



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

“Evaluación de la vida de anaquel del hongo *Paecilomyces lilacinus*  
como inoculante agrobiológico en polvo, con efecto nematicida”

(Proyecto de Residencia Profesional)

Presenta: Luis Alejandro Hernández Gómez

Licenciatura en Ingeniería Bioquímica

Asesor interno: Dr. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe

Asesor externo: M.C. Ricardo Olivares Moreno



**BIOKRONE S.A. DE C.V.**  
Código Interno de proyecto: Bk-170315

Celaya Gto., a 20 de Noviembre del 2018



Celaya, Gto., México; a 20 de Noviembre del 2018

### DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi proyecto de residencia profesional, en el **Centro de Biotecnología Biokrone**, y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente a **Biokrone S.A. de C.V.** y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

---

C. Luis Alejandro Hernández Gómez



## Agradecimientos

Agradezco a mis padres M. Elva Gómez y Manuel Hernández, y hermanos Carlos y Fernando Hernández Gómez, por brindarme su amor, apoyo y confianza incondicional durante todos estos años para que yo pudiera tener una carrera profesional, siempre serán mi fuerza y motivo para seguir adelante.

A mis compañeros y amigos que compartieron y comparten conmigo momentos de felicidad y tristeza, así como triunfos y fracasos.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez y la empresa Biokrone S.A. de C.V. por darme la oportunidad de alcanzar esta meta profesional.

A los maestros e ingenieros del ITTG por brindarme su apoyo y conocimientos que me sirvieron de guía durante mis años de formación.

Agradezco al M.C. Ricardo Olivares y al I.B.Q. Wilibaldo Varela Bautista por su ayuda y paciencia en la realización de este trabajo, por todos los consejos y observaciones que contribuyeron a mi proyecto de investigación.

A todas aquellas personas que quedaron fuera de la lista, pero saben que los llevo en el corazón.

Agradezco a Dios por todo lo que me ha brindado para seguir adelante con mis metas y sueños.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>PROBLEMAS POR RESOLVER.....</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>DIAGRAMA DE GANTT .....</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	14
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>7</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>8</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
8.1	NEMÁTODOS FITOPARÁSITOS .....	16
8.1.1	IMPORTANCIA Y DESCRIPCIÓN .....	16
8.1.2	CICLO BIOLÓGICO DE LOS NEMÁTODOS .....	17
8.2	MÉTODOS DE CONTROL Y MANEJO .....	19
8.2.1	CONTROL FÍSICO .....	19
8.2.2	CONTROL CULTURAL .....	20
8.2.3	CONTROL QUÍMICO .....	20
8.2.4	CONTROL BIOLÓGICO .....	20
8.3	HONGOS NEMATÓFAGOS.....	21
8.3.1	<i>PAECILOMYCES LILACINUS</i> (THOM) SAMSON (1974) .....	21
8.3.1.1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	22
8.3.1.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....	23
8.3.1.3	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA .....	23
8.3.1.4	CICLO BIOLÓGICO.....	23
8.3.1.5	MODO DE ACCIÓN .....	24
8.4	TEORÍA DE PRODUCCIÓN DE MASA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	25
8.4.1	TIPO DE PROPÁGULO .....	25
8.4.2	AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA.....	26
8.4.3	NUTRIENTES .....	26
8.4.4	FERMENTACIÓN LÍQUIDA .....	26
8.4.5	PRODUCCIÓN DE BLASTOESPORAS.....	27
8.4.6	ESTRÉS EN LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS Y SU VIRULENCIA .....	28
8.4.7	CONTENIDO DE HUMEDAD.....	28
8.4.8	FORMULACIÓN DE MICO INSECTICIDAS .....	29
8.4.9	ESTABILIDAD DE INGREDIENTE ACTIVO .....	29
8.5	TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA.....	31
<b>9</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
9.1	MATERIALES .....	34
9.1.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	34
9.1.2	MEDIOS DE CULTIVO.....	35



9.2	MÉTODOS .....	35
9.2.1	PREPARACIÓN DEL INOCULO.....	35
9.2.2	CONDICIONES DE CULTIVO .....	35
9.2.3	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LOS HONGOS .....	36
9.2.4	SECADO .....	36
9.2.4.1	SECADO TRADICIONAL .....	36
9.2.4.2	SECADO POR ASPERSIÓN .....	37
9.2.5	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO .....	37
9.2.6	EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VIDA DE ANAQUEL .....	37
9.2.7	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	38
<b>10</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
10.1	EVALUACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO EN LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS .....	39
10.2	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	41
10.3	EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE <i>P. LILACINUS</i> .....	43
10.4	EVALUACIÓN DEL SECADO POR ASPERSIÓN Y TRADICIONAL DE LOS HONGOS <i>P. LILACINUS</i> Y Bk-PCH-001 EMPLEANDO DIFERENTES INERTES .....	44
10.5	EVALUACIÓN DEL SECADO TRADICIONAL Y POR ASPERSIÓN DEL HONGO Bk-PL-001 CUANDO ES SECADA JUNTO CON EL HONGO Bk-PCH-001. ....	48
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>12</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>13</b>	<b>COMPETENCIAS DESARROLLADAS.....</b>	<b>55</b>
<b>14</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>15</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
15.1	PREPARACIÓN DE MEDIO PDA.....	65
15.2	EXTENSIÓN EN PLACA POR ESTRIADO .....	65
15.3	PREPARACIÓN DEL MEDIO CAD .....	65
15.4	TINCIÓN CON AZUL DE LACTO FENOL .....	66
15.5	FOTOGRAFÍAS.....	66

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. MEDIOS DE CULTIVO .....	38
CUADRO 2. ESTABILIDAD DEL INGREDIENTE ACTIVO .....	38
CUADRO 3 - PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>P. LILACINUS</i> EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO .....	40
CUADRO 4. PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE Bk-PCH-001 EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO .....	40
CUADRO 5. ESTABILIDAD DE ESPORAS DE <i>P. LILACINUS</i> FRENTE A LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO.....	44
CUADRO 6. EVALUACIÓN DEL MÉTODO E INERTES DE SECADO EN LA VIDA DE ANAQUEL DE LAS ESPORAS DE <i>P. LILACINUS</i> .....	47
CUADRO 7. ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE Bk-PCH-001 SECADAS POR MÉTODO TRADICIONAL EN 3 INERTES DIFERENTES.....	48
CUADRO 8. CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DE AMBOS HONGOS EN MEDIO LÍQUIDO ANTES DEL SECADO .....	49
CUADRO 9. EVALUACIÓN DEL SECADO POR ASPERSIÓN DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 EMPLEANDO LA MEZCLA DE INERTES (PCD2, SEAPM) .....	49
CUADRO 10. EVALUACIÓN DEL SECADO POR ASPERSIÓN DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 EMPLEANDO LA MEZCLA DE INERTES (PCD1, PCD2, SEM, SEAP).....	50



CUADRO 11. EVALUACIÓN DEL SECADO TRADICIONAL DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 3 EMPLEANDO INERTES DIFERENTES ..... 51

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA BOKRONE S.A. DE C.V. .... 11

FIGURA 2. CICLO DE VIDA PATOGENICA DE MELOIDOGYNE SPP. (AGRIOS, 2005) ..... 18

FIGURA 3. CICLO DE VIDA PATOGENICA DE PRATYLENCHUS SPP. (AGRIOS, 2005) ..... 19

FIGURA 4. NEMÁTODOS EN EL TRATAMIENTO CON *P. LILACINUS* (CARRION & DESGARENNES, 2011) ..... 22

FIGURA 5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *PAECILOMYCES LILACINUS* ..... 23

FIGURA 6. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *P. LILACINUS* EN PLACAS PDA ..... 41

FIGURA 7. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *PAECILOMYCES LILACINUS*; A) 24 H, B) 36 H, C) 48 H, D) 60 H, E) 72 H, F) 84 H.42

FIGURA 8. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *PAECILOMYCES LILACINUS* EN 40X..... 42

FIGURA 12. MEDIO PCD2 (CONTROL) ..... 66

FIGURA 13. MEDIO CAD (5 DIAS INCUBACIÓN)..... 67

FIGURA 14. MEDIO PCD2 (5 DIAS INCUBACIÓN) ..... 67

FIGURA 15. COMPARACIÓN DEL MEDIO CAD Y PCD2 ..... 67

FIGURA 16. MEDIO DEAPM (5 DÍAS DE INCUBACIÓN)..... 67

FIGURA 17. COMPARACIÓN DE LOS MEDIOS CAD, PCD2 Y DEAPM ..... 67

FIGURA 18. MUESTRA DE LOS HONGOS DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 SECADAS POR ASPERSIÓN EMPLEANDO LA MEZCLA DE INERTES ..... 68

FIGURA 19. MUESTRAS DE LOS HONGOS Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 SECADAS POR ASPERSIÓN EMPLEANDO LA MEZCLA DE INERTES (REVERSO DE LA PLACA) ..... 68

FIGURA 20. SECADO TRADICIONAL DE Bk-PL-001 EN MI Y AM1 ..... 68

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. COMPORTAMIENTO DE LA VIABILIDAD DE ESPORAS DE *P. LILACINUS* FRENTE A LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO ..... 44

GRÁFICO 2. ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE *P. LILACINUS* SECADAS POR EL MÉTODO TRADICIONAL..... 47

GRÁFICO 3. ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE Bk-PCH-001 SECADAS POR EL MÉTODO TRADICIONAL..... 48

GRÁFICO 4. ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE *P. LILACINUS* Y Bk-PCH-001 SECADAS POR ASPERSIÓN ..... 50

GRÁFICO 5. COMPORTAMIENTO DE LA ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 SECADAS POR ASPERSIÓN ... 51

GRÁFICO 6. COMPORTAMIENTO DE LA ESTABILIDAD DE LAS ESPORAS DE Bk-PL-001 Y Bk-PCH-001 SECADAS TRADICIONALMENTE ..... 52



## 1 Resumen

Actualmente uno de los grandes problemas en el cultivo de hortalizas, es el ataque de nemátodos, ya que producen una pérdida parcial o total en los rendimientos de estos, generando así una pérdida económica a nivel mundial. Esta es una plaga complicada de controlar, ya que muchos de los nematicidas químicos usados actualmente no afectan a estadios iniciales que presentan estos organismos, además de que el uso descontrolado de estas sustancias presenta graves complicaciones ambientales. Sin embargo, una alternativa es el manejo biológico, entre las cuales destaca, la utilización de controladores biológicos como el hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus*, el cual ataca a varios estadios de nemátodos dentro de los que se destacan *Meloidogyne spp.*, *Pratylenchus spp.*, *Globodera spp.*, entre otros; y pueden ser muy eficientes si se les encuentra en concentraciones adecuadas.

En el presente trabajo se evaluó la producción de blastoesporas, método de secado, condiciones de almacenamiento y vida de anaquel de los hongos nematófagos; durante la evaluación de los medios para la producción de esporas de Bk-PI-001 se obtuvo que los mejores medios fueron el medio CAD y el PCD2 alcanzando una concentración promedio de  $1.78 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> y  $1.49 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> respectivamente. En la evaluación del método de secado y condiciones de almacenamiento se obtuvo que los mejores métodos para el secado de hongos nematófagos pueden ser, tanto el secado tradicional como el de aspersion, no obstante, ciertos factores permiten que estos métodos tengan éxito y no afecten la viabilidad de los hongos tras la desecación.

Mientras que las condiciones de almacenamiento, a las temperaturas de 25°C y 4°C, demuestran no afectar la viabilidad de los hongos, otros factores que permiten una prolongada vida de anaquel de los hongos entomopatógenos es la actividad de agua (Aw) de las muestras y las características fisicoquímicas de los inertes que se empleen durante el secado y el almacenamiento de las esporas de estos hongos nematófagos.

**Palabras clave:** *Paecilomyces lilacinus*, hongos nematófagos, nemátodos fitoparásitos, inertes, biocontrol, manejo biológico.



## 2 Introducción

Los nemátodos fitoparásitos constituyen un grupo de gran impacto en cualquier agro sistema por su acción patogénica sobre la mayoría de los cultivos, como Chile seco (*Capsicum annuum* L.), Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Cacahuete (*Arachis hypogaea*), Papaya (*Carica papaya*), Plátano (*Musa sapientum*), entre otros (Montes-Belmont, 2000; Velásquez-Valle, 2001). Las pérdidas de cosecha anuales estimadas a nemátodos fitoparásitos en la producción agrícola se aproximan al 11%, siendo las pérdidas económicas anuales de \$100 billones de dólares alrededor del mundo (Agrios, 2005). El método más utilizado para el control de esta plaga es por medio de la aplicación de productos químicos como el bromuro de metilo o cloropicrina, ya que provoca una disminución drástica de la población del nemátodo y minimiza las pérdidas a corto plazo (Fe-Andrés, 2002). Sin embargo, como bien se sabe el uso de esta práctica causa daños al ambiente y enfermedades a seres humanos (productores y consumidores), además de provocar mayores niveles de resistencia, mutaciones del nemátodo (Castillo y Medina, 2014).

Debido a lo anterior, desde hace varios años se han buscado otras prácticas, tal como lo es el manejo biológico o biocontrol, esta práctica prometedora elude el uso de plaguicidas químicos; empleando depredadores, parasitoides, extractos botánicos, hongos, bacterias, nemátodos y virus; los cuales son enemigos naturales de las plagas. Los micoplaguicidas son una alternativa sustentable en gran parte a que presentan mayor especificidad y a que poseen gran rango de hospederos plaga, aunado a que son persistentes y no requieren ser ingeridos.

En la actualidad se emplean diferentes grupos de hongos entomopatógenos en el biocontrol, entre los cuales se encuentran *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Trichoderma* (Samaniego, 2015). El hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (1974) es un organismo que habita en la rizosfera, específicamente en suelos ricos en materia orgánica que contengan buena cantidad de humedad, sus poblaciones son mayores en climas templados y es reconocido como controlador biológico de nemátodos de los géneros *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. Y *Globodera* spp. (Cano, 2011). Este hongo,





además de solubilizar el fósforo, parasita huevos, estados juveniles y adultos de nemátodos. Al penetrar, produce toxinas que causan deformación, vacuolización, pérdida de movimiento, daño del estilete, daño al sistema nervioso, deterioro de estructuras reproductivas, y muerte del nemátodo, además tiene la capacidad de sobrevivir como saprófito en el suelo en el caso de ausencia de nemátodos (Samaniego, 2015). A pesar de que este se le puede encontrar de forma natural en el suelo, rara vez se hallan en poblaciones lo suficientemente numerosas como para lograr un control eficiente por lo que es recomendable la aplicación de este microorganismo, para elevar los niveles de la población y así tener un mejor control de la plaga.

El uso de agentes de control biológico por medio de hongos entomopatógenos ha sido extensivamente estudiado, pero solo pocos productos son comercialmente disponibles (Liu & Li, 2004). Dos de las mejores razones son la corta vida útil del hongo en los bioformulados y el alto costo de la producción en masa (Duan *et al.*, 2008). Estos factores incluyen: ingredientes activos (Elzein *et al.*, 2004), aditivos (Jackson *et al.*, 2006), proceso de secado (Teshler *et al.*, 2007), las condiciones de almacenamiento (Connik *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2008) y la actividad del agua (Miranda *et al.*, 2013). Para los hongos formulados como micoplaguicidas, la etapa más comúnmente utilizada como “ingrediente activo”, es la espora (Duan *et al.*, 2008); la espora es la estructura generada por hongos que permite la dispersión y supervivencia del microorganismo, además de su capacidad de infectar a su hospedero cuando llegan a estar en contacto con él.

En la actualidad, la producción masiva de los hongos entomopatógenos se basa en la técnica de fermentación difásica (SSF por sus siglas en inglés) y fermentación líquida sumergida; el atractivo de la fermentación líquida sumergida se basa en su impregnabilidad masiva, utilizando el equipo existente, líquido de fermentación, el control más detallado de las variables ambientales, y los tiempos de proceso más cortos (es decir, horas en lugar de días como para la fermentación difásica). Al mismo tiempo, la producción a escala comercial requiere una considerable inversión en equipo de fermentación, mientras que la fermentación en sustrato sólido puede lograrse de manera simple, aunque mucha



mano de obra. Para la producción de biomasa de estos hongos (micelio y conidios aéreos) es fundamental el desarrollo de un medio de cultivo, y para esto se debe de tener en cuenta la accesibilidad de los componentes, así como el aspecto económico, ya que esto repercute en la comercialización del producto. Un medio de cultivo debe de contener básicamente una fuente de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas y factores ambientales controlados (temperatura, pH, aireación) (Quintero-Zapata, 1998), ya que estos componentes repercuten significativa en los atributos de los propágulos producidos (blastoesporas) como su eficacia en el biocontrol, resistencia a la desecación, tolerancia y persistencia (Lane *et al.*, 1991).

