



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**Estrategias de manejo de saltamontes mediante hongos
entomopatógenos en agroecosistemas de maíz de
Erongarícuaro, Michoacán, México**

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

POR

**Maestra en Ciencias Biológicas
Venecia Quesada Béjar**

Directores:

**Dr. Carlos Ernesto González Esquivel
Dr. Enrique Reyes Novelo**

Mérida, Yuc., México, Agosto de 2017

Sínodo del examen de tesis de grado

Declaratoria de originalidad

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

Venecia Quesada Béjar

Maestra en Ciencias Biológicas

Agradecimientos

Esta investigación es gracias al trabajo en conjunto de Carlos González Esquivel, Enrique Reyes Novelo y Miguel Nájera Rincón. A ellos les quiero agradecer por el apoyo y esfuerzos realizados hasta el término de esta investigación. Los consejos que me dieron y la forma en que me encauzaron, fueron muy importantes para que pudiera culminar la tesis de doctorado, muchas gracias.

A John Larsen por aceptarme en el Laboratorio de Agroecología del IIES-UNAM y brindarme su amistad.

A Miguel Nájera Rincón por capacitarme en las primeras fases de investigación de esta tesis, fue sumamente importante su ayuda.

A mi sínodo: Luis Abdala Roberts, Juan Pinzón Esquivel, Virginia Méendez Ramírez, Hugo Delfín González y Celia Selem Salas, por la revisión y las contribuciones que realizaron.

Gracias al CONACyT por otorgarme beca de estudios de posgrado (444-081).

A Enrique Mariño Pedraza de la Colección Nacional de Insectos del Instituto de Biología de la UNAM por su colaboración en la identificación de las especies de saltamontes.

A Francisco Mora Ardila (Pacho) por ayudarme con los análisis estadísticos y su amistad. Gracias por tu paciencia.

Un especial agradecimiento a Elsy y a Hugo Delfín por su apoyo y sus palabras de aliento, me ayudaron mucho. Siempre estaré agradecida con ustedes.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 2.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	3
AGROECOSISTEMAS DE LA CUENCA DEL LAGO DE PÁTZCUARO.....	3
<i>Efecto del manejo agrícola sobre la entomofauna</i>	3
<i>Arvenses de los márgenes del cultivo</i>	4
<i>Saltamontes plaga en México</i>	5
<i>Importancia económica de saltamontes plaga</i>	6
<i>Control convencional de saltamontes</i>	6
<i>Control biológico de saltamontes con hongos entomopatógenos</i>	7
<i>Características de Beauveria bassiana</i>	8
<i>Características de Metarhizium anisopliae</i>	9
<i>Características de Metarhizium acridum</i>	9
<i>Cepa comercial</i>	10
OBJETIVO GENERAL	11
<i>Objetivos particulares</i>	11
HIPÓTESIS	11
<i>Hipótesis 1.</i>	11
<i>Hipótesis 2.</i>	11
<i>Hipótesis 3.</i>	12
<i>Hipótesis 4.</i>	12
LITERATURA CITADA.....	13
CAPÍTULO 3.....	22
ORTÓPTEROS (CAELIFERA) Y SUS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN AGROECOSISTEMAS DE MAÍZ EN ERONGARÍCUARO, MICHOACÁN, MÉXICO.....	22
RESUMEN	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCIÓN	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
<i>Zona de estudio y diseño de muestreo:</i>	26
<i>Aislamiento e identificación de HEP:</i>	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
<i>Composición de la CS:</i>	29
<i>Evaluación del sistema de manejo sobre la riqueza de especies de saltamontes:</i>	31
<i>Abundancia de S. purpurascens purpurascens:</i>	32
<i>HEP aislados en S. purpurascens purpurascens:</i>	36
CONCLUSIONES	37
AGRADECIMIENTOS	38
LITERATURA CITADA.....	38
CAPÍTULO 4	44
SUSCEPTIBILITY OF <i>SPHENARIUM PURPURASCENS PURPURASCENS</i> INSTARS TO A COMMERCIAL STRAIN OF <i>METARHIZIUM ACRIDUM</i> IN MICHHOACAN, MEXICO	44
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	44
MATERIALS AND METHODS	46
<i>Viability of the commercial product</i>	46
<i>Collection and maintenance of biological material</i>	47
RESULTS	48
DISCUSSION	52
CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	53
<i>Acknowledgements</i>	54
REFERENCES	54
CAPÍTULO 5	58
EVALUACIÓN DE DOS CEPAS NATIVAS DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> Y UNA CEPA COMERCIAL DE <i>METARHIZIUM ACRIDUM</i> (SORDARIOMYCETES: HYPOCREALES) PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE <i>SPHENARIUM PURPURASCENS PURPURASCENS</i> EN ERONGARÍCUARO, MICHHOACÁN	58
RESUMEN.....	58
INTRODUCCIÓN	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
Cultivos de HEP	60
Asignación genética de HEP nativos.	61
<i>Colecta y mantenimiento de material biológico para experimento de laboratorio</i>	61
Preparación de los inóculos	62
Evaluación de la patogenicidad de dos cepas nativas sobre <i>S. purpurascens purpurascens</i> en el laboratorio	62
Preparación de la cepa nativa en sustrato para el experimento en campo	62
Calidad de las cepas.....	64
Colecta y mantenimiento de material biológico para el experimento de campo.....	64

Virulencia de la cepa nativa y la cepa comercial sobre <i>S. purpurascens purpurascens</i> en campo.....	63
Análisis estadístico	64
RESULTADOS	65
Asignación genética de HEP nativos.....	65
<i>Patogenicidad de dos cepas nativas en laboratorio</i>	65
<i>CL50 y CL90 de las cepas nativas.</i>	67
<i>Esporulación de las cepas nativas</i>	67
<i>Viabilidad de la cepa nativa y la cepa comercial</i>	68
<i>Virulencia de la cepa nativa y la cepa comercial sobre S. purpurascens purpurascens en campo</i>	69
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES.....	72
LITERATURA CITADA	72
DISCUSIÓN GENERAL	77
CONCLUSIONES GENERALES.....	84
LITERATURA CITADA.....	85

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 3: Ortópteros (Caelifera) y sus hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en Erongarícuaro, Michoacán.

