85 cuidadosamente. Los tubos fueron colocados boca abajo por 5 min, transcurrido este
86 tiempo se procedió a disolver la pastilla de precipitación en 50 µL de buffer Tris-EDTA
87 (TE). Todas las muestras se procesaron mediante las mismas condiciones en la
88 extracción de ADN.

89

90 **Determinación de concentración de ADN**

91 La concentración de ADN de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría
92 UV-VIS con un equipo Velab®, a una densidad óptica de 260 nm, para determinar
93 de concentración en ng µL⁻¹ se aplicó la fórmula de coeficiente de extinción (Green y
94 Sambrook, 2012):

95

$$96 \quad 2) \frac{ng}{ul} = (\text{Absorbancia} \times 50 \times 500)$$

97

98 **Amplificación de la muestra de ADN**

99 La identificación de los aislados se llevó a cabo como en Pérez Álvarez *et al.*, (2018),
100 se amplificó la región Internal Transcribed Spacer (700-1400 pb), usando el par de
101 cebadores ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS-4
102 (TCCTCCGCTTATTGATATGC): La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se
103 llevó a cabo en termociclador, con una mezcla de reacción de 25 µL que contiene 0.2
104 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM de cada primer, 1.25 U de Taq Polimerasa
105 recombinante de ADN y el programa de amplificación comprendió un ciclo de 95 °C
106 por 4 min, 30 ciclos a 95 °C por un minuto, 60 °C por 60 min y 72 °C por 2 minutos,
107 y por último un ciclo a 72 °C por 5 min. Los fragmentos de ADN amplificados se
108 visualizaron por medio de gel de agarosa 1% y electroforesis. Las muestras fueron
109 enviadas a Macrogen® Korea para su purificación, secuenciación y BLAST.

110 Las secuencias ITS obtenidas se editaron en MEGA-X versión 10.1. Éstas se
111 compararon con secuencias seleccionadas de *Metarhizium* y como grupo externo se
112 utilizó una cepa de *Aspergillus niger*. Para realizar el análisis de distancia usando el
113 método del vecino más cercano. Bootstrap con 1000 repeticiones se realizará

114 utilizando 100 ciclos de adición aleatorios cada uno, para evaluar el soporte interno
115 de la rama.

116

117 **7.5. Cultivo de *M. anisopliae* en sorgo y arroz**

118 Se realizaron cultivos de acuerdo con la metodología propuesta por Devi y Chowdary,
119 (2000) con algunas modificaciones. *Metarhizium anisopliae* se cultivó en semillas de
120 sorgo triturado; sorgo adicionado con extracto levadura al 0.5%; sorgo triturado
121 adicionado con extracto de levadura al 0.5% y peptona al 24%; arroz; arroz
122 adicionado con extracto de levadura al 0.5%; y arroz adicionado con extracto de
123 levadura al 0.5% y peptona al 24%. Estos sustratos se colocaron en bolsas
124 transparentes de polietileno con torundas de algodón sujetas con anillos metálicos.
125 Las soluciones se extracto de levadura y peptona se adicionaron justo antes de la
126 esterilización en autoclave a 15 psi por 10 minutos. Una vez que el material se
127 atemperó, en campo estéril se añadieron posteriormente 10^7 gms⁻¹ conidias
128 (contenidas en 5 mL de agua estéril) por bolsa con micropipeta y el contenido se
129 agitó diariamente para distribuir las conidias uniformemente. Las muestras se
130 incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez observada la conidiación, las bolsas se almacenaron
131 a 4°C .

132

133 **7.6. Determinación de la producción de conidiosporas de *M. anisopliae*.**

134 Para estimar la producción de conidiosporas se tomaron 2 g muestra de sustrato
135 conidias, a los cuales se les añadió buffer de fosfatos pH 6.0 de fosfatos,
136 posteriormente se sometió a centrifugación 1×10^3 RFC por 5 minutos a 4°C . Se
137 resuspendieron las conidias en solución Tween 20 al 0.2%, para realizar conteo en
138 cámara de Neubauer por medio de microscopio óptico a 40 x y realizar así el cálculo
139 de conidias por gr de sustrato.

140

141 **7.7. Determinación de la dinámica de *Metarhizium* sp. durante el cultivo**

142 **7.7.1. Determinación de curvas de pH**

143 Se tomaron muestras de las bolsas de cultivo cada 24 horas, se extrajeron 2 g de
144 medio, este se lavó mediante agitación con un volumen 20 mL de agua destilada por

145 30 minutos, el agua obtenida se usó para medir el pH del cultivo por medio de un
146 potenciómetro Hana®.

147

148 **7.7.2. Determinación de actividad proteolítica y curva de proteólisis**

149 Los extractos del cultivo se obtuvieron tomando muestra de 1 g y se añadió buffer
150 de fosfatos pH 7 colocándose en tubo de centrifuga de 50 mL para agitarse durante
151 tres minutos. Se tomaron 1.2 mL de extracto, se centrifugó a 4000 RFC por 3 min a
152 4 °C para eliminar el sustrato restante. Se recuperó el sobrenadante en tubo
153 Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras fueron congeladas a -7 °C.

154 Se utilizó el método de Azocoll de Chavira *et al.*, (1984). El volumen del ensayo fue
155 de 1.2 mL el cual contenía 0.9 mL de buffer de fosfatos pH 7, 100 µL de Azocoll
156 MEGAZYME® y 200 µL de extracto de cultivo. Se agitan las muestras por 2 horas y
157 se lee en espectrofotómetro Velab® a 590 nm.

158 **7.8. Determinación del crecimiento de *M. anisopliae* en diferentes niveles de** 159 **actividad de agua (α_w)**

160

161 Se cultivó a *M. anisopliae* en PDA modificado con etilenglicol para obtener niveles de
162 α_w de 1, 0.9955, 0.991, 0.975, 0.955 y 0.865 ajustándose con un medidor de α_w
163 AquaLab® 4TE (Boraside *et al.* 2018). El crecimiento de las cepas se midió cada 24
164 h para obtener el diámetro mayor y menor, y así aplicar la formula del óvalo para
165 obtener la superficie colonial en cm².

166

167 **7.9. Bioensayos de infectividad de *M. anisopliae* sobre larvas de *Tenebrio*** 168 ***molitor***

169 Se realizaron soluciones de conidias a una concentración de mL⁻¹ de 1 x 10⁴, 1 x 10⁵,
170 1 x 10⁶ y 1 x 10⁷ y se utilizaron 10 larvas del tercer instar de *T. molitor* por cada
171 concentración de conidias (Sant *et al.*, 2019). Se colocaron en caja Petri las larvas
172 del tercer estadio y torunda de algodón humedecida con 3 mL de solución de conidias
173 provenientes de sustrato arroz; sorgo; arroz y extracto de levadura (E.L.); sorgo y

174 extracto de levadura (E.L.); arroz peptona-E.L. y sorgo peptona-E.L. Las larvas
175 fueron mantenidas a 25 ± 2 °C en incubadora.

176 Se utilizó un diseño completamente al azar por triplicado, 10 larvas por cada
177 repetición. Y como control, se colocaron 10 larvas junto con una torunda de algodón
178 con 3 mL de Tween 20 al 0.2% en caja Petri. Se observaron diariamente las larvas
179 muertas. A partir del momento que se registró la primera larva muerta se
180 contabilizaron las muertes para determinar el porcentaje de mortalidad diariamente.

181 **7.10 Análisis estadístico**

182 Se determinó la relación concentración-respuesta, con los datos de las 288 horas (11
183 días) y tiempo-mortalidad (Cruz-Avalos *et al.*, 2019), a través de un análisis de Probit,
184 calculándose la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀).

185 Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para comprobar si los
186 tratamientos son significativamente diferentes entre sí y posteriormente se realizó
187 una prueba de Tukey para distinguir entre los tratamientos.

188 **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

189

190 **8.1. Aislamiento de *Metarhizium* spp entomopatógenas**

191 La infección en larvas de *T. molitor* se registró después de cinco días de incubación.

192 A este tiempo, comenzaron a observarse síntomas tales como la aparición de micelio

193 blanco sobre la cutícula (Figura 1A) se mostró el cambio de coloración a verde,

194 debido a la conidiogénesis (1B). En dos de los tres sitios de muestreo dieron positivo

195 a larvas infectadas por micosis: Amealco y San Joaquín. En Amealco, el muestreo

196 se llevó a cabo en un campo de maíz, donde los 13 puntos muestreados dieron

197 positivo a micosis en larvas de *T. molitor* y, en San Joaquín, de las 17 muestras

198 obtenidas solo una muestra, proveniente de suelo de huerto de manzana, dio

199 positivo para infección por hongos entomopatógenos. Finalmente, en San Cristobal

200 ninguna muestra de la comunidad de San Cristóbal presentó larvas con signos de

201 infección fúngica.



202

Figura 1. A) Progresión de la micosis en larvas de *T. molitor* y B) larva de *T. molitor* afectada por micosis

203

204 Al realizar la inoculación de estas cepas, un total de 13 aislados fueron capaces de
205 desarrollar micosis en larvas de *T. molitor*, de estas una cepa perteneciente al
206 municipio de San Joaquín y 12 pertenecientes al municipio de Amealco.

207

208 Las 13 cepas aisladas que resultaron entomopatógenas produjeron una mortalidad
209 de entre el 20 al 70 % como se especifica más adelante.

210 **8.2. Identificación morfológica**

211 Se aislaron e identificaron en total dos morfoespecies, distinguidas por el tipo de
212 conidiación, ya sea pulverulento o esponjoso, pertenecientes a la localidad de San
213 Joaquín y de Amealco, respectivamente (Figura 2A). Todas las cepas presentaron



Figura 2. Caracterización microscópica de aislados de *Metarhizium*. Se muestra una fotografía representativa de un aislado proveniente de Amealco. A) Vista macroscópica de *Metarhizium* sp. y B) vista al microscopio (40X) de *Metarhizium* sp.

214 características que correspondieron al género de *Metarhizium*. Las cepas aisladas
 215 presentaron conidias de color verde, ovales; conidióforos catenulados y basípetos e
 216 hifas septadas (Figura 2B). Estas características son típicas de la morfología de
 217 especies pertenecientes al género *Metarhizium* acorde con la clasificación del atlas
 218 de hongos entomopatógenos de Samson et al. (1998).

219 8.3 Identificación molecular

220 Los 13 aislados que mostraron actividad patogénica contra *T. molitor* fueron
 221 identificadas a nivel de especie como cepas de *M. anisopliae*, *M. robertsii* y una cepa
 222 de *Metarhizium* indeterminada por medio del programa BLAST de NCBI obteniendo
 223 un 99% de identidad entre las secuencias de la base de datos y las secuencias
 224 genotipificadas. Se generó un árbol del vecino más cercano con el programa MEGA-
 225 X versión 10.1, el cual indicó la relación entre las especies de *Metarhizium* (Figura
 226 3). Todos los hongos entomopatógenos aislados fueron identificados como especies

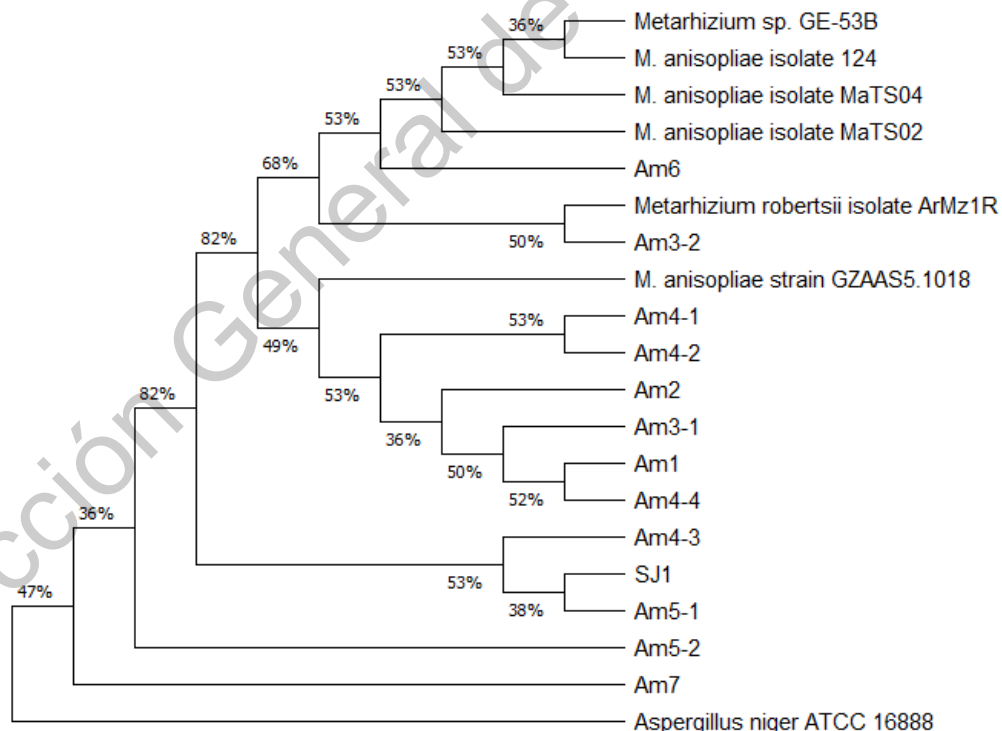


Figura 3. Analisis filogenetico de los aislados de *Metarhizium*. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y cepas representativas fueron tomada para el analisis.

227 de *Metarhizium* tanto por características morfológicas como por BLAST, este
228 resultado se esperaba mediante el uso del método de aislamiento de cebo con *T.*
229 *molitor* y además, porque *Metarhizium* es uno de los géneros entomopatógenos de
230 hongos más abundantes. *M. robertsii* y *M. anisopliae* son habitantes del suelo y se
231 consideran entomopatógenos generalistas (Kumar *et al.*, 1997; Zimmermann,
232 2007; Aw y Hue, 2017), a su vez se ha establecido que *M. anisopliae* se adapta mejor
233 a la patogenicidad de insectos que *M. robertsii* (Rezende *et al.*, 2015) porque *M.*
234 *anisopliae* se encuentra mayormente como patógeno de insectos, lo que explicaría
235 porque se encontraron cepas variadas de *M. anisopliae* que se aislaron de *T. molitor*
236 respecto a la única cepa de *M. robertsii* identificada. Behie *et al.* (2012) demostraron
237 que, en Brasil, en cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), *M. robertsii* fue la especie
238 más abundante en suelo de este género, con una ecología basada principalmente
239 en esta matriz a diferencia de *M. anisopliae* que tiene una ecología basada en la
240 patogenicidad de insectos. Resultados que corroboran los encontrados en el
241 presente trabajo donde en el modelo basado en la patogenicidad se encontraron
242 mayor abundancia de cepas de *M. anisopliae*.