Por las razones anteriores, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad en vida de anaquel del hongo *Paecilomyces lilacinus* como inoculante agrobiológico en polvo, con efecto nematicida.

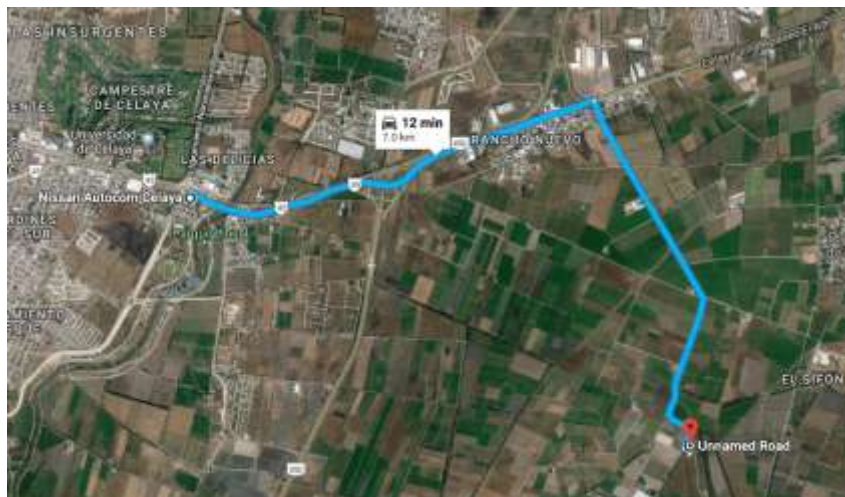
### 3 Descripción de la empresa

Biokrone es una empresa biotecnológica que contribuye en la generación de un ambiente saludable para el ser humano, promoviendo la conservación de los recursos naturales, a través del suministro de productos innovadores que fortalecen el desarrollo y sanidad de los cultivos.

Produce fungicidas biotecnológicos, biofortificantes, insecticidas botánicos, entre otros; que ayudan a la agricultura nacional de manera sustentable con el medio ambiente.

El Centro de Biotecnología Biokrone nace con la visión de desarrollar soluciones ecológicas innovando en compuestos activos, procesos y metodologías aplicables a la industria agrícola basadas en investigaciones biotecnológicas propias y alianzas estratégicas con diversos centros de investigación e instituciones de estudios superiores nacionales.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación del Centro de Biotecnología Biokrone bajo la dirección del M.C. Ricardo Olivares Moreno, Gerente del Departamento de Investigación y Desarrollo de la empresa Biokrone S.A. de C.V. Se encuentra ubicado en Domicilio conocido S/N, S/C, Rancho Particular Santa Rosa, C.P. 38191, Apaseo el Grande, Gto.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del Centro de Biotecnología Biokrone S.A. de C.V.



#### **4 Problemas por resolver**

El uso excesivo de sustancias agroquímicas se ha tornado una alternativa ineficaz para el control de plagas como los nemátodos fitoparásitos, además de causar impactos a los ecosistemas y estructuras poblacionales benéficas para los cultivos. Por lo que una alternativa más sostenible para el medio ambiente es por medio del control biológico, el cual emplea sustancias y microorganismos que atacan a la plaga en cuestión, uno de los microorganismos más utilizados para el control de este tipo de plaga es el hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus*, el cual ataca a huevos y estadios J2 de diferentes géneros de nemátodos. Sin embargo, uno de los mayores problemas que presenta la presente investigación es la producción masiva de los cuerpos de resistencia (blastoesporas) de este microorganismo y el tiempo de vida de anaquel de hongos que son empleados en el control biológico. Por lo que se pretende establecer un medio de cultivo líquido que sea capaz de producir altas concentración de blastoesporas de *P. lilacinus* e identificar el método de secado, soportes y condiciones de almacenamiento que permitan la estabilidad prolongada de las blastoesporas de *P. lilacinus*.



### 5 Diagrama de Gantt

Actividad		Semana															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ingreso al centro de Biotecnología de Biokrone.	P	█															
	R	█															
Revisión detallada de la bibliografía de temas correspondiente.	P	█	█														
	R	█	█														
Capacitación en procedimientos y técnicas.	P		█	█	█	█											
	R		█	█	█	█											
Caracterización morfológica de la cepa <i>P. lilacinus</i> .	P				█	█	█										
	R				█	█	█										
Desarrollo experimental para la producción de esporas del hongo <i>P. lilacinus</i> .	P			█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█			
	R			█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█			
Evaluación de parámetros de vida de anaquel.	P							█	█	█	█	█	█				
	R				█	█	█	█	█	█	█	█	█				
Redacción de reportes.	P	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
	R	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Revisión final del proyecto desarrollado.	P														█	█	█
	R												█	█	█	█	█
Revisión de la Bibliografía.	P	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
	R	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█



## 6 **Objetivos**

### 6.1 **Objetivo general**

- Evaluar la estabilidad en vida de anaquel del hongo *Paecilomyces lilacinus* como inoculante agrobiológico en polvo.

### 6.2 **Objetivos específicos**

- Encontrar el medio de cultivo y las condiciones adecuadas en las cuales los hongos alcancen la máxima producción de esporas.
- Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del hongo *Paecilomyces lilacinus*.
- Evaluar el efecto del método de secado sobre la viabilidad de esporas del hongo *Paecilomyces lilacinus*.
- Evaluar el método de secado del hongo *P. lilacinus* cuando es secada junto con otro microorganismo nematófago (Bk-Pch-001).
- Identificar la morfología macroscópica y microscópica de *P. lilacinus*.



## 7 Justificación

En los últimos años y debido a gran medida a monocultivos, humedad constante en los suelos y al desconocimiento de establecimientos de manejo preventivo de nemátodos fitoparásitos, los productores afrontan año con año incidencias cada vez más fuertes de este tipo de plaga, provocando muchas pérdidas económicas a nivel mundial. Entre las principales plagas de la región se encuentra el nemátodo agallador *Meloidogyne incógnita* y lesionador *Pratylenchus spp.*, que causan lesiones en el sistema radicular de las plantas provocando consecuentemente el agotamiento y estrés de estas, impidiendo aprovechar el potencial de producción, aunado a que el daño puede ser más grave si en el suelo se encuentra la presencia de hongos fitopatógenos; pues la interacción del nemátodo con la planta, predispone a que estos hongos realicen el daño total de las plantas.

Siendo por ello, que los agricultores busquen implementar prácticas de control más accesibles y sustentables sin el uso de agroquímicos, los cuales, por el mal manejo que le han dado, están siendo ineficaces para el control de esta plaga y causan un impacto a los ecosistemas y estructuras poblacionales. La generación de un bioplaguicida a base del hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus*, permitirá controlar la densidad poblacional de estos organismos. Debido a la especificidad de este microorganismo se asegura que no se genere daño a especies biológicas no nocivas a los cultivos, además que el mismo cuenta con características biológicas que permiten prolongar su estancia en los suelos, haciendo que se auto propague a mediano y largo plazo, y así obtener una producción agrícola de mejor calidad.



## 8 Marco teórico

### 8.1 Nemátodos fitoparásitos

#### 8.1.1 Importancia y descripción

Los nemátodos son un grupo muy importante dentro de los animales multicelulares. Pertenecen al filo *Nematoda*, cuyas raíces proviene del griego que significa hilo. Existe una gran diversidad dentro de esta agrupación, siendo considerados las criaturas más abundantes de la tierra. La mayoría de estos organismos son marinos, sin embargo, los nemátodos tienen varios ejemplares que se encuentran muy bien adaptados a la tierra. Estos se pueden encontrar en una gran variedad de ecosistemas, especialmente en climas tropicales y subtropicales, y se interrelacionan directamente con los cultivos (Triviño, 2003). Existen nemátodos benéficos que se alimentan de bacterias, hongos y otros nemátodos. Sin embargo, también existen nemátodos perjudiciales para los cultivos, ya que se alimentan de los tejidos de plantas creando repercusiones negativas sobre los cultivos. Estos últimos pueden ser clasificados como nemátodos del nudo de la raíz, enquistados, punzantes y de raíces lesionadas (FAO, 2013). En varios cultivos, los nemátodos llegan a ser una plaga bastante seria causando cuantiosos daños en siembras de uso agrícola. Hasta el momento se han descrito más de 28,000 especies diferentes, pero como son un grupo muy diverso de organismos, el número de especies puede ser mucho mayor, con algunas estimaciones de que el número de especies de nemátodos varía de 100,000 a 100,000,000 (Luc *et al.*, 2010) y por lo menos 2500 especies diferentes de nemátodos que son considerados plaga.

La gran mayoría de estos organismos ataca a las raíces de los organismos hospederos, sin embargo, algunos pueden causar daños en otros tejidos como en las hojas y flores. Sin embargo, debido a que su presencia es predominantemente en el suelo, estas plagas son consideradas uno de los problemas más complicados de identificar, demostrar y controlar en campo. Los géneros que mayor influencia tienen en la agricultura mexicana son: *Meloidogyne spp.*, *Heterodera spp.*, *Pratylenchus spp.*, *Radopholus spp.*, entre otros (FAO, 2018). Los nemátodos son





organismos microscópicos con aspecto vermiforme, alargados, no segmentados, de cuerpo delgado que se van achatando hacia los extremos; bajo el microscopio, aparecen como tubos muy delgados con una "cabeza" de forma contundente definida y una cola delgada. Crecen hasta aproximadamente 1 mm de longitud, aunque algunos pueden alcanzar más de 5 mm de longitud (FAO, 2018). Habitan en el suelo dentro de laberintos de poros interconectados, y se mueven en las capas de agua adheridas a las partículas del suelo.

Los nemátodos son sexuados y su fisiología es diferenciada dependiendo del sexo. Por lo general, los ejemplares machos son más pequeños que las hembras, lo cual es conocido como dimorfismo sexual. Si bien es cierto que existe una gran diversidad de nemátodos en el mundo, éstos conservan una sorprendente uniformidad estructural. No existe una cabeza diferenciada, por lo que el cerebro se ubica en la parte anterior del cuerpo, mientras que todos sus órganos sensoriales se encuentran concentrados en el tejido circundante a la invaginación bucal. La estructura corporal de los nemátodos está dividida en tres secciones que son la sección encefálica, la del esófago y la región caudal (Román y Acosta, 1991).

### **8.1.2 Ciclo biológico de los nemátodos**

Todo nemátodo tiene un ciclo biológico que consiste en seis estadios los cuales son: huevo, cuatro estadios juveniles (J1, J2, J3, J4) y adulto. En este último, es donde se desarrollan y se vuelven funcionales las estructuras reproductivas. Muchas de las especies de estos organismos tienen un cambio bastante significativo en la cutícula al llegar al estadio J3, brindando a estos animales una mayor resistencia al ambiente en comparación con las anteriores fases (Samaniego, 2015). Esto es un factor primordial que se debe tomar en consideración, si lo que se quiere es controlar a nemátodos que se encuentran en el edafón del suelo (Chitwood *et al.*, 2009). Para la mayoría de los nemátodos parásitos de plantas, el ciclo comienza con la inseminación de un nemátodo hembra, la cual desarrolla y deposita huevos fecundados. El estadio J1 normalmente se desarrolla en el interior del huevo y la primera muda también

ocurre dentro de esta estructura. La eclosión del huevo sucede en los juveniles J2, cuando salen al ambiente y suceden las mudas respectivas hasta convertirse en adultos. En esta fase los nemátodos tienen la habilidad de atacar e invadir a plantas, y normalmente ingresan por el tejido radicular para luego ubicarse en el córtex de la raíz produciendo daños considerables en el tejido. En el caso de las hembras, los ejemplares en el estadio J3 se adentran en los tejidos, donde busca un lugar para acomodarse el resto de su vida. Por otro lado, los machos se ubican justo debajo de la epidermis de la raíz y una vez que entran al estadio J4 salen al edafón en búsqueda de una hembra (Lee, 2005).

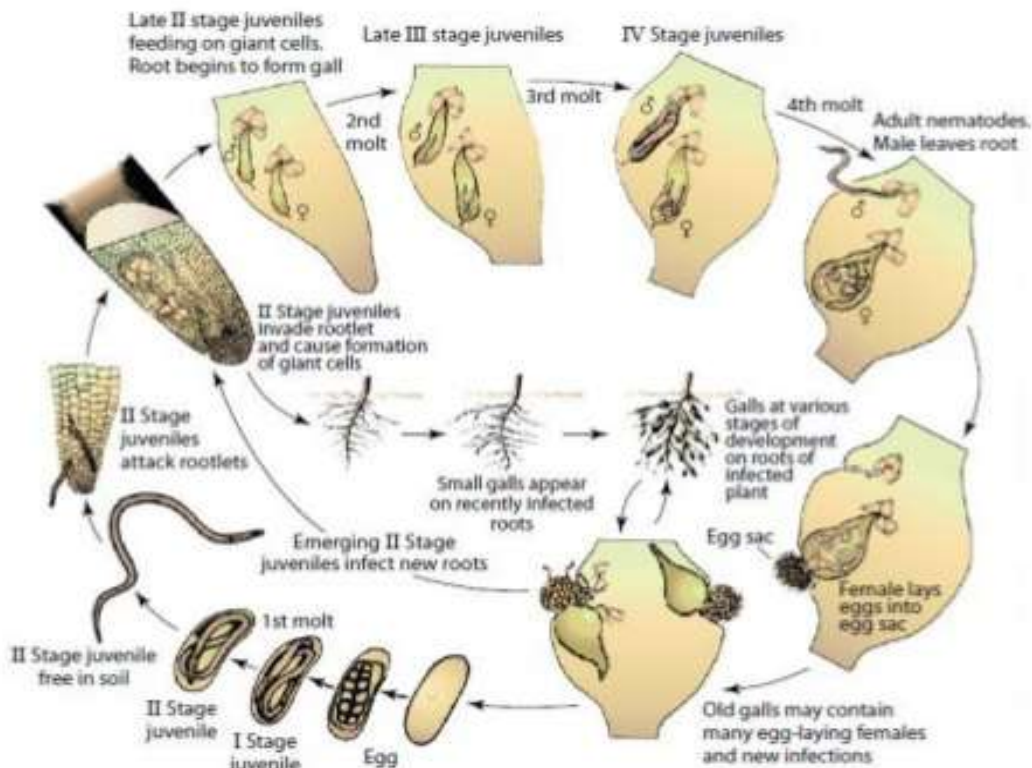


Figura 2. Ciclo de vida patogénica de *Meloidogyne spp.* (Agrios, 2005)

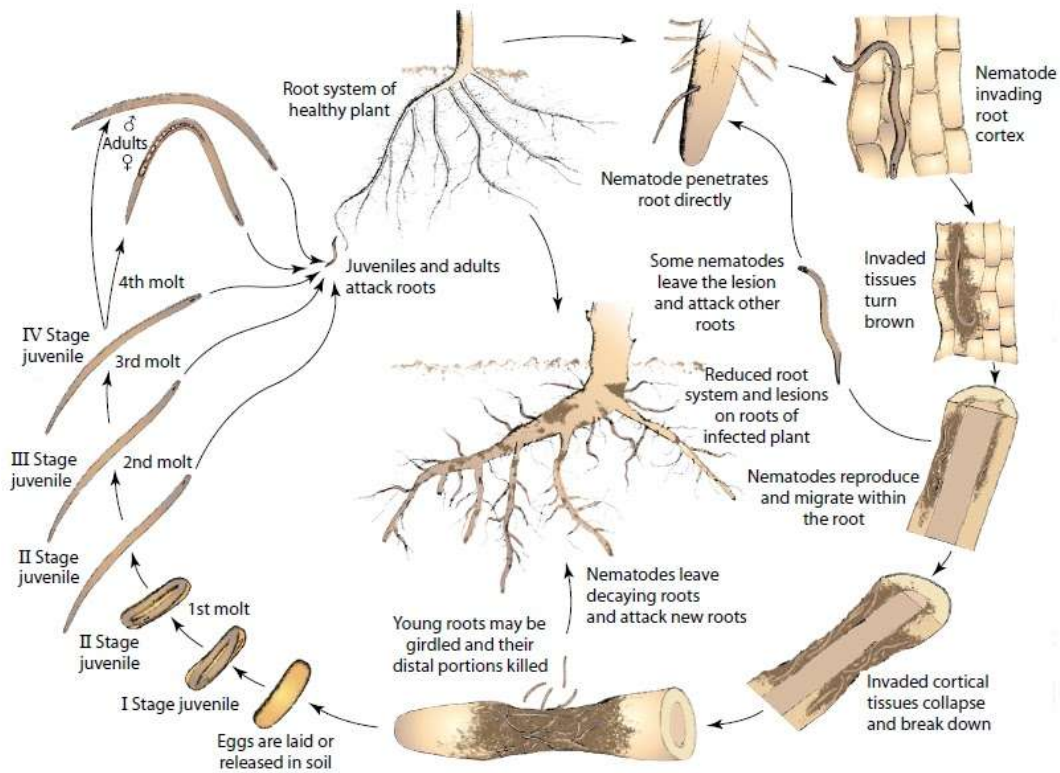


Figura 3. Ciclo de vida patogénica de *Pratylenchus* spp. (Agrios, 2005)

## 8.2 Métodos de control y manejo

El control y manejo de nemátodos es bastante complicado por medios convencionales, ya que normalmente cuando el agricultor nota señales de estrés en el cultivo, la plaga ya está establecida.