Figura 1. Abundancia promedio mensual de un muestreo con redes de golpeo realizado entre julio y diciembre de 2015. *Sphenarium purpurascens purpurascens* en dos tipos de manejo agrícola y la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. 2015. N = 72. Tratamiento: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. Covariables: VMM: vegetación marginal del monocultivo y VMP: vegetación marginal del policultivo. 33

Capítulo 4: Susceptibility of *Sphenarium purpurascens purpurascens* instars to a commercial strain of *Metarhizium acridum* in Michoacan, Mexico

Fig. 1 Accumulated survival percentage of *Sphenarium purpurascens purpurascens* instars inoculated with a comercial strain of *M. acridum*. +: Inoculated. -: Control. N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four. DAI – Days after inoculation 49

Fig. 2 Accumulated post mortem sporulation percentage of *Metarhizium acridum* on *Sphenarium purpurascens purpurascens*. N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four. DAD - Days after death 51

Capítulo 5: Evaluación de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* y una cepa comercial de *Metarhizium acridum* (Sordariomycetes: Hypocreales) para el control biológico de *Sphenarium purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro, Michoacán

Fig. 1. Porcentaje de supervivencia acumulada de saltamontes infectados con dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones. Días después de la infección (DDI). 66

Fig. 2. Porcentaje acumulado de individuos de *Sphenarium purpurascens* que presentaron esporulación post mortem de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* cuantificados en días después de la muerte del individuo (DDM). 68

Fig. 3. Porcentaje de supervivencia acumulada de saltamontes infectados con una cepa nativa de *Metarhizium anisopliae*, una cepa comercial de *Metarhizium acridum* y el control. CC: cepa comercial; DDI: días después de la infección. 69

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo 3: Ortópteros (Caelifera) y sus hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en Erongarícuaro, Michoacán.

Cuadro 1. Especies de saltamontes y su abundancia en dos tipos de manejo agrícola y de la vegetación de los márgenes de las parcelas en Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. Covariables: VMM: Vegetación marginal del monocultivo y VMP: vegetación marginal del policultivo. Datos acumulados de muestreos con redes de golpeo realizados entre julio y diciembre de 2015. 29

Cuadro 2. Matriz de similitud de distancia ecológica entre parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. PC: policultivo, MC: monocultivo..... 31

Cuadro 3. Análisis de la riqueza de saltamontes mediante un modelo lineal mixto. En dos tipos de manejo agrícola y las condiciones particulares de la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. *S*: Covariables (vegetación marginal del monocultivo y vegetación marginal del policultivo). *T*: tiempo. T^2 : tiempo cuadrático. *g.l*: grados de libertad, *F*: de distribución F de Fisher..... 32

Cuadro 4. Comparación de la abundancia de *Sphenarium purpurascens purpurascens* en dos tipos de manejo agrícola y la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo *S*: Covariables la vegetación marginal del monocultivo y vegetación marginal del policultivo. *T*: tiempo, T^2 : tiempo cuadrático. *g.l*: grados de libertad, *F*: de distribución F de Fisher....34

Cuadro 5. *Sphenarium purpurascens purpurascens* infectados con hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz de la región de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro. MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo, VMM: la vegetación de los márgenes del monocultivo, VMP: vegetación de los márgenes del policultivo 37

Capítulo 4: Susceptibility of *Sphenarium purpurascens purpurascens* instars to a commercial strain of *Metarhizium acridum* in Michoacan, Mexico

Table 1 Pairwise comparison (Kaplan-Meier) of survival curves of different stages of *Sphenarium purpurascens purpurascens* individuals inoculated with a commercial strain of *Metarhizium acridum*. Different letters show statistical differences ($P < 0.05$). N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four 50

Table 2 Pairwise comparison (Bonferroni test) of *Sphenarium purpurascens purpurascens* specimens sporulated by *Metarhizium acridum*. Different letters show statistical differences ($P < 0.05$). N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four 51

Capítulo 5: Evaluación de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* y una cepa comercial de *Metarhizium acridum* (Sordariomycetes: Hypocreales) para el control biológico de *Sphenarium purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro, Michoacán

Cuadro 1. Comparación por parejas de las curvas de supervivencia diaria de individuos de *Sphenarium purpurascens purpurascens* inoculados con diferentes concentraciones de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae*, con el método de Kaplan-Mier. 66

Cuadro 2. Comparación mediante la prueba de Bonferroni, del promedio de saltamontes *Sphenarium purpurascens purpurascens* esporulados post mortem a la infección por dos cepas nativas por parejas de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones de conidios. *indica diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 68

