



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**“EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE
ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA DE LOS
PROPÁGULOS INFECTIVOS DE CEPAS DEL
GÉNERO *Paecilomyces*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:

ERIKA ACOSTA SMITH

CD. OBREGÓN, SONORA

JULIO 2006

El presente trabajo de Tesis fue desarrollado con financiamiento del Proyecto SAGARPA-2004-CO1-5 del Consejo Nacional de ciencias y Tecnología (CONACYT). “Biotecnología para la producción masiva de entomopatógenos nativos de zona árida para el control de plagas agrícolas. La estudiante Erika Acosta Smith fue becaria del proyecto.

DEDICATORIA

A DIOS

Por llenar mi vida de bendiciones, permitirme terminar una carrera y ser mi compañero en cada paso que doy en la vida.

A MIS PADRES (Jesús y Amanda)

Por educarme, apoyarme, bendecirme y creer siempre en mi. Por que me enseñaron a respetar a los demás pero siempre respetándome a mi misma, porque me demostraron que todos somos iguales e importantes pero con formas de pensar distintas. Me dijeron sé feliz y rodéate de felicidad; y eso es lo que hago. ¡¡Los Amo papis!!

A MIS HERMANOS

Maytee, Haymee, Hanali y Jesús Eduardo, por aguantar mis ocurrencias, apoyarme en todas mis locuras y compartir conmigo momentos tan alegres y felices. ¡¡Los quiero muchísimo mis pichurrientos!!

Tamara mi hermana del alma, gracias porque siempre estuviste conmigo en mi alma, mente y corazón; TQM.

A MIS TIOS (Tomás y Socorro)

Por ser como mis segundos padres, apoyarme, comprenderme, bendecirme y estar conmigo siempre. ¡¡Gracias y los quiero mucho!!

A ISMAEL

Por haber aguantado conmigo todo este trayecto tan difícil, ayudarme a no caer y levantarme cuando parecía que todo estaba perdido. Por brindarme su amor, apoyo y comprensión incondicional. Por que sin ti mi amor este camino hubiese sido aun más difícil. ¡¡Te Amo!!

A MIS AMIGAS

Lupita, Bianca, Paulina y Rosalia por aceptarme en el grupo Masiaca y no dejarme ir, por todo su cariño y amistad invaluable.

A las chaparras (Denisse e Isceliata) por dejarme ser parte de su vida, compartir bellos momentos.

Soila, Jessica, Erika, Laura y Verónica, por que en ese momento tan difícil para mi estuvieron ahí para apoyarme, me hicieron ver que no todo en este mundo es brillo y belleza, sin embargo, las cosas oscuras pueden pasar, pero es mejor no darles importancia. ¡Gracias por su amistad y cariño!

Karla y Cecy gracias por ese ejemplo de seguridad, que tanto las distingue.

A MIS AMIGOS

Pedro, Fuantos y Rolando por los bellos momentos que pasamos juntos.

Javito, Huguito y Bemba por aguantarme, escucharme y protegerme.

A los niños del Averno: Moncho, Oscar, Seth, Arvayito, Fernando y David, por ser tan sinceros, amigos, fiesteros, adorables y lindos; apoyarme, confiar en mis aptitudes y seguir conmigo.

A todos lo quiero mucho y tienen un lugar especial e importante en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado.

Al centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C. por facilitarme instalaciones y materiales.

A la Dra. Mayra de la Torre por darme la oportunidad de entrar en su mundo científico y por brindarme su confianza.

A mi asesor el Dr. Ali Asaff por apoyarme, enseñarme, guiarme y aguantar tantas mal pasadas.

A mis compañeros de laboratorio en especial a la M. C. Yolanda Reyes por compartir con nosotros sus conocimientos, apoyarnos en todo momento, subirnos el animo cuando las cosas estaban mal y sobre todo por esa memoria invaluable que tanta ayuda nos brindo.

A la Coordinadora de carrera M. en C. Ruth Gabriela Ulloa M. por que sin su ayuda, apoyo y dedicación esto no fuese sido posible.

***“Hay hombres que luchan un día, y son buenos,
Hay otros que luchan un año y son mejores,
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,
Pero hay los que luchan toda la vida, esos, son los imprescindibles”.***

(Bertol Breach)

RESUMEN

El presente estudio fue realizado en el periodo febrero-julio de 2006 en el laboratorio de Ingeniería Celular y Bioprocesos de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que tienen la capacidad de causar infecciones en insectos y ácaros, constituyendo una alternativa importante para el control biológico de insectos plaga en la agricultura.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del medio de cultivo sobre la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como velocidad de germinación y tamaño de los propágulos infectivos, de tres cepas del género *Paecilomyces* producidos en fermentación líquida, para la selección de la cepa y el medio de cultivo más adecuados para su producción y uso en la región sur del Estado de Sonora. Para ello se obtuvieron propágulos de las cepas P43A, PAE y Pfrd (*Paecilomyces*) en tres medios de cultivo diferentes (medio Jackson, medio 5 y medio 8). Estos propágulos fueron sometidos a un estrés térmico de 30 minutos a temperaturas de 33, 36, 39, 42, 45 y 48°C, para luego determinar su porcentaje de germinación (sobrevivencia) en un medio rico en nutrientes. También se evaluó su velocidad de germinación, morfología y tamaño.

Se encontraron diferencias de resistencia a temperatura entre cepas. Se estableció que las cepas Pfrd y P43A son más resistentes a la temperatura que la cepa PAE. Por otro lado, se determinó que los medios de cultivo utilizados también tienen un efecto en la resistencia a la temperatura de los propágulos de las cepas utilizadas. Aquellos producidos en los medios 5 y 8 son más resistentes a la temperatura que los producidos en el medio Jackson, aunque estos últimos muestran una velocidad de germinación ligeramente mayor.

Otro cambio evidente en los propágulos, ocasionado por la composición del medio de cultivo, fue su morfología y tamaño. Se observó que en el medio 5 y en el medio 8, los propágulos obtenidos son mayoritariamente del tipo conidio (forma ovoide), aunque en el primer caso su tamaño es aproximadamente 42 % menor. En el medio Jackson, los propágulos producidos son principalmente blastosporas (forma de cacahuate), con un tamaño 90 % mayor al de los propágulos tipo conidio obtenidos en el medio 5. No se observaron diferencias morfológicas ni de tamaño de los propágulos de acuerdo al tipo de cepa.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
INDICE GENERAL	III
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VI

I INTRODUCCION

1.1.- Antecedentes.	1
1.2.- Planteamiento del problema.	3
1.3.- Justificación.	3
1.4.- Objetivos.	4
1.4.1.- Objetivo general.	4
1.4.2.- Objetivos específicos.	4
1.5.- Hipótesis.	5

II MARCO TEORICO.

2.1.- Control de plagas.	6
2.2.- Hongos entomopatógenos.	7
2.2.1.- Mecanismo patogénico.	8
2.2.2.- Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos.	9
2.3. - Características del género <i>Paecilomyces</i> .	10
2.3.1.- Características de los propágulos de <i>P. fumosoroseus</i> .	12
2.3.1.1.- <i>Micelio</i> .	12
2.3.1.2.- <i>Conidios aéreos</i> .	12
2.3.1.3.- <i>Conidios sumergidos</i> .	13
2.3.1.4.- <i>Blastosporas</i> .	13
2.4.- Medios de cultivo y producción masiva.	14

MATERIALES Y METODOS.

3.1.- Cepas utilizadas.	16
3.2.- Conservación de las cepas.	16

	IV
3.3.- Crecimiento radial.	17
3.4.- Obtención de propágulos en cultivo sumergido.	17
3.4.1.- Obtención del inóculo.	17
3.4.2.- Formulación de los medios de cultivo.	17
3.4.3.- Obtención de los propágulos.	18
3.4.4.- Cosecha de propágulos.	19
3.4.5.- Tratamiento térmico.	19
3.4.6.- Recuento de esporas y propágulos infectivos sumergidos.	20
3.4.7.- Tratamiento estadístico de los datos obtenidos.	20
IV RESULTADOS Y DISCUSION.	
4.1.- Evaluación del rango de temperatura óptima de las cepas utilizadas.	21
4.2.- Efecto del medio de cultivo sobre la resistencia a la temperatura de propágulos de las cepas del género <i>Paecilomyces</i> .	22
4.3.- Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad de germinación.	26
4.4.- Efecto del medio de cultivo sobre la morfología de los propágulos.	28
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	33
BIBLIOGRAFIA	34

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1.- Formulación de los medios de cultivo a utilizar.	18
2.-Velocidad de crecimiento radial de tres cepas del género <i>Paecilomyces</i> cultivadas a diferentes temperaturas [$\mu\text{m/h}$].	21
3.- LT_{50} [$^{\circ}\text{C}$] de los propágulos infectivos fúngicos del género <i>Paecilomyces</i> , producidos en cultivo líquido en tres medios diferentes.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Características microscópicas y macroscópicas de <i>Paecilomyces</i> spp.	11
2. Porcentaje de sobrevivencia a la temperatura de los propágulos de infectivos fúngicos del género <i>Paecilomyces</i> obtenidos en tres medios de cultivo.	23
3. Tiempo necesario para alcanzar el 50% de germinación de propágulos de tres cepas del género <i>Paecilomyces</i> producidos en cultivo líquido en tres medios diferentes.	27
4. Propágulos producidos en el Medio Jackson.	28
5. Propágulos producidos en el medio 5.	29
6. Propágulos producidos en el medio 8.	30

I INTRODUCCIÓN

1.1.- Antecedentes.