### 8.2.1 Control Físico

Consiste en la utilización de agentes físicos como la temperatura, humedad, radiación solar. El fundamento del método es que los nemátodos sólo pueden desarrollarse y sobrevivir dentro de ciertos límites de intensidad de los factores físicos ambientales; más allá de los límites mínimos y máximos, las condiciones resultan letales (Puertas, 2007; Andreu y Gómez, 2008).



### **8.2.2 Control cultural**

La mayoría de las prácticas o labores de cultivo tienen un impacto directo o indirecto sobre la incidencia y severidad de las enfermedades ocasionadas por organismos del suelo. Entre las principales prácticas culturales se encuentran: barbecho, rotación de cultivos, cultivos trampas, cultivos de cobertura, enmiendas orgánicas, biofumigación, cultivares resistentes y utilización de porta-injertos (Athman *et al.*, 2006).

### **8.2.3 Control químico**

Los nematicidas fumigantes son en su mayoría compuestos que actúan en la fase gaseosa del suelo, eliminando gran parte de los organismos vivos, son fitotóxicos de efectos irreversibles por lo que deben aplicarse en pre-plantación. Son tóxicos e impactantes al ambiente. Los no fumigantes son organofosforados y carbamatos que afectan al sistema nervioso del nemátodo, impidiendo su alimentación; no son fitotóxicos, por lo que pueden aplicarse una vez implantado el cultivo; son menos agresivos con el ambiente, no eliminan totalmente las poblaciones de nemátodos, sino que las mantienen a niveles tolerables (Stirling, 2014). Los productos químicos más utilizados para la fumigación del suelo son metam sodio, metam potasio, bromuro de metilo y dicloropropeno. Por otro lado, como nematicidas se emplea normalmente carbofuran, terbufos, cadusafos entre otros. Sin embargo, el control de huevos de nemátodo con esta técnica es bastante ineficiente (Cantuña, 2013).

### **8.2.4 Control Biológico**

Corresponde al uso de uno o más organismos benéficos para combatir organismos que causan daño. El propósito del control biológico es reducir las poblaciones de plagas a una escala que no represente daño económico y permitir una cantidad poblacional de los organismos plaga que garantice la supervivencia del agente controlador (Nicholls, 2008; Villacide y Corley, 2012). Entre los microorganismos que destacan potencialidades como agentes de control biológico



del nemátodo agallador, se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y *Pasteuria penetrans*, que son parásitos obligados de nemátodos fitoparásitos (Agrios, 2005); otro grupo son los hongos nematófagos con varias manifestaciones de parasitismo, también se encuentran nemátodos predadores y protozoos. (Waingwright, 1995; Agrios, 2005).

### 8.3 Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos son microorganismos con la capacidad de atacar, matar y digerir nemátodos (adultos, juveniles y huevos), muchos de estos pueden también vivir de forma saprofitica, atacar a otros hongos (micoparásitos) y colonizar raíces de plantas (endófitos); hay más de 300 especies de hongos antagonistas encontrados por todo el mundo, incluyendo las regiones polares (Barrón, 2005; Piedra, 2007). Entre las principales especies de hongos antagonistas de nemátodos se encuentran: *Arthrobotrys oligospora* y *Monacrosporium spp.*, que son hongos parásitos facultativos, *Catenaria anguillulae*, *Drechmeria coniospora* o *Hirsutella rhossiliensis* son hongos parásitos obligados de nemátodos; *Pochonia chlamydosporia* y *Dactylella oviparasitica* son parásitos de huevos y larvas; *Pleurotus ostreatus* forma toxinas en las estructuras de sus hifas para inmovilizar a los nemátodos antes de infectarlos; *Paecilomyces lilacinus*, parasita huevos y hembras; *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *Aspergillus niger*, *Glomus spp.*; Otros hongos reportados con diferentes formas de parasitismo son *Fusarium solani*; *Cylindrocarpon sp.*, *Lecanicillium lecanii* (Waingwright, 1995; Piedra, 2007).

#### 8.3.1 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (1974)

*P. lilacinus* es un hongo presente en la mayoría de los suelos, presentándose en una mayor concentración en suelos tropicales y subtropicales. Debido a la nueva organización taxonómica, el nuevo nombre científico de este hongo es *Purpureocillium lilacinum*, sin embargo, el nombre original sigue siendo comúnmente usado (Luangsa-ard *et al.*, 2011). Este organismo es normalmente un saprófito que empieza a consumir a su huésped hasta que esporula y consigue

otro hospedero, este organismo produce un espeso micelio de donde se forman los conidióforos que producen los conidios. La producción de conidios puede verse afectada o favorecida, dependiendo de algunos factores como lo es la humedad y la disponibilidad de nutrientes. El crecimiento y desarrollo del hongo es posible entre la temperatura de 8 a 38°C, teniendo un crecimiento óptimo entre 26 y 30°C (Tigano y Inglis, 2006; Kiewnick, 2006). Este organismo es reconocido por ser un eficiente controlador biológico que parasita varios nemátodos que son plagas de distintos cultivos. Entre estos destacan los géneros *Meloidogyne spp.*, *Radopholus spp.*, *Pratylenchus spp.*, *Heterodera spp.* y *Globodera spp.* (Cano, 2011). Aunque este hongo es más agresivo contra huevos de nemátodos también se ha visto que parasitan a nemátodos móviles y a hembras sedentarias (Esser & El-Gholl, 1993). Por esta razón es que este hongo está siendo desarrollado comercialmente como un agente de control de plagas (Inglis *et al.*, 2000).



Figura 4. Nemátodos en el tratamiento con *P. lilacinus* (Carrion & Desgarenes, 2011)

#### 8.3.1.1 Clasificación taxonómica

Este hongo pertenece al dominio *Eukaryota*, reino *Fungi*, a la división *Ascomycota*, subdivisión *Pezizomycotina*, clase *Ascomycete* y familia *Trichocomaceae*. Actualmente este hongo lo están catalogando dentro de la sección de las *Isarioidea*.

### 8.3.1.2 Características morfológicas

Las colonias en los medios como agar extracto de malta (MEA) o papa dextrosa (PDA), presentan una tendencia a cubrir toda la placa, con colonias inicialmente de tonalidad blanca-grisácea y al cabo de un desarrollo promedio, cambian a una tonalidad rosa-lila. La superficie de las colonias es acuminada-flocosa y de textura aterciopelada-pulvurulenta. El reverso es incoloro.

### 8.3.1.3 Morfología microscópica

El micelio normalmente presenta una estructura lisa, hialina, no septada y presentan un espesor entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ , a partir de las hifas se levantan los conidióforos erectos que pueden llegar a medir 650  $\mu\text{m}$ , los cuales son verticilados o irregulares, en cada una de las fiálides se presentan acúmulos de células conidiógenas, las cuales pueden ser solitarias en hifas fértiles. Los conidios se encuentran en cadenas basopetales divergentes o enredadas, son de apariencia hialina o ligeramente pigmentados con paredes suaves, unicelulares, elipsoidales o fusiformes 2-3x2-2,5  $\mu\text{m}$ .

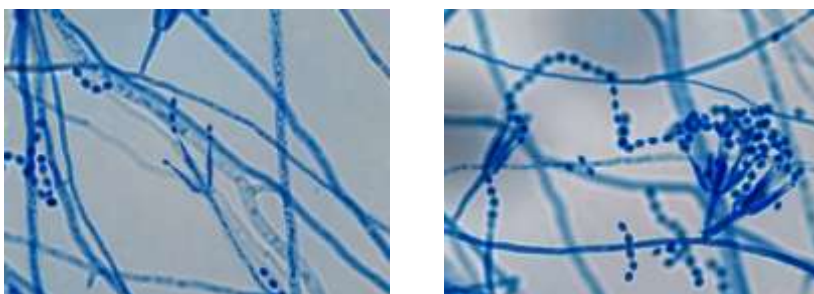


Figura 5. Morfología microscópica de *Paecilomyces lilacinus*

### 8.3.1.4 Ciclo biológico

El ciclo de biológico de hongos imperfectos comprende de 5 pasos principales los cuales son: Dormancia de las esporas, germinación, infección, desarrollo de micelio y conidiogénesis. El desarrollo de micelio y producción de conidios viables está directamente relacionado con la disponibilidad de nutrientes,



además del método de inoculación, salinidad del sustrato, relación C/N, aireación, contenido de humedad, entre otros. Los conidióforos son caracterizados por tener un reducido movimiento de agua, ausencia de movimiento citoplasmático y baja actividad metabólica. Bajo condiciones favorables, las conidias germinan formando un tubo vegetativo, el cual será el micelio. Una espora es considerada germinada cuando la longitud del tubo vegetativo es mayor a la dimensión de una espora (Brand *et al.*, 2010).

### 8.3.1.5 Modo de acción

El hongo *P. lilacinus* ataca principalmente a los estadios sedentarios y juveniles de nemátodos. Es importante saber que los huevos de nemátodos fitopatógenos están compuestos normalmente de tres capas diferentes que son: la capa externa vitelina, que está compuesta de proteínas, la capa media compuesta por quitina y la capa interior que está compuesta por lipoproteínas (Brand *et al.*, 2010). Para comenzar la colonización, las esporas germinan y forman apresorios, que es una estructura hifal que secreta enzimas extracelulares en función del reconocimiento de hidrofobicidad de la superficie del huésped; después fijarse a la pared del hospedero, las enzimas extracelulares, como las serinas proteasas y quitinasas, causan la destrucción de ovarios de las hembras y la reducción de la eclosión de los huevos.

Por otra parte, produce toxinas que afectan el sistema nervioso y causa la deformación del estilete de las hembras, vacuolizaciones y pérdida de movimiento. Se puede observar vacuolizaciones internas de las larvas del primer estadio, segmentación y gastrulación atípicas. El hongo es capaz de penetrar el huevo, crecer dentro del mismo y destruir el embrión. Park *et al.* (2004) estudiaron la influencia de las leucinostatinas, un metabolito secundario producido por *P. lilacinus*, en la colonización de huevos de *M. javanica*, que reveló resultados positivos. Además, demostraron que la actividad de la quitinasa puede estar relacionada con el parasitismo, y no tiene un papel directo en la degradación de la pared celular de los patógenos. También producen el antibiótico peptídico





leucinostatina, efectivo contra un amplio rango de hongos y bacterias Gram positivas y también el lilacinin (Elósegui, 2006).

## 8.4 Teoría de producción de masa de hongos entomopatógenos

### 8.4.1 Tipo de propágulo

En la naturaleza, el propágulo infeccioso tipo de los hongos Ascomicetes entomopatógenos es el conidio aéreo. Otro tipo de Propágulo de posible explotación son las blastoesporas, microciclo, microsclerotia. Este tipo de propágulo se elige dependiendo de los siguientes factores: (Jackson *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2015)

1. Virulencia
2. Tolerancia a la desecación
3. Tolerancia térmica
4. Velocidad de germinación
5. Infección
6. Tolerancia UV
7. Capacidad de producir el propágulo adecuado

Las blastoesporas son, propágulos fúngicos hidrófilos vegetativos, el cual es el modo preferido de crecimiento para muchos entomopatógenos dentro del hemocele de insectos infectados. El crecimiento tipo-levadura del hongo permite un mejor acceso a los nutrientes dentro del insecto y también se considera un factor de virulencia porque las blastoesporas poseen cierta capacidad para engañar al sistema inmunológico del insecto (Wang y St Leger, 2006; Boomsma *et al.*, 2014). Las blastoesporas tienen una tasa de germinación rápida (por ejemplo, > 90% de germinación en 6 h para *P. fumosoroseus* frente a 16-24 h para conidios), que pueden hacerlos útiles como mico insecticidas de contacto bajo determinadas circunstancias (Vega *et al.*, 1999).

Debido a este proceso de germinación acelerada, la germinación más rápida también puede reducir el período de exposición a tensiones perjudiciales ambientales (UV, baja humedad) después de la aplicación, en comparación con conidios aérea. Al mismo tiempo, blastoesporas son más intolerantes de tensiones ambientales que los conidios aérea y, hasta ahora, han reducido la viabilidad



después de la transformación, una mucha más corta vida de almacenamiento, especialmente en condiciones ambientales, y la persistencia después de la aplicación.

#### **8.4.2 Aislamiento y mantenimiento de la Cepa**

Una estrategia típica es aislar el hongo de un insecto para hacerlo genéticamente uniforme, “cultivo Madre”. Se debe tener cuidado para asegurar que el hongo conservado no ha sido subcultivado en varias ocasiones ( $\geq 10$  veces consecutivas) en medios artificiales, ya que pasajes sucesivos a través de medios artificiales, resultaría en la variación en el patrón normal de la morfogénesis (Butt *et al.*, 2000) y/o atenuación de la virulencia.

#### **8.4.3 Nutrientes**

La selección de ingredientes y concentración de los medios óptimos puede ser algo lento y laborioso, especialmente para la fermentación líquida, pero es extremadamente importante el definir las condiciones nutricionales apropiadas para el máximo rendimiento de propágulos en el tiempo de fermentación más corto. Los nutrientes también pueden afectar a la morfogénesis de hongos, la formación de propágulos, tasa de crecimiento específico, y la calidad de propágulos y la aptitud para su uso en el control biológico (Jackson *et al.*, 1997). Por lo tanto, los estudios nutricionales son de gran relevancia para el desarrollo de los medios de producción rentables para los hongos entomopatógenos. Altas concentraciones de oxígeno disuelto en cultivos líquidos o de oxígeno en la atmósfera ( $> 21\% O_2$ ) puede ser perjudicial para el crecimiento de hongos.

#### **8.4.4 Fermentación líquida**

La fermentación líquida sumergida para la producción de entomopatógenos *Hypocreales* ha sido un objetivo largamente buscado. El atractivo de la fermentación líquida sumergida se basa en su impregnabilidad masiva, utilizando el equipo existente, líquido de fermentación, el control más detallado de las variables ambientales, y los tiempos de proceso más cortos (es decir, horas en



lugar de días como para la fermentación-sustrato sólido). Al mismo tiempo, la producción a escala comercial requiere una considerable inversión en equipo de fermentación, mientras que la fermentación en sustrato sólido puede lograrse con una simple, aunque mucha mano de obra.

Los métodos de fermentación líquida se pueden clasificar en dos categorías: fermentación líquida sumergida, donde el hongo está sumergido en un medio líquido constantemente agitado y aireado para formar blastoesporas, conidios microciclo, o microesclerocios, y la fermentación líquido estacionario, en el que la esporulación tiene lugar en una superficie aún, el líquido, la producción de micelio y conidios aérea. Los productos finales de fermentación sumergida pueden ser blastoesporas, conidios “microciclo”, estabilizado productos de micelio, o microesclerocios (Jaronski, 2013).

La homogeneidad de un cultivo líquido simplifica métodos de producción y procesado y ayuda para el desarrollo de condiciones optimizadas de nutrición para la producción. Además, factores ambientales, tales como, temperatura, aireación y pH son fácilmente controladas, en comparación a la fermentación de sustrato sólido. Condiciones controladas de nutrición y ambiental, capacidad de escalamiento del proceso, seguridad en la calidad emitida y facilidad en la recuperación del producto, en general se traduce en costos de producción bajos para propágulos de hongos usando métodos de producción en cultivo líquido (Humphreys *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1997).

#### **8.4.5 Producción de Blastoesporas**

La producción de altas concentraciones puras de la desecación de blastoesporas se ha logrado con *Beauveria* e *Isaria* con tiempos cortos de fermentación. En general, medios ricos en nutrientes que contienen altas concentraciones de fuentes de carbono y de nitrógeno son más propensos a producir propágulos vegetativos como las blastoesporas, cuerpos de hifas, micelio y microesclerocios. Se ha demostrado que las blastoesporas pueden sobrevivir la desecación (secado al aire), de permanecer estables bajo almacenamiento refrigerado (4 ° C), pero no a temperatura ambiente y de infectar a las moscas



blancas mejor que los conidios aéreos. La influencia de las diferentes fuentes de nitrógeno sobre la virulencia de la blastoesporas y la velocidad de germinación sigue siendo difícil de alcanzar (Jaronski, 2013).

En cultivos limitados de nitrógeno, la fuente de nitrógeno es el primer nutriente que se agota, mientras que en cultivos limitados de carbono lo es el carbono. El crecimiento en cultivos limitados de nitrógeno lleva a un desbalance, tanto que la síntesis de proteínas es inhibida, sin embargo, la síntesis neta de carbohidratos y lípidos procede mientras que el medio contenga una fuente de carbono. Inch *et al.* (1986) mostraron que el contenido de glucógeno de *P. fumosoroseus* fue más alto en blastoesporas producidas en cultivos limitados de nitrógeno que en blastoesporas producidas en cultivos limitados de carbono y esto sugería que el contenido de glucógeno puede influir en la longevidad de estas esporas en el almacenaje.