RESUMEN

El cultivo de maíz es el más importante en México, su producción es mediante sistemas de monocultivo (MC) y policultivo (PC). En el MC la diversidad vegetal y de artrópodos se reduce, dificultando el control biológico por parte de los enemigos naturales, aumentando las poblaciones de insectos plaga. Los saltamontes son una de las principales plagas del maíz, uno de sus enemigos naturales son los hongos entomopatógenos (HEP). Esta investigación evaluó el efecto del manejo agrícola en MC, PC y de la vegetación de los márgenes del monocultivo (VMM) y del policultivo (VMP) sobre la comunidad de saltamontes y sus HEP. Se evaluó la susceptibilidad de diferentes estadios de *Sphenarium purpurascens purpurascens* a una cepa comercial de *Metarhizium acridum* en condiciones de laboratorio. Se comparó la virulencia de una cepa nativa de *M. anisopliae* de Erongarícuaro, Michoacán, México y la cepa comercial sobre *S. purpurascens purpurascens* bajo condiciones de campo. Se registraron en total de 17 especies de saltamontes, siendo dominante *S. purpurascens purpurascens*. El MC y PC no presentó un efecto sobre la riqueza de especies de saltamontes ni en la abundancia de *S. purpurascens purpurascens*. La VMM y la VMP no explicaron la riqueza de especies de saltamontes en el MC y PC, sin embargo la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en la VMM y la VMP explicó la abundancia encontrada en el MC y el PC. De 2 920 saltamontes colectados, el 0.41% estuvieron infectados por *Metarhizium* sp. o *Beauveria* sp. El HEP con mayor frecuencia de infección fue *Metarhizium* sp. La proporción de individuos infectados en las condiciones del PC se relacionó positivamente, en comparación con la VMP. Al evaluar la susceptibilidad de los estadios de *S. purpurascens purpurascens* a la cepa comercial en el laboratorio, las ninfas 1, 2, y 4 fueron los estadios más susceptibles y el menos susceptible fue el adulto. Las ninfas 1, 2 y 3 fueron los estadios que presentaron mayor esporulación de *M. acridum*. Al comparar la supervivencia de *S. purpurascens purpurascens* en campo, los saltamontes tratados con la cepa comercial presentaron una menor supervivencia en comparación a la cepa nativa. La cepa comercial de *M. acridum* es una alternativa viable para el control biológico de *S. purpurascens purpurascens* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán una supervivencia del 2.06%. La cepa nativa presentó una alta patogenicidad sobre *S. purpurascens purpurascens* en laboratorio. Sin embargo, en campo, es necesario evaluar su virulencia con dosis mayores. En estudios posteriores se recomienda aislar hongos entomopatógenos de *M. acridum* de *S. purpurascens purpurascens* y evaluarlos junto a la cepa comercial de *M. acridum* y formularlos en aceite citrolina.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, *Sphenarium purpurascens purpurascens*, maíz.

SUMMARY

Maize is the most important crop in Mexico, it is produced in monoculture (MC) and polyculture (PC) systems. In MC plant and arthropod diversity is reduced, making biological control difficult for natural enemies, thus increasing populations of pest insects. Grasshoppers are one of the main pests of maize, entomopathogenic fungi (EPF) being one of their natural enemies. This research evaluated the effect of cropping system (MC, PC) and of the marginal vegetation of monoculture (MVM) and polyculture (MVP) on the community of grasshoppers and their EPF. The susceptibility of different instars of *Sphenarium purpurascens purpurascens* to a commercial strain of *Metarhizium acridum* was evaluated under laboratory conditions. The virulence of a native strain of *M. anisopliae* from Erongarícuaro, Michoacan, Mexico and the commercial strain over *S. purpurascens purpurascens* were compared under field conditions. Seventeen grasshopper species were registered, the dominant one being *S. purpurascens purpurascens*. The MC and PC did not show an effect over grasshopper species richness and *S. purpurascens purpurascens* abundance. MVM and MVP did not explain grasshopper species richness in MC and PC. However, the abundance of *S. purpurascens purpurascens* in MVM and MVP explained the abundance found in MC and PC. Out of 2 920 collected grasshoppers, 0.41% were infected by *Metarhizium* sp. or *Beauveria* sp. The EPF with highest infection frequency was *Metarhizium* sp. The proportion of infected individuals under PC related positively with MVP. When evaluating the susceptibility of *S. purpurascens purpurascens* instars to the commercial strain under laboratory conditions, nymphs 1, 2 and 4 were the most susceptible instars, the least susceptible one being the adult. Nymphs 1, 2 and 3 were the instars with highest sporulation by *M. acridum*. When comparing the survival rates of *S. purpurascens purpurascens* in the field, grasshoppers treated with the commercial strain had lower survival compared to the native strain. The commercial strain of *M. acridum* is a viable alternative for biological control of *S. purpurascens purpurascens*, under field conditions in Erongarícuaro survival rates were 2.06%. The native strain showed a high pathogenicity on *S. purpurascens purpurascens* under laboratory conditions. However, it is necessary to evaluate its virulence in the field with higher doses. In subsequent studies is recommended to isolate *M. acridum* entomopathogenic fungi from *S. purpurascens purpurascens* and evaluate them together commercial strain.

Keywords: entomopathogenic fungi, *Sphenarium purpurascens purpurascens*, maize.

CAPÍTULO 1

Introducción General

En México, el maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo en términos de superficie, se siembran más de ocho millones de hectáreas, que representan 38% de la superficie agrícola nacional. Contribuye con 8% del producto interno de la agricultura y es el que más fuerza de trabajo utiliza (González *et al.*, 2008; SIAP, 2015). Para su producción las comunidades rurales usan diversos sistemas de manejo agrícola, resultado de sus conocimientos, de la forma de apropiación de los recursos y de los modos de vida de las comunidades rurales (Toledo, 1995; Gutiérrez y Maldonado, 2010). Uno de estos sistemas es el monocultivo. Este sistema simplifica los agroecosistemas por falta de diversidad vegetal y de artrópodos, dificultando el control biológico eficiente por parte de los enemigos naturales, lo que genera insectos plaga (Altieri, 1994; Atieri y Nicholls, 2013). Otro de los sistemas usados es el policultivo, también llamado milpa (Sarandón y Chamarro, 2003). En este sistema se ha encontrado mayor diversidad de artrópodos presentes en relación con el monocultivo (Herrera *et al.*, 2011). Dicha diversidad tiene un efecto en la regulación de plagas (Pérez, 2005). Se ha documentado que las plagas son menos dañinas en los policultivos que en los monocultivos (Martinez *et al.*, 2011). Este supuesto no siempre se cumple: Hopkinson *et al.* (2013), señalan que el efecto resultante dependerá de las especies de herbívoros y sus enemigos naturales asociados, así como de las propiedades de la vegetación de dentro y alrededor del cultivo.