243 El modelo de cebo o “bait” de *Tenebrio molitor* ayudó a cumplir el objetivo de obtener
244 cepas entomopatógenas del género *Metarhizium*. Para este método se utilizaron
245 larvas del tercer estadio de *T. molitor* expuestas a suelo radicular de los sitios de
246 muestreo: Huerto y bosque de manzano de San Joaquín, campo de maíz de la
247 comunidad de San Cristóbal en San Joaquín y campo de maíz en Amealco. Existen
248 otros métodos de aislamiento: “*in situ*” donde la larvas son dejadas en campo, en
249 este caso no se controla la temperatura ni la humedad y se monitorea el desarrollo
250 de la infección o el aislamiento directo en suelo con medios modificados, que puede
251 permitir el encontrar especies de hongos entomopatógenos pero que no
252 forzosamente sean específicos al hospedero de estudio, en contraste con el método
253 de cebo, donde las larvas al ser expuestas al suelo entran en contacto con las
254 conidias al moverse en este, y que junto con el control en el laboratorio de la
255 humedad y la temperatura, generan las condiciones para la germinación y desarrollo
256 de las conidias en las larvas, incrementando las posibilidades de encontrar hongos

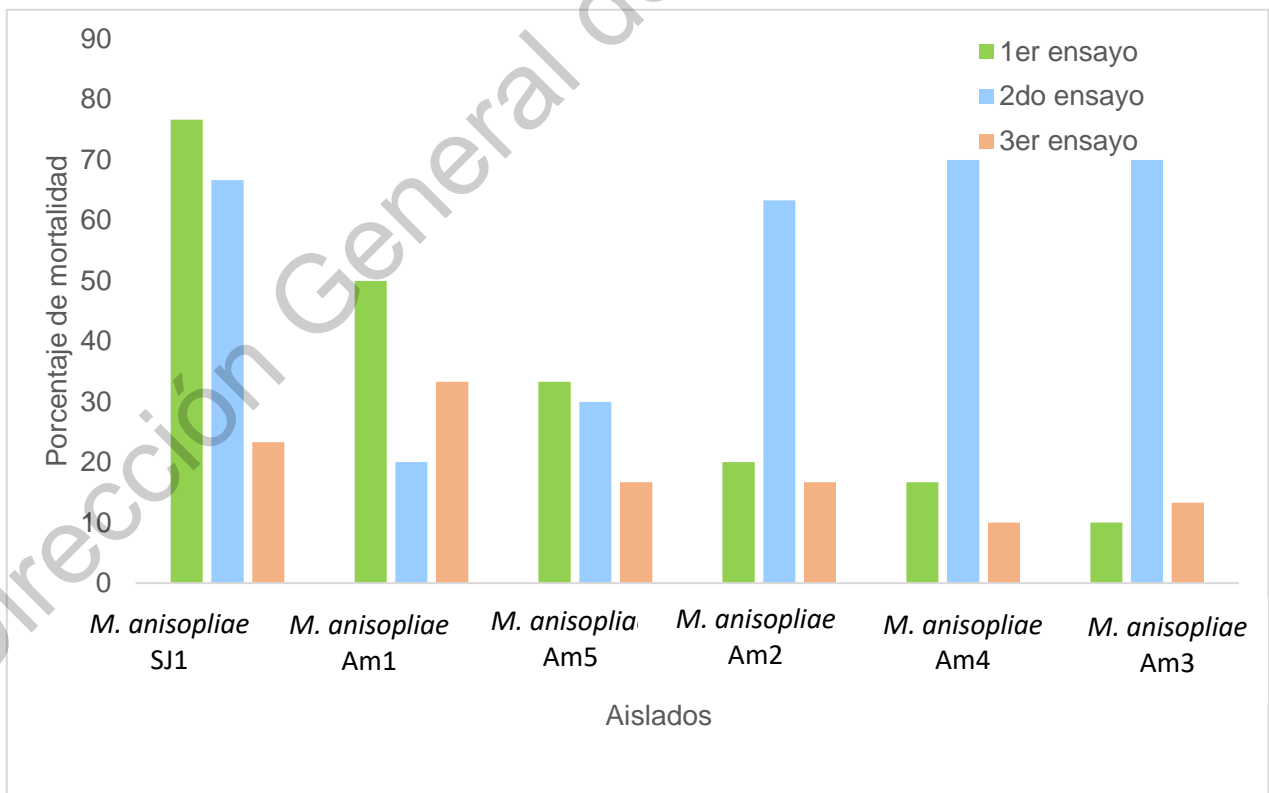
257 entomopatógenos específicos al hospedero. Por todo lo anterior, el método de cebo
258 es el más adecuado para aislar hongos entomopatógenos específicos para la
259 especie de estudio, como se demuestra en este trabajo. El 84% de las cepas aisladas
260 pertenecen a la especie *M. anisopliae*.

261 Sería interesante, realizar la genotipificación de estos aislados con otros marcadores
262 moleculares como los microsatélites que son los suficientemente variables y
263 permitirían distinguir entre los aislados que fueron identificados como *M. anisopliae*.

264

265 8.3. Mortalidad en *Tenebrio molitor*

266 En la figura 4, se observan los datos de mortalidad obtenidos para las diferentes
267 cepas de *Metarhizium* sp identificadas: SJ1, A1, A5, A4 y A3. Agrupando los
268 resultados obtenidos de los ensayos de mortalidad con las cepas identificadas, se
269 obtuvo una mortalidad de 76.6 %, 50 %, 33 %, 20 %, 16.67 %, 10 % ocasionadas por



270 las cepas de *Metarhizium* SJ1, A1, A5, A2, A4 y A3 en larvas de *T. molitor*. Estos

Figura 4. Porcentaje de mortalidad de *Metarhizium* spp en larvas de *T. molitor*

271 resultados son parecidos a los reportados para *M. anisopliae* F52 sobre *Polyphylla*
272 *fullo* del 74%, un 76.6% de *Cosmopolites sordidus* por *M. anisopliae* Ma148 (Negrete
273 *et al.*, 2017) y coinciden con el 40% en larvas de *T. molitor* obtenido por el grupo de
274 Alcántara *et al.* (2020), todas las especies anteriores son miembros del orden
275 Coleoptera al igual que *T. molitor*. Por otra parte, en el segundo bioensayo se obtuvo
276 una mortalidad de 70 %, 70 %, 66.67 %, 63.33 %, 30 %, 20 % ocasionada por las
277 cepas A4, A3, SJ1, A2, A5 y Am1. Una vez identificadas las especies de *Metarhizium*
278 aisladas, se procedió a determinar la mortalidad ocasionada por cada cepa
279 inoculándolas en larvas del tercer estadio de *T. molitor*. Obteniéndose la mayor
280 mortalidad con la cepa de *M. anisopliae* Am1 que ocasionó la muerte de 33.33 % de
281 larvas y la menor con la cepa *M. anisopliae* A4 con un 10%. Esto significó una
282 disminución de la capacidad de infectar de las cepas aisladas en un 55.5 %, 34 %,
283 26 %, 19% y 14.2 % para la mortalidad en un 66% y la cepa de *Metarhizium*
284 indeterminada mantuvo la mortalidad (Figura 5) cepas Am5, SJ1, Am2, Am3 y Am4
285 respectivamente en comparación con el segundo bioensayo.

286 Respecto a la virulencia de las cepas, éstas disminuyeron su infectividad en
287 comparación con el primer ensayo, a excepción de la cepa Am1, la cual incrementó
288 su mortalidad respecto al segundo ensayo. Se ha observado que cuando las conidias
289 son mantenidas en medios de laboratorio una consecuencia es la pérdida de la
290 virulencia, por ejemplo, las cepas de *M. rileyi* conservadas en condiciones de
291 laboratorio propicia que la virulencia de las conidias se vea comprometida con cada
292 transferencia de medio. También se encontró que pases seriales en medio PDA de
293 *M. anisopliae* cepa M34412 provocó una disminución en la formación del apresorio
294 en larvas del tercer estadio de *Helicoverpa armigera* y por tanto disminución de la
295 virulencia (Nahar *et al.*, 2008). Por otro lado, se reportó la disminución de la
296 mortalidad en un 17% provocada por *M. anisopliae* 715 en ninfas del tercer instar del
297 ortóptero *Uvarovistia zebra* después de cuatro pases seriales en medio PDA
298 (Mohammadbeigi, 2013). Esto podría explicar porque algunas de las cepas en este
299 trabajo disminuyeron su capacidad de infectar a *T. molitor*. En contraste, según

300 Ignoffo et al. (1982), determinó que no existe una disminución o incremento
301 significativo en la actividad de las conidias de *M. rileyi* después de 12 pases seriales
302 in vivo en larvas de *Trichoplusia ni*, o después de 12 pases seriales *in vitro* en un
303 medio semi sintético. La CL_{50} al principio de los pases seriales fue de 16.7 ± 4
304 conidias mm^{-2} ; después de 12 pases seriales la LC_{50} de conidias producidas *in vitro*
305 e *in vivo* fue de 15.2 ± 1.9 conidias mm^{-2} y 12.0 ± 1.9 conidias mm^{-2} , respectivamente.
306 Concluyeron que la disminución de la capacidad infectiva solo se ve comprometida
307 si la cepa de hongo es inestable o esta se ve sometida a condiciones de estrés. Para
308 el caso de *B. bassiana* DEBI 001 se encontró que el subcultivo en PDA no disminuyó
309 significativamente la virulencia contra ninfas del tercer estadio de *U. zebra* después
310 de cuatro pases, considerándose un patotipo estable (Mohammadbeigi, 2013). Por
311 lo tanto, es posible que *M. anisopliae* cepa Am1 posea características consideradas
312 estables y probablemente las condiciones de estrés no le afecte tanto como al resto
313 de las cepas, además, otro factor a tomar en cuenta, en los traspasos, es que la
314 conidiación se ve disminuida al aumentarlos (Kamp *et al.*, 2002), que para fines de
315 producción en masa de esporas es perjudicial.

316 **8.4. Relación de la actividad de Agua (α_w) con el crecimiento superficial y** 317 **esporulación**

318 En la figura 5 a y b se muestran las curvas de crecimiento superficial de colonias de
319 las cepas Am1 y SJ1 en placas de Petri con PDA con valores de α_w 1, 0.995, 0.991,
320 0.975 y 0.955, modificados con la adición de etilenglicol; se grafica el crecimiento
321 superficial de las colonias desarrolladas cada 24 horas expresado en cm^2 . Se
322 ensayaron valores de α_w de 0.865, pero en ningún caso presentaron crecimiento por
323 lo que no se incluyeron en la gráfica.

324 En la gráfica 6A, que corresponde a la cepa Am1, se observa que, a una α_w de 1, la
325 cepa presenta un patrón sigmoide típico del crecimiento microbiano, mientras que
326 las placas con α_w 0.995 y 0.991 mostraron el mismo patrón de crecimiento con un
327 desarrollo acelerado hasta las 24 o 48 horas y un segundo periodo de crecimiento
328 entre las 72 a 96 horas. Por otra parte, para la α_w de 0.971 se observó un crecimiento

329 limitado entre las 24 y 72 horas, sin crecimiento posterior, pero la placa con α_w de
330 0.955 mostró un crecimiento mucho más rápido que las demás placas hasta las 48 h
331 y en ese momento se detuvo del todo.

332 En el caso de la gráfica 6B, se observa que el mayor crecimiento es alcanzado a las
333 96 h a una α_w de 0.995, seguido de las α_w de 1 y 0.991, las líneas de tendencia de
334 estas actividades de agua presentaron un patrón similar con un crecimiento
335 relativamente bajo hasta las 48 horas, que se aceleró durante todo el tiempo posterior
336 de cultivo. En cambio, las placas con α_w de 0.971 y 0.955, presentaron un crecimiento
337 acelerado hasta las 48 h, y no se detectó crecimiento posterior.

338 Puede observarse que a las 96 horas de cultivo de la colonia Am1 el mayor
339 crecimiento se obtuvo a una α_w de 1 alcanzando 2.5 cm², el cual fue 1.6, 1.7, 4 y 8
340 veces mayor que los valores presentados por las α_w , 0.995, 0.991, 0.955 y 0.971 a las
341 96 h, respectivamente. En el caso de la cepa SJ1, esta alcanzó a las 96 h el mayor
342 crecimiento en α_w de 0.955, 2.2 cm², que es 1.2, 1.3, 2.7 y 3 veces mayor que los
343 cm² de crecimiento obtenidos para las α_w de 1, 0.991, 0.971 y 0.955 a las 96 h,
344 respectivamente. El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas
345 respecto al crecimiento de las dos cepas a las 96 h. De lo anterior se demuestra que
346 las cepas Am1 y SJ1, tienen distintos requerimientos de α_w .

347 Estos datos coinciden con lo reportado por Boraside et al. (2018) quien encontró que
348 las conidias de *M. anisopliae* Ma V75, germinaron entre un 97-89 % al cultivarlas en
349 condiciones de α_w de 0.995, 0.98 y 0.96. Estos valores parecen ser validos solamente
350 para *M. anisopliae* ya que los valores reportados para otras cepas de hongos
351 entomopatógenos son muy diversos; por ejemplo, las colonias de *M. rileyi* que
352 pertenece al mismo género, crecen entre 27 y 5 mm² en 12 días en valores de α_w de
353 0.998 y 0.99 respectivamente y en el mismo trabajo se estableció que *M. rileyi* no es
354 capaz de germinar, crecer y esporular en condiciones de α_w menor a 0.99 (Aguirre,
355 2009). Esto confirma que la menor α_w produce una disminución en el crecimiento en
356 *M. rileyi*, tal como se observa también con las cepas Am1 y SJ1. Este fenómeno
357 también fue reportado por Dagnas et al. (2013) quienes cultivaron *Alternaria* sp.,

358 *Fusarium sacchari* y *Cadophora malorum*, en medio PDA modificado con glicerol
359 para obtener valores de α_w de 0.88, 0.92 y 0.96 e igual Gervais et al. (1988)
360 encontraron que al disminuir los valores de α_w en cultivos de *Penicillium roqueforti*,
361 se presenta un crecimiento retardado en el diámetro de las colonias.

362 Al cultivar conidias en medio con α_w de 0.900 en el caso de dos especies de
363 *Penicillium*, se encontró un crecimiento y esporulación retrasada (Van Long et al.,
364 2016). En contraste, aquí se encontró que a valores α_w de 0.975 y 0.955 un
365 crecimiento mayor en los primeros días que a α_w mayores para la cepa SJ1 (Fig. 6B).
366 Resultados similares han sido obtenidos por Abellana et al. (1999), quienes
367 encontraron un acortamiento del periodo de latencia cuando cultivaron especies de
368 *Eurotium* sp. a diferentes temperaturas a α_w de 0.90.

369 Respecto a la esporulación, el tiempo fue de 4 días para los valores de α_w de 1,
370 0.9955, 0.991 y de 7 días para α_w de 0.955 para ambas cepas, en contraste con los
371 reportado para *M. rileyi* (Aguirre, 2009) que tardaron 12 días con valores superiores
372 a 0.98 y no germina en valores menores a este, las cepas de *M. anisopliae* aisladas
373 en este trabajo fueron capaces de germinar, crecer y esporular en condiciones de α_w
374 de hasta 0.955. Por todo lo anterior, las cepas aisladas se pueden clasificar como
375 hongos moderadamente sensibles al estrés hídrico como *Trichoderma viride*
376 (Gervais et al, 1987).

377 Se sabe que la α_w es uno de los factores principales que modifican la capacidad de
378 las esporas para germinar y crecer (Nanguy et al., 2010), y, por ende, este factor
379 afecta la eficacia que tiene un hongo con fines de biocontrol (Boyette et al., 2007),
380 este valor también modifica la producción de metabolitos secundarios que se
381 encuentran involucrados en la infección de hospedero como las destruxinas,
382 metabolitos importantes en el ataque del sistema inmune del insecto. El valor de α_w
383 que se ha detectado como óptimo para la producción de destruxina A fue de 0.98
384 para la cepa de *M. anisopliae* V275 (Boraside, 2018). Por tanto, es posible que
385 algunas de estas cepas mejoren su capacidad de expresar enzimas y elaborar

386 metabolitos relacionados con la infección de hospedero según sea la α_w en la que se
387 cultive.