Los insecticidas químicos si bien han permitido un control eficaz de las plagas de insectos, se ha establecido que estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas; además, por su persistencia en el medio ambiente, favorecen la selección de insectos plaga resistentes a ellos, lo que ha motivado el uso de dosis cada vez mayores o de productos cada vez más tóxicos. Esto ha generado mucha preocupación en el ámbito mundial y actualmente se trabaja para limitar su aplicación, promoviendo el manejo integrado de plagas (MIP) que incluye otras formas de control menos contaminantes, entre las que se encuentra el control biológico (Asaff *et al.*, 2002).

El control biológico es, en sí, la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su crecimiento. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parasitoides, así como microorganismos patógenos de insectos (entomopatógenos). Estos microorganismos son selectivos, afectando sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores (Asaff *et al.*, 2002). Las formulaciones comerciales de los microorganismos son conocidas como bioinsecticidas e incluyen a diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nemátodos y virus.

Los hongos entomopatógenos constituyen el segundo grupo de mayor importancia en el control microbiológico de insectos plagas, después de *Bacillus thuringiensis*. La unidad infectiva de los hongos entomopatógenos usualmente es una espora

(propágulo infectivo), la que una vez adherida a la cutícula del insecto inicia el proceso germinación y posterior penetración al hemocele. La adhesión es un fenómeno de superficie en el que se ven involucradas interacciones del tipo hidrofóbico. Algunos estudios han señalado que las características de pared de la espora así como su tamaño guardan una relación directa con la virulencia del hongo (Aitre *et al.*, 1999). Por otro lado se ha sugerido que una velocidad de germinación alta favorece el proceso infectivo y expone menos tiempo al hongo a factores externos, por lo cual es considerado otro factor de virulencia (Jackson, 1997). Para que estos eventos se desarrollen es necesario que la espora esté viable; sin embargo, factores externos tales como la humedad y la temperatura pueden disminuir drásticamente su viabilidad. Prácticamente en todas las regiones del mundo han sido aislados hongos entomopatógenos, buscando aprovechar las ventajas intrínsecas que puedan tener cepas nativas, por su adaptación al ecosistema del cual provienen. Sonora se caracteriza por ser una región de clima desértico, con humedad relativa baja y altas temperaturas, que son justamente factores antagónicos a la viabilidad de las esporas, por lo que en un trabajo previo en el laboratorio, se buscó aislar cepas nativas que pudieran tener un mejor comportamiento que cepas provenientes de otras regiones.

Dentro de los hongos entomopatógenos, uno de los más importantes es *Paecilomyces fumosoroseus*, utilizado exitosamente como agente de control microbiano contra “mosquita blanca” *Bemisia* spp. (Vidal y Fargues, 1997). Este hongo puede ser cultivado tanto en fermentación sólida (FS), como en fermentación líquida (FL). En FS produce conidios aéreos y en FL produce conidios sumergidos y blastosporas (De la torre y Cárdenas Cota, 1996), en una relación que es función de las características del medio de cultivo. Diversos autores han señalado que las condiciones nutritivas durante la etapa de crecimiento y esporulación del hongo, influyen directamente en la obtención de esporas de calidad, tolerantes a condiciones ambientales adversas como una baja humedad y altas temperaturas, lo que aumenta la eficacia del biocontrol (Jackson, 1997; Taroco *et al.*, 2005).

1.2.- Planteamiento del problema.

En un trabajo previo del grupo de laboratorio se aisló una cepa nativa del género *Paecilomyces*, (P43A), a partir del piojo harinoso de la vid, en la zona agrícola de Pesqueira, contigua a Hermosillo, Sonora. Por su origen, esta cepa probablemente tenga una mayor resistencia a factores medioambientales adversos como baja humedad y altas temperaturas y por ende, mejor capacidad de control de plagas en este sector. Por otro lado se observó que algunos medios de cultivo ocasionaban la formación de estructuras morfológicas diversas del hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, que podrían estar relacionadas con fenotipos virulentos y de resistencia a temperatura (Asaff, comunicación personal).

La temperatura es un factor abiótico, no controlable a nivel de campo, que afecta gravemente la viabilidad de las esporas (propágulos infectivos), cuando se eleva demasiado. Para que el control de plagas con hongos entomopatógenos en la región sea exitoso, se requieren propágulos infectivos resistentes a las condiciones climáticas adversas del sur del Estado de Sonora. Para el efecto, por una parte será importante contar con cepas adaptadas a las condiciones climáticas extremas de la región, y por otra, desarrollar medios de cultivo que permitan obtener esporas de calidad, virulentas y tolerantes a las condiciones ambientales. Con este propósito, en el presente trabajo se desarrolló un estudio comparativo a cerca de la resistencia a la temperatura de propágulos fúngicos del aislado nativo de Sonora (P43A) y de otras dos cepas del mismo género provenientes de diferentes regiones, evaluando además el efecto de tres medios de cultivo sobre la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como la velocidad de germinación y tamaño de los propágulos.

1.3.- Justificación.

Paecilomyces fumosoroseus es un agente de control efectivo de la mosquita blanca *Bemisia spp.*, considerada en México como una de las principales plagas de cultivos

agrícolas (Vidal y Fargues, 1997); además, podría ser utilizado para el control de otros insectos chupadores como el piojo harinoso de la vid, *Planococcus ficus*, constituido en una seria amenaza para la viticultura regional.

Los hongos entomopatógenos requieren una serie de condiciones ambientales para el desarrollo del proceso infectivo. Dada las condiciones extremas de la región, es importante contar con una cepa y medio de cultivo adecuados para la producción de propágulos virulentos y resistentes a las temperatura.

1.4.- Objetivos.

1.4.1.- Objetivo general.

Evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como velocidad de germinación y tamaño de los propágulos infectivos sumergidos de tres cepas del género *Paecilomyces*, para la selección de la cepa y el medio de cultivo más adecuados para su producción y uso en la región sur del Estado de Sonora.

1.4.2.- Objetivos específicos.

- Propagar las cepas en cajas Petri y tubos inclinados en medio SDA para la obtención de inóculos.
- Producir propágulos sumergidos en fermentación líquida de tres cepas del género *Paecilomyces*, en tres medios de cultivo, para la evaluación del efecto del medio de cultivo sobre la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como velocidad de germinación y tamaño de los propágulos.

- Establecer las curvas de sobrevivencia de los propágulos producidos, mediante la aplicación de choques térmicos para la selección de la cepa y medio de cultivos más adecuados.
- Evaluar la velocidad de germinación de los propágulos producidos, mediante el seguimiento de la formación del tubo germinal a diferentes tiempos durante su cultivo en un medio rico.
- Evaluar la morfología de los propágulos producidos por observación directa en microscopio, buscando su correlación con fenotipos virulentos.

1.5.- Hipótesis.

El medio de cultivo afecta la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como velocidad de germinación y tamaño, de los propágulos infectivos de tres cepas del género *Paecilomyces* producidos en fermentación líquida.

II MARCO TEÓRICO

2.1.- Control de plagas.

A finales del siglo XIX, ante las dificultades encontradas para controlar las múltiples formas en que los insectos plaga atacaban y asediaban los cultivos agrícolas, se empezó a recurrir a los medios químicos para su control. Desde el punto de vista de prevención y control, el empleo de plaguicidas permitió eliminar de forma relativamente rápida y efectiva a los insectos plaga, encontrados en los cultivos. Sin embargo, esta efectividad está unida a una serie de efectos desfavorables como son: las afectaciones sobre la fauna benéfica, la contaminación ambiental y el desarrollo acelerado de resistencia de los insectos a los plaguicidas (Zavaleta-Mejía, 1999).

Para reducir el uso de los plaguicidas de síntesis química se vienen introduciendo medios de control alternativos dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP); a fin de forjar una agricultura ambientalmente segura, socialmente justa y económicamente viable. Uno de estos medios es el control biológico, que es la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su cantidad. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos (entomopatógenos), entre los que se incluyen diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nemátodos y virus. Estos microorganismos son selectivos, afectando sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores. (Sterk y Mertens, 1998; Asaff *et al.*, 2002; Alatorre, 2001).

Los microorganismos entomopatógenos, como componentes naturales de un ecosistema constituyen un grupo importante de elementos biológicos de uso

fitosanitario, debido a su diversidad y la posibilidad de crear epizootias, que en ocasiones logran mantener las plagas y enfermedades por debajo del umbral de daño, sin necesidad de nuevas aplicaciones. Algunos de estos productos han sido utilizados durante muchos años sin ningún efecto dañino aparente sobre la salud humana o el ambiente (Jaronski y Goettel, 1997).

2.2.- Hongos entomopatógenos.

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedad en insectos, fueron los hongos por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos. Algunos hongos entomopatógenos; sin embargo, no producen crecimiento superficial o producen muy poco. La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas en particular, alta humedad y temperatura adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos constituyen una alternativa potencial para el control biológico de insectos plagas en la agricultura (Zambrano *et al.*, 2003). Actúan como insecticidas de contacto y son los únicos agentes capaces de atacar a insectos chupadores.

Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre las más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón *et al.*, 2001).

2.2.1.- Mecanismo patogénico.