Una de las plagas en las que se puede evaluar lo antes mencionado son los saltamontes, al ser una de las plagas más importantes del maíz por alimentarse de hojas, tallos y frutos tiernos (Uribe-Gonzalez y Santiago-Basilo, 2012). Los saltamontes plaga son casi exclusivamente controlados con productos químicos (Barrientos-Lozano y Almeguer-Sierra, 2009). El uso excesivo de estos ha provocado resistencia de los insectos, además de la acumulación de residuos en el medio ambiente que ocasionan daños en la flora y fauna silvestre benéfica (Altieri y Nicholls, 2013). Por lo tanto, se han desarrollado alternativas amigables con el medio ambiente como los hongos entomopatógenos, los cuales constituyen un grupo de gran

importancia en el control biológico de insectos plaga con los que se fabrican bioinsecticidas (Barrientos-Lozano y Almeguer-Sierra, 2009). Entre los agentes más importantes para el control poblacional de saltamontes está *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Uribe-González *et al.*, 2012; Rodríguez y Lecuona, 2002) y *Metarhizium acridum* (Driver y Milner) J.F. Bisch., Rehner y Humber. Este último presenta especificidad para acrídidos. Para que estos agentes patógenos tengan un desempeño eficiente como bioinsecticidas se recomienda evaluar la patogenicidad de un amplio rango de aislados sobre el insecto plaga y seleccionar el aislado más promisorio (Claro *et al.*, 2006). De igual manera se debe evaluar la susceptibilidad de los estadios del insecto plaga, para usarlos de forma eficiente en la etapa crítica de desarrollo del insecto (Espinel y Torres, 2009). Finalmente, los agentes patógenos seleccionados se evalúan en campo, debido a que su eficacia está relacionada con la temperatura y humedad relativa (García *et al.*, 2014).

Debido a las pérdidas económicas que ocasionan los saltamontes al alimentarse del maíz, esta investigación tuvo como objetivo evaluar estrategias agroecológicas de manejo de saltamontes plaga en agroecosistemas de maíz de Erongarícuaro, Michoacán. De esta forma se evaluaron: a) el efecto del manejo agrícola del monocultivo, el policultivo, la vegetación de los márgenes del monocultivo y del policultivo sobre la comunidad de saltamontes y sus HEP, b) la susceptibilidad de los diferentes estadios de la especie de saltamonte dominante de los agroecosistemas de maíz a una cepa comercial de *M. acridum* en laboratorio, c) la patogenicidad de dos cepas nativas de Erongarícuaro sobre saltamonte dominante en laboratorio y d) comparar la virulencia en campo de la cepa nativa más promisorio con una cepa comercial de *M. acridum* sobre la especie de saltamonte dominante en Erongarícuaro, Michoacán.

Capítulo 2

Revisión de Literatura

Agroecosistemas de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro

Los agroecosistemas de maíz de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro son unidades de manejo complejas, al ser multifuncionales, hay parcelas con tres cultivos, con dos, monocultivo y parcelas en descanso (Balvanera *et al.*, 2009). Estas unidades tienen como objetivos asegurar el autoconsumo de maíz, la generación de ingresos de los productores y satisfacer también necesidades con fines gastronómicos, festivos y religiosos (SAGARPA-SEDAGRO, 2002). El maíz es el cultivo con mayor superficie, con el 56% del total de la superficie de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro (SIAP, 2014). Para su producción se usan principalmente dos sistemas agrícolas: a) el monocultivo de maíz (*Zea mays* L.) y b) la milpa o policultivo compuesto de maíz, calabaza (*Cucurbita* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Del Val *et al.*, 2013). Sin embargo, no es raro encontrar agricultores que siembran más de cinco cultivos de manera asociada o en rotación (Del Val *et al.*, 2013).

Efecto del manejo agrícola sobre la entomofauna

Debido a la necesidad de producción de alimentos para la población, se ha apostado por el monocultivo, donde se aplican fertilizantes e insecticidas sintéticos, para un mayor rendimiento siendo la base económica de muchas familias mexicanas (Gliessman, 2002). El monocultivo tiene altos costos de producción y problemas ambientales como la simplificación de los agroecosistemas, la pérdida de la diversidad y la reducción de las interacciones tróficas (Altieri, 2003; Altieri y Nicholls 2013). Las grandes extensiones de monocultivos se han relacionado con problemas de plagas, ya que raramente se autorregulan por ser un sistema simple en donde la abundancia de los depredadores y su eficacia se reduce (Gliessman *et al.*, 2007). Un ejemplo de estos efectos se observó en las poblaciones de insectos fitófagos presentes en los monocultivos de maíz, de frijol y en el policultivo de ambas especies, siendo superiores en los monocultivos (Castillo y González, 2008). A causa

de estos efectos negativos, muchos científicos han tomado conciencia de que los sistemas de maíz modernos como el monocultivo son frágiles y ecológicamente inestables (Litsinger y Ano-Moody, 1976; Viglizzo *et al.*, 2006).