388 El crecimiento atípico que presentan cepas Am1 y SJ1 en actividades de agua 0.975
389 y 0.955 podría explicarse por medio de las respuestas de estrés osmótico que induce
390 la expresión de proteínas SOS/Hsrp que funcionan mejorando la captación de agua
391 y nutrientes por gradiente de concentración (Van Long *et al.*, 2016). En esas

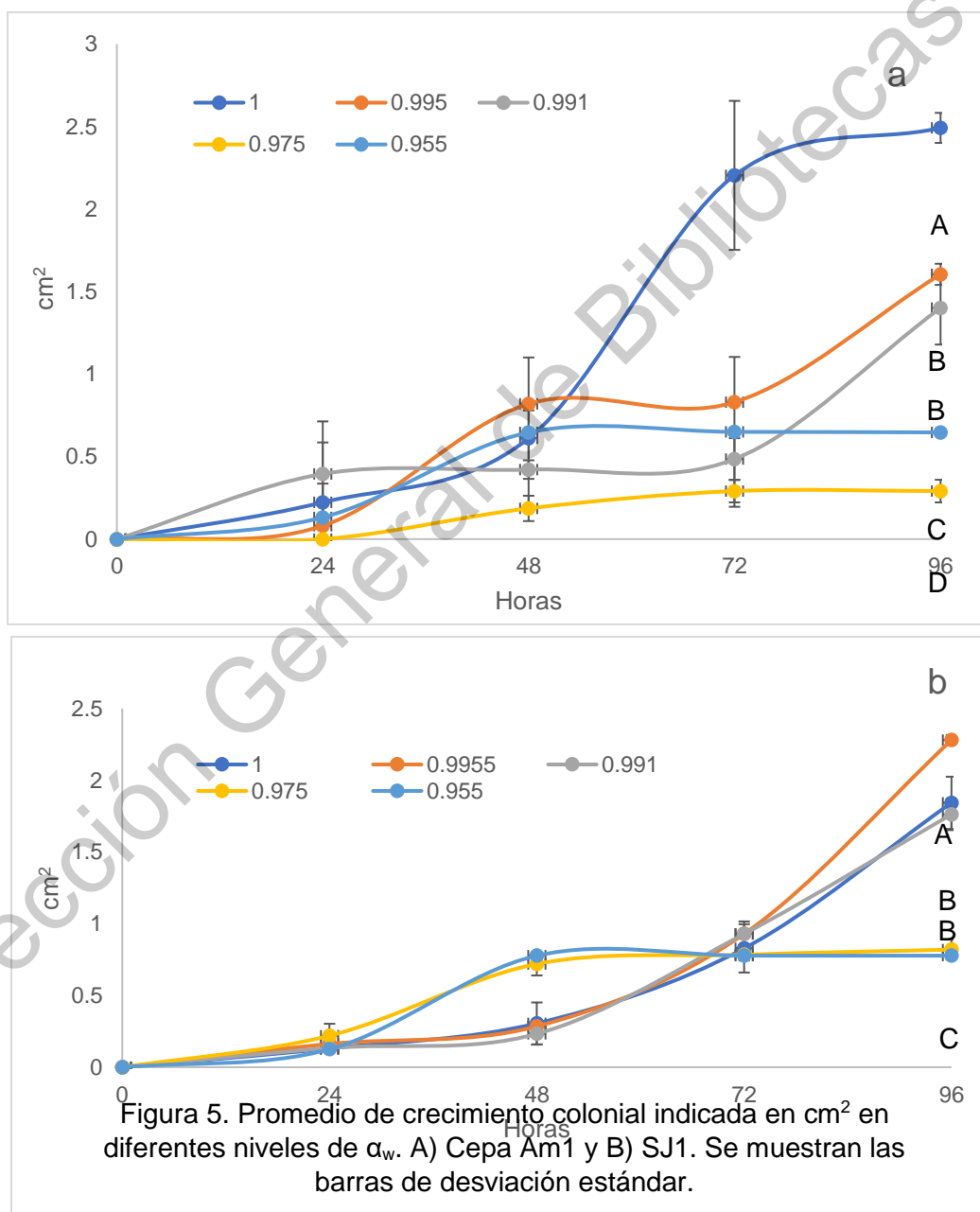


Figura 5. Promedio de crecimiento colonial indicada en cm² en diferentes niveles de α_w . A) Cepa Am1 y B) SJ1. Se muestran las barras de desviación estándar.

392 condiciones las cepas presentan un crecimiento acelerado para huir del ambiente y
393 desvían toda su energía metabólica hacia la extensión de las hifas y producción de
394 proteínas que le permiten cambiar el gradiente de concentración de agua. Dicho
395 crecimiento se detiene debido

396 a la sobre carga metabólica al agotar las reservas materiales de las esporas para
397 producir biomasa; sin embargo, las cepas fueron capaces de producir conidias a los
398 siete días de cultivo a pesar de estancarse en su crecimiento a los cuatro días. A
399 diferencia la cepa SJ1 crecida en condiciones de α_w 0.971 y 0.955, probablemente
400 utilizó tres mecanismos posibles: la adaptación de potencial osmótico produciendo
401 glicerol y eritritol, acumulación de azúcares y producción de transportadores que
402 facilitan la introducción de solutos al citoplasma (Judet *et al.*, 2008 y Gervais *et al.*,
403 1987), de forma que logró alcanzar un mayor crecimiento en estas condiciones
404 respecto la cepa Am1. Puede ser que la cepa SJ1 mostrara un gasto energético
405 mayor en la producción de metabolitos para la captación de agua durante el cultivo
406 en actividad de agua 1, y por tanto no dedicaría suficiente energía a crecer, si no a
407 actividades de mantenimiento celular.

408 De lo anterior se demuestra que las cepas Am1 y SJ1, tienen distintos requerimientos
409 de α_w . Estos distintos requerimientos pueden explicarse por la adaptación de las
410 cepas a los sitios de aislamiento, la cepa Am1 fue aislada de un suelo radicular de
411 campo de cultivo de maíz, el cual es un campo de riego, por tanto, al recibir este
412 suelo constante irrigación es probable que la cepa Am1 estuviese habituada a
413 condiciones de α_w cercanas a 1. En el caso de la cepa SJ1 que creció más a una α_w
414 de 0.995, esta se aisló de suelo radicular de huerto de manzana, el cual es de riego
415 de temporal, lo cual condicionaría que la cepa SJ1 presente mayor adaptabilidad a
416 las diferentes α_w debido a las fluctuaciones constantes de disponibilidad de agua en
417 el suelo. Este comportamiento en diferentes niveles de α_w da indicios del posible
418 desempeño de estas cepas en aplicación en campo, siendo posible que la cepa SJ1
419 tenga mejor desempeño en niveles de α_w más bajos que la cepa Am1.

420 **8.5. Producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* en sorgo y carroz**

421 La producción de conidias obtenidas en diferentes sustratos y suplementos se puede
422 observar en la figura 6, donde en la figura 6a se visualiza la producción en una escala
423 de 1 a 1×10^9 gms⁻¹ de conidias y para observar la diferencia entre los tratamientos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

424 se realizó una gráfica a escala de 1×10^7 gms⁻¹ a 1×10^9 gms⁻¹ de conidias. La mayor
 425 producción conidial se obtuvo con la cepa SJ1 en sustrato de sorgo adicionado con

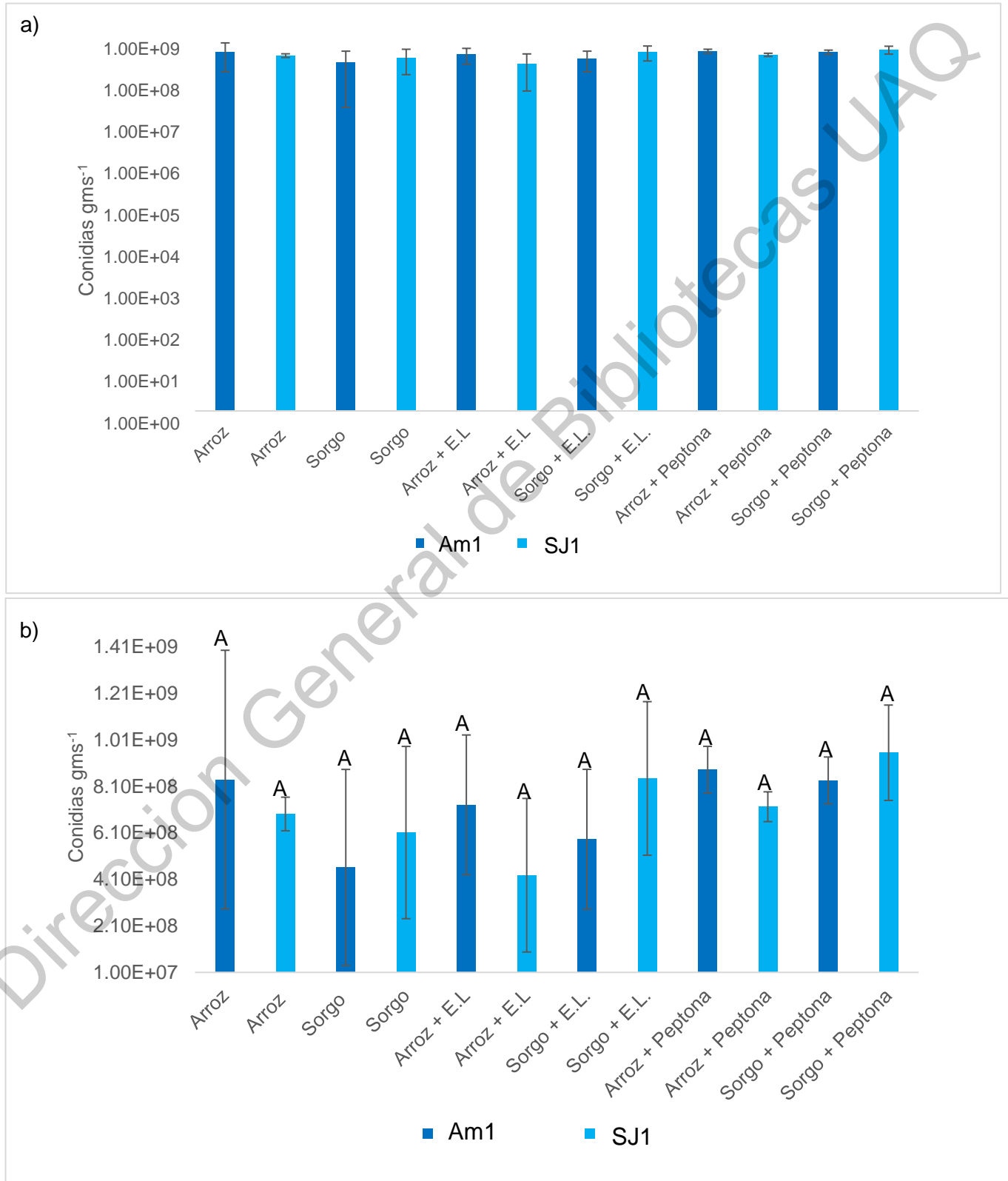


Figura 6. Producción de conidias de los aislados SJ1 y Am1 en diferentes sustratos y suplementos. a) Observación en escala de 0 a 1×10^9 y b) escala de 1×10^7 a 1×10^9

426 peptona + E.L. con un promedio de $9.55 \pm 20.5 \times 10^8$ gms⁻¹ y para la cepa Am1 fue
427 en sustrato arroz y suplemento de peptona + E.L con una producción de $8.8 \pm 1.1 \times$
428 10^8 gms⁻¹. Lo anterior implica que el suplemento de peptona puede incentivar un
429 aumento en la producción de conidias a comparación de utilizar solo el sustrato
430 humedecido o extracto de levadura. Además, cabe mencionar que la cantidad de
431 arroz y peptona utilizada resulta en una relación C/N media, en contraste con el
432 estudio de Ali, et al. (2007).

433 Ali et al. (2009), encontraron que al cultivar a *Isaria fumosoroseus* a una relación C/N
434 baja, obtuvieron 6.5×10^7 conidias mL⁻¹ que es menor a lo obtenido en este estudio,
435 que fue de 9.5×10^8 conidias mL⁻¹ para la cepa SJ1 cultivada en sorgo adicionado
436 con peptona + E.L. Sin embargo, el estadístico Tukey arrojó que no existe diferencia
437 significativa entre la producción de esporas, es decir, no importa la cepa, el
438 suplemento o sustrato utilizado es posible obtener en promedio las mismas conidias
439 por gms.

440 El cultivo de especies de *Metarhizium* puede realizarse tanto en líquido como en
441 sólido (Bhanu-Prakash *et al.*, 2008). Se han realizado diferentes estudios de
442 producción de conidiosporas de *Metarhizium* spp. en cultivo sólido en sustratos
443 viables que han probado tener alto rendimiento de conidias obtenidos sobre granos
444 de arroz y sorgo (Devi y Chowdary, 2000) o incluso chips de plátano y papa (Thakre
445 *et al.*, 2011). El rendimiento más alto de conidias reportado del género *Metarhizium*
446 es para *M. rileyi* cultivado en sorgo en contenedor bolsa de polipapel, con el cual se
447 logró una producción de 10^9 conidias gms⁻¹ (Devi y Chowdary, 2000), esto es mayor
448 a lo obtenido en cultivo con sorgo en este trabajo.

449 En el caso *M. anisopliae* se considera que la producción de 1×10^9 conidias gms⁻¹
450 es la esperada en sustrato de arroz (Barajas *et al.*, 2010), sin embargo, se ha
451 reportado una producción de 2.67×10^9 conidias gms⁻¹ en granos de arroz
452 sancochados reciclados cultivados en bolsa (Barra-Bucarei *et al.*, 2016), lo cual es
453 mayor que la producción más alta de conidias de $5.61 \pm 2.1 \times 10^8$ gms⁻¹ obtenida en
454 este trabajo. Asimismo, se obtuvo a los 7 días de cultivo una producción de $1.09 \times$
455 10^9 gms⁻¹ de *M. anisopliae* en biorreactor de lecho empacado utilizando como

456 sustrato arroz (Mendez-González *et al.*, 2018), rendimiento equivalente a lo esperado
 457 en bolsas (Barajas *et al.*, 2010), en comparación los resultados de días de cultivo en
 458 biorreactor hasta esporular son similares a los obtenidos ya que aquí en promedio la
 459 conidiación se presentó a los 7 días de cultivo. De lo anterior se puede concluir que
 460 el sistema de cultivo en sólido puede realizarse en bolsas sin necesidad de
 461 incrementar costos utilizando biorreactor dado que no hay un incremento significativo
 462 de producción de conidias ni se disminuye el tiempo de cultivo.

463 Para lograr hacer una comparación entre artículos que reportan la producción
 464 conidias mL⁻¹ se realizó el cuadro 3, el cual muestra la cantidad de conidias obtenidas
 465 por mL para cada cepa en los tratamientos de arroz; sorgo; arroz y E.L.; sorgo y E.L.,
 466 arroz, E.L. y peptona y sorgo, E.L. y peptona. Con la cepa SJ1 se obtuvo la mayor
 467 producción de conidias por mL⁻¹ en el cultivo en sorgo, E.L. y peptona con 5.6×10^8
 468 $\pm 2.1 \times 10^8$ conidias mL⁻¹ y la menor en arroz con E. L obteniéndose 1.8×10^8 conidias
 469 por mL⁻¹.