El inóculo o unidad infectiva de los hongos entomopatógenos está constituido por las estructuras de reproducción sexual y asexual; es decir, sus esporas que son usualmente conidios (Monzón *et al.*, 2001).

Para iniciar este proceso infectivo es necesario que la espora esté adherida a la cutícula del insecto y que haya disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno. Esto permite que la espora incremente su volumen e inicie la germinación (Hajek y St. Leger, 1994). En esta etapa, la disponibilidad de agua en el ambiente juega un papel importante para que la espora no pierda su viabilidad, pues en condiciones de baja humedad y temperatura elevada, su potencial se ve limitado (Hallsworth y Magan, 1994). Aunque en menor grado, las condiciones de luz, disponibilidad de nutrientes o sustancias inhibitoras presentes en la cutícula de los insectos o de las plantas hospederas son factores que afectan la germinación (Tanada y Kaya, 1993). Luego de adherida la espora a la cutícula del insecto, e iniciada la germinación, se inicia el desarrollo de un tubo germinal y un apresorio con el que el hongo se fija en la cutícula e inicia la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el proceso mecánico (Monzón *et al.*, 2001). La eficiencia de la penetración y posterior infección no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto. Durante este proceso los hongos excretan toxinas que muchas veces son la causa de la muerte

directa del insecto. Por ejemplo, se ha encontrado que las dextruxinas, producidas por *Metarhizium anisopliae* son sustancias altamente tóxicas para insectos, ácaros y nemátodos. (Monzón *et al.*, 2001).

Ya que ha colonizado completamente al insecto, el hongo puede continuar su crecimiento en el exterior; y si las condiciones ambientales son adecuadas produce conidios aéreos, los cuales se diseminan y pueden iniciar nuevamente el proceso de infección (Eyal *et al.*, 1994).

2.2.2.- Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos.

La clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973), separa los hongos en dos divisiones: Myxomycota por formar plasmodios y Eumycota por no formarlos y ser frecuentemente de crecimiento miceliar. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los órdenes de insectos; la mayoría comúnmente son Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Tanada y Kaya, 1993; Ferron *et al.*, 1975). En algunos órdenes de insectos los estados inmaduros (ninfas o larvas) son más susceptibles al ataque que los maduros o estado adulto. Los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados por los hongos (Tanada y Kaya, 1993).

La selectividad del hospedero varía considerablemente, algunos hongos infectan un amplio rango de hospederos y otros están restringidos a unos pocos o a una sola especie de insectos. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* infectan cerca de 100 especies diferentes de insectos en varios ordenes (Fargues, 1976; Ferron *et al.*,

1972). *Paecilomyces fumosoroseus* es un patógeno de amplio rango de hospederos y distribución geográfica y ha sido aislado del suelo y de insectos de diversas familias de los Ordenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera, Thysanoptera, Hemiptera y Homoptera. Ha sido reportado atacando a más de 30 especies de insectos y es utilizado específicamente para el control de *Carposina sasakii* (Matsumura), *Leptinotarsa decemlineata* (Say.), *Lymantria dispar* (L.), *Galleria mellonella* (L.), *Bemisia tabaci* (Genn.) y *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Mietkiewski *et al.*, 1998; Hoddle, 1999).

2.3.- Características del género *Paecilomyces*.

La clasificación taxonómica de estos hongos es la siguiente:

División: Deuteromycetes

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliacea

Género: *Paecilomyces*

Otros géneros de la familia Moniliacea son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Otras especies del género *Paecilomyces* son *p. farinosus* y *p. lilacinus* (Ulloa y Herrera, 1994).

El género *Paecilomyces* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio (Figura 1A). Los conidióforos llevan cadenas de conidios; éstos son hialinos, unicelulares y de forma ovoide (Figura 1 B) (Bustillo, 2001).

En nuestro medio se registran como mínimo cinco especies de *Paecilomyces* infectando ocho insectos diferentes. Las infecciones causadas por *P. fumosoroseus* se reconocen por el color rosado pálido mientras que en *P. lilacinus* son de color violeta claro. La especie más importante del género es *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Bustillo, 2001).

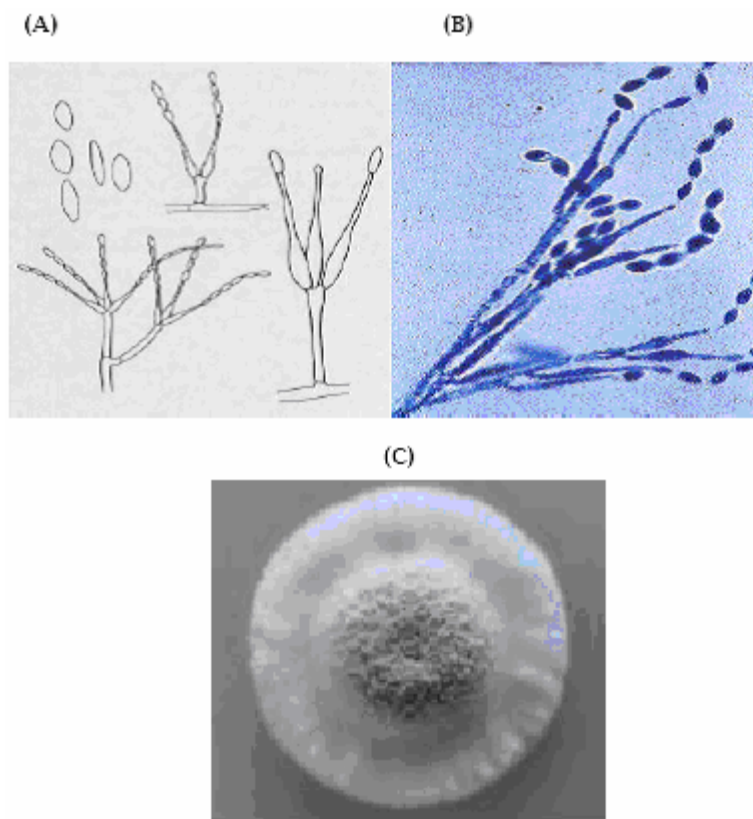


Figura 1. Características microscópicas y macroscópicas de *Paecilomyces* spp. A) Esquema de conidióforos y conidios de *Paecilomyces* spp., tomado de Malloch (1997) B) Microfotografía de conidióforos y conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* tomada de Herrera (2001) C) Morfología de las colonias de *Paecilomyces fumosoroseus*.

Paecilomyces fumosoroseus produce una rápida infección y muerte de todos los estadios de la mosquita blanca *Bemisia* spp. En condiciones óptimas, las hifas están presentes en la hemolinfa dentro de las 24 h siguientes a la inoculación y la muerte

ocurre entre 24 y 48 h, las hifas emergen y la conidiogénesis ocurre sobre la superficie del cadáver en 72 h. Las larvas de mosquita blanca cuando están infectadas se observan ligeramente pigmentadas de amarillo o naranja. Después de la muerte de la larva, el micelio de *P. fumosoroseus* la cubre rápidamente, extendiéndose algunos milímetros alrededor de aquélla (Wraight *et al.*, 1998).

2.3.1.- Características de los propágulos de *P. fumosoroseus*.

Existen tres tipos de propágulos de *Paecilomyces* que se estudian para ser utilizados en la formulación de un producto insecticida, estos son: los conidios aéreos obtenidos por cultivo sólido (Alves y Pereira, 1989), las blastosporas o cuerpos hifales (Jackson *et al.*, 1996) y los conidios obtenidos de cultivos sumergidos (Thomas *et al.*, 1987).

2.3.1.1.- Micelio.

Paecilomyces crece en forma radial en medio sólido como Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y tiene velocidades óptimas de crecimiento menores a 5.2 mm/día a temperaturas entre 20 y 30 °C. Las temperaturas entre 30 y 40 °C disminuyen el crecimiento ó lo impiden por completo en comparación a temperaturas de 8 y 11°C en las que se tienen velocidades de crecimiento bajas pero no impiden el desarrollo del hongo. (Vidal, 1997).

En cultivo sumergido se obtiene micelio en forma dispersa o de agregados y representa entre el 80 al 95% de la biomasa (Eyal *et al.*, 1994).

2.3.1.2.- Conidios aéreos.

La técnica más común utilizada para la producción de conidios es el cultivo en superficie o el cultivo en dos etapas, en el que el hongo inicialmente crece en condiciones sumergidas y después en el cultivo en superficie, en medio semisólido, se presenta la esporulación. Estos métodos producen conidios con alta virulencia y resistencia a condiciones ambientales (Thomas *et al.*, 1987). Las desventajas de estos métodos son: las técnicas laboriosas (Jackson, 1999) y el tiempo necesario para la esporulación, además de los altos costos de producción que no siempre hacen factible su comercialización.

Para la producción masiva de conidios aéreos se utiliza arroz, salvado de trigo o cebada como sustrato, las cuales se mantienen en cubetas, botellas o bolsas de plástico que permitan la esterilización (Roberts, 1989). El proceso consiste en la preparación de unidades de cultivo, esterilización, inoculación, maduración o cosecha, formulación y almacenamiento.

2.3.1.3.- Conidios sumergidos.

Se ha propuesto como una alternativa para la producción a gran escala la fermentación en cultivo líquido porque las condiciones pueden ser controladas y así inducir e incrementar la esporulación (Humphreys *et al.*, 1989). Las especies *Paecilomyces* producen tanto conidios como blastosporas.