Por lo anterior, se han buscado alternativas productivas que generen un menor impacto negativo a los agroecosistemas, que al momento de evaluarlas demuestren que son mejores en rendimiento y además que sean sustentables (Dellepiane *et al.*, 2015). Una de las alternativas son los policultivos, los cuales son sistemas diversificados, relativamente estables, productivos y presentan rendimientos altos por unidad de trabajo y energía (Altieri y Nicholls, 2004). Este sistema aumenta la diversidad de especies de insectos que propician el control biológico de plagas (Ruiz-González y Victorino-Ramírez, 2015). Las mayoría de los experimentos donde se evalúa el monocultivo contra el policultivo demuestran que hay menos poblaciones de herbívoros especializados en los policultivos que en los monocultivos (Risch 1983; Montero, 2014). Existen dos escenarios posibles que lo explican: a) heterogeneidad del hábitat, donde hay menor colonización de parte de los herbívoros y su reproducción es menor por la repelencia química, camuflaje o inhibición de alimentación por parte de plantas no-hospederas. b) La presencia de enemigos naturales donde hay mayor depredación y parasitismo (Andow, 1991). Sin embargo, no siempre se presentan menos poblaciones de herbívoros en los policultivos en comparación con los monocultivos, ya que las propiedades de la vegetación de dentro y de los márgenes del cultivo afectan su dinámica (Altieri, 1992).

Arvenses de los márgenes del cultivo

Una serie de publicaciones se refieren a las arvenses como reservorio de organismos que afectan a cultivos (Bendixen *et al.*, 1981; Mendoza-Pérez, 2009). Para *Spodoptera frugiperda* (Walker) o “gusano cogollero” del maíz, las malezas *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Amaranthus dubius* Mart. y *Eleusine indica* (L.) Gaertn. son sus principales hospederas, las cuales lejos de realizar una influencia negativa en las poblaciones del fitófago provoca una atracción similar a la que provoca el monocultivo de maíz (Blanco y Leyva, 2009).

McClure (1982) encontró que los cicadélidos adultos invadieron los huertos de melocotoneros desde los bordes, con presencia de maleza, donde se encontraron correlaciones significativas negativas entre las densidades de cicadélidos sobre la distancias de los árboles de melocotones con las plantas hospederas silvestres, así como la colonización de los árboles donde existía una cubierta vegetal compuesta por sus hospederos silvestres.

Por lo tanto, las interacciones múltiples entre el cultivo, arvenses, fitófagos y reguladores biológicos naturales y su manejo afectan las dinámicas de poblaciones de insectos y la sanidad del cultivo (Mendoza-Pérez, 2009). Son pocos los trabajos donde se explora la dinámica de poblaciones de insectos plaga en las áreas de los márgenes de los cultivos donde se encuentran las arvenses.

Saltamontes plaga en México

Los saltamontes pertenecen al orden Orthoptera y tienen una gran importancia agrícola en México, ya que se han convertido en una plaga con un alto potencial que ha llegado a poner en riesgo a la ganadería y agricultura (García y Lozano, 2011). La superfamilia Acridoidea es la más importante desde el punto de vista del número de especies que afectan a los cultivos en México. En la familia Acrididae se encuentran las siguientes especies de saltamontes plaga: *Melanoplus sp.*, *Brachystola magna* (Girard), *Taeniopoda eques* (Burmeister), y algunas especies de *Chromacris versicolor*. Otras de las especies son *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y *Sphenarium mexicanus* (Saussure) que son parte de la familia Pyrgomorphae, una de las familias comprendidas dentro de la superfamilia Pyrgomorphae (Kevan, 1977). Estas especies afectan una superficie de hasta 300,000 ha aproximadamente localizadas en el Altiplano y Norte del país, principalmente en cultivos de maíz, frijol, pastizales y hortalizas (SAGARPA, 2012).

De acuerdo al Comité Estatal de Sanidad Vegetal en el Estado de Michoacán (CESAVEM) las especies de saltamontes que se consideran plaga en el estado son *S. purpurascens*, *Melanoplus differentialis* (Thomas), *Brachystola magna* (Girard), *Taeniopoda eques* Burmeister, *Boopedum diabol* *Boopedum diabolicum*, *Melanoplus femurrubrum* (DeGeer),

Schistocerca damnifica (Saussure) y *Opeia* sp., estas se encuentran en 54 municipios de la parte norte de Michoacán (CESAVEM datos no publicados, 2013).

Importancia económica de saltamontes plaga

El saltamonte en todos sus estados de desarrollo causa daños, llega a consumir casi la mitad de su peso corporal de forraje verde en un día, lo que equivale a 250 miligramos diarios, 10 saltamontes/m² en una ha se llegan a abastecer con 25 kg, cantidad que equivale al consumo que realiza una vaca en un día (García *et al.*, 2006). Hewitt (1979) estimó que entre doce y veinticuatro saltamontes (dependiendo del tamaño) por metro cuadrado en 0.4 ha de zacate navajita, pueden consumir tanto forraje diario como el que consume una vaca, con esto se reduce de forma considerable el valor del forraje de los pastizales, lo que provoca una disminución en el peso del ganado. En México el umbral económico de los saltamontes son cinco saltamontes/m² dentro del cultivo y 15 en los márgenes de los cultivos, al contarse igual o mayor número de saltamontes y no aplicar ninguna medida de control se llega a reducir hasta el 75% de la producción e incluso provoca la pérdida total del cultivo (SENASICA, 2015).

Control convencional de saltamontes

En México el método más utilizado para regular los brotes poblacionales de ortópteros es la aplicación de productos químicos, los cuales están clasificados de acuerdo a su toxicidad (Barrientos-Lozano y Almaguer-Sierra, 2009) como: endosulfán (altamente tóxico), malatión (moderadamente tóxico), paratión metílico (extremadamente tóxico), azinfós metílico (altamente tóxico), clorpirifós (moderadamente tóxico), diazinón (moderadamente tóxico), metamidofós (altamente tóxico), dimetil (moderadamente tóxico), carbaril (moderadamente tóxico), metomil (altamente tóxico), deltametrina (ligeramente tóxico), cipermetrina (moderadamente tóxico), lambda cyhalotrina (moderadamente tóxico) y fipronil (moderadamente tóxico) (Forestales y Ebano, 2005). En Yucatán, México para el control de

la población de la langosta *S. piceifrons piceifrons* del 2004 al 2010 se aplicaron alrededor de 800 toneladas de paratión metílico (SENASICA, 2015), a pesar de que este producto está prohibido en siete países de Europa por causar daños al medio ambiente y la salud de las personas (Bejarano, 2001).