Cuadro 3. Producción en conidias por mL⁻¹ de las cepas de *M. anisopliae* Am1 y SJ1

	Am1	SJ1
Tratamiento	Conidias mL ⁻¹ (Promedio \pm DESVEST)	Conidias mL ⁻¹ (Promedio \pm DESVEST)
Arroz	$4.9 \times 10^8 \pm 3.3 \times 10^8$	$4.1 \times 10^8 \pm 4.3 \times 10^8$
Sorgo	$2.7 \times 10^8 \pm 2.5 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$
Arroz + E. L.	$3.4 \times 10^8 \pm 2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$
Sorgo + E. L.	$2.6 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$
Arroz + Peptona + E. L.	$5.2 \times 10^8 \pm 2.7 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8 \pm 5.2 \times 10^8$
Sorgo + Peptona + E. L.	$4.9 \times 10^8 \pm 3.9 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8 \pm 2.1 \times 10^8$

470 La mayor producción de todos los tratamientos se obtuvo con la cepa SJ1 cultivada
 471 en sorgo suplementado con peptona y E.L., con la cual se alcanzó con 5.6×10^8
 472 conidias por mL⁻¹ que es superior a lo reportado por Thakre *et al.* (2011), quienes

473 cultivaron en matraz a *M. rileyi* en arroz triturado adicionado con 1 % de extracto de
474 levadura y su producción alcanzó 5.53×10^7 conidias mL^{-1} , esto es incluso menor
475 obtenido en este con las cepas de *M. anisopliae* en arroz adicionado con E. L. al
476 0.5%, alcanzándose entre 1.8×10^8 y 3.4×10^8 para cepa SJ1 y Am1,
477 respectivamente. Esto implica que las cepas de *M. anisopliae* usadas en este estudio
478 tienen mayor capacidad de utilizar el sustrato y el extracto de levadura para generar
479 conidiosporas en comparación con la cepa de *M. rileyi* previamente mencionada. Por
480 otro lado, Rajan-Sonai et al. (2010), cultivaron *M. rileyi* cepa PDBC en jugo comercial
481 maltova y extracto de patata solidificado con agar y obtuvieron una concentración de
482 3×10^7 conidias mL^{-1} . Esta producción menor a la obtenida en este trabajo, la cual
483 que podría ser explicado por la ausencia de proteína en el medio utilizado para
484 crecer.

485 Devi y Chowdary (2000) realizaron cultivo de *M. rileyi* en medio ABPY que consistió
486 en agar-agar (1.5%), extracto de cebada (2%), peptona (1%) y extracto de levadura
487 (0.5%), obteniéndose 8.4×10^8 conidias mL^{-1} , resultado mayor a la máxima
488 producción aquí reportada. Estos resultados se pueden explicar por la ausencia de
489 extracto de cebada, que quizá potencializó la producción en el trabajo anteriormente
490 mencionado. Sin embargo, aparentemente, a pesar de que en este estudio se añadió
491 24 % de peptona, 24 veces la peptona utilizada por Devi y Chowdary (2000) no
492 implicó una mayor producción de conidias.

493 A pesar de que no existe una diferencia entre los tratamientos utilizados, el utilizar
494 uno u otro dependerá de la capacidad que tenga la cepa y el sustrato, así como sus
495 suplementos para mantener la producción conidial a través de cada generación,
496 además de la supervivencia en aplicación en campo, que será algo que se tiene que
497 investigar a futuro.

498 Entonces, cabe la posibilidad que la adición de peptona al cultivo permita un aumento
499 en la producción de conidias al equilibrar la C/N a un nivel medio, relación que como
500 se ha reportado genera una mayor cantidad de conidias (Ali, 2006). De lo anterior,
501 se infiere que al privar a las cepas de Am1 y SJ1 de la peptona como fuente de

502 proteína, estas no contaron con los nutrientes necesarios por lo que el desarrollo de
503 la biomasa fue menor y esto limitó el proceso de conidiogénesis al disminuir la
504 proporción de micelio capaz de diferenciar los conidióforos. Este patrón se logró
505 identificar de forma clara en los ensayos, a pesar de ello no se obtuvieron diferencias
506 significativas entre los tratamientos debido a una variabilidad muy alta en los
507 ensayos.

508 A pesar de que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los
509 tratamientos utilizados, el usar uno u otro dependerá de la capacidad que tenga la
510 cepa y el sustrato para mantener la producción conidial a través de cada generación.
511 Además, es importante determinar la supervivencia en aplicación en campo.
512 Respecto a las posibles modificaciones que se pueden realizar, está el usar lote
513 alimentado con peptona, donde al medio de cultivo se le añaden pequeñas
514 cantidades de peptona de forma constante, de esta manera se evita una posible
515 inhibición por exceso de peptona y que la cepa agote las reservas de peptona durante
516 el cultivo, esto permitiría una mayor producción de biomasa en el soporte, lo que
517 daría lugar a una mayor conidiación así como a una preadaptación a una matriz rica
518 en proteína para promover conidias con capacidad de degradar proteínas de su
519 hospedero plaga.

520 La fermentación sólida semeja al tipo de crecimiento que es natural para el hongo,
521 crecimiento sobre un sustrato sólido formado por carbohidratos complejos inducen la
522 expresión de familias completas de hidrolasas. Cuando revisamos la producción de
523 conidias al añadir peptona no se observa un aumento importante en la cantidad de
524 conidias puesto que todos están en el orden de 10^8 esto nos indica que los sustratos
525 utilizados, que el sorgo y el arroz, son sustratos lo suficientemente completos para
526 permitir un buen crecimiento micelial con la consiguiente producción de conidias, la
527 estabilidad de pH que se observa en los cultivos nos indica que el metabolismo es
528 vigoroso y balanceado, puesto que no se observa producción de ácidos orgánicos o
529 liberación de amonio que serían los dos agentes que normalmente modifican el pH
530 ambiental (Romero-Gómez, 2001).

531 **8.6. Actividad proteasa**

532 En la figura 7a se muestran la curva de actividad proteasa de los extractos del cultivo
533 de la cepa SJ1 sobre sustrato de arroz (A) y Arroz peptona-E.L. (APEL), junto con el
534 blanco del arroz sin inocular, mientras que la figura 7b muestra la producción de
535 proteasas de la cepa Am1 sobre el soporte de sorgo (S) y sorgo peptona-E.L. (SPEL),
536 junto con el blanco de sorgo sin inocular. Se muestreó la actividad proteasa,

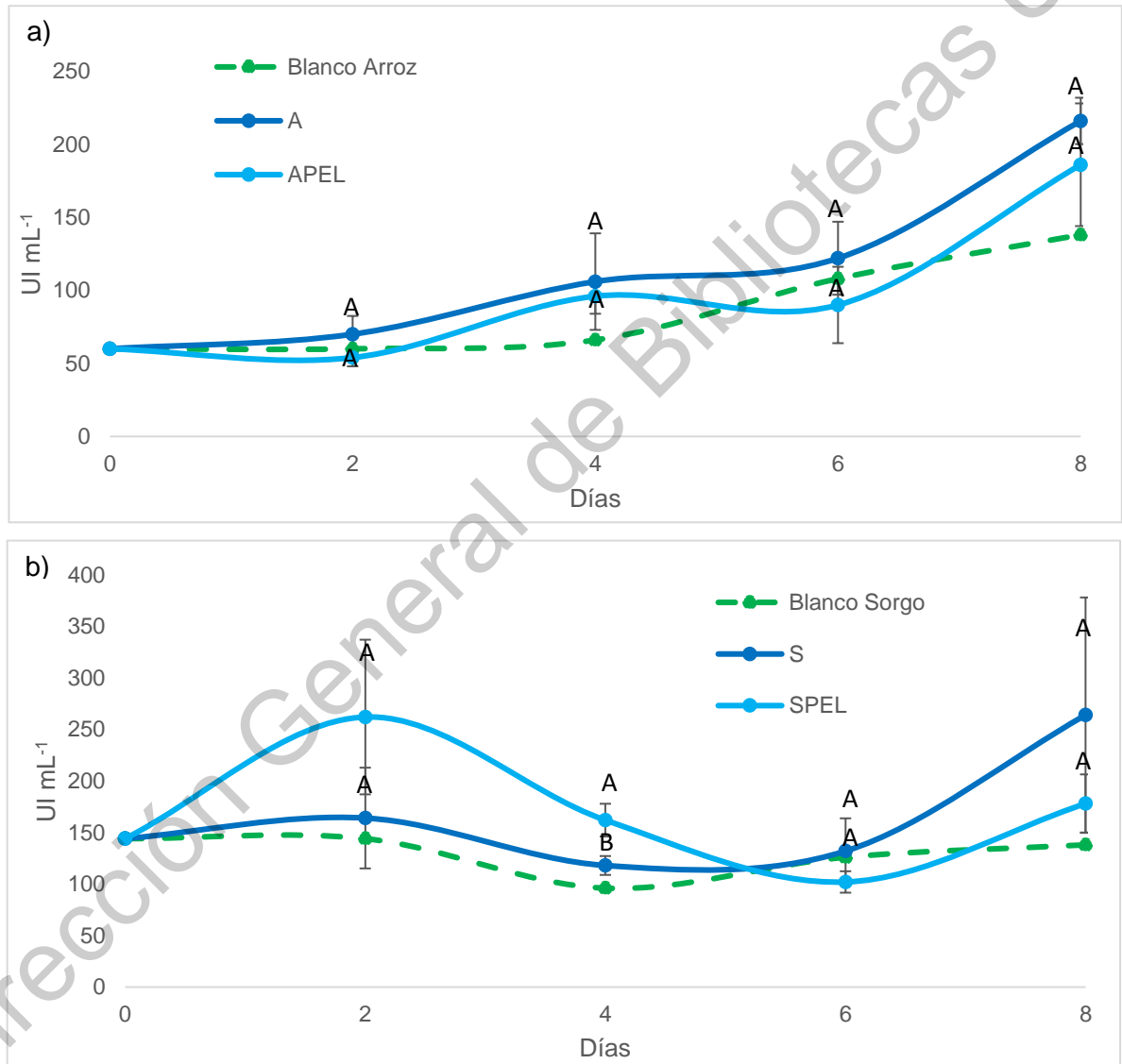


Figura 7. Actividad proteasa (UI mL⁻¹) de cultivos sólidos de la cepa a) Am1 sobre sorgo (S) y sorgo con peptona-E.L. (SPEL) y b) SJ1 arroz (A) y arroz con peptona-E.L. (APEL).

537 expresada en UI mL⁻¹, cada dos días hasta que la fermentación llegó a la
538 esporulación a los ocho días de cultivo.

539 Como control negativo se midió la actividad de proteasa en arroz o sorgo, donde no
540 se añadieron conidias, y así poder distinguir proteasas fúngicas de las de las
541 semillas, ya que se sabe que estas poseen proteasas asociadas a aleurona
542 (Lichtenwalner *et al.*, 1979). Esta actividad debe ser tomada en cuenta para poder
543 obtener la actividad proteasa atribuible al hongo.

544 En el gráfico 8(b) se muestran las curvas de actividad proteasa de los extractos del
545 cultivo por fermentación sólida de la cepa SJ1 en arroz y arroz más peptona-E.L. En
546 los extractos de arroz la actividad proteasa aumentó conforme pasaron los días
547 alcanzándose la mayor actividad a los ocho días con 216 UI mL⁻¹ y en cambio la
548 actividad proteasa de los extractos arroz más peptona-E.L. resultó en aumento en
549 los primeros cuatro días y disminución al día 6, aumentando el día ocho, con la mayor
550 actividad de 186 UI mL⁻¹. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los
551 extractos obtenidos de arroz más agua y arroz más peptona-E.L. Por el
552 comportamiento del gráfico 8(a), se nota que la adición de peptona no incentivo la
553 producción de proteasas.

554 En la gráfica 8(a), se muestra la actividad de proteasa. correspondiente a los
555 extractos de sorgo más agua y sorgo más peptona-E.L. de la cepa Am1, para los
556 extractos de sorgo más agua, no se observó actividad de proteasa mayor a la del
557 blanco hasta llegar al octavo día registrándose la máxima actividad de 264 UI mL⁻¹,
558 de las cuales 126 UI mL⁻¹ son atribuibles a la cepa Am1. Mientras que en sorgo más
559 peptona-E.L. hubo mayor actividad proteasa a los dos días, obteniéndose una
560 actividad de 262 UI mL⁻¹ de las cuales 122 pueden atribuirse a la cepa Am1. La
561 producción proteasa decayó en los siguientes cuatro días, encontrándose la menor
562 actividad a los seis días con 102 UI mL⁻¹ y presentó una disminución al día 8 con 40
563 UI mL⁻¹. Lo anterior, se puede explicar por la presencia peptona, que al principio
564 indujo la expresión de proteasas y al avanzar los días se agotaron las reservas y por
565 lo que disminuyó la actividad de proteasa. A pesar de que en los extractos de cultivo

566 de sorgo con peptona se registró la mayor actividad proteasa a los dos días, no
567 existen diferencias significativas en la producción de proteasas entre estos extractos
568 y los extractos de sorgo. El aumento de la actividad de proteasa en los cultivos a los
569 ocho días de cultivo puede atribuirse a la presencia de proteasas asociadas a la
570 conidiación como a las proteasas de degradación cuticular, que se asocia a
571 maduración de conidias (Huang *et al.*, 2019) y proteasas parecidas subtilisina,
572 también llamadas subtilinasas (Fu *et al.*, 2020 y Liu *et al.*, 2020).

573 A pesar de que no hubo diferencias significativas respecto a la actividad proteasa de
574 extractos de agua y peptona-E.L. para ambas cepas; si se observa una diferencia
575 significativa en la actividad proteasa entre las cepas Am1 y SJ1 siendo mayor la
576 actividad proteasa de los extractos de la cepa Am1 (Cuadro 4). Esto puede deberse
577 a la diferencia de las cepas y al efecto de crecimiento en el sustrato sorgo.

Cuadro 4. Promedio total de Actividad proteasa	
Cepa	Actividad proteasa (UI mL ⁻¹)
Am1	172.75 ± 73 ^a
SJ1	117.5 ± 57 ^b

578

579 Se puede proponer que para la producción de proteasas hay un efecto ocasionado
580 por la cepa y el sustrato. Por tanto, son factores importantes para tomar en cuenta
581 para la inducción de proteasas relacionadas con el proceso infectivo como subtilisina
582 Pr1, tripsinas, quimotripsinas y cinasa Hog1 (Aw y Hue, 2017).

583 El valor de 126 UI mL⁻¹ actividad de proteasa de los cultivos de la cepa Am1 en sorgo
584 con peptona-E.L. a los ocho días de cultivo es mayor al reportado para los extractos
585 de cultivo de cinco días de *M. anisopliae* CLII en medio líquido con caseína al 0.5 %
586 como inductor, que fue de 10 UI mL⁻¹ (Braga *et al.*, 1999). Resultados menores a los
587 de este trabajo fueron reportados por Rosas *et al.* (2014) en extractos de *M.*

588 *anisopliae* cepa 6342 cultivado en medio líquido Reese modificado obteniendo 92 UI
589 mL⁻¹. También se realizaron ensayos de actividad proteasa en extractos de *M. rileyi*
590 MTCC 4254 cultivado en SMAY, obteniendo a los ocho días una máxima actividad
591 2.39 UI mL⁻¹, que es menor al máximo obtenido aquí al mismo tiempo de cultivo
592 (Grewal *et al.*, 2021). Se puede destacar que hay mayor producción de proteasas en
593 los extractos aquí obtenidos en cultivo sólido, el cual se sabe promueve mayor
594 expresión y variedad de enzimas (Viniestra-González *et al.*, 2003). Por lo anterior, las
595 cepas aquí obtenidas producen mayor cantidad de proteasas a las cepas publicadas
596 en literatura.

597 Un factor que puede jugar en contra de la medición de la actividad proteasa en los
598 extractos de sorgo es la presencia de inhibidores de proteasas que se han reportado
599 en estos granos, estos se saben que inhiben la actividad de subtilisina, quimotripsina
600 y tripsina (Hariprasanna *et al.*, 2016 y Boise, 1983). Este hecho pudo afectar la
601 actividad de proteasa, más no su inducción, la cual podría ser analizada mediante
602 métodos de PCR para medir ARNm.