En el estudio realizado por De la Torre y Cárdenas-Cota (1996) se encontró que la relación carbono-nitrógeno (C:N) tiene efectos sobre el rendimiento, relación y tipo de propágulos sumergidos. Los autores también reportaron la producción de conidios directamente de blastosporas, a través de un microciclo de conidiación.

2.3.1.4.- Blastosporas.

Las blastosporas o cuerpos hifales tienen una vida corta y no sobreviven bajo condiciones ambientales adversas tanto como los conidios. (Thomas, 1987). Las blastosporas de *P. fumosoroseus* son más infectivas que los conidios aéreos. En los estudios realizados por Fargués *et al.* (1994), la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* expuestas a blastosporas fue de 61% y la de las expuestas a conidios aéreos fue de 29%. Se tiene la hipótesis de que la alta virulencia de estos propágulos se debe a su rápida germinación, lo cual aumenta la capacidad de las esporas para infectar a la mosquita blanca y a otras plagas susceptibles (Jackson, 1997). Sin embargo, la desventaja de estas esporas es que son muy susceptibles a las técnicas de secado y mueren rápidamente en almacenamiento a temperatura ambiente. En 1999, Jackson patentó un método para producir blastosporas de *P. fumosoroseus* tolerantes a la desecación enriqueciendo el medio de cultivo con aminoácidos y vitaminas.

2.4.- Medios de cultivo y producción masiva.

Jackson (1997) menciona que las condiciones nutritivas durante la etapa de crecimiento y la esporulación del hongo influyen directamente en la obtención de esporas de calidad, tolerantes a la desecación y estables luego de la aplicación, lo que aumenta la eficacia del biocontrol. Así mismo, la presencia de aleloquímicos en el medio nutritivo, como por ejemplo cutícula de insecto o de hojas de plantas puede significar en una mayor supervivencia del hongo (Vega *et al.*, 1997).

El hongo ha sido reproducido en laboratorio usando diversos medios convencionales y alternativos. Figueroa *et al.* (2000) evaluaron cepas de *P. fumosoroseus*, las cuales se desarrollaron bien sobre Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) enriquecido con extracto de trigo, mientras que Borges *et al.* (1997) mencionan la utilización de mosto de destilería para la producción del hongo, con buenos resultados. De la Torre y Cárdenas Cota (1996) observaron estimulación de la esporulación de *P. fumosoroseus* cuando se usó SDA, enriquecido con levadura y extracto de malta.

La fermentación líquida representa otra alternativa para producción a gran escala (Humphreys *et al.*, 1989). Varios experimentos han mostrado que el extracto de levadura incrementa el crecimiento y la esporulación y es por lo tanto común su uso para la producción masiva.

III MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el periodo Marzo-Junio de 2006, en el laboratorio de Ingeniería celular y bioprocesos de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), localizado en el Km 6 de la carretera a La Victoria en la ciudad de Hermosillo, Sonora.

3.1.- Cepas utilizadas.

- ❖ P43A.- *Paecilomyces* spp., nativa del Estado de Sonora, aislada del piojo harinoso de la vid.

- ❖ PAE.- *Paecilomyces fumosoroseus*, proporcionada por Agrobionsa, S.A. de C.V.

- ❖ Pfrd.- *Paecilomyces fumosoroseus* obtenida de la colección del Centro Nacional de Referencia y Control Biológico DGSV-SAGARPA.

3.2.- Conservación de las cepas.

Los conidios de *Paecilomyces* para las cepas P43A, PAE y Pfrd fueron obtenidos en matraces erlenmeyer de 250 mL, con 15 mL de Agar Dextrosa Sabourad (SDA) y en cajas petri con 10 mL de SDA. Ambos sistemas fueron incubados durante 14 días a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta conidiación, con ciclos naturales de luz oscuridad y se guardaron en refrigeración a una temperatura de 4°C .

3.3.- Crecimiento radial.

Se prepararon cajas petri con 20 mL de Agar Dextrosa Sabourad (SDA), las cuales se sembraron por picadura en el centro con conidios de cada una de las cepas estudiadas (P43A, PAE y Pfrd) y se incubaron a temperaturas de 25, 30 y 35°C. Las pruebas fueron realizadas por triplicado para cada una de las cepas y temperaturas ensayadas. Las cajas fueron incubadas durante 67 h., trascurrido este tiempo se midió el diámetro de la colonia y se continuó con las mediciones cada 24 h, hasta que la colonia abarcó casi totalmente la superficie del agar.

3.4.- Obtención de propágulos en cultivo sumergido.

3.4.1.- Obtención del inóculo.

El inóculo se obtuvo a partir de conidios aéreos de las cepas: P43A, PAE y Pfrd. Los conidios aéreos se diluyeron en Tween 80 al 0.1% y se ajustó su concentración a 5.5×10^7 esporas/mL.

3.4.2.- Formulación de los medios utilizados.

La composición de los medios utilizados para la producción de propágulos infectivos en fermentación líquida para cada una de las tres cepas utilizadas se detalla en la Tabla 1. Los medios M1, M5 y M8 corresponden a los descritos por Asaff (2006) y el medio Jackson al descrito por el mismo autor (Jackson 1999). Estos medios fueron seleccionados debido a las diferencias morfológicas observadas de los propágulos producidos en ellos (Asaff, comunicación personal) y que pudieran ser asociadas a fenotipos virulentos por el tamaño y color. Además por antecedentes de la literatura se esperarían también diferencias en cuanto a su resistencia a la temperatura y velocidad de germinación.

Tabla 1.- Formulación de los medios de cultivo a utilizar.

Componentes	Unidad	M1	M5	M8	M. Jackson
Glucosa	g/L	50	50	50	50
Ext. de levadura	g/L	5			2.16
Glutamato	g/L		2.50		
Casaminoacidos	g/L				8.25
NH ₄ NO ₃	g/L	0.70		1.17	
KH ₂ PO ₄	g/L	0.39	0.13	0.39	2
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	g/L	1.42		1.42	
MgSO ₄ 7H ₂ O	g/L	0.60	0.15	0.60	0.33
Na ₂ SO ₄	g/L		2.40		
CaCl ₂ 2 H ₂ O	g/L		0.40		0.53
KCl	g/L	1	0.50	1	
FeCl ₃ 6H ₂ O	mg/L			0.10	
MnSO ₄ H ₂ O	mg/L			2.00	0.0156
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	mg/L			10	
CoCl ₂ 6H ₂ O	mg/L				0.04
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	mg/L			2	
ZnSO ₄ 7H ₂ O	mg/L		15.50	20	0.01
CuSO ₄ 5H ₂ O	mg/L			3	
FeSO ₄ 7H ₂ O	mg/L		5	20	0.05
Na ₂ EDTA	mg/L			60	
pH		5.60	5.60	5.60	5.60

3.4.3.- Obtención de propágulos.

Se obtuvieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL del medio. Cada matraz fue inoculado con 1 mL del inóculo para alcanzar una concentración final de 5.5×10^5 esporas. Los matraces se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con una agitación de 180 rpm. Los tiempos de incubación fueron cuatro días para el medio Jackson, seis días para el medio 5 y ocho días para el medio 8. Este procedimiento se siguió por triplicado para las tres cepas en los tres medios de cultivo estudiados.

3.4.4.- Cosecha de propágulos.

Después del tiempo de incubación asignado para la producción de propágulos en cada uno de los medios y con las tres cepas utilizadas, se obtuvo una suspensión formada por propágulos infectivos y micelio. Para separar los propágulos infectivos del micelio se tomaron 50 mL de la suspensión en una probeta estéril y se filtraron con gasa estéril dos veces. La suspensión de propágulos infectivos libre de micelio sirvió para dar inicio a los ensayos de resistencia a la temperatura a partir de alícuotas de 2 mL colocadas en tubos de ensayo estériles de 15 mL. Este mismo procedimiento se realizó por triplicado con las 3 cepas y en los tres medios.

3.4.5.- Tratamiento térmico.

Las alícuotas de 2 mL, colocadas en tubos de ensayo estériles de 15 mL, conteniendo la suspensión de propágulos infectivos se sometieron a estrés térmico durante 30 minutos a diferentes temperaturas (33, 36, 39, 42, 45 y 48°C .). Este mismo procedimiento se realizó por triplicado con los propágulos de las 3 cepas obtenidos en los tres medios. Para evaluar y cuantificar el efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de los propágulos luego del tratamiento térmico, se traspasó 1 mL de la alícuota tratada a 50 mL de un medio rico en nutrientes (medio 1) contenidos en matraces erlenmeyer de 250 mL. En este medio se incubaron a $27 \pm$

2°C y 180 rpm a fin de observar su germinación. La cuenta final de propágulos en este medio fue aproximadamente de $2 \text{ a } 10 \times 10^5$ propágulos/mL, lo cual permitió su cuenta directa sin recurrir a diluciones

Para determinar el inicio de la germinación de los propágulos tratados, se observó la emergencia del tubo germinal en intervalos de una hora a partir del traspaso al medio de germinación (medio 1). Una vez iniciada la germinación, se inició el conteo de esporas germinadas y no germinadas cada 2 h hasta llegar a un 100% de germinación en el control (30°C).

3.4.6.- Recuento de esporas y propágulos infectivos sumergidos.

El conteo se realizó con un hemocitómetro de Neubauer bajo microscopio con una ampliación de 400 ×.