El insecticida más aplicado por los productores en Michoacán es la cipermetrina (Junta Local de Sanidad Vegetal “Generalísimo Morelos” en Queréndaro, Michoacán, datos no publicados). Este insecticida del grupo de los piretroides de amplio espectro, tiene varios efectos negativos sobre la salud humana, al alterar el sistema nervioso e inmunológico (Kaczwer, 2009), además de tener efectos en el sistema reproductivo interfiriendo en el transporte de las hormonas sexuales (Soderlund *et al.*, 2002).

Control biológico de saltamontes con hongos entomopatógenos

El control biológico es una estrategia de control de plagas en la que se utilizan enemigos naturales, antagonistas o competidores vivos capaces de regular la población de un organismo plaga a un nivel que no cause daños relevantes y mantenga la sustentabilidad de los agroecosistemas (Arredondo-Bernal y Sánchez, 2009).

Entre los agentes de control biológico están los hongos entomopatógenos, con cerca de 700 especies (Monzon, 2001). Estos organismos se encuentran en diversos ambientes en la naturaleza, como lo son rastrojos de cultivos, estiércol, en el suelo o en las plantas, pudiendo desarrollarse en lugares frescos, húmedos y con poco sol (Monzon, 2001; Becerra *et al.*, 2013). Poseen gran potencial para ser empleados como agentes de control biológico al presentar importantes ventajas, ya que pueden atravesar la cutícula del insecto de manera directa (Charnley y Collins, 2007), no afectan la salud humana ni al medio ambiente (Nava-Pérez *et al.*, 2012) y son fáciles de producir en sustratos económicos (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011). Los hongos entomopatógenos asociados al control de saltamontes son *B. bassiana*, *M. anisopliae* (Tamez, 2001) y *M. acridum*, el cual presenta especificidad para saltamontes y langostas. La especificidad de *M. acridum* se atribuye a que tiene menos

genes transposon en comparación con *M. anisopliae*, los cuales presentan mutaciones puntuales repetidas, que codifican proteínas que juegan un rol en las interacciones hongo-insecto (Gao *et al.*, 2011) Hay evidencia de que al analizar los genes encargados de codificar la transposasa, *M. acridum* presentó mutaciones puntuales inducidas por la repetición, las cuales no ocurren en *M. anisopliae*, ya que ha evolucionado con genes expandidos los cuales codifican a enzimas como proteasas, quitinasas, citocromo P450s, policétidos, sintasas y péptidos, los cuales degradan la cutícula, facilitando su capacidad de adaptación y la infección de varios ordenes de insectos. Además, *M. acridum* se caracterizó por transcripción de receptores acoplados a la proteína G: M (Gao *et al.*, 2011).

Características de *Beauveria bassiana*

Pertenece a la clase Sordariomycetes, orden Hypocrales, familia Clavicipitaceae (Sung *et al.*, 2007). Es uno de los géneros de hongos entomopatógenos que se aísla con más frecuencia y que presenta una distribución cosmopolita, ya que cuenta con un amplio rango de hospederos (Safavi, 2012). Sus características morfológicas son conidióforos simples e irregulares que terminan en racimos. La base de la célula es globosa o abultada con adelgazamiento del área de inserción de los conidios, el micelio es septado y los conidios se forman en cadenas (Humbert, 1998). Sus requerimientos de temperatura son entre 23.8 y 28.7 °C, sin embargo el crecimiento y esporulación son mayores a una temperatura de 25°C (Fernández, 2015). *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno que infecta a más de 500 especies de insectos de varios ordenes (Fargues y Remaudiere, 1977). Al seleccionar cepas de esta especie para el control biológico de un insecto plagas es necesario determinar la especificidad de hospedantes, mediante bioensayos en laboratorio (Vélez-Arango *et al.*, 2001), ya que se ha registrado que la virulencia y patogenicidad de aislados varía entre especies de insectos (Zimmermann, 2007).

Características de *Metarhizium anisopliae*

Pertenece a la clase Sordariomycetes, orden Hypocrales, familia Clavicipitaceae (Driver *et al.*, 2000). La distribución geográfica natural de *M. anisopliae* es muy amplia aunque se ha aislado más en áreas del Mediterráneo y tropicales, debido a que sus requerimientos térmicos son relativamente altos. Puede infectar a un amplio rango de hospederos (insectos) o bien desarrollarse como saprófito (Zimmermann, 1993). Se ha observado infectando a 200 especies de insectos (Cloyd-Raymond 1999), sin embargo, existen diferencias de patogenicidad entre éstas (Sepúlveda-Sanhueza, 2015). Requiere humedad relativa superior al 92.5% y temperaturas de 15 a 35°C para la germinación de esporas, crecimiento de micelios y esporogénesis (Roberts, 1974). El hongo germina cuando está en contacto físico con un insecto (Walstad *et al.*, 1970). Solo cuando las condiciones ambientales de humedad y temperatura son adecuadas los conidióforos pueden extenderse a través de la cutícula para cubrir al insecto con conidios (Carballo y Gurharay, 2004).

La especie *M. anisopliae* presenta conidios de forma cilíndrica u ovals, es frecuentemente angosto en la parte media y truncado en ambos lados, desarrolla colonias verdes (Humber, 1997).