#### **8.4.6 Estrés en la producción de esporas y su virulencia**

El hongo cultivado bajo condiciones de estrés hídrico, por ejemplo, es capaz de acumular más polioles, los cuales, a su vez, se han asociado con una mayor virulencia y la velocidad de germinación incluso en condiciones de baja humedad relativa (Magan, 2001; Andersen *et al.*, 2006; Rangel *et al.*, 2008). La reducción de la actividad de agua de los medios líquidos se ha asociado con un aumento en la producción de esporas por diversos hongos entomopatógenos (Humphreys *et al.*, 1989; Inch y Trinci, 1987).

#### **8.4.7 Contenido de Humedad**

Otro aspecto que puede afectar a la virulencia y debe ser tenido en cuenta en la producción en masa se refiere al contenido de humedad de conidios después de secar. Para larga duración en almacén, conidios se debe secar a menos del 5% de humedad o una actividad de agua ( $A_w$ ) < 0.3. Como regla general, cuanto, la disponibilidad de oxígeno seco más frío y más bajo, se puede lograr la supervivencia más larga de propágulos fúngicos. Se ha demostrado que los conidios muy secos ( $A_w$  < 0.1) pueden sufrir de daño imbibición, debido a la



rápida rehidratación en agua fría (Faria *et al.*, 2009). Estos conidios muy secos deben ser rehidratados lentamente bajo vapor de agua o mediante el uso de agua con temperatura  $>25^{\circ}\text{C}$ , a pesar de que el daño por imbibición podría variar entre especies de hongos y cepas.

#### **8.4.8 Formulación de mico insecticidas**

La formulación de propágulos de hongos para su uso como agentes de biocontrol ha sido guiada por la necesidad de mejorar la vida de anaquel de este, su eficiencia y/o las características físicas del producto. Las formulaciones que mejoran la tolerancia a la desecación de la espora o la vida de anaquel, así como los crioprotectores y aceites pueden inhibir la germinación o el contacto de la espora con su hospedero, resultando en la reducción de la eficiencia del biocontrol.

La viabilidad de estos propágulos debe ser garantizada hasta el momento en que penetre la cutícula del insecto. Una de las principales razones que acortan la vida de anaquel es la inestabilidad de las esporas en temperaturas altas, así como la exposición a radiaciones UV y precipitaciones.

#### **8.4.9 Estabilidad de ingrediente activo**

La estabilidad está estrechamente relacionada con la acumulación de reservas endógenas y la alteración de la composición de las paredes celulares. Estas diferencias se observan entre el empleo de una fuente de carbono y/o nitrógeno a otra, así como las condiciones que se le dan posteriormente al ingrediente activo, como el secado y condiciones de almacenamiento; lo que hace que las blastoesporas producidas tengan una viabilidad menor en comparación con las esporas normales.

Se ha observado que los niveles de trehalosa son altos en los estados de dormancia de las esporas, una parte es consumida por las mismas durante este periodo y la otra permanece como reserva que se va degradando para transformarse en glucosa cuando comienza la germinación. La síntesis de trehalosa comienza justo antes del estado de dormancia, al presentarse un factor



estresante como el declive de los nutrientes en el medio durante el crecimiento de los hongos (Feofilova *et al.*, 2012).

Se ha considerado que también la fuente de nitrógeno podría ser un factor que interviene en la viabilidad de las esporas, esto lo observaron Jackson *et al.* (2003) donde evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la sobrevivencia de blastoesporas liofilizadas de *Paecilomyces fumosoroseus* ARSEF 4491 en un medio basal con 80 g L<sup>-1</sup> de glucosa como fuente de carbono y 13.2 g L<sup>-1</sup> de la fuente de nitrógeno a evaluar. Mientras que los rendimientos de esporas fueron equiparables al cabo de 4 días de cultivo a 28 °C en agitación de 300 rpm, no fue así con la sobrevivencia después de ser liofilizadas ya que por una parte los casaminoácidos y el extracto de levadura permitieron una germinación de 82 y 79% respectivamente, el líquido de remojo de maíz sostuvo una sobrevivencia del 44% y el digerido de harina de soya un 38%. Si se desea evaluar el efecto de una fuente de carbono sobre este mismo parámetro, debe tomarse en cuenta utilizar una fuente de nitrógeno que no intervenga en el resultado.

La temperatura es otro factor determinante en la sobrevivencia de las esporas de un hongo a través del tiempo, eso lo demostraron Cliquet & Jackson (2005) quienes almacenaron a 4°C blastoesporas frescas de *Paecilomyces fumosoroseus* 612 en su medio de cultivo o en la solución de glucosa al 2.5%. Al transcurrir 4 semanas, lograron conservar una germinación menor a 30% sin importar los nutrientes del medio de cultivo o si el líquido de almacenado era el propio medio o la solución de glucosa al 2.5% y sin formular; mientras que esporas protegidas por un secado por liofilización no germinaron después de 4 días a 25 °C sin importar los medios de producción o los fluidos de almacén. En ambas pruebas utilizaron las mismas condiciones nutrimentales.

El método de secado podría afectar la vida de anaquel de las esporas producidas. Esto se demostró en el trabajo de Kassa *et al.* (2004) en el cual aplicaron 3 técnicas de secado a esporas de *M. anisopliae* producidas en el medio líquido BH (3% biomalta y 1% extracto de levadura). Después de 24 horas de germinación, las esporas recién cosechadas a las cuales no se les aplicó una



técnica de secado presentaron un porcentaje de sobrevivencia del 98.39% mientras que las secadas por aspersión, liofilización y liofilización con pulverizado revelaron una germinación de 92.66, 66.64 y 36.32% respectivamente.

### 8.5 Trabajos relacionados con el tema

Samaniego (2015) propuso evaluar los efectos de la concentración de carbono y la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de conidias de *P. lilacinus*. El usó 3 diferentes concentraciones de carbono (10, 20 y 30 gL<sup>-1</sup>) “Sacarosa”, mientras que los niveles de la relación C: N fueron 20:1, 30:1 y 40:1, utilizando Urea como fuente de N. Los resultados indicaron una mayor concentración final de conidias 2.1x10<sup>9</sup> en el tratamiento (30 gL<sup>-1</sup>, 40:1), mientras que la concentración final de conidias más baja (3.75x10<sup>8</sup>) se presentó en el tratamiento (10gL<sup>-1</sup>, 40:1), aunque no tuvo una diferencia estadística con el tratamiento (10 gL<sup>-1</sup>, 20:1). El análisis del ANOVA demostró que ambos factores y la relación entre estos dos tienen un efecto directo sobre la concentración final de conidias de *P. lilacinus*.

López *et al.* (2009) obtuvieron resultados variados al aplicar *P. lilacinus* contra *Meloidogyne spp.* en café, en la altura de plantas no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de estos. Las diferencias de peso de la planta se dieron entre los tratamientos con *P. lilacinus*; en el peso de las raíces tampoco observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos; en el número de masas de huevos y número de nemátodos por 100 g suelo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Mert y Dizbay (1977) estudiaron el efecto de la presión osmótica y la salinidad sobre la producción de conidios y el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Paecilomyces lilacinus*, aislados del suelo, se han estudiado en esta investigación. La producción máxima de conidios en ambas especies se observó en el medio nutriente que contenía NaCl al 1%, mientras que el crecimiento máximo se registró en el medio nutriente que contenía NaCl al 3% para *A. niger*. Se ha observado así



que la salinidad y la presión osmótica relacionada con ella afectan el desarrollo reproductivo y vegetativo de ambas especies, y se ha observado que estos efectos son diferentes. La sensibilidad de ambas especies de hongos a la sal también fue investigada. No se observaron conidios en la especie de *P. lilacinus* crecida en medio nutritivo con 5% de NaCl, mientras que el desarrollo conidial tuvo lugar en el caso de *Aspergillus niger* crecido en el medio nutriente que contiene 5% de NaCl.

En estados unidos se diseñó un medio liquido de bajo costo (20 centavos/L) que se componía de una alta concentración de carbono ( $\geq 80 \text{ gL}^{-1}$  de glucosa) suplementado con  $25 \text{ gL}^{-1}$  de harina de semilla de algodón, usado como un sustituto de casaminoácidos, produjo altas concentraciones de blastoesporas de desecación tolerante y viables por 1 año (Jackson, 2012; Mascarín *et al.*, 2015).

Vega *et al.* (2003) evaluaron diferentes concentraciones carbono (glucosa) y tasas de C: N (glucosa y casaminoácidos). Sorpresivamente encontraron que al utilizar una tasa C: N de 1:1 ( $45 \text{ gL}^{-1}$  glucosa y  $45 \text{ gL}^{-1}$  casaminoácidos), todos los hongos obtuvieron sus máximos rendimientos en casi todos los momentos de medición (a los días 2, 4 y 7 después de cultivo). Específicamente, las producciones más eficientes al séptimo día, las consiguieron las cepas ATCC 20874 ( $2.69 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ), ARSEF 6730 ( $2.24 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) y ARSEF 4502 ( $1.3 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) de *P. fumosoroseus* seguidas por *B. bassiana* ATCC 74250 ( $1.23 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Las concentraciones más bajas fueron registradas por *B. bassiana* ARSEF 5460 ( $0.27 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) y *M. anisopliae* ARSEF 4901 ( $0.07 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ).

Cliquet & Jackson (2005) evaluaron el impacto del carbono y nitrógeno en la producción, germinación, tolerancia a la desecación y estabilidad en almacén de blastoesporas de *P. fumosoroseus* después de 4 días de cultivo a 300 rpm y  $28^\circ \text{C}$  en agitación orbital. La mayor producción se obtuvo con los más altos niveles de nitrógeno y carbono ( $13.2$  y  $80 \text{ gL}^{-1}$  de casaminoácidos y glucosa





respectivamente) logrando una cifra de  $8.5 \times 10^8$  blastoesporas  $\text{mL}^{-1}$ . Por otra parte, la segunda mejor producción, de  $5.9 \times 10^8$  blastoesporas  $\text{L}^{-1}$ , fue en el medio con los mismos  $13.2 \text{ g L}^{-1}$  de casaminoácidos, pero la concentración de glucosa fue reducida a  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

Lozano-Contreras *et al.* (2007) emplearon un biorreactor de 5 litros a una agitación de 520 rpm, recuperaron  $2 \times 10^{10}$  blastoesporas  $\text{mL}^{-1}$  de *P. fumosoroseus* después de 72 horas de incubación. El medio de cultivo utilizado está formulado con  $80 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa como fuente de carbono y  $20 \text{ g L}^{-1}$  como fuente de nitrógeno.

Silva *et al.* (2017) evaluó el efecto de *Pochonia chlamydosporia* (*var. Catenulata y chlamydosporia*) y la cepa *Paecilomyces lilacinus* sobre los huevos del nemátodo agallador *Meloidogyne enterolobii* en superficies de agar agua (AA). La reducción en la eclosión de los juveniles del segundo estadio (J2) varió del 13% al 84%, dependiendo de la cepa. Las cepas más efectivas redujeron la incubabilidad de J2 en un 57% a 84% en comparación con los huevos no tratados, pero las reducciones promedio fueron solo del 37% al 55% cuando se aplicaron las mismas cepas a las masas de huevos. Las combinaciones de especies fúngicas (una cepa de cada especie) no aumentaron ni disminuyeron la eficacia del control.

Jackson *et al.* (1997), trabajaron distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y relaciones de carbono: nitrógeno, para producir blastoesporas de *P. fumosoroseus* tolerantes a la desecación. Todos los medios probados soportaron la esporulación en cultivos sumergidos, incrementaron la concentración de blastoesporas ( $5.8 \times 10^3$  esporas/ml) cuando se produjeron en medios conteniendo  $80 \text{ g}$  de glucosa y  $13.2 \text{ g}$  de casaminoácidos, y un alto porcentaje (79%) de las blastoesporas que sobreviven al secado por aire. El medio que contenía  $20 \text{ g}$  de glucosa y concentraciones de casaminoácidos de  $13.2$  a  $40 \text{ g}$ , presentó un incremento en la producción de blastoesporas tolerantes a



desección. Las blastoesporas de *P. fumosoroseus* secadas por aire tienen una LD<sub>50</sub> de 60 y 113 blastoesporas/mm<sup>-3</sup> para *B. argentifolli* en dos bioensayos separados con relaciones (LD<sub>50</sub> *B. bassiana* y LD<sub>50</sub> *P. fumosoroseus*) de 3.9 y 3.8 respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que altas concentraciones de blastoesporas de *P. fumosoroseus* se pueden producir rápidamente en cultivos líquidos, mantener su viabilidad después del secado e infectar y matar a la mosquita blanca.

## **9 Metodología**

La metodología para este estudio se dividió en dos etapas, la primera constará inicialmente en la evaluación de crecimiento y producción de esporas de ambos hongos nematófagos en diferentes medios de cultivo líquidos con la finalidad de encontrar la mejor concentración de blastoesporas. Una vez obtenidos los mejores resultados se procederá a encontrar el inerte en el cual los hongos mantienen una viabilidad prolongada, en esta última etapa, se probarán dos tipos de secado: Por aspersión y tradicional; y a partir de las muestras secadas se encontrarán las condiciones de almacenamiento (temperatura) que permitan la viabilidad de las cepas.

### **9.1 Materiales**

#### **9.1.1 Material biológico**

Las cepas de hongos nematófagos utilizadas en el presente trabajo fueron *Paecilomyces lilacinus* bajo la clave Bk-PI-001 y el hongo nematófago Bk-Pch-001 proporcionados por el centro de biotecnología Biokrone. Para su preservación se realizaron resiembras en placas de agar papa dextrosa (DIFCO, BD®) e incubadas por 120 h a 25 - 30°C y fotoperiodos de 16:8 h en una cámara de crecimiento vegetal Lumistell® ICP-55.



### 9.1.2 Medios de cultivo

Los componentes basales para los medios a evaluar en la producción de blastoesporas de *P. lilacinus*, contienen: Minerales:  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y Metales traza:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , y  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . La dextrosa y la sacarosa fueron las únicas fuentes de carbono que compondrán los medios evaluados y serán agregadas en dos concentraciones (1x y 2x), La fuente de nitrógeno para la producción de blastoesporas y tolerancia a la desecación fueron extracto de levadura, peptona de caseína, peptona de carne y casaminoácidos adicionadas en concentraciones 1x y 2x.

Para el caso de Bk-Pch-001 se basó en un medio ya propuesto en el centro de biotecnología Biokrone. Los componentes basales para los medios a evaluar contienen: Minerales:  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . La sacarosa, dextrosa y almidón modificado 1; fueron los carbohidratos que compondrán los medios a evaluar a una concentración de 1x en el caso de la dextrosa y la sacarosa. La fuente de nitrógeno utilizada fue extracto de levadura a concentraciones de 1 – 2x.

## 9.2 Métodos

### 9.2.1 Preparación del Inoculo

Se efectuaron cultivos en placas de agar PDA por extensión en placa de cada uno de los hongos y posteriormente se incubaron a 25 - 30°C durante 120 h con fotoperiodos de 16:8 h dentro de una cámara de crecimiento vegetal marca Lumistell® ICP-55. El inoculo de los medios líquidos fueron discos de 15 mm de diámetro de agar PDA con esporas de los hongos correspondientes. La concentración del inoculo fue de  $5.6 \times 10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

### 9.2.2 Condiciones de cultivo

Los medios líquidos fueron incubados a 25 - 30°C en una agitadora orbital Lumistell® ISO-45 de 120 - 200 rpm durante 120 h. Después de las 120 h de incubación se realizó un análisis de viabilidad (UFC·mL<sup>-1</sup>) y control de calidad (C.C.) por duplicado en placas de agar PDA y agar nutritivo (AN); y serán



incubadas a 25 - 30°C, 72 h con fotoperiodos de 16:8 h dentro de una cámara de crecimiento vegetal marca Lumistell® ICP-55; y a 37°C durante 24 h en una incubadora Thermo scientific® Heratherm.

### **9.2.3 Descripción morfológica colonial y microscópica de los hongos**

Para la descripción morfológica colonial se procedió a realizar un estriado masivo en placas de agar PDA y luego fueron incubadas de 25 - 30°C con fotoperiodos de 16:8 h dentro de una cámara de crecimiento vegetal marca Lumistell® ICP-55. Las placas fueron monitoreadas cada 12 h.

La descripción microscópica de *P. lilacinus* se hizo mediante tinciones con azul de lactofenol; para esto se tomó una muestra de una colonia (de las placas monitoreadas) mediante un pedazo de cinta adhesiva transparente y se colocó sobre un portaobjetos que contiene colorante azul de lacto fenol. La muestra fue observada con ayuda de un microscopio compuesto Leica® DME usando el objetivo de 40x.