603 Se ha reportado repetidamente que la producción de proteasas extracelulares está
604 fuertemente influenciada por el pH ambiental. En el caso de *M. anisopliae* se sabe
605 que es capaz de aumentar el pH del medio lo que induce diversas proteasas
606 relacionadas con el proceso infeccioso como subtilisina Pr1 y tripsina Pr2 y se conoce
607 que estas se producen en un rango de pH 7 a 8, alcanzándose la máxima producción
608 en pH 8. También otras proteasas que se ven influenciadas por el pH ambiental son
609 las aminopeptidasas y aspartil proteasas, las cuales se inducen a pH 7 y pH,
610 respectivamente (Fonseca *et al.*, 2010 y St Leger *et al.*, 1999).

611 Un factor que pudo haber modificado la actividad de proteasa fue el hecho de que
612 las semillas de sorgo presentan inhibidores de proteasas, precisamente para evitar
613 ser degradadas por hongos, por lo cual, probablemente la producción de proteasas
614 fue más alta, pero es imposible distinguir el efecto posible de estos inhibidores. En
615 este caso sería conveniente analizar los transcritos pertenecientes a proteasas y así
616 determinar como la adición de peptona incentiva la producción de proteasas.

617 En el caso de la actividad proteasa de las cepas SJ1, se puede decir que fue baja en
618 consideración de la cepa Am1 y se considera que la adición de peptona no disparó
619 la producción de proteasas, y esto resulta más contradictorio, cuando no se añadió
620 peptona al medio, sino que se cultivó solo en arroz, la producción de proteasas fue
621 un poco mayor, aunque no estadísticamente significativa. Entonces se puede
622 suponer que la forma en que tiene de utilizar los nutrientes SJ1 es diferente a la que
623 tiene la cepa Am1.

624 Para estos ensayos, será necesario el realizar estudios en proteasas específicas
625 relacionadas con el proceso infectivo como las subtilisinas Pr1 y Pr2. Y así encontrar
626 un medio que sea capaz de inducir su expresión y garantizar conidias infectivas.

627

628 La estabilidad del valor de pH puede atribuirse a un crecimiento aeróbico balanceado
629 en el cual los soportes cuentan con suficiente nitrógeno para permitir un crecimiento
630 rico del micelio sin la necesidad de secretar ácidos orgánicos que bajarían el pH
631 debido a la falta de nitrógeno. Y cuando hay exceso de proteína se aumenta el pH.
632 Esto puede tener un efecto importante sobre la inducción y producción de proteasas
633 dado que es conocido que esta se encuentra regulada por la acción del gen *pacc* que
634 en presencia de un pH ácido induce la producción de proteasas ácidos y en pH
635 alcalinas se induce la producción de proteasas alcalinas.

636 El pH del medio en el cual se crecieron las cepas de *M. anisopliae* se mantuvo
637 durante la fermentación en un rango de 7 a 7.6, por tanto, es posible que las
638 proteasas expresadas durante estos cultivos fueran de tipo aminopeptidasas,
639 subtilisinas Pr1 y tripsina Pr2, ya que estas son capaces de degradar colágeno, el
640 sustrato utilizado para los ensayos enzimáticos (St Leger *et al.*, 1997, Wentworth, *et*
641 *al.* 1993 y Ding *et al.*, 2014).

642

643

644

645 **8.7. Mortalidad, CL₅₀ y TL₅₀**

646 **Efecto de la concentración conidial sobre el porcentaje de mortalidad de**
647 **larvas de *Tenebrio molitor***

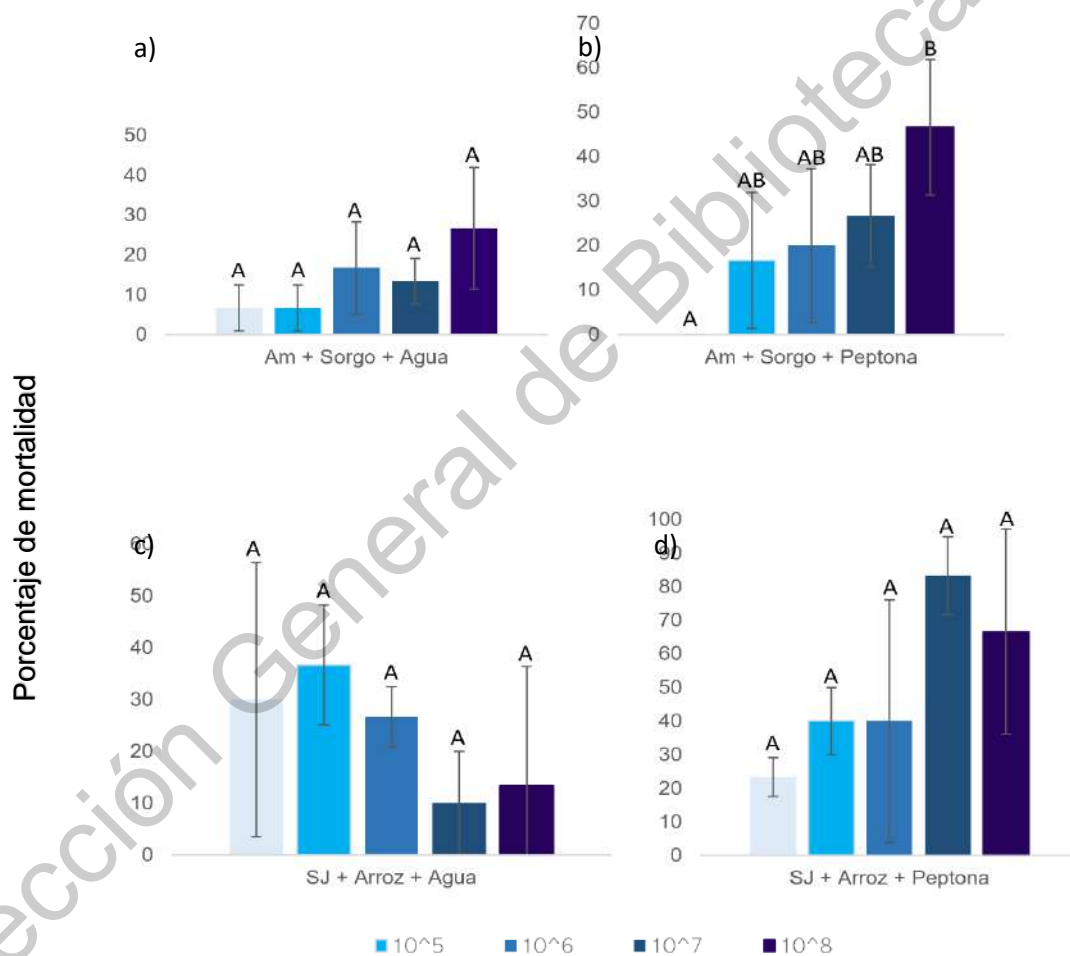
648 En la figura 8 se presenta el porcentaje de mortalidad de *T. molitor*, ocasionada por
649 concentraciones de 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ conidias mL⁻¹ de las cepas Am1 cultivada
650 en sorgo (S), sorgo + peptona-E.L. (SP) y SJ1 cultivada en arroz (A) y arroz +
651 peptona-E.L. (AP). Se observa que el porcentaje de mortalidad con las conidias de
652 la cepa Am en S (Fig. 8a) fue mayor cuando se utilizó la concentración de 10⁸ conidias
653 mL⁻¹ y fue menor en las concentraciones 10⁴ y 10⁵ conidias mL⁻¹.

654 La mortalidad promedio obtenida a las concentraciones crecientes de conidias fue
655 de 6.7 hasta 26.7%. Pero no se observa un patrón de incremento de la mortalidad a
656 mayor concentración de conidias. Respecto al tratamiento SJ1 + A (Fig. 8c) se obtuvo
657 mayor porcentaje de mortalidad a la concentración de 10⁵ conidias mL⁻¹ y menor
658 mortalidad a la concentración de 10⁷ conidias mL⁻¹. El promedio de porcentaje de
659 mortalidad fue del 5.8 al 26.7 % para las diferentes concentraciones. Al igual que en
660 el tratamiento de Am + S, en el tratamiento SJ1 + A no hay una relación entre el
661 incremento de concentración de conidias e incremento de mortalidad, aunque los
662 resultados deben tomarse con precaución debido a la variabilidad encontrada en los
663 diferentes ensayos. Los datos obtenidos para estos tratamientos no fueron
664 estadísticamente significativos, por tanto, no podemos reportar un efecto de la
665 concentración de conidias sobre la mortalidad.

666 En el caso del tratamiento, Am + SP (Fig. 8b), el mayor porcentaje de mortalidad se
667 obtuvo con la concentración de 10⁸ conidias mL⁻¹ y el menor a 10⁴ conidias mL⁻¹ con
668 46 y 0 %, respectivamente. En la gráfica se observa un incremento en la mortalidad
669 conforme se aumenta la concentración conidial, de forma que se puede afirmar que
670 a mayor concentración de conidias se produce una mayor mortalidad en las larvas
671 los tenebrios. Para el tratamiento SJ1 + AP (Fig. 8d), hubo mayor mortalidad en las
672 larvas de tenebrios en la concentración de 10⁷ conidias mL⁻¹ y menor a concentración

673 10^4 conidias mL^{-1} con 83.3 y 23.3 % respectivamente. En la gráfica se observa que
 674 entre la concentración de 10^4 a 10^7 conidias mL^{-1} se registra un aumento en la
 675 mortalidad conforme aumenta la concentración conidial y hay un declive en la
 676 mortalidad a concentración 10^8 conidias mL^{-1} . Sin embargo, no hay diferencias
 677 significativas según el estadístico Tukey.

678 La mayor mortalidad alcanzada fue de 83.3 % obtenida con conidias provenientes



679 del medio AP a concentración de 1

Figura 8. Porcentaje de mortalidad en larvas *T. molitor* ocasionada por las cepas de *M. anisopliae* SJ1 y Am1 a diferente concentración de conidias.

680 $\times 10^7$ conidias mL^{-1} . Esta mortalidad fue mayor

681 a los resultados obtenidos por Alcántara et al. (2020) sobre *T. molitor*, quienes
682 reportaron una mortalidad del 40 % con la cepa Ame 2.1 de *M. anisopliae*, cuyas
683 conidias fueron obtenidas por medio de cultivo en arroz precocido de la marca Verde
684 Valle®. Resultados menores fueron reportados para las cepas de *M. anisopliae* F52
685 y *M. anisopliae* Ma148 sobre los coleópteros *Polyphylla fullo* y *Cosmopolites*
686 *sordidus*, con una mortalidad del 74 y 76.6 %, respectivamente (Negrete et al. 2017
687 y Erler y Ates, 2015).

688 **8.8. Efecto sobre la mortalidad en larvas de *T. molitor* de las conidias** 689 **obtenidas en diferentes condiciones de cultivo sólido**

690 En el cuadro 5 se presenta el porcentaje de mortalidad promedio sobre larvas de *T.*
691 *molitor* provocada por conidias de las cepas Am1 y SJ1 cultivadas en diferentes
692 sustratos y suplementos. En dicho cuadro se observa una mayor mortalidad en larvas
693 de *T. molitor* 50.6 %, por parte de las conidias de la cepa SJ1 cultivada en APEL y la
694 menor mortalidad de 14 % ocasionada por la cepa Am1 cultivadas en S. Cuando se
695 utilizaron conidias de la cepa Am1 cultivadas en SPEL la mortalidad de *T. molitor* fue
696 1.6 veces mayor que cuando se usó solo sorgo, y cuando se usó APEL para el cultivo
697 de la cepa SJ1, las conidias resultantes fueron 2.17 veces más virulentas que las
698 conidias que fueron obtenidas de cultivo de arroz. Sin embargo, no existen
699 diferencias significativas entre la mortalidad obtenida con las conidias de Am1
700 obtenidas de cultivo en sorgo y sorgo con peptona-E.L. En contrataste para la cepa
701 SJ1, si existe un efecto significativo entre el porcentaje de mortalidad obtenida por
702 parte de conidias obtenidas de condiciones de cultivo A y AP. Por tanto, se puede
703 atribuir este efecto de incremento de mortalidad a la peptona.

704 Esto implica que existe una marcada diferencia entre la forma que tienen de utilizar
705 los nutrientes las cepas de *M. anisopliae* Am1 y SJ1, ya que las conidias obtenidas
706 presentaron diferencias en la mortalidad atribuible a las condiciones de cultivo en las
707 que fueron desarrolladas, en donde la mortalidad de las conidias de la cepa Am1 no
708 presentaron diferencias por la adición de peptona y para la cepa SJ1 se puede inferir
709 que la peptona jugó un papel importante para desarrollar conidias infectiva

710 probándose así la influencia de la nutrición en la cepa SJ1 sobre la mortalidad de
711 larvas de *T. molitor*.

712 Se sabe que las condiciones ambientales en las cuales la conidia se desarrolla le
713 confiere una pre-adaptación para el estilo de vida patogénico (St Leger *et al.*, 1996).
714 Por tanto, posiblemente la adición de peptona al medio de cultivo ayudó a una mejor
715 adaptación de la conidia y por ende dió lugar a micelio, expresando proteínas
716 relacionadas con la invasión al hospedero, tales como: hidrofobinas, adhesinas,
717 trehalasa, subtilisinas, lacasas, tripsinas, entre otras y la posterior colonización de
718 tejidos donde se expresan proteínas tipo destruxinas (Aw y Hue *et al.*, 2017).

719

720

721

722

723

724

725

726

727

Cuadro 5. Mortalidad promedio ocasionada por las cepas Am1 y SJ1 sobre larvas de <i>T. molitor</i>	
Tratamiento	Mortalidad (%)
Am1 + Sorgo (S)	14 ± 11.2 ^a
Am1 + Sorgo + Peptona-E.L. (SPEL)	22 ± 19.5 ^a
SJ1 + Arroz (A)	23.3 ± 17 ^a
SJ1 + Arroz + Peptona-E.L. (APEL)	50.6 ± 18 ^b

8.8.1. CL₅₀ y TL₅₀

Cuadro 6. CL₅₀ y TL₅₀ de las conidias de las cepas de *M. anisopliae* Am1 y SJ1

Conidias	CL ₅₀ (conidias mL ⁻¹)	IC fiducial		TL ₅₀ (días)
		Inferior	Superior	
Am1 (S)	2.1 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁷	8 x 10 ⁷	78
Am1 (SPEL)	1.03 x 10 ⁸	7.4 8 x 10 ⁷	1.7 x 10 ⁸	38
SJ1 (A)	--	--	--	73

SJ1 (APEL)	3.8×10^7	1.2×10^8	3.8×10^9	11
------------	-------------------	-------------------	-------------------	----

728 La CL₅₀ y TL₅₀ de las cepas Am1 y SJ1 se presentan en el cuadro 6. Se muestra que
 729 la cepa Am1 cultivada en S, obtuvo una CL₅₀ de 2.2×10^8 conidias mL⁻¹ y la menor
 730 CL₅₀ para la cepa Am1, con 1.03×10^8 conidias mL⁻¹ obtenidas de cultivo en SPEL.
 731 Se puede atribuir esta disminución de CL₅₀ a la presencia

732 de peptona-E.L. en el cultivo en el cual se desarrollaron las conidias. Por tanto, las
 733 conidias de la cepa Am1 cultivada en SPEL. fueron capaces de ocasionar infección
 734 al 50 % de la población con menos conidias. Se sabe el medio de cultivo influye en
 735 la posterior capacidad que tiene una cepa para crecer, germinar y de infectar al
 736 hospedero, es decir a diferente cepa existen diferentes necesidades (Ali *et al.*, 2009).