3.4.7.- Tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

La velocidad de crecimiento radial fue estimada mediante regresión lineal de los datos experimentales, mientras que la temperatura letal media, LT_{50} , mediante una regresión Probit. Para la diferencia de medias se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa NCSS 2000.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Evaluación del rango de la temperatura óptima de crecimiento de las cepas utilizadas.

La evaluación del rango de la temperatura óptima de crecimiento para las cepas del género *Paecilomyces* P43A, PAE y Pfrd se realizó con el propósito de establecer las temperaturas de mínimas de tratamiento que pudieran ocasionar un estrés térmico sobre los propágulos infectivos obtenidos y caracterizar cinéticamente cada una de las cepas a través de su velocidad crecimiento radial. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.- Velocidad de crecimiento radial de tres cepas del género *Paecilomyces* cultivadas a diferentes temperaturas [$\mu\text{m}/\text{h}$]

CEPA	25°C	30°C	35°C
P43A	67.7(\pm 2.14) ^a	74.6(\pm 2.14) ^{ab}	nc
PAE	83.2(\pm 2.14) ^b	81.7(\pm 2.14) ^b	nc
Pfrd	81.5(\pm 2.14) ^b	78.6(\pm 2.14) ^b	nc

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa, según la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). nc = no se observó crecimiento.

Según el análisis estadístico de los datos no existió un cambio significativo en las velocidades de crecimiento radial por un aumento de la temperatura de 25 a 30°C en

ninguna de las tres cepas. De la misma forma se puede ver que no hubo diferencia entre las velocidades de crecimiento radial de las cepas PAE y Pfrd a 25 o 30°C; sin embargo, la velocidad de crecimiento radial de la cepa P43A a 25°C fue menor a la de las otras dos cepas cultivadas a la misma temperatura (Tabla 2).

Se determinó que para las cepas PAE y Pfrd el rango óptimo de temperatura va de 25 a 30°C, al no existir diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento radial a tales temperaturas. A 35°C no se observó crecimiento, indicando la sensibilidad de las tres cepas a esta temperatura. Para la cepa P43A se estima que el rango de temperatura para su crecimiento óptimo podría estar entre los 28 y 32°C, pues a 25°C su velocidad de crecimiento (67.7 $\mu\text{m/h}$) es menor a cualquiera de las otras dos cepas, mejorando a los 30°C (74.6 $\mu\text{m/h}$); temperatura a la cual es estadísticamente similar a las de las otras dos cepas. Para determinar la temperatura óptima de crecimiento para la cepa P43A es necesario realizar este experimento con una ΔT menor a 5°C (Tabla 2).

Un análisis comparativo de las velocidades de crecimiento radial de las cepas estudiadas con las de otros hongos entomopatógenos como *Beauveria brongniartii*, indica que ambos géneros tienen velocidades de crecimiento radial similares. Se reporta que en el caso de *Beauveria brongniartii* su velocidad de crecimiento radial oscila entre 70.41 y 76.25 $\mu\text{m/h}$ a una temperatura óptima de crecimiento de 22°C (Vargas M.; 2003). Sin embargo otros estudios (Vidal, 1997) revelan que cepas del género *Paecilomyces* tienen velocidades óptimas de crecimiento radial menores o iguales a 216.55 $\mu\text{m/h}$, a temperaturas entre 20 y 30°C. Estos resultados difieren considerablemente de los obtenidos en el presente trabajo., probablemente por el tipo de medios de cultivo utilizados.

4.2.- Efecto del medio de cultivo sobre la resistencia a la temperatura de propágulos de las cepas del género *Paecilomyces*.

El efecto de tres medios de cultivo (medio Jackson, medio 5 y medio 8) sobre la resistencia a la temperatura de los propágulos producidos en ellos, de tres cepas del género *Paecilomyces* (P43A, PAE y Pfrd) se puede ver en la Figura 2.

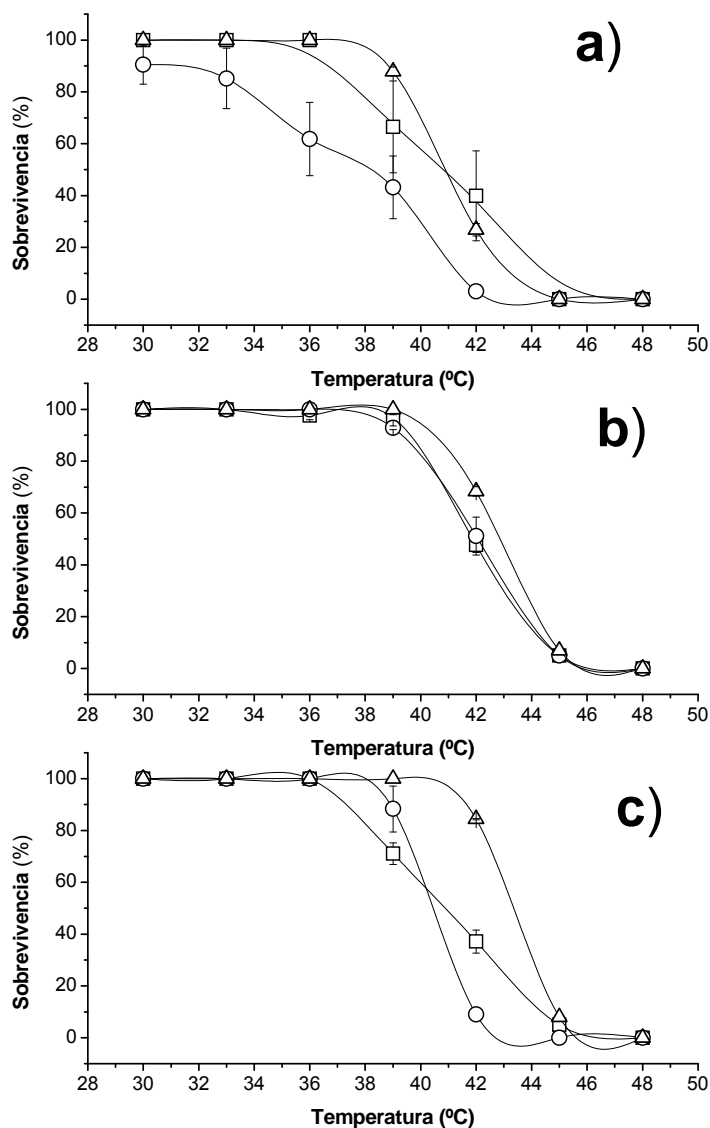


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia (% de germinación) a la temperatura de los propágulos infecciosos fúngicos del género *Paecilomyces*, obtenidos en tres medios de cultivo a) Medio Jackson, b) Medio 5, c) Medio 8. □ cepa P43A; ○ cepa PAE; △ cepa Pfrd.

Se observó que los propágulos de la cepa PAE producidos en el medio Jackson son menos resistentes a la temperatura que los propágulos que produjeron las otras dos cepas en éste mismo medio (Fig.2a). Por ejemplo a una temperatura de 36°C se ve una disminución del 40% en la sobrevivencia de los propágulos de la cepa PAE, mientras que en las otras dos cepas se mantiene una sobrevivencia del 100% a esa misma temperatura.

Por otro lado se observa que los propágulos de las tres cepas (P43A, PAE, Pfrd) producidos en el medio 5, son más resistentes a la temperatura que los producidos en el medio Jackson; por ejemplo la sobrevivencia de propágulos de las tres cepas a 39°C en el medio 5 fue mayor al 90% mientras que en el medio Jackson bajó considerablemente entre un 20 a 60% (Fig. 2b).

De la misma forma se puede apreciar que la sobrevivencia de los propágulos producidos en el medio 8 fue similar a la de los propágulos producidos en el medio 5, con la diferencia que a 39°C la sobrevivencia de los propágulos de las cepas P43A y PAE, disminuyeron en un 10 y 30% respectivamente (Fig. 2c).

Los resultados obtenidos muestran que en general los propágulos producidos en el medio Jackson son menos resistentes a la temperatura que los propágulos producidos en los otros dos medios, mientras que los propágulos producidos en el medio 5 y el medio 8 tienen un comportamiento similar.

Para realizar un análisis estadístico comparativo de los datos anteriores se hicieron estimaciones de la temperatura letal media (LT_{50}) mediante una Análisis Probit, el cual arrojó los resultados presentados en la Tabla 3. En esta Tabla se observa que no existe diferencia significativa entre los valores de LT_{50} de los propágulos de la cepa P43A producidos en los tres medios de cultivo utilizados (medio Jackson, medio 5 y medios 8). En contraste la LT_{50} de los propágulos de la cepa PAE, muestran diferencias de acuerdo al medio en el fueron producidos. De la misma forma en la

cepa Pfrd la LT_{50} es diferente en cuanto a propágulos producidos en el medio Jackson y los producidos en los otros dos medios.

Tabla 3.- LT_{50} [°C] de los propágulos infectivos fúngicos del género *Paecilomyces*, producidos en cultivo líquido en tres medios diferentes.

Cepa	M. Jackson	Medio 5	Medio 8
P43A	40.53(± 0.23) ^{ab}	41.58(± 0.23) ^{ade}	40.59(± 0.23) ^{abd}
PAE	36.60(± 0.23) ^c	41.70(± 0.23) ^{df}	39.96(± 0.23) ^b
Pfrd	40.80(± 0.23) ^{abd}	42.29(± 0.23) ^{ef}	42.70(± 0.23) ^f

LT_{50} indica la temperatura a la cual se presenta una mortalidad del 50% de la población. Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa, según la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha= 0.05$).