### **9.2.4 Secado**

#### **9.2.4.1 Secado Tradicional**

Una vez obtenidos los medios con la mayor concentración de blastoesporas de los hongos se procedió a secar de manera tradicional; para esto se utilizaron charolas de aluminio con una cubierta de papel aluminio estériles, ahí se colocó el medio líquido y el soporte (o inerte) en relación 1:1.5 (v/w) respectivamente. Una vez agregado se mezcló hasta dejar homogéneo y se dejó secando en una campana de flujo laminar horizontal TecnoLab® BFM-126 durante 45 h aproximadamente. Las muestras secas fueron maceradas mediante un pistilo de mortero y depositadas en bolsas herméticas Ziplock de 125-250 g debidamente rotuladas.



### **9.2.4.2 Secado por Aspersión**

Para esta actividad se empleo un secador por aspersión marca Buchi B-290. Las condiciones de operación del aire de secado fueron de: 80 - 110°C (entrada) y 50 - 80°C (salida); la velocidad de flujo a usar fue de 5 - 10 mL/min. Para evitar daños al equipo los inertes empleados tuvieron que ser a base de almidones. Los microorganismos utilizados en este estudio se cultivaron principalmente en medios líquidos y luego del tiempo de incubación a las condiciones establecidas, se procedió a verter en esterilidad; el medio y el inerte sobre un frasco de vidrio y agitador magnético.

### **9.2.5 Condiciones de almacenamiento**

Las muestras secadas por ambos métodos fueron colocadas dentro de otra bolsa Ziplock de 1 Kg y almacenadas a 4°C en un cuarto frio y a 25°C depositadas en un estante.

### **9.2.6 Evaluación de los parámetros de vida de anaquel.**

El parámetro de vida de anaquel a evaluar únicamente fue el de viabilidad, mediante  $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ , para esto se pesaron aproximadamente 0.1 g de muestra sólida y se deposito en tubos para micro centrífuga de 1.5 mL que contienen 0.9 mL de agua estéril (Dilución madre), posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se agregaron 20  $\mu\text{L}$  en placas con agar PDA por duplicado realizando una extensión con varilla Drigalsky de acero inoxidable para luego ser incubadas a 25°C - 30°C durante 72 h con fotoperiodos de 16:8 h dentro de una cámara de crecimiento vegetal marca Lumistell® ICP-55. También se realizo un control de calidad a las muestras, donde se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de la dilución madre a la placa de agar nutritivo (AN) por duplicado e incubadas por 37°C durante 24 h en una incubadora Thermo scientific® Heratherm.

### 9.2.7 Diseño experimental

El diseño experimental consto de un diseño screening o de cribado donde se pretendió identificar los factores más importantes en el proceso, en este caso, la estabilidad de los hongos al paso del tiempo.

Cuadro 1. Medios de cultivo

Medio	Tipo de fuente de carbono	Concentración fuente carbono	Tipo de fuente de nitrógeno	Concentración fuente de nitrógeno	Microorganismo
SE	Sacarosa	1x	Ext. Levadura	1x	<i>P. lilacinus</i>
SEm	Sacarosa	1x	Ext. Levadura	2x	<i>P. lilacinus</i>
PCD1	Dextrosa	2x	Peptona de Carne	2x	<i>P. lilacinus</i>
PCD2	Dextrosa	2x	Peptona de Caseína	2x	<i>P. lilacinus</i>
CAD	Dextrosa	2x	Casaminoácidos	2x	<i>P. lilacinus</i>
SEAP	Sacarosa	1x	Ext. Levadura	1x	Bk-Pch-001
DEAPm	Dextrosa	2x	Ext. Levadura	2x	Bk-Pch-001

Cuadro 2. Estabilidad del ingrediente activo

Inerte	Niveles Temperatura Almacenamiento (°C)
Inerte mineral (IMC)	25
	4
Almidón modificado 1 (AM1)	25
	4
Almidón modificado 2 (AM2)	25
	4
Tierra de diatomeas (TD)	25
	4
Mezcla de inertes (MI)	25
	4



## 10 Resultados

### 10.1 Evaluación del medio de cultivo líquido en la producción de esporas

El hongo *P. lilacinus* es un excelente controlador biológico usado principalmente para el manejo de nemátodos fitoparásitos. Este hongo se caracteriza por parasitar estadios de huevos con la ayuda de la formación de micelio (Anastasiadis *et al.*, 2008; Fernández-Santillán *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017). Sin embargo, este micelio se forma a partir de los conidios presentes cerca del organismo a infectar. Por ende, para tener una buena efectividad en el proceso de supresión de plaga, es muy importante contar con altas concentraciones de conidios para la aplicación. Se ha descubierto que la cantidad de nitrógeno disponible para la nutrición del hongo afecta directamente sobre el desarrollo micelial. Sin embargo, es importante resaltar que el tipo y concentración de fuentes de carbono y nitrógeno disponibles en el sustrato afecta de forma directa en la producción de conidióforos y por ende de conidias (Samaniego, 2015; Jaronski, 2013).

El medio basal empleado en el presente trabajo fue el propuesto por Jackson *et al.* (1997), las modificaciones a ese medio, como el tipo y concentración de fuentes de carbono y nitrógeno, llevaron a la producción de esporas vegetativas “blastoesporas” en la mayoría de los medios que se diseñaron. Durante la evaluación de los medios para la producción de esporas de Bk-PI-01 se obtuvo que los mejores medios para el desarrollo de la cepa fue el medio CAD, SE y el PCD2 alcanzando una concentración promedio de  $1.78 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>,  $1.18 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> y  $1.49 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> respectivamente (Cuadro 3). Sin embargo, las características morfológicas de las esporas producidas en el medio SE son las parecidas a conidios aéreos, en comparación a las esporas del medio PCD2, que se caracterizan por tener forma de blastoesporas o de “levadura”, mientras que el medio CAD resulta difícil de preparar ya que la fuente de nitrógeno es esterilizada por filtración haciendo de este un medio poco convencional. Según Jaronski (2013), los medios empleados en la producción

masiva de hongos entomopatógenos deben ser simples en su preparación (para no incrementar los costos de producción y permitir su escalamiento en reactores de mayor capacidad), por lo que el medio PCD2 se siguió empleando para la producción de este propágulo.

**Cuadro 3 - Producción de esporas de *P. lilacinus* en medios de cultivo líquido**

Medio	Tipo de fuente de carbono	Concentración fuente carbono	Tipo de fuente de nitrógeno	Concentración fuente de nitrógeno	Concentración de esporas ( $\times 10^7$ UFC·mL <sup>-1</sup> ) $\pm$ (DE $\times 10^7$ UFC·mL <sup>-1</sup> )
SE	Sacarosa	1x	Ext. Levadura	1x	1.18 $\pm$ 0,24
SEm	Sacarosa	2x	Ext. Levadura	2x	0.47 $\pm$ 0,25
PCD1	Dextrosa	2x	Peptona de Carne	2x	0.51 $\pm$ 0,19
PCD2	Dextrosa	2x	Peptona de Caseína	2x	<b>1.49<math>\pm</math>0.036</b>
CAD	Dextrosa	2x	Casaminoácidos	2x	<b>1.78<math>\pm</math>0.78</b>

**Cuadro 4. Producción de esporas de Bk-Pch-001 en medios de cultivo líquido**

Medio	Tipo de fuente de carbono	Concentración fuente carbono	Tipo de fuente de nitrógeno	Concentración fuente de nitrógeno	Concentración de esporas ( $\times 10^8$ UFC·mL <sup>-1</sup> ) $\pm$ (DE $\times 10^8$ UFC·mL <sup>-1</sup> )
SEAP	Sacarosa	1x	Ext. Levadura	1x	0.026 $\pm$ 0,005
DEAPm	Dextrosa	2x	Ext. Levadura	2x	<b>1.22<math>\pm</math>0.55</b>

Anteriormente se habían realizado experimentos evaluando el impacto del carbono y nitrógeno en la producción, germinación, tolerancia a la desecación y estabilidad en almacén de blastoesporas de *P. fumosoroseus* después de 4 días de cultivo a 300 rpm y 28 °C en agitación orbital. La mayor producción se obtuvo con los más altos niveles de nitrógeno y carbono (13.2 y 80 g·L<sup>-1</sup> de casaminoácidos y glucosa respectivamente) logrando una cifra de 8.5 $\times 10^8$  blastoesporas·mL<sup>-1</sup>. Por otra parte, la segunda mejor producción, de 5.9 $\times 10^8$  blastoesporas·mL<sup>-1</sup>, fue en el medio con los mismos 13.2 g·L<sup>-1</sup> de casaminoácidos, pero la concentración de glucosa fue reducida a 8 g·L<sup>-1</sup> (Cliquet & Jackson, 2005). Estos resultados son mayores a los obtenidos, sin embargo, los autores manejan la adición de vitaminas y condiciones diferentes a las utilizadas, lo que permite el incremento en la producción de esporas.

Por otra parte, la modificación al medio ya establecido en la producción de Bk-Pch-001, llevo al incremento de la concentración de esporas, este aumento de





la concentración fue provocado por el tipo e incremento en su fuente de carbono (Cuadro 4), también se pudo percatar que la modificación en algunas condiciones de crecimiento no afecta de forma agresiva a la cepa y permite una mayor concentración de esporas.

## 10.2 Descripción morfológica

La morfología de *P. lilacinus* fue realizada en placa Petri con agar papa dextrosa (PDA), una de las características principales de la cepa, es su crecimiento radial, lo que facilita su recuento en placa. Las colonias de este hongo tienen tendencia a cubrir toda la placa e inicialmente presentan una coloración blanca, y con el tiempo se va haciendo ligeramente grisácea, al final de un desarrollo considerable adquiere una tonalidad lila opaco (Figura 7). La superficie de las colonias es acuminada-flocosa y de textura aterciopelada (Figuras 7 y 8). El reverso de la placa presenta una coloración ligeramente amarilla. Cabe resaltar que las características de las colonias variaron dependiendo del tipo de agar empleado, en nuestro caso únicamente se realizó en PDA, pero en 2 presentaciones de la marca Becton- Dickinson® (Figura 7).

El micelio normalmente presenta una estructura lisa, hialina, no septada. Los conidios producidos en medios líquidos presentaron la forma de levadura (Blastoesporas) de apariencia hialina (Figura 8).



Figura 6. Morfología macroscópica de *P. lilacinus* en placas PDA

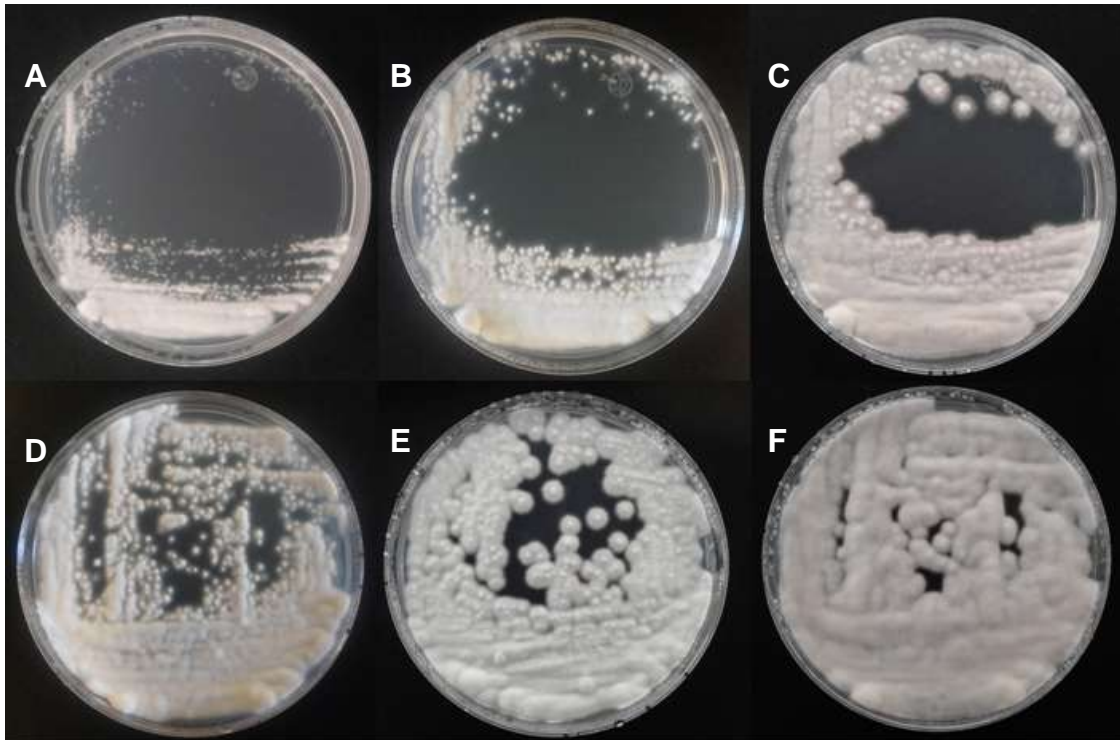


Figura 7. Morfología macroscópica de *Paecilomyces lilacinus*; A) 24 h, B) 36 h, C) 48 h, D) 60 h, E) 72 h, F) 84 h.

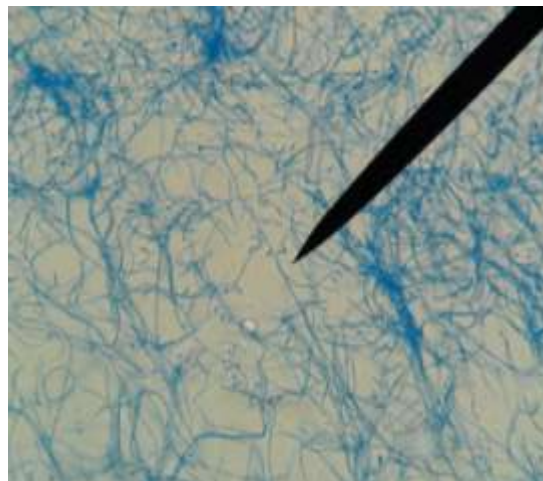


Figura 8. Morfología microscópica de *Paecilomyces lilacinus* en 40x



### 10.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de *P. lilacinus*

Para este experimento se eligió al azar “almidón modificado 2” como inerte para su secado y posterior al secado se almacenó a 25 y 4°C, los resultados mostraron que empleando el medio PCD2 se logra alcanzar una viabilidad de  $8.06 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> y  $6.21 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> respectivamente al paso de 7 semanas en comparación a las muestras donde se utilizaron medios de cultivo diferentes (PCD1 y SEm). Las esporas producidas con los medios PCD1 y SEm presentan una decaída que oscila en el orden 4 y 5 (Según la temperatura de almacenamiento) (Cuadro 5). Por otra parte, basándonos en la producción de esporas en PCD2, y las condiciones de almacenamiento, se puede decir que la temperatura de almacenamiento no afecta drásticamente en la viabilidad de la cepa.

Dicha afirmación se evidenció por Garza-Pérez (2014), el cual después de secar sus muestras y almacenarlas a 4 y 26°C, encontró que las cepas mantenían una viabilidad superior al 47% después de 4 meses de almacenamiento, el autor relaciona lo anterior, al uso de altas concentraciones de fuente de carbono, las cuales permiten al microorganismo almacenar reservas endógenas al momento de ser desecadas (Feofilova *et al.*, 2012). El motivo por el cual este tipo de microorganismo sobrevive en ambas temperaturas, puede referirse a que muchos autores comprueban que la temperatura de almacenamiento adecuada y que presenta mejores porcentajes de viabilidad y de germinación es a los 4°C (Jackson *et al.*, 1997; Cliquet & Jackson, 2005; Lozano-Contreras *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008). Sin embargo, Carrillo-Pérez *et al.* (2013), expone el hecho de que los microorganismos que se localizan en zonas tropicales y subtropicales están expuestos a temperaturas superiores y por lo tanto estarían más acostumbrados a 26°C que a 4°C. Para comprobar dicha hipótesis, los investigadores sometieron a *Isaria fumorosea* (*P. fumosoroseus*), recién cosechadas en un medio líquido que contenía 50 g·L<sup>-1</sup> de dextrosa; a 30, 34, 38 y 42°C por 30 min, siendo que aun a 38°C cerca del 80% de esporas lograron sobrevivir a este tratamiento.