737 No fue posible obtener la CL₅₀ de las conidias de la cepa SJ1 cultivada en arroz
 738 debido a que no se alcanzó la mortalidad de la mitad de la población. Las conidias
 739 que presentaron menor CL₅₀ fueron las de la cepa SJ1 de cultivo en APEL y se
 740 determinó que la CL₅₀ contra larvas de *T. molitor* del 3er estadio fue de 3.8×10^7
 741 conidias mL⁻¹. La cepa SJ1 posee mayor porcentaje de mortalidad cuando sus
 742 conidias fueron obtenidas de cultivo en APEL por tanto, se esperaba este resultado.

743 De lo anterior, se puede ver las diferencias entre las cepas Am1 y SJ1 en su
 744 capacidad para infectar a *T. molitor* y como el medio de cultivo donde se desarrollan
 745 estas cepas modificadas la capacidad de infectar al hospedero.

746 El tiempo letal medio para la cepa Am1 fue menor cuando las conidias fueron
 747 cultivadas en el medio SP y mayor cuando se obtuvieron de Sorgo con 38 y 78 días,
 748 respectivamente. Se disminuyó en 51 % el TL₅₀ con conidias cosechas de medio SP.
 749 No fue posible obtener el TL₅₀ con el ensayo con las conidias de la cepa SJ1 cultivada
 750 en arroz. Y respecto a las conidias cosechadas de AP se obtuvo un TL₅₀ de 11 días,
 751 el menor registrado en estos bioensayos.

752 La CL₅₀ menor obtenida en este trabajo fue de 3.8×10^7 conidias mL⁻¹, esto fue mayor
 753 al resultado publicado por García et al. (2011), quienes reportaron una CL₅₀ de 8.18
 754 $\times 10^6$ conidias mL⁻¹ sobre larvas del 2do estadio larvas de *Spodoptera frugiperda* en

755 tratamiento de contacto y un TL₅₀ de 4.5 días, que es menor 11 días, reportado aquí.
756 Maistrou et al. (2018) utilizaron *Beauveria bassiana* KVL 03-144 sobre escarabajos
757 de *T. molitor* y obtuvieron una CL₅₀ de 3 x 10⁵ conidias mL⁻¹ y TL₅₀ de 5.5 días,
758 resultados son menores a los nuestros, esto indica que probablemente *B. bassiana*
759 tenga ciertas características genéticas / bioquímicas que le permiten infectar
760 escarabajos de *T. molitor* de las cuales carecen las cepas Am1 y SJ1 de *M.*
761 *anisopliae*, ya que estas tuvieron una CL₅₀ y TL₅₀ mayor sobre larvas del tercer
762 estadio de *T. molitor*, siendo esta etapa de desarrollo cuando tienen menores
763 posibilidades de sobrevivir a infecciones fúngicas. A pesar, de que *M. anisopliae* sea
764 un hongo entomopatógeno generalista, existe diferencias entre las distintas cepas
765 para poder penetrar y colonizar tejidos del insecto hospedero, determinada por su
766 carga genética y diferencias respecto a las necesidades nutrimentales (Ali et al.,
767 2009).

768 Existen defensas presentes en larvas de *T. molitor*, empezando por la cutícula, que
769 es considerada una barrera física, que posee hidrocarburos e inhibidores de
770 proteasas importantes en la resistencia al ataque fúngico (Ortiz-Urquiza y Keyhani,
771 2012).

772 Se pudo observar durante el bioensayo que las larvas que originalmente son de color
773 amarillo se tornaron oscuras, esto se puede explicar revisando la respuesta al daño
774 de las capas de la cutícula producida por penetración fúngica de la epidermis que
775 lleva a la síntesis y acumulación de melanina en estos tejidos e inicia la cascada de
776 señalización pro-Fenol oxidasa y la actividad de esta se observa principalmente en
777 la epícutícula, epitelio (intestinos y gónadas) y hemolinfa, donde tiene la función dual
778 de endurecer/pigmentar y de defensa inmune, que incluye el reconocimiento de
779 cuerpos exógenos y la encapsulación de organismos invasores (Butt et al., 2016). Lo
780 anterior pudo haber interferido con la progresión de la infección y aumentar la CL₅₀ y
781 el TL₅₀.

782 Existen también metabolitos antimicrobianos como las tenecinas, producidas
783 constitutivamente por *T. molitor*, que poseen la capacidad de destruir los cuerpos

784 hifales presentes en la hemolinfa durante la infección y se ha reportado que cuando
785 se bloquean dichas defensas mediante ARNi se observa una disminución del 33%
786 en el TL₅₀ (Maistrou *et al.*, 2018). Todos los sistemas de defensa de *T. Molitor*
787 descritos pudieron tener un rol importante en evitar o disminuir la infección fúngica y
788 dar lugar a los resultados obtenidos.

789 Se realizaron ensayos de infectividad en larvas del tercer estadio larval utilizando
790 conidias de ambas cepas, Am1 y SJ1, cultivadas en arroz, sorgo, arroz-E.L., sorgo-
791 E.L., arroz peptona-E.L. y sorgo peptona-E.L. El mayor porcentaje mortalidad se
792 obtuvo con la cepa SJ1 cultivada en arroz peptona E.L. y la cepa Am1, alcanzó el
793 segundo mayor porcentaje de mortalidad cuando sus conidias se obtuvieron en sorgo
794 peptona-E.L, esto puede explicarse mediante la pre adaptación de las conidias a una
795 ambiente rico en proteína (Andersen, 1979), es decir, peptona y entonces al
796 momento de entrar en contacto con la cutícula rica en proteína de *T. molitor*, pudo
797 producir proteasas necesarias para desarrollar la infección fúngica tal como se
798 mencionó anteriormente (St Leger *et al*, 1996).. Respecto al resto de los ensayos,
799 cuando se cultivaron las cepas en arroz solo o sorgo solo, se ve una mayor
800 mortalidad que cuando se adicionó E.L. Esto podría explicarse por las condiciones
801 de inanición en las que se desarrollaron cuando solo se usó arroz y sorgo, lo que
802 resulta en conidias más infectivas y cuando se añadió E.L. como fuente de vitaminas,
803 no permitió la preadaptación de conidias a condiciones adversas (Ali *et al*, 2009).

804 De los anteriores resultados podría deducirse un efecto provocado por la adición de
805 peptona al sustrato arroz para la cepa SJ1, también para la cepa Am1, con la cual se
806 obtuvo mayor mortalidad cuando sus conidias fueron obtenidas de sustrato sorgo
807 con peptona-E.L. en *T. molitor*.

808 Las conidias obtenidas del cultivo de las cepa Am1 y SJ1 en sorgo más peptona-E.L.
809 y arroz más peptona-E.L., respectivamente, fueron usadas para obtener CL₅₀ y TL₅₀
810 en dichas condiciones. La CL₅₀ de la cepa SJ1 fue la menor cuando sus conidias
811 provinieron de cultivo en sorgo y peptona-E.L. sin embargo, no fue posible determinar
812 CL₅₀ de las conidias cultivadas en arroz solamente, aunque se puede realizar una

813 comparación con la cepa Am1, que obtuvo mayor CL₅₀ y entonces se encuentran
814 diferencias entre ambas cepas, siendo la más adecuada para infectar a larvas de *T.*
815 *molitor* la cepa de *M. anisopliae* SJ1. Para la cepa Am1 si hubo una disminución de
816 la CL₅₀ y se puede concluir que hubo un efecto por parte de la peptona al medio que
817 probablemente juegue un papel importante para generar una cepa con capacidad de
818 infectar, esto justificado desde las proteasas, donde si la peptona incentiva la
819 producción de estas, se verá reflejado en conidias preadaptadas a producir proteasas
820 relacionadas con el proceso infeccioso.

821 Al analizar los resultados en un contexto general, se encuentra que en los ensayos
822 de cultivo adicionados con peptona-E.L. contribuyen en un efecto en la producción
823 de conidias y a la mortalidad. Respecto a la producción de conidias y la adición de
824 peptona-E.L. aporta los nutrientes necesarios para desarrollar micelio profuso, lo que
825 culmina en mayor producción de conidias al presentar mayor extensión de biomasa
826 resulta en mayor conidiogénesis. Para la cepa SJ1 la mayor producción de conidias
827 fue obtenida en sorgo peptona-E.L. y para la cepa Am1 en arroz más peptona-E.L.
828 Sin embargo, las conidias con mayor porcentaje de mortalidad se obtuvieron con la
829 cepa SJ1 cultivada en arroz peptona-E.L. y en el caso de la cepa Am1 con sorgo
830 peptona-E.L. Entonces lo que se observa en mayor cantidad de conidias no implica
831 mayor capacidad de infección en *T. molitor*. Comparando el porcentaje de mortalidad
832 y la producción de proteasas. Se observa que para la cepa SJ1 no hubo inducción
833 significativa de estas y, por lo tanto, no se le puede atribuir una mayor capacidad de
834 infección con base en la actividad proteasa. En contraste, la cepa Am1 mostró mayor
835 actividad proteasa a los dos días de cultivo en sorgo peptona-E.L, atribuida a la
836 presencia de peptona y explicaría el mayor porcentaje de mortalidad sobre larvas de
837 *T. molitor* ocasionada por conidias cultivadas en estas condiciones. Sin embargo, la
838 cepa SJ1 cuando fue cultivada en arroz peptona-E.L. obtuvo una mortalidad
839 significativamente mayor que el resto de los ensayos. Los resultados obtenidos
840 respecto a la infección en *T. molitor* de las cepas de *M. anisopliae* Am1 y SJ1 pueden
841 deberse a factores relacionados con las defensas mencionadas anteriormente de
842 este hospedero y su origen de aislamiento: La cepa Am1 fue aislada de suelo de

843 riego y la cepa SJ1 de suelo con régimen de riego temporal, esto junto con los datos
844 obtenidos de crecimiento en diferentes α_w respaldan que cada cepa tiene diferentes
845 requerimientos de humedad para poder crecer y comparando con la capacidad
846 distinta de infectar a *T. molitor* entre la cepa Am1 y SJ1, donde la cepa SJ1 tuvo
847 mayor porcentaje de mortalidad en *T. molitor*, entonces, se deduce que la cepa SJ1
848 al encontrarse en condiciones estrés hídrico al avanzar la infección pudo establecer
849 la invasión en el hospedero a pesar de la baja de la α_w (Machin, 1984) a diferencia
850 de la cepa Am1, que tiene menor resistencia a condiciones de α_w baja. Por tanto, la
851 producción de proteasas no es lo único que condicionaría el porcentaje de
852 mortalidad, sino también las estrategias para solventar la baja de α_w en el contexto
853 de infección al hospedero.

854

9. Conclusiones

855

856 Fue posible identificar dos especies pertenecientes al género *Metarhizium*, aisladas
857 exitosamente por medio del método de cebo utilizando *T. molitor*. Por tanto, se pudo
858 alcanzar el primer objetivo de esta tesis.

859 Se alcanzó el objetivo específico de observar el efecto del cultivo a base de mezclas
860 de arroz y peptona sobre la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae*, así
861 como determinar el porcentaje de mortalidad, TL₅₀ y CL₅₀ ocasionadas por estas
862 conidias.

863 Las proteasas extracelulares obtenidas en extractos de cultivos de dos cepas de *M.*
864 *anisopliae* fueron medidas, cumpliéndose el tercer objetivo específico de analizar la
865 producción de proteasas de *M. anisopliae* en distintos sustratos.

866 Por último, se alcanzó el objetivo general de este trabajo que fue evaluar la actividad
867 infectiva de *Metarhizium anisopliae* SJ1 y Am1 cultivadas en sustrato sólido contra
868 *Tenebrio molitor*.

869 De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo se pudo observar que la
870 adición independientemente del soporte o la cepa duplica la infectividad de las
871 conidias, a pesar de que no se observa un efecto en la producción de conidias y
872 proteasas.

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

10. REFERENCIAS

- 883 Abellana, M., Benedi, J., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (1999). "Water activity and
884 temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E.*
885 *chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products". Journal of applied
886 microbiology. 87(3), 371-380.
- 887 Aguirre, N., Villamizar, L., Espinel, C. y Cotes, A. M. (2009). "Efecto del pH y de la
888 actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes)". Revista
889 Colombiana de Entomología. 32 (2): 138-144.
- 890 Alcántara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., y Angel-Cuapio, A.
891 (2020). "Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género
892 *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México". Revista
893 Mexicana de Biodiversidad. 91.
- 894 Ali, S., Huang, Z. y Ren, S. (2009) "Media composition influences on growth, enzyme
895 activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*".
896 Entomologia Experimentalis et Applicata. 131(1): 30–38.
- 897 Ali, S., Huang, Z. y Ren, S. X. (2009) "Production and extraction of extracellular lipase
898 from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae;
899 Hypocreales)". Biocontrol Science and Technology, 19(1): 81–89.
- 900 Andersen, S. O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. Annual review of entomology.
901 24(1), 29-59.
- 902 Andrews, K. (1988) "Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:
903 Noctuidae)". Latin American Armyworm Research. 71(4): 630–645.
- 904 ASERCA (2018) "El maíz es un cultivo representativo de México". Disponible en:
905 www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico.
- 906 Ávalos, A. y Pérez, E. (2009) "Metabolismo secundario de plantas". REDUCA. 2(3):

907 119–145.

908 Aw, K. M. S. y Hue, S. M. (2017) “Mode of infection of *Metarhizium* spp. Fungus and
909 their potential as biological control agents”. *Journal of Fungi*. 3(2).

910 Barajas, C. G., del-Pozo, E. M., García, I. y Méndez, A. (2010) “Obtención de conidios
911 del aislamiento Ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una
912 alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*. 25 (3): 174-180.

913 Barra-Bucarei, L., Vergara, P. y Cortes, A. (2016) “Conditions to optimize mass
914 production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates”.
915 *Chilean Journal of Agricultural Research*. 76(4): 448–454.

916 Behie, S. W., Zelisko, P. M. y Bidochka, M. J. (2012). “Endophytic Insect-Parasitic
917 Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants”. *Science* (80) 33: 1576–
918 1577.

919 Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, J.R. (2015) “Cross-resistance between Cry1
920 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current
921 pyramided *Bt* maize hybrids in Brazil”. *PloS One*. 10(10): 1-15.

922 Bhanu-Prakash, G. V. S., Padmaja, V. y Siva-Kiran, R. R. (2008) “Statistical
923 optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium*
924 *anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation”. *Bioresource Technology*. 99(6):
925 1530–1537.

926 Bidochka, M. J., Kasperski, J. E. y Wild, G. A. M. (1998) “Occurrence of the
927 entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from
928 temperate and near-northern habitats”. *Canadian Journal of Botany*. 76(7): 1198-
929 1204.

930 Blanco, C. A., Pellegaud, J. G., Nava-Camberos, U., Lugo-Barrera, D., Vega-Aquino,
931 P., Coello, J., Terán-Vargas, A. P. y Vargas-Camplis, J. (2014) “Maize Pests in
932 Mexico and Challenges for the Adoption of Integrated Pest Management Programs”.
933 *Journal of Integrated Pest Management*. 5(4): 1–9.