Los valores de LT_{50} estimados muestran que los propágulos de la cepa PAE son menos resistentes a la temperatura, pues presentan valores de LT_{50} menores (36.60-41.70°C) en comparación con los propágulos de las otras dos cepas (P43A y Pfrd), las cuales presentaron características de resistencia similares (Tabla 3).

En cuanto al medio de cultivo se refiere, se determinó que el medio en el que se presenta una menor resistencia a la temperatura de los propágulos producidos, es el medio Jackson; pues sus LT_{50} son las menores (36.60 – 40.80°C) en comparación a las obtenidas en los otros dos medios. Por el contrario los medios 5 y 8 confieren mayor resistencia a los propágulos, en los cuales las LT_{50} oscilaron entre 39.96 y 42.70°C (Tabla 3).

En el presente trabajo se encontró que la LT_{50} para propágulos sumergidos de la cepa Pfrd va de 40.80 (± 0.23) a 42.70 (± 0.23) °C (Tabla 3); sin embargo, Carmona (2002) reportó que la LT_{50} para propágulos morfológicamente similares a los obtenidos en el medio 5 es de 44°C. Esta ligera variación pudo deberse a que los propágulos fueron producidos en diferentes medios y también a que el método de experimentación utilizado no fue el mismo.

Para explicar las modificaciones en las propiedades de resistencia a la temperatura se encontró un estudio con *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* en el cual se reportó que existe una relación estrecha entre el contenido de proteínas del tipo hidrofobinas (FAE) en la pared celular de los propágulos y su termoresistencia, observando que dicho contenido puede ser modificado de acuerdo al medio de cultivo en el cual se producen (Ying, 2004). Probablemente las variaciones de resistencia a la temperatura encontradas se debieron justamente a modificaciones en la composición de pared de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

Además de la resistencia a la temperatura, otras características como la velocidad de germinación de los propágulos, su morfología, su resistencia a la desecación y su resistencia a la luz UV pueden modificarse de acuerdo al medio de cultivo en el cual son producidos.

4.3.- Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad de germinación.

El efecto del medio de cultivo sobre la velocidad de germinación se observa en la Figura 3. La escasa cantidad de datos experimentales impidió establecer las curvas de germinación necesarias para estimar el tiempo de germinación medio (GT_{50}) y el tiempo de germinación noventa (GT_{90}) de los diferentes propágulos de cada una de las cepas. Por esta razón, únicamente se estimó el tiempo de germinación medio (GT_{50}) mediante una regresión lineal.

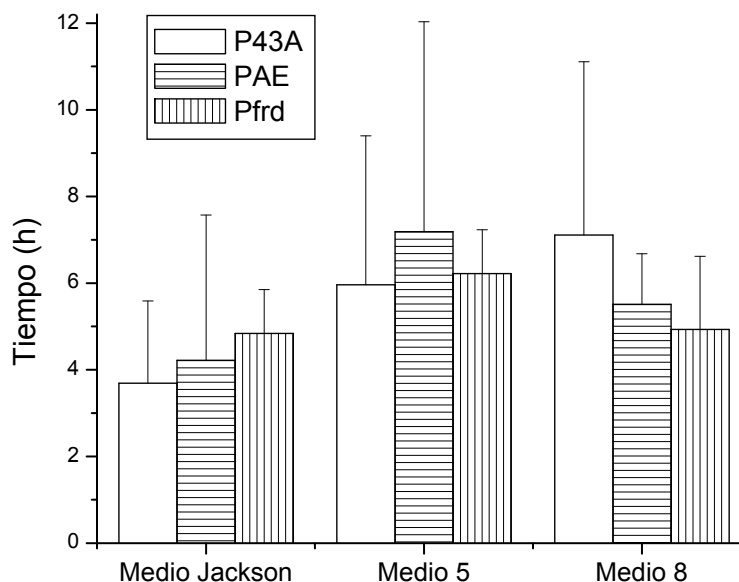


Figura 3. Las barras indican el tiempo necesario para alcanzar el 50% de germinación de propágulos de tres cepas del género *Paecilomyces* producidos en cultivo líquido en tres medios diferentes.

Este primer análisis permite observar que a pesar de la dispersión de datos, los propágulos producidos en el medio Jackson tienen un tiempo de germinación más corto (4 a 5 h) que los propágulos producidos en los otros dos medios (5 a 7 h) (Fig. 3). En un estudio similar con propágulos de la cepa Pfrd (Carmona, 2002) se estableció que el GT_{50} para propágulos producidos en el medio Jackson (blastosporas) es de 6.3 ± 0.2 hrs, mientras que el GT_{50} para propágulos similares a los obtenidos en el medio 5 (conidios sumergidos) es de 14 ± 1.65 h. En el primer caso, dichos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, en el segundo caso difieren considerablemente, fenómeno que puede ser atribuido a diferencias en el medio de producción, así como en los métodos de experimentación.

4.4.- Efecto del medio de cultivo sobre la morfología de los propágulos.

El efecto que presentó el medio de cultivo sobre la morfología de los propágulos se puede ver en las Figuras 4, 5 y 6. Cabe destacar que no se observaron diferencias morfológicas de los propágulos entre cepas.

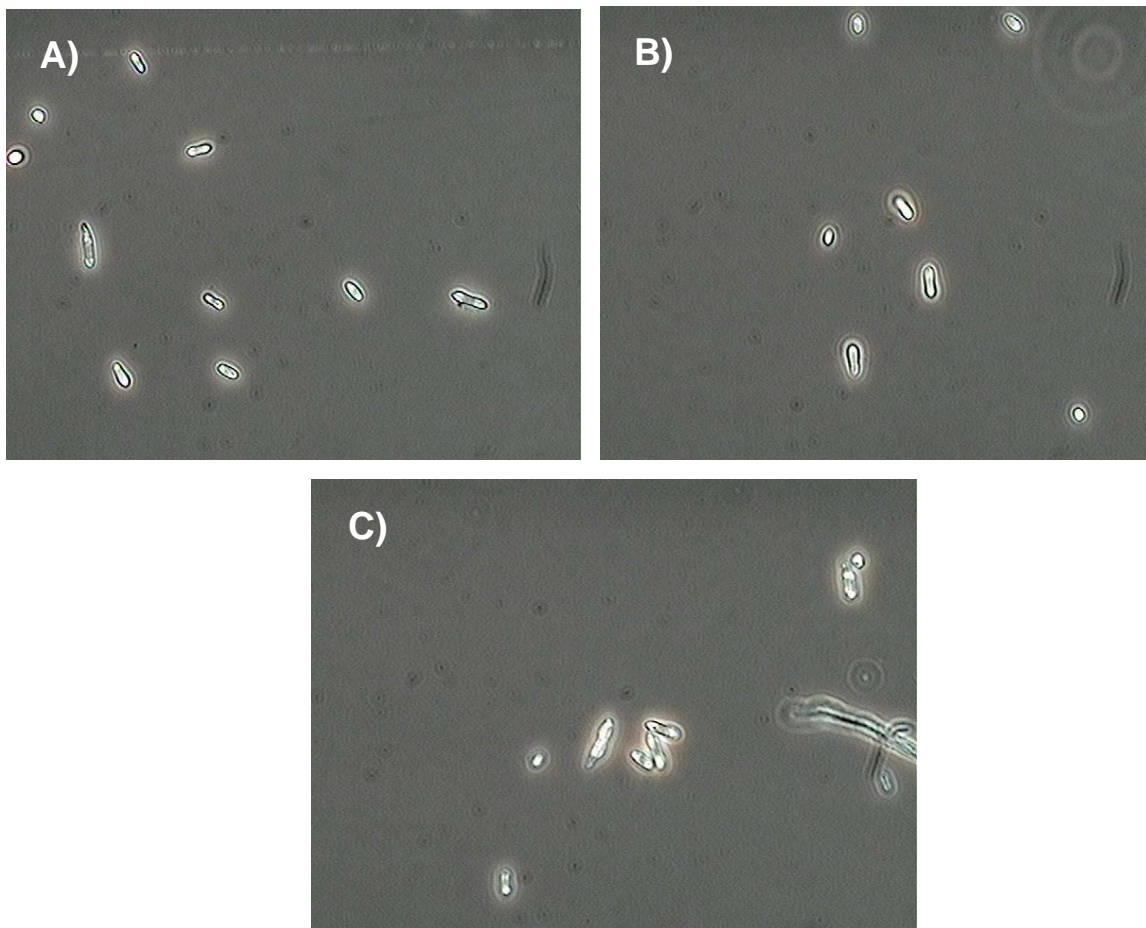


Figura 4. Propágulos producidos en el medio Jackson. A) PAE, B) P43A y C) Pfrd (400 ×).

En el medio Jackson se observó que la mayoría de los propágulos producidos son blastosporas ($\approx 70\%$), identificados por su forma típica (caca-huete), siendo de 3 a 4 veces el largo que el ancho, y por tanto de mayor tamaño que los conidios (Fig. 4).