Cuadro 5. Estabilidad de esporas de *P. lilacinus* frente a la temperatura de almacenamiento

Medio	Temperatura Almac. (°C)	Viabilidad ( $\times 10^5$ UFC·g <sup>-1</sup> )							
		Semana							
		0	1	2	3	4	5	6	7
PCD1	25	5.00	4.50	1.28	0.58	0.72	0.56	0.11	0.81
	4	5.00	1.50	6.59	1.66	2.14	2.23	0.97	0.25
PCD2	25	15.00	37.50	18.80	10.90	16.80	12.60	10.40	8.06
	4	22.50	24.70	17.80	8.82	4.34	9.81	5.87	6.21
SEm	25	5.00	1.00	5.04	0.65	0.45	0.90	0.26	0.64
	4	5.00	1.00	4.32	1.71	1.91	1.93	2.41	1.12

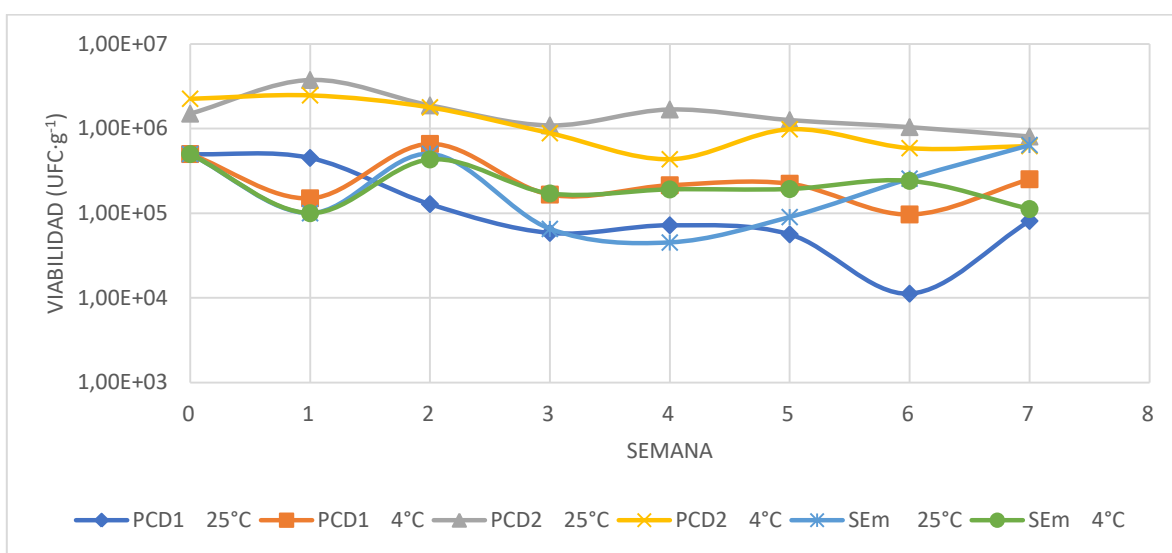


Gráfico 1. Comportamiento de la viabilidad de esporas de *P. lilacinus* frente a la temperatura de almacenamiento

#### 10.4 Evaluación del secado por aspersión y tradicional de los hongos *P. lilacinus* y Bk-Pch-001 empleando diferentes inertes

Los resultados de la evaluación de los métodos de secado para *P. lilacinus* y Bk-Pch-001, demostraron que las blastoesporas de *P. lilacinus* no soportaron la desecación por el método por aspersión, el método fue probado con varios inertes, pero todas las muestras mostraban bajo % de supervivencia. Según Garza-Pérez (2014), el método de secado podría afectar la estabilidad de las esporas que se desean almacenar ya que de ser muy agresivo disminuiría considerablemente la



sobrevivencia de estas. El método de secado por aspersión se considera una de las principales técnicas de secado industrial de microorganismos; este procedimiento es crítico, si no se conocen los parámetros del secado y los protectores para ello, pues elimina al instante la mayoría de la humedad de la muestra sometiendo a un estrés hídrico a los microorganismos, y las altas temperaturas aplicadas harían perder esa característica de termo tolerancia de las blastoesporas. Kassa *et al.* (2004) menciona que, sin los protectores adecuados durante el secado por aspersión de los microorganismos, como *M. anisopliae* o *B. bassiana*, resulta en la pérdida total de la viabilidad de estos hongos.

Otra opción es la aplicación del secado gradual a temperatura ambiente (Secado tradicional), siendo que representa un factor importante para los altos porcentajes de sobrevivencia observados en algunos casos. La supervivencia de las esporas justo después del tratamiento de secado es variable según los diferentes métodos aplicados a un mismo hongo (Garza-Pérez, 2014). Lo antes mencionado, se explica cuando se procede a secar *P. lilacinus* y Bk-Pch-001 con diferentes inertes, como tierra de diatomeas, mezcla de varios inertes, almidón modificado 1, almidón modificado 2 y un inerte mineral a base de caolín empleando el secado tradicional; Después de 6 semanas de almacenamiento se obtuvo una viabilidad máxima para *P. lilacinus* usando la Mezcla de inertes de  $1.29 \times 10^8$  UFC·g<sup>-1</sup> (25°C) y  $4.48 \times 10^7$  UFC·g<sup>-1</sup> (4°C) y de 0 UFC·g<sup>-1</sup> (25°C) y  $3.02 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> (4°C) usando tierra de diatomeas (resultados más representativos)(Cuadro 6). Los resultados obtenidos pueden sugerir que el inerte empleado para el secado es otro factor que afecta a la viabilidad de las cepas cuando se almacenan a diferentes temperaturas, para este caso y como se puede observar de los resultados (Cuadro 6); la viabilidad de *P. lilacinus* es más estable solo sí, se utiliza la mezcla de inertes y se almacena a temperatura ambiente (25°C) o cuando se usa tierra de diatomeas y se almacena a 4°C, estas observaciones en la viabilidad tiene que ver con las características fisicoquímicas de los inertes y por lo tanto es la causante de la variación.

En pocas investigaciones se hace referencia al uso de almidones para el secado de hongos, ya que generalmente se emplean otros inertes como: caolín,



tierra de diatomeas, ceniza y cascaras de soja, maíz y café. Varios autores mencionan algunas características de estos inertes, como la tierra de diatomeas, la cual mencionan es el soporte más utilizado (Batta, 2008; Jackson *et al.*, 1997; Sandoval, 2001; Lozano-Contreras *et al.*, 2007) y que existe naturalmente, formada por restos fosilizados de diatomeas (algas unicelulares acuáticas), donde uno de los principales componentes es el dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) y pequeñas cantidades de minerales como aluminio, óxido de hierro, hidróxido de calcio, magnesio y sodio (Round *et al.*, 1990), el cual ha mostrado un efecto sinérgico con el hongo, pues es un soporte muy abrasivo a la cutícula del insecto, lo que permite el contacto hongo-hospedero (Batta, 2008). El caolín ha sido otro inerte empleado para la desecación de hongos entomopatógenos, como lo demuestra Sandoval (2001), donde muestra la viabilidad inicial de muestras secas de blastoesporas obtenidas en el medio LM 1 (medio basado en Jackson *et al.*, 1997) y mezclados con los diferentes soportes, mostraron que con el soporte Surround (Caolin 5%) en sus tres concentraciones, la viabilidad fue superior al 95%; con tierra de diatomeas del 69%; del 55 a 68% con los tres diferentes talcos; con fécula de maíz al 7.5, 5 y 2.5 % con el 79 84% de blastoesporas viables, respectivamente; 42% con formulaciones con harina de arroz; y 10% en formulaciones con cal hidratada.

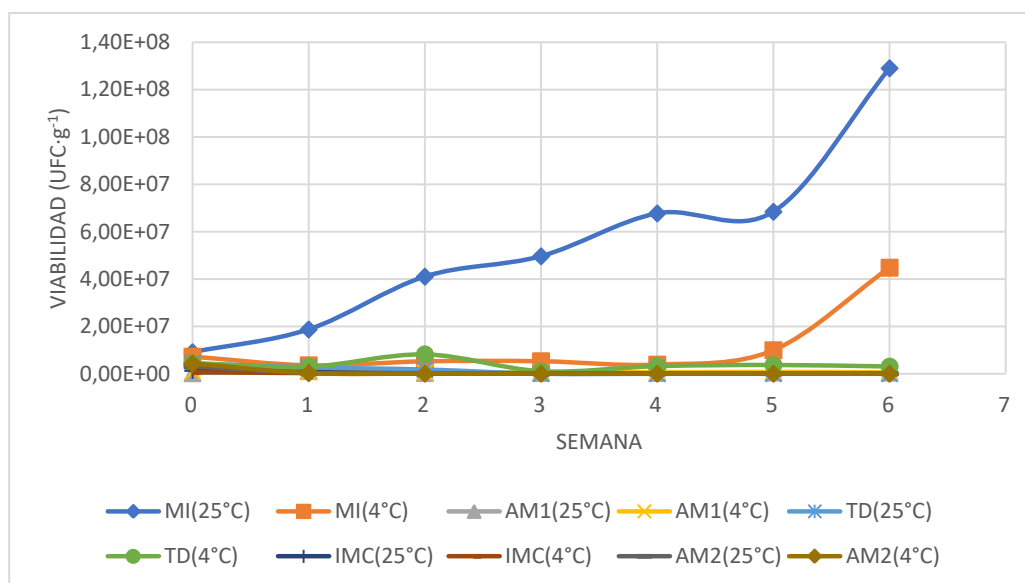
Los resultados muestran que el empleo del inerte mineral a base de caolín y almidón modificado 2, no fueron lo más adecuado para el secado, ya que después de 3 semanas aproximadamente, se observa la decaída completa de la viabilidad de las blastoesporas de *P. lilacinus* (Cuadro 6). Esto puede explicarse ya que, durante el secado tradicional, existen otros factores como la humedad relativa.

Estudios anteriores mostraron que la humedad relativa del secado al aire puede tener impacto sobre la estabilidad al almacenaje de blastoesporas secadas de *P. fumosoroseus*. Las blastoesporas secadas de *P. fumosoroseus* con una humedad relativa (>50%) mejoró su estabilidad al almacenamiento (Jackson & Payne, 2007). Como estos estudios de secado se realizaron en una cámara de flujo laminar bajo condiciones ambientales, es posible que estas preparaciones estuvieran sujetas a condiciones de humedad relativa muy baja y el proceso de secado fue muy rápido lo cual afectó la viabilidad de las blastoesporas.



**Cuadro 6. Evaluación del método e inertes de secado en la vida de anaquel de las esporas de *P. lilacinus***

Semana	Viabilidad ( $\times 10^5$ UFC·g <sup>-1</sup> )									
	MI		AM1		TD		IMC		AM2	
	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C
0	90.90	72.20	2.47	9.00	44.30	43.60	12.50	5.85	30.00	43.00
1	187.00	35.70	11.70	6.43	26.90	29.40	6.50	2.23	3.25	2.36
2	410.00	52.60	3.37	4.72	18.00	81.70	0	0.09	0.05	0.135
3	496.00	52.90	3.49	4.88	0.382	10.20	0	0	0	0.067
4	677.00	38.70	3.46	6.21	0	31.60	0	0	0	0
5	684.00	99.40	5.26	7.58	0	36.70	0	0	0	0
6	1290.00	448.00	4.68	5.92	0	30.20	0	0	0	0



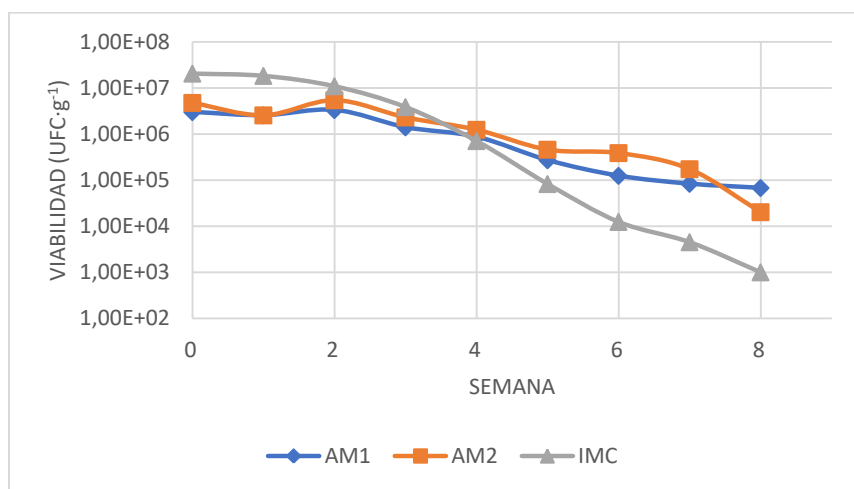
**Gráfico 2. Estabilidad de las esporas de *P. lilacinus* secadas por el método tradicional**

Bk-Pch-001 resulto ser un sujeto de estudio bastante apto, desde la producción en medios líquidos hasta su secado tradicional con inertes como ambos almidones modificados y el inerte mineral a base de caolín. Las esporas de este hongo mostraron una viabilidad (durante las 8 semanas que fueron muestreados) de  $0.675 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup>,  $0.202 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> y  $0.01 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> respectivamente (Gráfico 2).



**Cuadro 7. Estabilidad de las esporas de *Bk-Pch-001* secadas por método tradicional en 3 inertes diferentes**

Viabilidad ( $\times 10^5$ UFC·g <sup>-1</sup> )			
Semana	AM1	AM2	IMC
0	30.00	47.50	205.00
1	25.50	25.50	183.00
2	33.20	54.20	109.00
3	14.00	23.00	38.50
4	8.66	12.40	7.06
5	2.70	4.59	0.824
6	1.24	3.87	0.124
7	0.832	1.73	0.045
8	0.675	0.202	0.01



**Gráfico 3. Estabilidad de las esporas de *Bk-Pch-001* secadas por el método tradicional**

### 10.5 Evaluación del secado tradicional y por aspersión del hongo *Bk-PI-001* cuando es secada junto con el hongo *Bk-Pch-001*.

Durante la evaluación del secado por aspersión de *P. lilacinus* cuando es secada junto con *Bk-Pch-001*, se demostró que mantiene una vida de anaquel superior a los dos meses (Cuadro 9), comparada cuando solo *P. lilacinus* es secada por el mismo método. Este resultado hace referencia a lo mencionado por Kassa *et al.* (2004), siendo que, *Bk-Pch-001* funcionó como el agente protector de *P. lilacinus*, y a su vez el inerte empleado sirvió de protector de *Bk-Pch-001*. Sin embargo, la viabilidad de *P. lilacinus* baja un orden respecto a su viabilidad (en medio líquido) antes del secado (Cuadro 8).





**Cuadro 8. Concentración de esporas de ambos hongos en medio líquido antes del secado**

Medio	Concentración (x10 <sup>7</sup> UFC·mL <sup>-1</sup> )
PCD2	1.45
SEAPm	3.68

La mezcla de inertes tiene una composición tal que permite su aplicación para ambos métodos de secado, y ofrece ciertas características propias de su composición, como la maltodextrina la cual, por sus propiedades, ayudan en el almacenamiento y conservación; y por su consistencia, permite realizar una encapsulación y fácil homogenización. Estas y otras características de las maltodextrinas, favorecen la recuperación de los productos ya que este es un coadyuvante en la producción y en el mejoramiento de los suelos (Bryshila *et al.* 2012; Rodríguez-Rodríguez, 2013); Por otro lado, los almidones ayudan con la formación de biopelículas degradables, lo que permite la supervivencia y homogenización después del secado. Estas características son las que ayudaron a que la mezcla de estos inertes fuese uno de los que mejores resultados presentaron.