- 934 Bosa, C. F., Chávez, D., Torres, L., París, A., Villamizar, L. y Cotes, A. M. (2004)
935 “Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera*
936 *frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. Revista Colombiana de Entomología. 30(1).
- 937 Boisen, S. (1983). Protease inhibitors in cereals: occurrence, properties, physiological
938 role, and nutritional influence. Acta Agriculturae Scandinavica. 33(4), 369-381.
- 939 Boucias, D. G. y Pendland, J. C. (1991) “Attachment of Mycopathogens to Cuticle”,
940 The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. 101–12.
- 941 Borisade, O. A. (2018). “Effects of Water Activity and Temperature on
942 Entomopathogenic Fungal Culture, Implications on Conidia Integrity and Virulence”.
943 Journal of Advances in Microbiology. 1-9.
- 944 Boyette, C. D., Hoagland, R. E., y Weaver, M. A. (2007). “Effect of row spacing on
945 biological control of sicklepod (*Senna obtusifolia*) with *Colletotrichum*
946 *gloeosporioides*”. Biocontrol science and technology. 17(9), 957-967.
- 947 Braga, G. (2001) “Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability
948 and Delay Germination in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*”.
949 Photochemistry and Photobiology. 74(5): 734-739.
- 950 Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. R., Soumya, M., Bidochka, M. J. y Toriello,
951 C. (2018) “A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial
952 biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico”. Biocontrol Science
953 and Technology. 29(1): 83-102.
- 954 Butt, T. M., Coates C. J., Dubovskiy, L. M. y Ratcliffe N. A. (2016) “Entomopathogenic
955 Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions”. Advances in Genetics. 94: 307-
956 364.
- 957 Cañedo, V., Alfaro, A. y Kroschel, J. (2011) “Manejo integrado de plagas de insectos
958 en hortalizas”. Principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú. Centro
959 Internacional de la papa. Sección II: 24-28.

960 Carrillo-Benítez, M. G., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R. y Enríquez-Vara,
961 J. (2013) "Diversity and Genetic Population Structure of Fungal Pathogens Infecting
962 White Grub Larvae in Agricultural Soils., *Invertebrate Microbiology*. 65(2): 437–449.

963 Carvalho, R. A., Omoto, C., Field., L. M., Williamson, M. S. y Bass, C. (2013)
964 "Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid
965 Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*", *PLoS ONE*, 8(4).

966 Chandler, D. (2017) "Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi".
967 *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Cap. 5: 69-89.

968 Chavira, R., Burnett, T. J. y Hageman, J. H. (1984) "Assaying proteinases with
969 azocoll". *Analytical Biochemistry*. 136(2): 446–450.

970 Cotton, R. T. (1927). "Notes on the Biology of the Meal Worms, *Tenebrio Molitor*
971 Linneaus and *T. Obscurus* Fab". *Annals of the Entomological Society of America*.
972 20(1), 81-86.

973 Cruz-Avalos, A. M., Bivián-Hernández, M. A., Ibarra, J. E. y Del Rincón-Castro, M. C.
974 (2019) "High Virulence of Mexican Entomopathogenic Fungi Against Fall Armyworm,
975 (Lepidoptera: Noctuidae)". *Journal of Economic Entomolog.*, 112(1): 99-107.

976 Dagnas, S., y Membré, J. M. (2013). "Predicting and preventing mold spoilage of food
977 products". *Journal of food protection*. 76(3), 538-551.

978 Devi, V. (1994) "Conidia production of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*
979 and Its Evaluation for control of *Spodoptera litura* on *Ricinus communis*". 63: 145-
980 150.

981 Devi, V., Chowdary, A y Prasad, Y. G. (2000) "Cost-effective multiplication of the
982 entomopathogenic fungus". *Mycopathologia*. 151: 35–39.

983 Ding, G. W., Zhou, N. D., & Tian, Y. P. (2014). "Over-expression of a proline specific
984 aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen
985 degradation". *Applied biochemistry and biotechnology*. 173(7), 1765-1777.

- 986 Dumas, C., Robert, P., Pais, M., Vey, A. y Quiot, J. M. (1994) "Insecticidal and
987 cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins". Comparative Biochemistry
988 and Physiology. 108(2): 195–203.
- 989 Edelstein, J. D., Lecuona, R. E. y Trumper, E. V. (2004) "Selection of culture media
990 and *in vitro* assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*".
991 Neotropical Entomology. 33(6): 737–742.
- 992 El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M., Leather, T. D. y Gupta S. C. (1993) "Insect cuticle
993 and yeast extract effects on germination, growth, and production of hydrolytic
994 enzymes by *Nomuraea rileyi*". Mycopathologia. 122(3): 143–147.
- 995 Erler, F., y Ates, A. O. (2015), "Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria*
996 *bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as biological control agents against the June
997 beetle (Coleoptera: Scarabaeidae)". Journal of Insect Science. 15(1), 44.
- 998 FAO (2016) "Ciclo Biológico Del Gusano Cogollero Del Maíz (En América Latina)".
- 999 Faria, M. R. D. y Wraight, S. P. (2007) "Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A
1000 comprehensive list with worldwide coverage and international classification of
1001 formulation types". Biological Control. 43(3): 237–256.
- 1002 Fonseca, A. R., Nascimento-Martins, J., Furlaneto, M. C. y Monteiro, N. (2010)
1003 "Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence
1004 against *Anticarsia gemmatalis*". Ciencia Rural. Santa Maria. 40(9): 1853-1859.
- 1005 Fronza, E., Specht, A., Heinzen, H. y Monteiro, N., (2017) "*Metarhizium (Nomuraea)*
1006 *rileyi* as biological control agent". Biocontrol Science and Technology. 27(11): 1243–
1007 1264.
- 1008 Fu, H., Chung, K. R., Liu, X., & Li, H. (2020). "Aapr1, a subtilisin-like protease,
1009 required for autophagy and virulence of the tangerine pathotype of *Alternaria*
1010 *alternata*". Microbiological Research. 240, 126537.
- 1011 Fuxa, J. R. y Tanada, Y. (1987) "Epidemiological concepts applied to insect

- 1012 epizootiology”. Epizootology of insect diseases. Cap. 1: 6.
- 1013 García Roa, F., Mosquera, A. T., Vargas, C. A. y Rojas A. (1999) “Manejo integrado
1014 del gusano cogollero del maíz”. Corporación Colombiana de Investigación
1015 Agropecuaria Regional No. 5.
- 1016 García, C., González, M. B. y Bautista M, N. (2014) “Patogenicidad de aislamientos
1017 de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)
1018 y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)”. Revista Colombiana de
1019 Entomología. 37: 217–22.
- 1020 García, G. C., González, M. M. B., y Bautista, M. N. (2011). “Pathogenicity of isolates
1021 of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)
1022 and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)”. Revista Colombiana de
1023 Entomología. 37(2), 217.
- 1024 García, F. (1999) “Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera*
1025 *frugiperda* (J.E. Smith)”. I Curso-Taller Internacional Control Biológico. 156–16.
- 1026 Gerardo, G. y Tarango, S. (2009) Manejo biorracional del gusano cogollero en maíz.
1027 INIFAP, Sección 6: 15-22.
- 1028 Gervais, P., Bensoussan, M., y Grajek, W. (1988). “Water activity and water content:
1029 comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate”. Applied
1030 Microbiology and Biotechnology. 27(4), 389-392.
- 1031 Grewal, G. K., Joshi, N., y Suneja, Y. (2021). “Pathogenicity of *Metarhizium rileyi*
1032 (Farlow) Kepler, SA Rehner and Humber isolates against *Spodoptera litura*
1033 (Fabricius) and their extracellular enzymatic activities”. Egyptian Journal of Biological
1034 Pest Control. 31(1), 1-7.
- 1035 Goettel, M. S., Eilenberg, J. y Glare, T. (2005) “Entomopathogenic Fungi and their
1036 Role in Regulation of Insect Populations, Comprehensive Molecular Insect Science”.
- 1037 González-Cortés, Silos-Espino, H., Estrada-Cabral, J. C. y Tejero-Jiménez, J. (2017)

- 1038 “Características y propiedades del maíz (*Zea mays* L.) criollo cultivado en
1039 Aguascalientes, México”. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(3): 669.
- 1040 González-Maldonado, M. B., Hernández-Zetina, D. A. y Ruíz-Cancino, E. (2018)
1041 “Parasitoides (Diptera: Tachinidae) del Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.
1042 E. Smith) en Maíz en Durango, México”. *Southwestern Entomologist*. 43(1): 183–18.
- 1043 Green, M. R. y Sambrook, J. S. (2012) “Molecular cloning: A laboratory Manual”.
1044 Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cap. 6: 28-30.
1045
- 1046 Grijalba, E. P., Espinel, C., Cuartas, P. E., Chaparro, M. L. y Villamizar, L. F. (2018)
1047 “*Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and
1048 insecticidal activity under glasshouse conditions”. *Fungal Biology*. 122(11): 1069-
1049 1076.
- 1050 Guevara, S. V. V. y Brechelt, A. (2004) “El Manejo Ecológico de Plagas y
1051 Enfermedades”, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América
1052 Latina: 36.
- 1053 Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermúdez, A., Cambero-Campos, J., Santillán-
1054 Ortega, C., Ortiz-Catón, M., Coronado-Blanco, J. M. y Campos-Figueroa, M. (2015)
1055 “Parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Encontrados en
1056 Nayarit, México”. *Southwestern Entomologist*. 40(3): 555–564.
- 1057 Hariprasanna, K., Agte, V., Elangovan, M., Gite, S., y Kishore, A. (2016). “Genetic
1058 Variability for Cyanogen and Trypsin Inhibitor Contents in Sorghum [*Sorghum bicolor*
1059 (L.) Moench]”. *Electronic Journal of Plant Breeding*. 7(4): 1098-1104.
- 1060 Hegedus, D. D. y Khachatourians, G. G. (1995) “The impact of biotechnology on
1061 hyphomycetous fungal insect biocontrol agents”. *Biotechnology Advances*. 13(3):
1062 455–490.
- 1063 Hernandez-Trejo, A., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J. A., Rios-Velasco, C.
1064 Rodríguez-Herrera, R y Osorio-Hernández E. (2019) “Effects of Native

- 1065 Entomopathogenic Fungal Strains and Neem Extract on *Spodoptera frugiperda* on
1066 Maize". Southwestern Entomologist. 44(1): 117-124.
- 1067 Hesketh, H., Roy, H E., Eilenberg., J., Pell, J. K., y Hails, R. S. (2010) "Challenges in
1068 modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of
1069 Insects". The Ecology of Fungal Entomopathogens. 55: 55-73.
- 1070 Hoddle, M. S. y Van Driesche, R. G. (2009) Biological Control of Insect Pests,
1071 Encyclopedia of Insects. Segunda Edición. Elsevier Inc: 91-101.
- 1072 Holdom, D. G. y Klonhorst, G. (1986) "Inexpensive Culture Media and Methods for
1073 *Nomuraea rileyi*". Journal of Invertebrate Pathology. 48: 246–248.
- 1074 Howard, R. S. (1955). "The biology of the grain beetle *Tenebrio molitor* with reference
1075 to its behavior". Ecology. 36(2), 262-269.
- 1076 Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., Liu, X., Zhan, S., St.-Leger,
1077 R. J. y Wang, C. (2014) "Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen
1078 speciation and host adaptation". Proceedings of the National Academy of Sciences
1079 of the United States of America. 111(47): 16796–16801.
- 1080 Huang, W., Huang, Y., Hao, Y., Huang, S., Gao, T., Keyhani, N. O., y Huang, Z.
1081 (2020). "Host-dependent contributions of the Cfcdp1 protease gene to virulence in the
1082 entomopathogenic fungus *Cordyceps fumosorosea*". Pest management science.
1083 76(2), 575-588.
- 1084 Humber, R. A. (2008) "Evolution of entomopathogenicity in fungi". *Journal of*
1085 *Invertebrate Pathology*. 98(3): 191-198.
- 1086 Ibarra-Vázquez, S. E., Arcos-Cavazos, G., Terán-Vargas, A. P., González-Gaona, O.
1087 J., y Azuara-Domínguez, A. (2018). "Occurrence of *Metarhizium rileyi* (Farlow)
1088 Kepler, SA Rehner & Humber in *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:
1089 Erebidae) and *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Tamaulipas
1090 and Veracruz, Mexico". Florida Entomologist. 101(3): 517-518.

1091 Ignoffo C. M., Marston, N. L., Bell, J. V., Hostetter D. L., Puttler B. y Bell, J. V. (1976)
1092 “Natural and Induced Epizootics of *Nomuraea rileyi* in Soybean Caterpillars”. Journal
1093 of Invertebrate Pathology. 27: 191–198.

1094 Ignoffo, C. M., McIntosh, A. H., García, C., Kroha, M. y Johnson, J. M. (1982) “Effects
1095 of successive in vitro and In vivo passages on the virulence of the entomopathogenic
1096 fungus, *Nomuraea rileyi*”. Entomophaga. 27(4):371–378.

1097 Jiménez, E. (2009) “Métodos de Control de Plagas”. Universidad Nacional Agraria:
1098 141.

1099 Judet, D., Bensoussan, M., Perrier-Cornet, J. M., y Dantigny, P. (2008). “Distributions
1100 of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum*
1101 conidia depend on water activity”. Food microbiology. 25(7), 902-907.

1102 Kamp, A. M. y Bidochka, M. J. (2002) “Conidium production by insect pathogenic
1103 fungi on commercially available agars”. Letters in Applied Microbiology. 35(1): 74-77.

1104 Kavallieratos, N. G., Michail, E. J., Boukouvala, M. C., Nika, E. P., y Skourti, A. (2019).
1105 “Efficacy of pirimiphos-methyl, deltamethrin, spinosad and silicoSec against adults
1106 and larvae of *Tenebrio molitor* L. on wheat, barley and maize”. Journal of Stored
1107 Products Research. 83, 161-167.

1108 Keller, S., Kessler, P. y Schweizer, C. (2003) “Distribution of insect pathogenic soil
1109 fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium*
1110 *anisopliae*”. BioControl. 48(3): 307-319.

1111 Kepler, R. M. y Rehner, S. A. (2013) “Genome-assisted development of nuclear
1112 intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium*
1113 *anisopliae* species complex”. Molecular Ecology Resources. 13(2): 210–217.

1114 Khachatourians, G. y Qazi, S. (2008) “Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and
1115 Molecular Biology”. Human and Animal Relationships: The Mycota VI, Springer: 33-
1116 61.

- 1117 Kogan, M. y Prokopy, R. (2009) Capítulo 3 – “Agricultural Entomology”. Encyclopedia
1118 of Insects. Segunda Edición. Elsevier Inc: 4-8.
- 1119 Kumar, Vineet et al. (1997) “SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow)
1120 on silkworm, *Bombyx mori* Linneaus causing green muscardine”. Mycopathologia.
1121 138: 141–144
- 1122 Lezama-Gutiérrez, R, Hamm, J. J., Molina-Ochoa, J., López-Edwards, M., Pescador-
1123 Rubio, A., González-Ramírez, M. y Styer, E. L. (2000) “Occurrence of
1124 Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican
1125 States of Michoacán, Colima, Jalisco”. The Florida Entomologist. 84(1): 23.
- 1126 Lichtenwalner, R. E., Glover, G. I., y Shaw, C. C. (1979). “Protease activity of water-
1127 and acid-reconstituted grain sorghum”. Journal of agricultural and food chemistr.,
1128 27(2), 359-362.
- 1129 Life Science Group - Bio-Rad Laboratories (1994) “Bio-Rad Bradford Protein Assay
1130 Instruction Manual”. Disponible en: [http://www.bio-
1131 rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf).
- 1132 Liu, X., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Chen, T., y Cheng, J. (2020). “The subtilisin-like
1133 protease Bcser2 affects the sclerotial formation, conidiation and virulence of *Botrytis*
1134 *cinerea*”. International journal of molecular sciences. 21(2), 603.
- 1135 Machin, J. (1983). “Water vapor absorption in insects. American Journal of
1136 Physiology-Regulatory”. Integrative and Comparative Physiology. 244(2), 187-192.
- 1137 Maistrou, S., Paris, V., Jensen, A. B., Rolff, J., Meyling, N. V., y Zanchi, C. (2018). “A
1138 constitutively expressed antifungal peptide protects *Tenebrio molitor* during a natural
1139 infection by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*”. Developmental &
1140 Comparative Immunology. 86, 26-33.
- 1141 Méndez, A. y del Pozo E., G. I. (2009) “Producción masiva de *Nomuraea rileyi*
1142 (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico”. Protección vegetal.
1143 24(3): 156–161.