Características de *Metarhizium acridum*

Es el agente biológico más promisorio por presentar especificidad para saltamontes y langostas (Wang *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2011). Sibao *et al.*, (2011) observaron que al realizar una comparación de los genes que regulan el crecimiento sobre la cutícula de la oruga (*Monduca sexta* L.) de *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner y Humber (Clavicipitaceae) y *M. acridum*, en el primero el desarrollo fue regulado por el gen *Mest 1*. En *M. acridum* este gen estaba ausente, por lo que no infectó a la oruga. *Mest 1* aumentó la virulencia de *M. robertsii* en las orugas *Galleria mellonella* y *M. sexta*, apuntando a la conclusión de que la especialización de *M. acridum* de saltamontes y langostas es el resultado de cambios en un único gen. *M. acridum* presenta una patogenicidad y virulencia mayor en saltamontes y langostas, en comparación con *M. anisopliae* (Milner y Prior, 1994). Se ha demostrado baja virulencia hacia termitas, larvas de escarabajos y *Apis mellifera* L. (Gao *et al.*, 2011).

En el 2002 Rodríguez y Lecuona realizaron una selección de hongos entomopatógenos considerando porcentajes de mortalidad mayores al 90% y virulencia sobre *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). Se obtuvieron 34 cepas de *B. bassiana* y 35 de *M. acridum*. Se observó que los saltamontes tratados con *M. acridum* tuvieron un menor tiempo de supervivencia de los saltamontes, con respecto a los tratados con *B. bassiana*. Las cepas de *M. acridum* provocaron la muerte a los siete días en promedio, frente a los 10.4 días de *B. bassiana*.

Cepa comercial

La cepa comercial de *M. acridum* producida por el Comité de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), tiene la clave CHE-CNRCB 213 en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) (datos no publicados). Fue obtenida de una búsqueda de hongos entomopatógenos realizada de diciembre de 1995 a febrero de 1996 para el control de *S. piceifrons piceifrons* en la Isla Socorro, archipiélago de Revillagigedo, México. Se seleccionó por medio de bioensayos en laboratorio de una colección de 40 aislados de *Metarhizium* sp. pertenecientes al CNRCB por ser uno de los más virulentos y por tener los mayores rendimientos de conidios/kg de arroz (Hernández-Velázquez *et al.*, 1997).

Las primeras aplicaciones de esta cepa se realizaron en Tizimín, Yucatán en 40 bandos de primer y segundo estado ninfal de *S. piceifrons piceifrons* en una extensión de 17 ha y se observó la disminución de los bandos al séptimo día de la aplicación, alcanzando su máximo efecto con un 85% de mortalidad acumulada entre los días 12 y 14 (Hernández-Velázquez *et al.*, 2003). Esta cepa se ha caracterizado molecularmente junto con 16 cepas de *Metarhizium* de las colecciones “Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi” (ARSEF), USA y de la “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization” (CSIRO), Australia. El resultado de este estudio mostró que los aislados de México se agrupan de manera separada del resto de las cepas de referencia. Asimismo se observó que este grupo de aislados de México mantienen el valor de similitud más alto (82%) con la cepa FI-985 de Australia, que corresponde al clado siete de *M. acridum* (Milner *et al.*, 2003).

Objetivo general

Evaluar las estrategias agroecológicas de manejo de saltamontes plaga en agroecosistemas de maíz de Erongarícuaro, Michoacán.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del manejo agrícola en policultivo, monocultivo y la vegetación de los márgenes de los cultivos sobre la comunidad de saltamontes y sus hongos entomopatógenos asociados (Capítulo 3).
- Evaluar la susceptibilidad de diferentes estadios del *Sphenarium purpurascens purpurascens* a una cepa comercial de *Metarhizium acridum* en laboratorio (Capítulo 4).
- Comparar cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* y una cepa comercial de *Metarhizium acridum* (Sordariomycetes: Hypocreales) para el control biológico de *Sphenarium purpurascens purpurascens* en condiciones de laboratorio y campo (Capítulo 5).

Hipótesis

Hipótesis 1.

En el policultivo hay menor riqueza y abundancia de saltamontes y mayor riqueza y abundancia de hongos entomopatógenos en comparación del monocultivo.

En la vegetación de los márgenes del policultivo y monocultivo hay mayor riqueza y abundancia de saltamontes y hongos entomopatógenos en relación al interior del monocultivo y del policultivo.

Hipótesis 2.

Los estadios de ninfas de *Sphenarium purpurascens purpurascens* son mas susceptibles a una cepa comercial de *Metarhizium acridum* en comparación con el adulto.

Hipótesis 3.

Existen diferencias de patogenicidad entre dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* de Erongarícuaro, Michoacán sobre *Sphenarium purpurascens purpurascens* en condiciones de laboratorio.

Hipótesis 4.

La patogenicidad y virulencia sobre *Sphenarium purpurascens purpurascens* de la cepa nativa es mayor en comparación con la cepa comercial *Metarhizium* sp, bajo condiciones de campo, ya que está adaptada a las condiciones ambientales del sitio de estudio.

Literatura citada

Altieri, M. A. (1992). Agroecological foundations of alternative agriculture in California. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 39, 23-53.

Altieri, M. A. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 22(53), 8581-8589.

Altieri, M. A., (1994). Bases agroecológicas para una producción agrícola sustentable. *Agricultura técnica*, 54(4), 371-386.

Altieri, M. A., y Nicholls, C. I. (2004). *Biodiversity and pest management in agroecosystems*. Second Edition. CRC Press, 32.

Altieri, M. A., y Nicholls, C. I. (2013). *Diseños agroecológicos para incrementar la biodiversidad de entomofauna benéfica en agroecosistemas*. Primera edición. SOCLA. Medellín, Colombia, 83.