**Cuadro 9. Evaluación del secado por aspersión de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 empleando la mezcla de inertes (PCD2, SEAPm)**

Semana	Viabilidad (x10 <sup>6</sup> UFC·g <sup>-1</sup> )		
	Bk-PI-001	Bk-Pch-001	Total
0	3.17	21.50	24.70
1	1.29	34.40	35.70
2	1.25	29.80	31.0
3	2.15	28.00	30.10
4	6.15	16.30	16.90
5	1.18	21.50	22.50
6	0.675	13.70	14.20
7	1.14	20.50	21.70
8	0.51	13.40	13.90
9	0.048	2.01	2.06
10	0.119	4.08	4.20

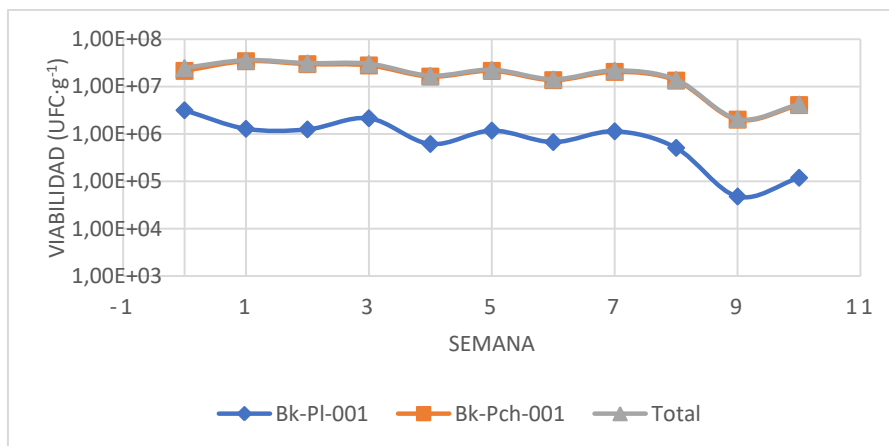
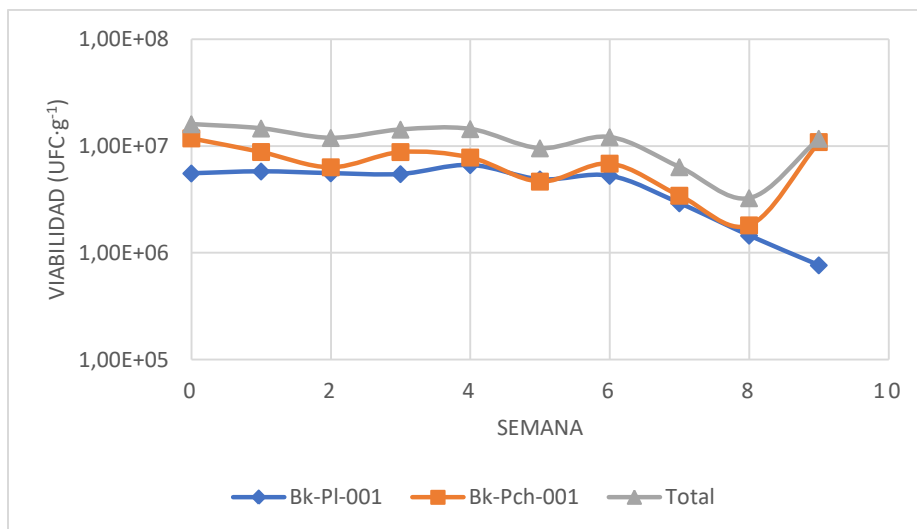


Gráfico 4. Estabilidad de las esporas de *P. lilacinus* y Bk-Pch-001 secadas por aspersión

El mismo experimento se repitió, pero utilizando diferentes medios de cultivo antes del secado, lo cual condujo a que se obtuvieran concentraciones similares de ambos hongos, esto puede deberse a la relación de medio líquido empleada para el secado, que para este caso fue una relación (3:1 v/v).

Cuadro 10. Evaluación del secado por aspersión de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 empleando la mezcla de inertes (PCD1, PCD2, SEm, SEAP)

Semana	Viabilidad (x10 <sup>6</sup> UFC·g <sup>-1</sup> )		
	Bk-PI-001	Bk-Pch-001	Total
0	5.54	11.80	16.00
1	5.78	8.80	14.60
2	5.56	6.33	11.90
3	5.46	8.79	14.25
4	6.63	7.81	14.40
5	4.87	4.65	95.20
6	5.26	6.85	12.10
7	2.91	3.43	6.34
8	1.45	1.81	3.25
9	0.765	10.90	11.70



**Gráfico 5. Comportamiento de la estabilidad de las esporas de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 secadas por aspersión**

Los dos hongos fueron secados por el método tradicional, la viabilidad inicial después del secado sugiere que la humedad relativa estuvo debajo del 50% (Jackson & Payne, 2007), lo que afectó en la desecación de las esporas de ambos hongos. Sin embargo, se puede notar el mismo comportamiento cuando son secadas conjuntamente. El secado de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 obtuvo una viabilidad máxima total (después de 6 semanas) de  $3.50 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> cuando se usa tierra de diatomeas y es almacenada a 4°C, con la mezcla de inertes alcanzó una viabilidad de  $1.27 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> y es almacenada a 25°C; y de  $1.44 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> y es almacenada a 4°C, y una viabilidad total de  $1.82 \times 10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> empleando almidón modificado 1 y almacenándolo a 25°C.

**Cuadro 11. Evaluación del secado tradicional de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 3empleando inertes diferentes**

		Viabilidad ( $\times 10^5$ UFC·g <sup>-1</sup> )					
Semana	Cepa	MI		AM1		TD	
		25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C
0	Bk-PI-001	9.00	9.67	1.35	1.57	0.45	1.35
	Bk-Pch-001	6.97	11.70	0.90	0.45	36.40	60.50
	<b>Total</b>	<b>15.97</b>	<b>21.40</b>	<b>2.25</b>	<b>2.02</b>	<b>36.90</b>	<b>61.90</b>
1	Bk-PI-001	5.60	9.79	2.36	1.39	0.090	0.45
	Bk-Pch-001	5.76	7.13	0.81	0.337	40.80	40.30
	<b>Total</b>	<b>11.40</b>	<b>16.9</b>	<b>3.17</b>	<b>1.73</b>	<b>40.90</b>	<b>40.80</b>



2	Bk-PI-001	5.78	4.95	9.67	8.55	11.90	33.30
	Bk-Pch-001	8.44	9.02	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>14.20</b>	<b>13.90</b>	<b>9.67</b>	<b>8.55</b>	<b>11.90</b>	<b>33.30</b>
3	Bk-PI-001	1.66	3.44	0.79	0.562	0.65	0.72
	Bk-Pch-001	3.94	9.43	0.45	0.315	1.26	25.30
	<b>Total</b>	<b>5.60</b>	<b>12.90</b>	<b>1.24</b>	<b>0.877</b>	<b>1.91</b>	<b>26.00</b>
4	Bk-PI-001	1.53	6.82	0.945	1.48	0.022	0.38
	Bk-Pch-001	5.04	8.10	0.675	0.495	0	49.20
	<b>Total</b>	<b>6.57</b>	<b>1.49</b>	<b>1.62</b>	<b>1.98</b>	<b>0.022</b>	<b>49.60</b>
5	Bk-PI-001	1.98	2.68	1.46	0.787	0.067	1.57
	Bk-Pch-001	5.49	4.01	0.36	0.292	0.045	40.00
	<b>Total</b>	<b>7.47</b>	<b>6.68</b>	<b>1.82</b>	<b>1.08</b>	<b>0.112</b>	<b>41.60</b>
6	Bk-PI-001	4.14	5.53	0.247	1.10	0	0.315
	Bk-Pch-001	8.57	8.86	0.225	0.72	0	34.70
	<b>Total</b>	<b>12.70</b>	<b>14.40</b>	<b>0.472</b>	<b>1.82</b>	<b>0</b>	<b>35.00</b>

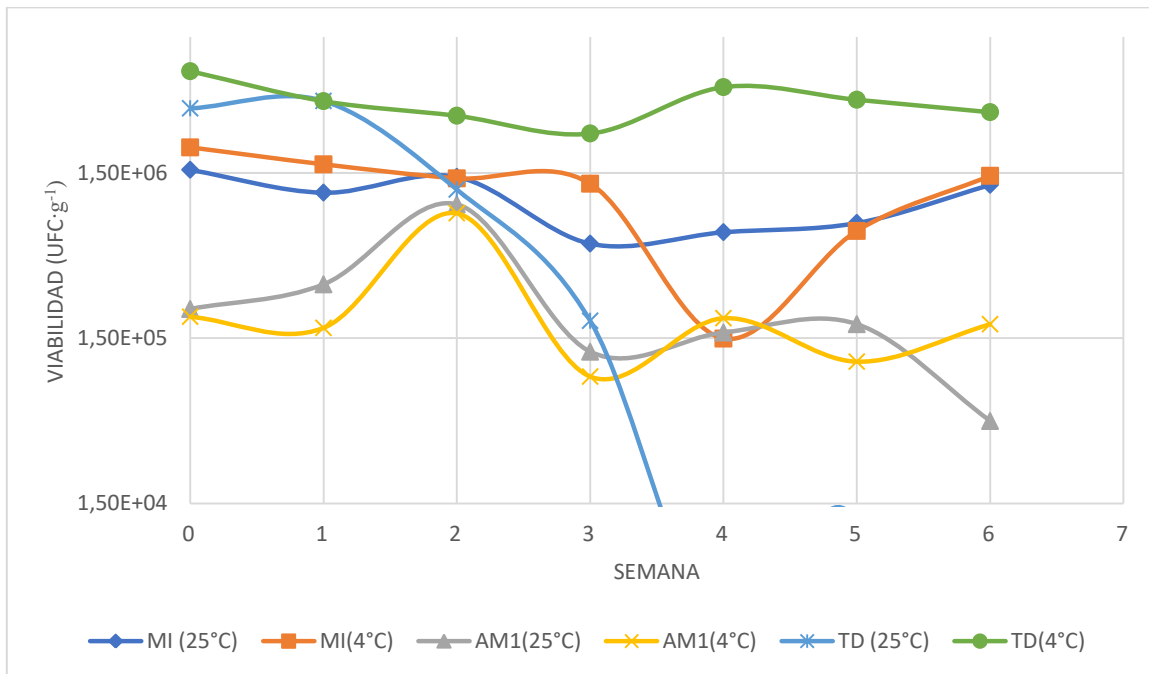


Gráfico 6. Comportamiento de la estabilidad de las esporas de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 secadas tradicionalmente



## 11 Conclusiones

El medio de producción debe proveer un ambiente nutricional que promueva la formación de blastoesporas que les permitan sobrevivir a la desecación y al almacenaje en un estado de sequedad, los medios como PCD2 y CAD fueron los que alcanzaron una producción de 1.49 y  $1.78 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>, siendo los mejores. Sin embargo, una de las dificultades presentadas en la elaboración del medio CAD, fue la adición de la fuente de nitrógeno y vitaminas al medio base, ya que es necesario esterilizar por filtración y no perder sus propiedades, al desnaturalizar aminoácidos y vitaminas termolábiles que contiene, lo que imposibilita su escalamiento a reactores de mayor capacidad e incrementa los costos de producción, aunado a que aumentaría el costo del medio por el precio del reactivo. Por esta razón, el medio PCD2 representa una alternativa óptima en la producción de blastoesporas de *P. lilacinus*.

De la misma manera, los soportes deben proveer una matriz que permita a las blastoesporas adaptarse a los procesos de secado y la proteja de las condiciones nocivas durante el almacenaje. Se demostró que la mezcla de inertes se puede utilizar para secar blastoesporas de *P. lilacinus* por ambos métodos, aunado a que esta mezcla de inertes le confiere ciertas características al ingrediente activo, siendo por ello necesario un mejoramiento en la estabilidad de almacenado, si, estos procesos se van a utilizar para la producción comercial de estos hongos como bionematicidas. Los estudios dirigidos a optimizar los medios nutritivos y las condiciones de secado de blastoesporas de *P. lilacinus* se deben continuar y con esto ayudar a mejorar la tolerancia a la desecación y su estabilidad durante el almacenamiento.



## **12 Perspectivas**

Se debe de optimizar las fuentes de nitrógeno en la producción de esporas de *P. lilacinus*, ya que otro tipo de recurso podría resultar en costos bajos de producción o en mejores concentraciones de blastoesporas.

Se debe hacer la optimización del proceso de producción evaluando temperatura, agitación, pH y tiempo de fermentación en el reactor de tanque agitado (5 L) controlando estrictamente dichas variables.

A la vez, se debe probar otros métodos de secado u optimizar los ya establecidos con la finalidad de no perder la viabilidad después del secado.

Se debe de utilizar otros tipos de inertes orgánicos que fueron el producto secundario en otros procesos, como la utilización de cascaras de arroz, trigo, maíz o soya, lo que podría optimizar la estabilidad de las blastoesporas de *P. lilacinus*.

Se debe evaluar otros parámetros de vida de anaquel, como el % de germinación y % de viabilidad, que haría más específica la información obtenida y que muchos autores manejan.

Así también, se debe probar otros tipos de formulaciones que permitan mejorar la estabilidad del bionematicida.



### **13 Competencias desarrolladas**

- Trabajar bajo un Sistema de Gestión de Calidad (ISO 9001:2017) y Ambiental (ISO 14001:2015)
- Desarrollo de competencias en equipo para la ejecución de un proyecto de innovación procedente de la cartera de productos Biokrone.
- Laborar en un laboratorio en proceso de acreditación en la Norma ISO 17025:2017
- Operación de sistema biorreactores de tanque agitado de 7 L de la marca holandesa Applikon.
- Aplicación de métodos normalizados para la cuenta de microorganismos viables en productos agrobiológicos (NOM 092 SSA 1994, NOM 112 SSA 1994)
- Estandarización en producción y métodos de secado de hongos benéficos utilizados para el control biorracional de plagas que afectan cultivos de interés económico
- Capacitación en manejo de Residuos sólidos y primeros auxilios.



## 14 Referencias

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. In: Agrios G.N. (5<sup>th</sup> Ed.), Elsevier. Academic Press. 734-749 p.
- Almeida, E. J., and Santos, J. M. (2011). Ocurrencia de *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, en municipio de Uberlandia, Minas Gerais, Brasil. *Bioscience Journal* (27), 877–878.
- Anastasiadis, I.A., Giannakou, I.O., Prophetou-Athanasiadou, D.A, Gowen, S.R. (2008). The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Elsevier* (27), 352-361.
- Andersen, M., Magan, N., Mead, A., Chandler, D., (2006). Development of a population-based threshold model of conidial germination for analyzing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. *Environ. Microbiol.* 8, 1625–1634.
- Andreu-Rodríguez, C. M. y Gómez-Sousa J. R. (2008). Sanidad vegetal. Cuba. 113-129 p.
- Athman, S. Y. (2006). Host-endophyte-pest interactions of endophytic *Fusarium oxysporum* antagonistic to *Radopholus similis* in banana *Musa* spp. University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, South África, 383 p.
- Barrón, G. L. (2005). The nematode-destroying fungi topics in Mycobiology. *Canadian Biological Publications Ltd.* (140 p), Guelph. Canada.
- Batta, Y.A. (2008). Control of Main Stored-Grain Insects with New Formulations of Entomopathogenic Fungi in Diatomaceous Earth Dusts. *International Journal of Food Engineering* (4), 8-10.
- Bateman, R., Carey, M., Moore, D., Prior, C. (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann. Appl. Biol.* (122), 145–152 pp.
- Brand, D., Soccol, C., Sabu, A., y Roussos, S. (2010). Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Micologia Aplicada Internacional* (1:22), 31-48.
- Bryshila, L., González, C., Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de ciencias y tecnología de alimentos*.





Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V., Eilenberg, J., (2014). Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu. Rev. Entomol.* (59), 467–485.

Butt, T.M., Goettel, M.S., (2000). Bioassays of entomogenous fungi. Navon, A., Ascher, K.R.S. (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (pp. 141–195). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.

Cliquet, S. & Jackson, M.A. (2005). Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 204 - 210.

Cano, M. (2011). Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: *Trichoderms spp.*, *Paecilomyces spp.* y *Pseudomonas spp.* U.D.C.A. *Actualidad y Divulgación Científica* (14), 15-31.

Cantuña, N. (2013). Detección e identificación del nemátodo formador de agallas *Meloidogyne spp.* en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR. Universidad de las Fuerzas Armadas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Sangolquí.

Carranza, G. (2014). Evaluación in vitro de la patogenicidad del hongo *Paecilomyces lilacinus*. Universidad Rafael Landívar, 16.

Carrillo-Pérez, E., E. Acosta-Smith, R. M. Montesinos-Cisneros, M. De la Torre (2013). Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (29), 309 - 317.

Carrión, G. y Desgarenes, D. (2011). Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en Nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Rev. Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 86-72 p.

Carneiro, R. M. D. G., Almeida, M. R. A., Braga, R. S., Almeida, C. A., and Gioria, R. (2006). Primer registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de pimiento y tomates resistentes a *Meloidogyne* en el Estado de Sao Paulo. *Nematologia Brasileira* (30), 81–86.

Castillo Ávila, M.L., Medina Medina, J.V. (2014). Control biológico del nemátodo agallador del tomate de mesa *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949; Mediante Aislamientos de hongos nematofagos nativos. (Tesis de grado). Área agropecuaria y de recursos naturales renovables. Universidad Nacional de Loja.

Chitwood, D., y Perry, R. (2009). Reproduction, Physiology and Biochemistry. En R. Perry, M. Moens, y J. Starr (1st Ed.), *Root-knot nematodes* (págs. 182-200). Cambridge, USA.



Chen-Yuan, L., Gao, Y., Zhang, K. & Z. Cheng-Gang. (2013). Autophagy is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan, China. *Source Environmental Microbiology Reports* 5(4), 511-517 pp.

Crosnier, R., Montecinos, G., Jimenez, M. & Gallo, P. (1984). Efectividad de *Paecilomyces lilacinus*, Thom, Samson, en el control de nemátodo cecidógeno, *Meloidogyne incognita*, Chitwood, IDESA, Chile (8), 21-37.

Connick, W.J., Daigle, D.J., Boyette, C.D., and Williams, K.S. (1996), 'Water Activity and Other Factors that Affect the Viability of *Colletotrichum truncatum* Conidia in Wheat Flourkaolin Granules ('Pesta')', *Biocontrol Science and Technology* (6), 277-284.

Duan, W., Yang, E., Xiang, M., Liu, X. (2008). Effect of storage conditions on the survival of two potential biocontrol agents of nematodes, the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. *Biocontrol Sci Techn* 18(6), 613-620.