- 1144 Méndez A., Del Pozo E., y García, G. A. (2010) "Evaluación de sustratos sólidos para
1145 la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) SAMSON". Protección Vegetal.
1146 25(2): 108–112.
- 1147 Méndez, A., del Pozo, E. y García, I. (2007) "Biomass production by the strain Nr-003
1148 of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in different liquid media in shake culture and its
1149 virulence on *Spodoptera frugiperda* (J.E. smith)". Revista de Protección Vegetal.
1150 22(2): 118–123.
- 1151 Mendez-Gonzalez, F., Loera, O. y Favela-Torres, E. (2018) "Conidia production of
1152 *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors". Current
1153 Biotechnology. 7(1): 65–69.
- 1154 Mohammadbeigi, A. (2013). "Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*
1155 *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an
1156 insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae)". International Journal of
1157 Agriculture and Crop Sciences. 6(16): 1147.
- 1158 Morrow, B. J., Boucias, D. G. y Heath, M. A. (1989) "Loss of Virulence in an Isolate
1159 of an Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea rileyi*, After Serial In Vitro Passage".
1160 Journal of Economic Entomology. 82(2): 404-407.
- 1161 Nahar, P. B., Kulkarni, S. A., Kulye, M. S., Chavan, S. B., Kulkarni, G., Rajendran, A.,
1162 y Deshpande, M. V. (2008). "Effect of repeated in vitro sub-culturing on the virulence
1163 of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)".
1164 Biocontrol Science and Technology. 18(4): 337-355.
- 1165 Nanguy, S. P. M., Perrier-Cornet, J. M., Bensoussan, M., y Dantigny, P. (2010).
1166 "Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and
1167 *Penicillium* species". International Journal of food microbiology. 142(1-2), 273-276.
- 1168 Negrete Baron, F. y Angulo Morales, J. (2003) "El gusano cogollero del maíz".
1169 Primera Edición. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- 1170 Negrete, G. D., Ávalos, M. y Lezama-Gutiérrez, R., Wilberth, C. C., Molina-Ochoa,

- 1171 J., y Galindo-Velasco, E. (2017), "Suitability of *Cordyceps bassiana* and *Metarhizium*
1172 *anisopliae* for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germar)(Coleoptera:
1173 Curculionidae) in an organic Mexican banana plantation: laboratory and field trials".
1174 Journal of Plant Diseases and Protection. 125(1): 73-81
- 1175 Okuno, M., Tsuji, K., Sato, H., y Fujisaki, H. (2012) "Plasticity of grooming behavior
1176 against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius*
1177 *japonicus*". Journal of Ethology. 30(1): 23–27.
- 1178 Oliveira, A. S., Braga, G. U., y Rangel, D. E. (2017). "*Metarhizium robertsii* illuminated
1179 during mycelial growth produces conidia with increased germination speed and
1180 virulence". Fungal biology. 122(6), 555-562.
- 1181 Oliveira, A. S., y Rangel, D. E. (2018). "Transient anoxia during *Metarhizium robertsii*
1182 growth increases conidial virulence to *Tenebrio molitor*". Journal of invertebrate
1183 pathology. 153, 130-133.
- 1184 Ordóñez-García, Bustillos-Rodríguez J. C., Berlanga-Reyes, D. I., Cambero-Campos
1185 O.J., Salas-Marina M.Á., Estrada-Virgen M.O. y Ríos-Velasco, C. (2018) "Natural
1186 occurrence of *Metarhizium rileyi* on *Spodoptera frugiperda* larvae in Chihuahua state".
1187 Bio-ciencias: 1–17.
- 1188 Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N. O. (2013) "Action on the surface: Entomopathogenic
1189 fungi versus the insect cuticle". Insects. 4(3): 357–374.
- 1190 Pal, S., St. Leger, R. J. y Wu, L. P. (2007) "Fungal peptide destruxin a plays a specific
1191 role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*". Journal
1192 of Biological Chemistry. 282(12): 8969–8977.
- 1193 Pavone, Díaz, M., Trujillo, L. y Dorta, B. (2009) "A granular formulation of *Nomuraea*
1194 *rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:
1195 Noctuidae)". Interciencia., 34(2): 130–134.
- 1196 Pedrini, N. (2018). "Molecular interactions between entomopathogenic fungi
1197 (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and

- 1198 hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies”.
1199 Fungal biology. 122(6), 538-545.
- 1200 Pendland, J. C. y Boucias, D. G. (1997) “In vitro growth of the entomopathogenic
1201 hyphomycete *Nomuraea rileyi*”, 89(1): 66–71.
- 1202 Pérez-Álvarez, S., Méndez-Guerrero, A., Nayar, B., Duarte, D., Magallanes-Tapia, M.
1203 A., Chávez-Medina, J. A. y Domínguez-Rodríguez, Y. (2018) “First Report of a New
1204 Isolate of *Metarhizium rileyi* from Maize Fields of Quivicán, Cuba”. Indian Journal of
1205 Microbiology. 58(2): 222–226.
- 1206 Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-
1207 López, J. H., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G. y Baverstock, J. (2014)
1208 “Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in
1209 Mexican agricultural soils”. Journal of Invertebrate Pathology. 119: 54–61.
- 1210 Pérez-López, E. (2012) “Plaguicidas Botánicos: Una Alternativa a tener en cuenta”.
1211 Fitosanidad. 16(1): 51–59.
- 1212 Prokopy, R. y Kogan, M. (2009) “Integrated Pest Management”. Encyclopedia of
1213 Insects. Segunda Edición. Elsevier Inc: 523-528.
- 1214 Rajan, S. T. y Muthukrishnan, N. (2010) “Influence of various health drinks media on
1215 growth and sporulation of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates”. Journal of
1216 Biopesticides. 3(2): 463–465.
- 1217 Ramos, Y., Taibo, A. D., Jiménez, J. A. y Portal, O. (2020) “Endophytic establishment
1218 of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect
1219 against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae”.
1220 Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30(20).
- 1221 Ramos-López, M. A., Pérez, S., Rodríguez-Hernández, C., Guevara-Fefer, P. y
1222 Zavala-Sánchez, M. A. (2010) “Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against
1223 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. African Journal of Biotechnology.
1224 9(9): 1359–1365.

- 1225 Rezende, J. M., Zanardo, A. B. R., da Silva Lopes, M., Delalibera, I. y Rehner, S. A.
1226 “Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane
1227 agriculture”. *BioControl*. (2015)
- 1228 Rivero-Borja, M., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Santillán-Ortega, C.
1229 y Pérez-Panduro, A. (2018) “Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*
1230 *anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae”. *Pest*
1231 *Management Science*. 74(9): 2047–205.
- 1232 Roberts, D. W. y Hajek, A. E. (1992) “Entomopathogenic fungi as biopesticides”.
1233 *Frontiers in industrial mycology*: 144–159.
- 1234 Robinson, W. H. (2005). “Urban insects and arachnids: a handbook of urban
1235 entomology”. Cambridge University Press.
- 1236 Romero-Arenas, O., Rivera, A., Aragon, A., Parraguirre, C., Cabrera, E. y López, F.
1237 (2014) “Mortality evaluation of armyworm (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) by
1238 using *Metarhizium anisopliae* *In vitro*”. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 8:
1239 59–67.
- 1240 Romero-Gómez, S. J. “Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en
1241 Fermentación Líquida y Fermentación Sólida”. Tesis de Doctorado. Divisiones de
1242 Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.
- 1243 SAGARPA (2020) “Reporte del mercado de Maíz”.
- 1244 Rosas-García, N. M., Ávalos-de-León, O., Villegas-Mendoza, J. M., Mireles-Martínez,
1245 M., Barboza-Corona, J. E., y Castañeda-Ramírez, J. C. (2014). “Correlation between
1246 pr1 and pr2 Gene Content and Virulence in *Metarhizium anisopliae* Strains”. *Journal*
1247 *of microbiology and biotechnology*. 24(11), 1495-1502.
- 1248 Samson, R. A., Evans, H. C. y Latgé, J. P. (1988). “Atlas of Entomopathogenic Fungi”.
1249 Springer.
- 1250 Samuels, R. I., Charnley, A. K. y Reynolds, S. E. (1988) “The role of destruxins in the

- 1251 pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm
1252 *Manduca sexta*". Mycopathologia. 104(1): 51–58.
- 1253 Sant, N., Iwanicki, A., Pereira, A. A., Botelho, A. B. R. Z., Rezende, J. M., de Andrade
1254 Moral, R., y Júnior, I. D. (2019). "Monitoring of the field application of *Metarhizium*
1255 *anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects,
1256 soil and sugarcane roots". Scientific reports. 9(1), 1-12.
- 1257 Santos, A. (2014) "Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi*
1258 mediante el uso de factores abióticos de estrés". Tesis de Maestría. Facultad de
1259 Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- 1260 Schrank, A. y Vainstein, M. H. (2010) "*Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins".
1261 Toxicon. 56(7): 1267–1274.
- 1262 Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J. y Butt, M. T. (2007) "Repeated in vitro subculturing
1263 alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*". FEMS
1264 Microbiology Letters. 276(1): 60–66.
- 1265 Shah, F. A., Wang, C. S. y Butt, T. M. (2005) "Nutrition influences growth and
1266 virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*". FEMS
1267 Microbiology Letters. 251(2), pp. 259–266.
- 1268 Shah, P. A. y Pell, J. K. (2003) "Entomopathogenic fungi as biological control agents".
1269 Springer: 414-423.
- 1270 Smith, R. J., Pekar, S. y Grula, E. A. (1981) "Requirement for sequential enzymatic
1271 activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*)".
1272 Journal of Invertebrate Pathology. 38(3): 335–344.
- 1273 Song, Z., Lin, Y., Du, F., Yin, Y., y Wang, Z. (2017) "Statistical optimisation of process
1274 variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes:
1275 Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation". Mycology. 8(1): 39–47.
- 1276 Song, Z., Yin, Y., Jian, S., Liu, J. y Wang, Z. (2014) "Optimization of culture medium

- 1277 for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use
1278 as a mycoinsecticide". *BioControl*. 59(5): 597–605.
- 1279 Sowjanya Sree K y Vadlamani Padmaja, Y. L. (2008) "Review Semiochemicals for
1280 biting y control: their identification and exploitation., *Pest Management Science*. 657:
1281 647–657.
- 1282 Sparks, A. N. (1979) "A Review of the Biology of the Fall Armyworm". *The Florida*
1283 *Entomologist*. 62(2): 82-87.
- 1284 St. Leger, R. J., Goettel, M., Roberts, D. W. y Staples, R. C. (1991) "Prepenetration
1285 events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*". *Journal of*
1286 *Invertebrate Pathology*. 58(2): 168–179.
- 1287 St. Leger, R. J., Joshi, L. y Roberts, D. (1998) "Ambient pH is a major determinant in
1288 the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium*
1289 *anisopliae*". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2): 709–71.
- 1290 St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., y Roberts, D. W. (1996). "Construction of
1291 an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease". *Proceedings of the*
1292 *National Academy of Science*. 93(13), 6349-6354.
- 1293 St Leger, R. J., Nelson, J. O. y Screen, S. E. (1999) "The entomopathogenic fungus
1294 *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production
1295 and activity". *Microbiology*. 145(10): 2691–2699.
- 1296 St Leger, R. J., Joshi, L., y Roberts, D. W. (1997). "Adaptation of proteases and
1297 carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the
1298 requirements of their ecological niches". *Microbiology*. 143(6), 1983-1992.
- 1299 Steinkraus, D. C. (2007) "Documentation of naturally occurring pathogens and their
1300 impact in agroecosystems". *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology:*
1301 *Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate*
1302 *Pests*. Dordrecht: Springer Netherlands: 267–281.

- 1303 Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B. y
1304 Spatafora, J. W. (2007) "Phylogenetic classification of Cordyceps and the
1305 clavicipitaceous fungi". *Studies in Mycology*. 57: 5-59.
- 1306 Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A. y Wiwat, C. (2010) "Characterization of an
1307 extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity
1308 toward *Spodoptera litura*". *Journal of Invertebrate Pathology*. 105(3): 228–235.
- 1309 Thakre, M., Thakur, M., Malik, N. y Ganger, S. (2011) "Mass scale cultivation of
1310 entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro
1311 wastes". *Journal of Biopesticides*. 4(2): 176–179.
- 1312 Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S.,
1313 Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N. y
1314 Roy, H. (2009) "Fungal entomopathogens: new insights on their ecology". *Fungal
1315 Ecology*. 2(4): 149–159.
- 1316 Van-Breukelen, F. R. *et al.* (2011) "Bioreactor and substrate selection for solid-state
1317 cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*". *Process
1318 Biochemistry*. 46(3): 751–757.
- 1319 Van Long, N. N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., y
1320 Rigalma, K. (2017). Temperature, water activity and pH during conidia production
1321 affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species.
1322 *International journal of food microbiology*. 241, 151-160.
- 1323 Villamizar, L., Arriero, C., Bosa, C. F. y Cotes, M. A. (2004) "Desarrollo de
1324 preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda*
1325 (Lepidoptera: Noctuidae)". *Revista Colombiana de Entomología*. 30(1).
- 1326 Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., y Moret, Y. (2019). "Immune defenses of a
1327 beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*". *Frontiers in physiology*. 10,
1328 138.
- 1329 Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gómez, S. D. J.,

- 1330 Díaz-Godínez, G. y Augur, C. (2003) “Advantages of fungal enzyme production in
1331 solid state over liquid fermentation systems”. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2–
1332 3): 157–167.
- 1333 Wang, C. y St. Leger, R. J. (2007) “The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae*
1334 links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2
1335 adhesin enables attachment to plants”. *Eukaryotic Cell*. 6(5): 808–816.
- 1336 Wang, Z., Cheng, X., Meng, Q., Wang, P., Shu, B., Hu, Q., Hu, M. y Zhong, G. (2015)
1337 “Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and
1338 cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells”. *International Journal of*
1339 *Biochemistry and Cell Biology*. 64: 126–135.
- 1340 Wattanalai, R. Wiwat, C., Boucias, D. G. y Tartar, A. (2005) “Chitinase gene of the
1341 dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*”. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85(1):
1342 54–57.
- 1343 Wentworth, J. S., Paterson, C. A., Wells, J. T., Tilki, N., Gray, R. S., y McCartney, M.
1344 D. (1993). “Collagen shields exacerbate ulceration of alkali-burned rabbit corneas”
1345 *Archives of Ophthalmology*. 111(3), 389-392.
- 1346 Yu, S. J. y McCord, E. J. (2007) “Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-
1347 resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella*
1348 (Lepidoptera: Yponomeutidae)”. *Pest Management Science*, 63: 63–67.
- 1349 Yu, S. J., Nguyen, S. N. y Abo-Elghar, G. E. (2003) “Biochemical characteristics of
1350 insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)”.
1351 *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 77(1): 1–11.
- 1352 Yu, Simon J, Nguyen, S. N. y Abo-Elghar, G. E. (2003) “Significance of the
1353 sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition
1354 in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*”. *Pesticide Biochemistry &*
1355 *Physiology*. 34(8): 43–752.
- 1356 Zare, R. y Gams, W. (2001) “A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The

1357 genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov.”. *Nova Hedwigia*. 73(1–2): 1–50.

1358 Zimmermann, G. (2007) “Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria*
1359 *bassiana* and *Beauveria brongniartii*”. *Biocontrol Science and Technology*. 17(6):
1360 553–596.

1361

1362

1363

Dirección General de Bibliotecas UAQ