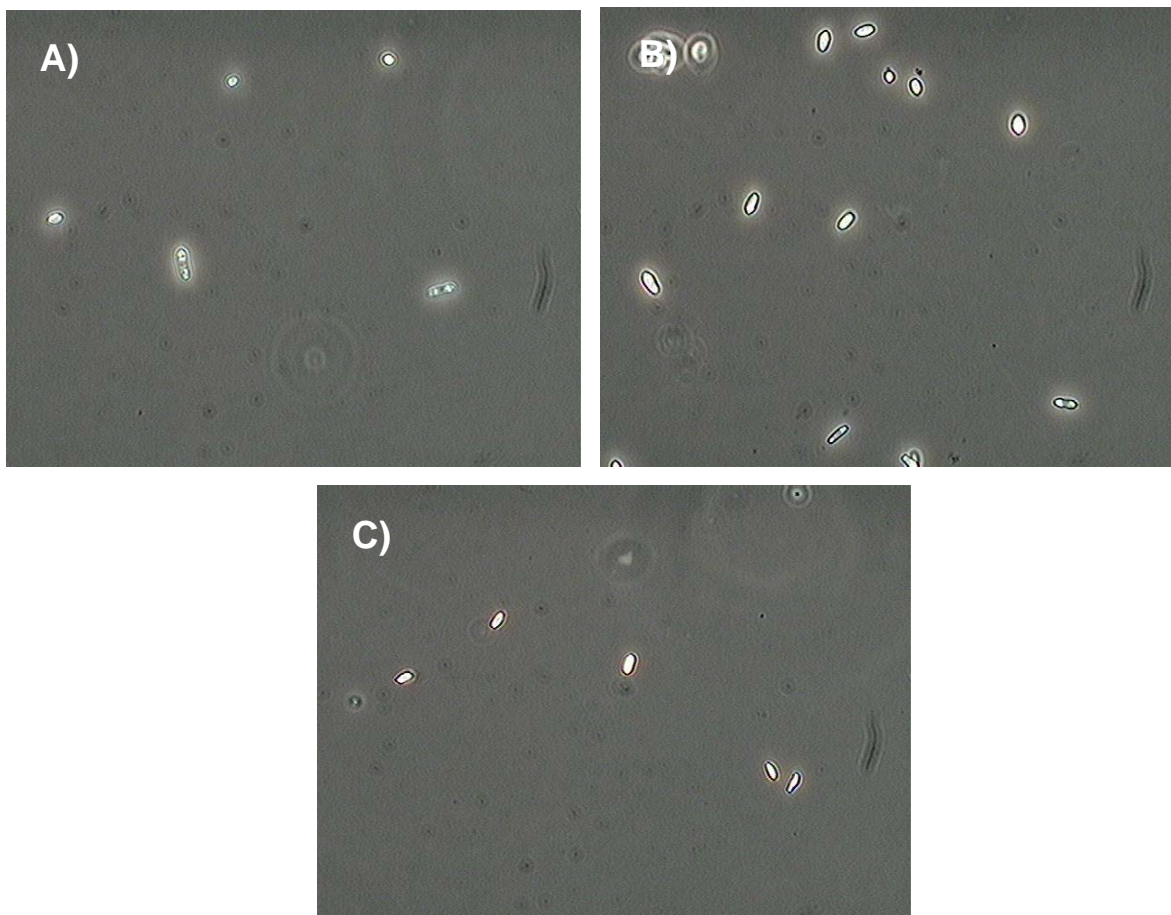


Figura 5. Propágulos producidos en el medio 5. A) PAE, B) P43A y C) Pfrd (400 ×)

En el medio 5, la relación de los propágulos producidos (conidios y blastosporas) es inversa a la relación observada para el medio Jackson. Los conidios producidos en éste medio muestran una forma ovoide definida, con una relación largo ancho más uniforme y lucen más pequeños que los producidos en otros medios.

La producción de propágulos en el medio 8 es, principalmente del tipo conidio ($\approx 90\%$), mostrando una forma ovoide definida, aunque lucen mucho más grandes que los producidos en otros medios (Fig. 6). Este hecho es notable pues probablemente corresponda al de un fenotipo virulento, al existir evidencia sobre la correlación entre el tamaño de la espora y el grado de patogenicidad (Altre *et al.*, 1999). Un punto adicional a resaltar es que en los propágulos producidos en el medio

8 presentaron una coloración similar a la de los conidios aéreos (café-parda), que se sabe presentan una mayor resistencia a la luz UV, probablemente por esta pigmentación. Se ha determinado que la luz UV es altamente nociva para los propágulos infectivos de los hongos (Smits 1996).

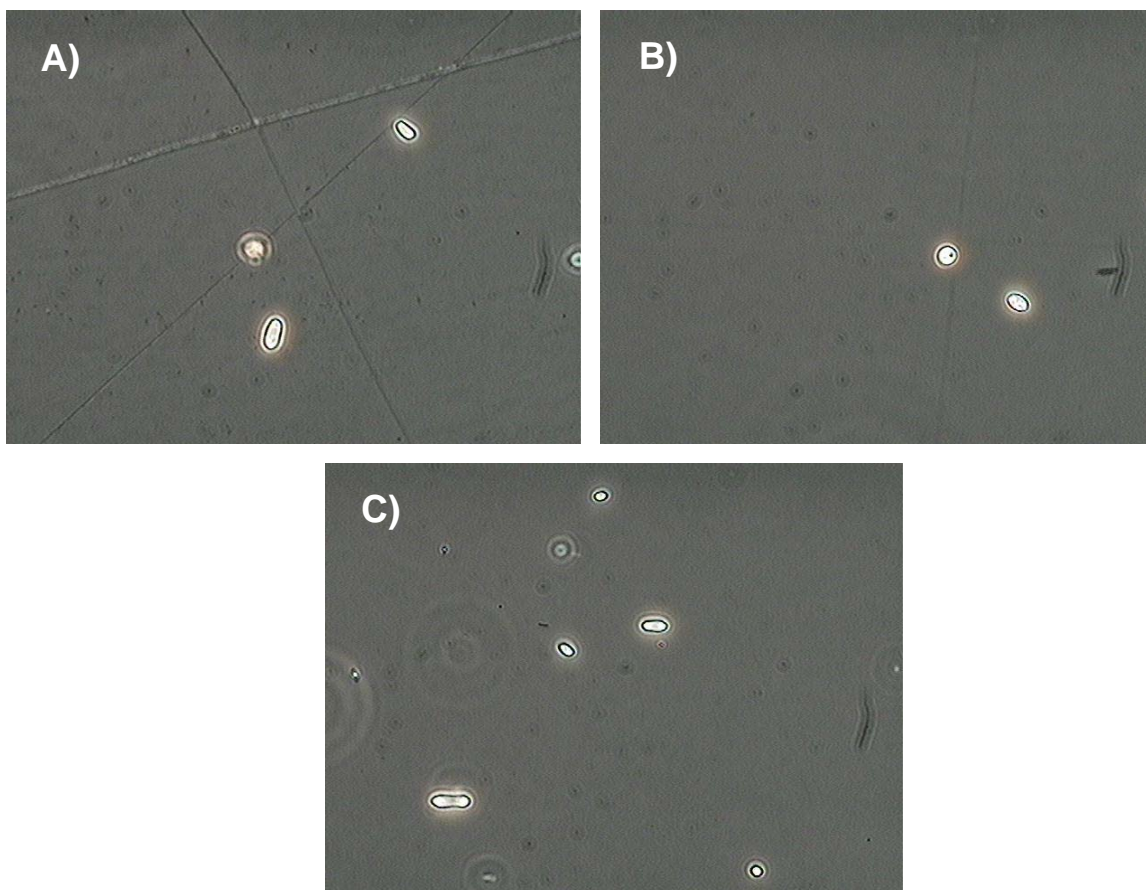


Figura 6. Propágulos producidos en el medio 8. A) PAE, B) P43A y C) Pfrd (400 ×).

Al no contar con una escala de referencia y el software adecuado para el procesamiento de imágenes, no se pudieron establecer los tamaños de los diferentes propágulos observados; sin embargo, las imágenes fueron ampliadas a una misma escala y se midieron directamente nueve propágulos en cada caso. De estas mediciones se estableció que existe evidentemente una diferencia significativa ($p \leq 0.0001$) en el tamaño (largo) de los propágulos. Los más pequeños son los del tipo conidio producidos en el medio 5, los cuales resultaron 42 % más chicos que los

producidos en el medio 8 y 90 % más pequeños que las blastosporas producidas en el medio Jackson.

Además de la afección de todos los factores hasta ahora señalados por el medio de cultivo, es importante considerar que existen otros factores que también pueden ser modificados y que deberían ser tomados en cuenta en estudios posteriores. Por ejemplo, en el presente estudio se observó que las blastosporas, independientemente del medio donde fueran producidas, al iniciar su germinación, forman dos tubos germinales, mientras que en el caso de los otros propágulos únicamente se da la formación de un tubo germinal único, hecho que podría explicar en parte la mayor efectividad de este tipo de propágulos (Fargues *et al.*, 1994). Por otro lado, se conoce que la hidrofobicidad de los propágulos también puede ser afectada por el medio de cultivo en el cual se producen (Jeffs, 1999), lo que es de suma importancia ya que este factor interviene de manera determinante en el fenómeno de adhesión que es donde se origina la patogénesis. Asimismo, la resistencia a la desecación puede ser modificada, tanto por el medio de cultivo (Cliquet, 2005), como por algunos parámetros de operación (pH y temperatura) (Hallsworth, 1996), gracias a la acumulación de polioles (manitol, glicerol, eritritol y tetralosa).