Elósegui, O. (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Cuba. 61 p.

Elzein A, Kroschel J, Muller-Stover D. (2004). Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of «Pesta» formulation of *Fusarium oxysporum* «Foxy 2», a Potential mycoherbicide for Striga: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Sci Techn* (14), 545-559.

Esser, R., y El-Gholl, N. (1993). *Paecilomyces lilacinus*, a fungus that parasitizes nematode eggs. Florida Department of Agriculture y Consumer Services, Division of Plant Industry.

Faria, M., Hajek, A.E., Wraight, S.P., (2009). Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Control* (51), 346–354 pp.

Fe-Andrés, M. (2002). Estrategias en el control y manejo de nemátodos fitoparásitos. *Ciencia y Medio ambiente*, 221-226.

Fernandes, É.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Roberts, D.W., (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Curr. Genet.* (61), 427–440 pp.

Fernández-Santillán, G., Cerna-Rebaza, L., Chico-Ruiz, J. (2016). Eficacia de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne incognita* que ataca al cultivo de *Capsicum annum*, "Pimiento piquillo". *Rev. Fitosanidad*, 20(3), 109-119 p.



Feofilova, E.P., Ivashchkin, A.A., Alekhin, A.I. & Y.E. Sergeeva. (2012). Fungal Spores: Dormancy, Germination, Chemical Composition, and Role in Biotechnology (Review). *Appl. Biochem. Microbiol* 48 (1), 1 – 11pp.

Freitas, V. M., Silva, J. G. P., Gomes, C. B., Castro, J. M. C., Correa, V. R., and Carneiro, R. M. D. G. (2016). Host status of selected cultivated fruit crops to *Meloidogyne enterolobii*. *European Journal of Plant Pathology*.

Food and Agriculture Organization. (2018). Important nematode pest. [Versión electrónica]. Recuperado el 24 de octubre del 2018 de: <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0p.htm#bm25>.

Food and Agriculture Organization. (2013). Organismos del suelo. [Versión electrónica]. Recuperado el 24 de octubre del 2018 de: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/spi/soil-biodiversity/soil-organisms/by-type/nematodes/en/>.

Hall, R. A.; D Perkin; B. (1995). Fungal Control of Whitefly, *Thrips palmi* and *Sugarcane Froghopper* in Trinidad Tobago. VI International Colloguium on Interthrate Pathology and Microbial Control.

Garza-Pérez, C.N. (2014). Evaluación de residuos agroindustriales como fuente de carbono en la producción de hongo entomopatógenos. (Tesis de grado). Facultad de agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Escobedo, N.L.

Harrigan, W. P. & H. R. Mac Cance. (1968). Métodos de laboratorio en microbiología, Ed. Academia León, España.

Humphreys, A.M., Matewale, P., Trinci, A.P.J., (1989). Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. *Mycol. Res.* (92), 257–264 pp.

Inch, J.M., Trinci, A.P.J. (1987). Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J. Gen. Microbiol.* (113), 247–252 pp.

Inch, J.M., A.M. Humphreys, Trinci, A.P.J. & A.T. Gillespie (1986). Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans Br. Mycol. Soc.* (87), 215-222 pp.

Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S. (1996). Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Technol.* (6), 35–50 pp.



Inglis, P. W., Tigano, M. & C. Valadares (1999). Transformation of the Entomopathogenic Fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to Benomyl Resistance.

Inglis, P., Tigano, M., & C. Valadares (2000). Transformation of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces lilacinus* to benomyl resistance. *Genetic Molecular Biology* 22(1), 48-61.

Jackson, M. A., McGuire, M. R., Lacey, L. A. and S. P. Wraight (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*. (101), 35-41.

Jackson, M., Cliquet, S., & Loren B. (2003). Media and Fermentation Processes for the Rapid Production of High Concentrations of Stable Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology* (13), 23 -33.

Jackson, M., Erhan, S., and Poprawski, T. (2006), 'Influence of Formulation Additives on the Desiccation Tolerance and Storage Stability of Blastospores of The Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)', *Biocontrol Science and Technology* (16), 61-75.

Jackson, M.A., Payne, A.R. (2007). Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-sale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocont. Sci. and Technol.*, 17(7): 709 - 719.

Jackson, M.A., (2012). Dissolved oxygen levels affect dimorphic growth by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 67–79 pp.

Jaronski, S.T., (2013). Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., Shapiro-Ilan, D.J. (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms* (pp. 357–415). Elsevier Inc., Amsterdam.

Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G. (2004). Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. *Mycol. Res.* 108(1), 93 – 100 pp.

Kiewnick, S. (2006), Effect of Temperature on Growth, Germination, Germ-Tube Extension and Survival of *Paecilomyces lilacinus* Strain 251, *Biocontrol Science and Technology* (16), 535-546.

Kiewnick, S., and Sikora, R.A. (2006), Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* Strain 251, *Biological Control* (38), 179-187.



Kerry, B.R., and Jaffee, B.A. (1997). Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. *The Mycota* (4), 203-218.

Kerry, B.R. (1995). Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany* (73), 565-570.

Lane B.S.; Trinci, A.P.J.; Gillespie, A.T. (1991). Influence of culture conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycol Rev.* (95), 29-833.

Lee, D. (2005). Life cycles. En D. Lee (1st. Ed.), *The Biology of Nematodes* (págs. 141-162). Londres, Inglaterra.

Liu, X.Z., and Li, S.D. (2004), 'Fungal Secondary Metabolites in Biological Control of Crop Pests', in *Handbook of Industrial Mycology* (pp. 723-747), ed. Z.Q. An, Yew York: Marcel Dekker Inc.

Lopez-Llorca, L.V., Duncan, J.M. (1986). New media for the estimation of fungal infection in eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, *Woll. Nematologica* (32), 486-490.

López, L. V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*. Dpto. de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Universidad de Alicante. España

López, I. (2009). Control de *Meloidogyne* sp. en Viveros de Café (*Coffea arabica* L.). Universidad de El Salvador.

Lozano-Contreras, M.G., Elias-Santos, M., Rivas-Morales, C., Luna-Olvera, H.A., Gálan-Wong, L.J., Maldonado-Blanco, M.G. (2007). *Paecilomyces fumosoroseus* blastospore production using liquid culture in a bioreactor. *African Journal of Biotechnology* 6(18), pp. 2095-2099.

Luangsa-ard, J., Houbraken, J., Van Doom, T., Hong, S., Borman, A., Hywel-Jones, N., y Samson, R. (2011). *Purpleocillium*, a newgenus for themedically important *Paecilomyces lilacinus*. *Federation of European Microbiological Societies* (321), 141-149.

Luc, J.E., Pang, W., Crow, W.T., Giblin-Davis, R.M. (2010). Effects of formulation and host density on the ability of in vitro-produced *Pasteuria* endospores to control it's host *Belonolaimus longicaudatus*. *Journal of Nematology* (42), 87-90.



Magan, N. (2001). Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents* (pp. 239–251). CAB Publishing, Oxon.

Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kabori, N.N., Behle, R.W., Delalibera Jr. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *J. Invertebr. Pathol.* (127), 11–20 pp.

Mert, H.H., Dizbay, M., (1977). The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinus* species. *Mycopathologia* (61), 125–127.

Miranda, I., Arévalo, J., Hidalgo-Díaz, L. (2013). Metodología de superficie respuesta para evaluar estabilidad en almacén de un agente de control biológico. *Rev. Protección vegetal* 28(3), 224-228.

Montes-Belmont, R. (2000). Nematología vegetal en México, Investigación documental. *Sociedad Mexicana de Fitopatología*. 2da Edición, Pag. 98.

Nicholls Estrada, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 278 p.

Olivares-Bernabeu, C.M. & López-Llorca, L.V. (2002). Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Universidad de Alicante, Dpto. de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. *Revista Iberoamericana de Micología* (19). España, 104-110 pp.

Park, J. O., J. R. Hargreaves, E. J. McConville, G. R. Stirling and E. L. Ghisalberti. (2004). Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Lett. Appl. Microbiol.* (38), 271-276.

Piedra Naranjo, R. (2007). Manejo biológico de nemátodos fitoparásitos con hongos y bacterias. Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 21(1), 123-132.

Puertas-Arias, A. (2007). Nemátodos Fitoparásitos: Los nemátodos formadores de agallas, tácticas para su manejo. Cuba. Recuperado el 13 de Agosto del 2018 de: <https://www.monografias.com/trabajos75/nemátodos-fitoparasitos-manejo-formadores-agallas/nemátodos-fitoparasitos-manejo-formadores-agallas.shtml>

Quintero-Zapata, I. (1998). Producción de esporas de *Paecilomyces fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo líquidos. (Tesis de grado). Facultad de ciencias biológicas, Universidad de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N. L.



Rangel, D.E.N., Alston, D.G., Roberts, D.W. (2008). Effects of physical and nutritional conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungi. *Mycol. Res.* (112), 1355–1361 pp.

Robl, D., Sung, L.B., Novakovich, J.H., Marangoni, P.R.D., Zawadneak, M.A.C., Dalzoto, P.R., Gabardo, J., I.C. Pimentel (2009) Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson strains on agro-industrial residues. *Braz. J. Microbiol.*, 40: 296 - 300.

Rodríguez, M. G., Sánchez, L., Gómez, L., Hidalgo, L., González, E., Gómez, M., Díaz Viruliche, L., Casanova, A., Cuadra, R., Fernández, E., Hernández R. (2005). *Meloidogyne spp.*, Plagas de las Hortalizas: Alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegido. Cuba. *Revista protección vegetal* 20(1), 1-10 p.

Rodriguez-Rodriguez, G. H. (2013). Matrices de soporte como conservador inerte de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*. (Trabajo de grado). Facultad de ciencias microbiología agrícola y veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Román, J., y Acosta, N. (1991). Nematodos: diagnóstico y combate. Universidad de Puerto Rico, Servicio de Extensión Agrícola, Mayagüez.

Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990) The diatoms Cambridge University Press, Cambridge, P 747.

Samaniego, J.C. (2015). Efectos de la concentración de carbono y la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de conidias de *Paecilomyces lilacinus*. Proyecto de investigación, Colegio de ciencias e ingeniería, Universidad San Francisco de Quito USFQ.

Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied *hyphomycetes*. *Studies in Mycology*,(6). The Netherlands.

Sandoval-Coronado, C.F. (2001). Secado y formulación de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus* (*Hyphomycetes*) producidos en dos medios líquidos diferentes. (Tesis). Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Escobedo, N.L.

Silva, S.D., Carneiro, R., Faria, M., Souza, D.A., Monnerat, R.G., Lopes, R.B. (2017). Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. *Journal of Nematology* 49(1), 77-85.

Stirling, G. (2014). Biological control of plant-parasitic nematodes. Boston, USA: CABI.



Teshler, M., Ash, G., Zolotarov, Y., Watson, A. (2007). Increased shelf-life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. *Biocontrol Sci Techn*, 17, 387-400 pp.

Tigano, M., & Inglis, P. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetic and Molecular Biology* 29(1), 132-136.

Triviño, C. (2003). Control biológico de nemátodos en el Ecuador. Recuperado el 14 de octubre de 2015, de INIAP: [http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com\\_sobi2ycatid=2ylimitstart=90](http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_sobi2ycatid=2ylimitstart=90).

Valenzuela L.E. (1987). Microorganismos entomopatógenos: su aprovechamiento en el control de insectos plaga. 1a edición. Ed. Silva Castillejo. México, pp. 15-26

Velásquez-Valle, R. (2001). Nemátodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* (19), 107-109.

Vega, F.E., Jackson, M.A., McGuire, M.R., (1999). Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia* (147), 33–35 pp.

Vega, F.E., M. A. Jackson, G. Mercadier and T. J. Poprawski (2003). The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 363 - 368.

Villacide, J., Corley J. (2012). Introducción a la teoría del control biológico de plagas: Manejo Integrado de Plagas Forestales. Bariloche, Argentina. 21 p

Waingwright, M. (1995). Introducción a la biotecnología de los hongos. Editorial Acribia. España, 189 p.

Wang, C., St Leger, R., (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (103), 6647–6652.

Zimmermann, G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocont. Sci. and Technol.*, 18 (9): 865 - 901.





## 15 Anexos

### 15.1 Preparación de medio PDA

Disolver 39 g de polvo en un litro de agua destilada, mezclar con agitador magnético durante 10 min a 90-95°C hasta la homogeneidad, posteriormente esterilizar a 121°C y 15 Lbs durante 15 minutos. Una vez estéril el medio verter en placas Petri (20 mL por placa) y dejar solidificar. Incubar por 24 h a 37°C, para descartar posibles contaminaciones.

### 15.2 Extensión en placa por estriado

Calentar la varilla Drigalsky de acero inoxidable durante 20 segundos a fuego directo para eliminar cualquier microorganismo. Depositar la varilla en un vaso con alcohol etílico al 70% durante 10-20 segundos agitando constantemente con la finalidad de enfriar la varilla, posteriormente flamear la varilla y agitar durante 15-20 segundos para enfriar la varilla (Nota: tener cuidado en no prender el vaso con etanol al 70%), tomar una muestra del microorganismo para este caso *P. lilacinus*. Levantar y flamear la tapa, colocar la varilla en las orillas de la placa durante 10 segundos o deslizar la varilla alrededor de la muestra (Sin tocar la muestra) durante 15 segundos, luego de estar fría completamente la varilla se realiza la extensión de la muestra mediante movimientos perpendiculares y circulares en toda la placa, finalmente se flamea la tapa de la placa, se tapa y se le coloca cinta plástica.

### 15.3 Preparación del medio CAD

Pesar los reactivos correspondientes, disolver todas las sales y fuente de carbono en agua desmineralizada (sin mezclar con los casaminoácidos), ajustar el pH con NaOH 0.1M o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado (Según se requiera), posteriormente esterilizar el medio a 121°C durante 15 min. Adicionar los casaminoácidos con una jeringa de 10 mL y un filtro tipo pirinola millipore de 0.45 µm, para esto se emplea la ecuación de  $C_1V_1=C_2V_2$ , donde  $C_1$  es la concentración que se necesita en el

medio,  $V_1$  el volumen del medio en el matraz,  $C_2$  la concentración de la solución madre de casaminoácidos y  $V_2$  el volumen que se agregara de la solución madre al matraz con sales y fuente de carbono (Nota: Una solución madre muy concentrada puede tapan el filtro).

#### 15.4 Tinción con azul de lacto fenol

Agregar una gota de azul de lacto fenol en un portaobjetos, posteriormente tomar un pedazo de cinta adhesiva transparente (sin dejarle huella o marcas a la cinta), y tocar suavemente donde este esporulado el hongo (colonias en un medio solido), luego colocar la cinta con la muestra sobre la gota de azul de lacto fenol, y tratando de cubrir toda la muestra. Finalmente observar al microscopio. (Nota: Se debe de colocar equipo de protección personal pues el reactivo empleado es cancerígeno y provoca irritación de las vías respiratorias).

#### 15.5 Fotografías



Figura 9. Medio PCD2 (Control)



Figura 10. Medio CAD (5 días incubación)

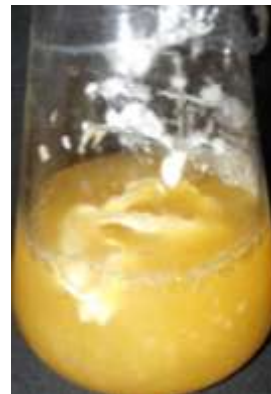


Figura 13. Medio DEAPm (5 días de incubación)



Figura 11. Medio PCD2 (5 días incubación)

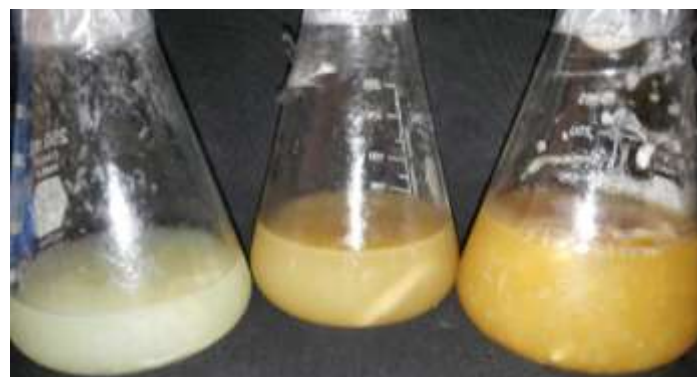


Figura 14. Comparación de los medios CAD, PCD2 y DEAPm



Figura 12. Comparación del medio CAD y PCD2



**Figura 15. Muestra de los hongos de Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 secadas por aspersión empleando la mezcla de inertes**



**Figura 16. Muestras de los hongos Bk-PI-001 y Bk-Pch-001 secadas por aspersión empleando la mezcla de inertes (Reverso de la placa)**



**Figura 17. Secado Tradicional de Bk-PI-001 en MI y AM1**