CONCLUSIONES

El medio de cultivo afectó la resistencia a la temperatura y otros factores de virulencia, como la velocidad de germinación, el tamaño y forma de los propágulos infectivos de tres cepas del género *Paecilomyces* producidos en fermentación líquida.

Los propágulos producidos en el medio Jackson son menos resistentes a la temperatura, pues sus valores de LT_{50} son menores a los de los propágulos producidos en los otros dos medios.

La cepa menos resistente a la temperatura es la PAE, pues las LT_{50} de sus diferentes propágulos son más bajas que las de las otras dos cepas. Pfrd y P43A poseen características de resistencia similares.

El medio 5 y el medio 8 confirieron las mejores características de resistencia a la temperatura a los propágulos producidos en ellos. Adicionalmente el medio 8 permitió la producción de propágulos, tipo conidio, más grandes y con pigmentación similar a la de los conidios aéreos lo cual podría favorecer su virulencia y su resistencia a la luz UV.

La velocidad de germinación de los propágulos de cada una de las cepas producidos en los tres medios no presentó diferencias significativas, aunque se apreció una ligera superioridad de los propágulos producidos en el medio Jackson.

RECOMENDACIONES

Se recomienda repetir el experimento para estimar de mejor manera el GT_{50} y GT_{90} de los propágulos infectivos fúngicos de cepas del género *Paecilomyces* (P43A, PAE y Pfrd) producidos en tres medios de cultivo diferentes (medio Jackson, medio 5 y medio 8).

Por las condiciones ambientales de la región (Sur de Sonora) y para la complementación de este trabajo sería importante que se realice un estudio sobre la resistencia a la desecación de los propágulos infectivos fúngicos de cepas del género *Paecilomyces* (P43A, PAE y Pfrd) producidos en tres medios de cultivo diferentes (medio Jackson, medio 5 y medio 8).

Por otro lado, otro estudio que complementaria en gran medida los datos presentados en el presente trabajo; es el grado de patogenicidad (virulencia) que presenten los propágulos infectivos fúngicos de las cepas del género *Paecilomyces* P43A, PAE y Pfrd producidos en tres medios de cultivo diferentes (medio Jackson, medio 5 y medio 8).

También es importante estudiar la productividad de los tres medios de cultivo (medio Jackson, medio 5 y medio 8) para las cepas del género *Paecilomyces* P43A, PAE y Pfrd.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, G. 1973. Introduction and keys to higher taxa. En: "The Fungi: An Advanced Treatise". Ainsworth, G.; Sparrow, F. and Sussman, A. Academic Press. New York. (IVA) pp. 1-7.
- Alatorre, R. Hongos entomopatógenos. 2001. En: Memorias XII Curso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guzmán, M. C y Barajas, G. Chihuahua, México. Agosto de 9-10. pp. 169-179.
- Altre, J. A.; Vandenberg, J. D.; Cantone, F. A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**. 73 (3) pp. 332-338.
- Asaff T. A. 2006. Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana UAM-I. México, D. F.
- Asaff T. A.; Reyes, V. T.; López V. E.; De la Torre, M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. **Avance y Perspectiva**. (21) pp. 291-195.
- Borges, M.; García, C.; Fonseca, R.; Leyva, M. 1997. Aprovechamiento del mosto de destilería para la producción de biopreparados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson and *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. **Revista de Protección Vegetal**. (12) pp. 33-37.

- Bustillo, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá, Colombia. pp. 30-53.
- Carmona, B. A. 2002. Resistencia a la temperatura de los propágulos de *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de Químico Bacteriólogo. Instituto Politecnico Nacional. Mexico, D. F.
- Cliquet, S.; Jackson, M. A. 2005. Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastosporas of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 32 (5) pp. 204-210.
- De la Torre, M.; Cardenas-Cota, H. M. 1996. Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. **Entomophaga**, (41) pp. 443-453.
- Eyal, J.; Walter, J. S.; Lance, O.; Landa, Z. 1994. Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. **United States Patent**. pp.1-24.
- Fargues, J. 1976. Spécificité des champignons entomopathogènes imparfaits (Hyphomycètes) pour les larves de coleopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae). **Entomophaga**. (21) pp. 313-323.
- Fargues, J.; Maniania, N. K. ; Delmas, J. C. 1994. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosoroseus* durings in vitro development to *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Invertebrate Pathology**. (64) pp. 173-178.
- Ferron, P.; Hurpin, B.; Robert, P. 1972. Sur la spécificité de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Entomophaga**. (17) pp. 165- 178.

- Ferron, P.; Robert, P.; Deotte, A. 1975. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. (25) pp. 335-356.
- Figueroa, L. M; Valera, A.; Corredor, D. 2000. Evaluation of isolates of the fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with relation to their physiology and effectiveness in the control of *Frankliniella occidentalis*. Program and abstracts XXXIII Meeting. University of Guanajuato, México. Agosto 13-18. pp. 40.
- Hajek, A. E.; St. Leger, F.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**. (39) pp. 293-322.
- Hallsworth, J. E.; Magan, N. 1994. Effect of carbohydrate type and concentration on polyols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. **Microbiology-SGM**. (140) pp. 2705-2713.
- Herrera, J. 2001. División of Science. Truman State University. Kirksville.
<http://www2.truman.edu/~jherrera/Anamorphic_fungi/genera.html>
- Hoddle, M. S. 1999. The Biology and Management of Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) on Greenhouse Grown Ornamentals.
<<http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>>
- Humphreys, A. M.; Matewale, P.; Cunliffe, B.; Trincy, A. P.; Gillespie, A. T. 1989. Effect of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycology Research**. 3(2) pp. 257-264.
- Jackson, M. A.; McGuire, M. R.; Lacey, L. A.; Wraight, S. P. 1996. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycology Research**. (100) pp. 270-279.

- Jackson, M. A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 19 (3) pp.180-187.
- Jackson, M. A. 1999. Method for Producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. **United States Patent**. pp. 1-13.
- Jaronski, S. T.; Goettel, M. S. 1997. Development of *Beauveria bassiana* for Control of Grasshoppers and Locusts. En: Memoirs of the Entomological Society of Canada. pp. 225-237.
- Jeffs, L. B.; Xavier, I. J.; Matai, R. E.; Khachatourians, G. G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for enthomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Verticillium*. **Canadian Journal of Microbiology**. 45 (11) pp. 936-948.
- Lacey, L. A.; Kirk, A. A.; Millar, L.; Mercadier, G.; Vidal, C. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. **Biocontrol Science and Technology**. 9 (1) pp. 9-18.
- Malloch, D. M. 1997. Isolation, cultivation, identification. Department of Botany, University of Toronto.
<<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>>
- Mietkiewski, R.; Dziegielewska, M.; Janowicz, K. 1998. Entomopathogenic fungi isolated in the vicinity of Szczecin. **Acta Mycologica**. 33 (1) pp. 123-130,

- Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. **Manejo Integrado de Plagas**. (63) pp. 95-103.
- Roberts, D. W. 1989. World Picture of biological control of insects by fungus. En: Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. (84) pp. 89-100.
- Samson, R.; Evans, H.; Latgé, J. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag. pp. 300.
- Smits, N.; Rougier, M.; Fargues, J.; Goujet, R.; Bonhomme, R. 1996. Inactivation of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia by diffuse and total solar radiation. **FEMS Microbiology Ecology**. 21 (3) pp. 167-173.
- Sterk, G.; Mertens, M. 1998. Biological control: The white death. **Proeftuinnieuws** 8 (11) pp. 19-20.
- Tanada; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). pp. 666.
- Taroco, F.; Lecuona, R.; Couto, A.; Arcas, J. 2005. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**. (68) pp. 481-488.
- Thomas, K. C.; Khachatourians, G. G.; Ingledew, W. M. 1987. Production and Properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**. (33) pp. 12-20.
- Ulloa, M.; Herrera T. 1994. Etimología e iconografía de géneros de Hongos. Cuadernos del Instituto de Biología No. 21. UNAM. Estado de México. pp. 300.

- Vargas, F. M. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniarti* (Sacardo) Petch y su virulencia en *Phthorimea opercullela* (Zeller) y *Symmetrischma tangolias* (Gyen). Tesis de Biólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru.
- Vega, F. E.; Dowd, P. F.; McGuire, M. R.; Jackson, M. A.; Nelsen, T. C. 1997. In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**. 70 (3) pp. 209-213.
- Vega, F. E.; Jackson, M. A.; Mercadier, G.; Poprawski, T. J. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 19 (4) pp. 363-368.
- Vidal, C.; Fargues, J.; Lacey, L. A. 1997. Intraespecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*. Effect of temperature on vegetative growth. **Journal of Invertebrate pathology**. (70) pp. 18-26.
- Vidal, C.; Lacey, L. A.; Fargues, J. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. **Journal of Economical Entomology**. 90 (3) pp. 765-772.
- Volcy, C.; Pardo, V. 1994. Principios de Micología. Publicaciones de la Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. pp. 141.
- Ying, S. H.; Feng, M. G. 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. **Journal of Applied Microbiology**. 97 (2) pp. 323-331.

Zambrano, C.; Sepúlveda, M.; Zambrano, E.; Molina, N. 2003. Hongos entomopatógenos en Venezuela: *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Caracterización, formulación, producción y aplicación.

Zavaleta-Mejia, M. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. **Revista Terra**. 17 (3) pp. 201-207.