Andow, D. A. 1991. Vegetational diversity and arthropod population response. *Annual review of entomology (United States)*, 36, 561-586.

Arredondo-Bernal, H., y J. Sánchez. (2009). Situación Actual del Control Biológico en México. XX Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. 2-4 nov. 2009, Villahermosa, Tabasco, México, 49.

Balvanera, P., y H. Cotler (2009). *Estado y tendencias de los servicios ecosistémicos, en Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, 185-245.

Barrientos-Lozano, L., y Almaguer-Sierra, P. (2009). Manejo sustentable de saltamontes (Orthoptera: Acridoidea) en México, *Vedalia*, 13, 51-56.

Becerra, V. V., Paredes, M. C., Rojo, C. M., y France, A. (2013). RAPD and ITS reveal molecular variation of Chilean populations of *Beauveria bassiana*. Recuperado el 17 de mayor del 2016 de: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/36657/1/at07014.pdf>

- Bejarano, F. (2001). “*Plaguicidas: Docena sucia en México*”. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM), 23.
- Bendixen, L. E., Kim, K. U., Kozak, C. M., y Horn, D. J. (1981). An annotated-bibliography of weeds as reservoirs for organisms affecting crops. 2a. arthropods. *Ohio agricultural research and development center research bulletin*, 1125, 1-117.
- Blanco, Y., y Leyva, A. (2009). Las arvenses y su entomofauna asociada en el cultivo del maíz (*Zea mays*, L.) posterior al periodo crítico de competencia. *Cultivos tropicales*, 30(1), 36.
- Carballo, M., y Gurharay, F. (2004). *Control Biológico de Plagas. Plaguicidas-Aspectos Ambientales*. Primera edición. Manual técnico, 232.
- Castillo, N., y González, C. (2008). Comportamiento poblacional de insectos fitófagos en el monocultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y en la asociación con maíz (*Zea mays* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 154-159.
- Charnley, A.K. & Collins, S.A. (2007) *Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control*. In: Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S., Eds., *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin, 159-187.
- Claro, O. E., Ramos, J. J., y Pérez, A. C. (2006). Aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. *Fitosanidad*, 10(4), 1-8.
- Cloyd-Raymond, A. (1999). The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Midwest Biological Control News*. V1 (7). Recuperado el 17 de junio del 2016 de: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf607.html>
- Collar Urquijo, J. L., Celma Calamita, J., Blandford, S., y Thomas, M. B. (2002). Control of *Dociostaurus maroccanus* and *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) by field applications of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 28, 185-192.

Del Val, E., Arnés, E., Gaona, J. A., y Astier, M. (2013). Incidencia de gallina ciega, sistemas de manejo campesino y variabilidad climática en la comunidad de Napízaro, Michoacán (México). *Agroecología*, 8(1), 53-62.

Dellepiane, A. V., Sánchez Vallduví, G., y Tamagno, L. N. (2015). Sustentabilidad del monocultivo e intercultivo de *Helianthus annuus* L. (girasol) con *Trifolium pratense*, *Trifolium repens* o *Lotus corniculatus* en La Plata, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114(3), 85-91.

Driver, F., Milner, R. J. & Trueman, W. H. A. (2000). "A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA". *Mycological Research*. 104(2), 135-151.

Espinel, C., y Torres, T. (2009) Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 35(1), 18-21.

Fargues, J., y Remaudiere, G. (1977). Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, 62, 31–37.

Fernández Bravo, M. D. C. (2015). Efecto de la temperatura, la actividad del agua, y la radiación UV-B sobre la germinación y crecimiento de aislados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuill. Procedentes del suelo y filoplano de dos ecosistemas forestales. Recuperado el 17 de agosto del 2016 de: <http://hdl.handle.net/10396/12794>

Forestales A. Y. P., Ebanó C. E. (2005) El chapulín *Melanoplus* sp. y su manejo en la planicie Huasteca. Recuperado el 12 de mayo del 2016 de: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/147.pdf>

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., y Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*. Recuperado el 30 de agosto del 2017 de: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>

García G. C., y Lozano G. J. (2011). Control biológico de plagas de chapulín en el norte-centro de México. Instituto Politécnico Nacional. Zacatecas, México. Recuperado el 13 de enero del 2016 de: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2014_1/control_biologico.pdf

García, E., Gurrola-Reyes, J. N., y González-Maldonado, M. B. (2006). Saltamontes (orthoptera: acridoidea) de pastizales de la “región de los llanos” en Durango, México. *Folia Entomologica Mexicana*, 45(3), 273-282.

García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., y Martínez, R. F. M. (2014). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28.

Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Agruco-CATIE. Turrialba, Costa Rica, 359.

Gliessman, S. R., Rosado-May, F. J., Guadarrama-Zugasti, C., Jedlicka, J., Cohn, A., Méndez, V. E., y Jaffe, R. (2007). Agroecología: promoviendo una transición hacia la sostenibilidad. *Revista Ecosistemas*, 16(1), 23-30.

González E. A. J., Islas G. A., Espinosa C. J. A., y Vázquez C. S. W. (2008). Impacto económico del mejoramiento genético del maíz en México: híbrido H-48. Publicación Especial No. 25. *INIFAP. México, D.F.*, 88-90.

Gutiérrez, C. G., y Maldonado, M. B. G. (2010). Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai*, 6(1), 17-22.

Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M., y Garza-González, E. (1997). Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia*, 4, 45-46.

Hernández-Velázquez, V. M., Hunter, D. M., Barrientos-lozano, L., Lezama-Gutiérrez, R., y Reyes-Villanueva, F. (2003). Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): laboratory and field trials. *Journal of Orthoptera Research*, 12(1), 89-92.

Herrera, J., Cadena, P., y Sanclemente, A. (2011). Diversidad de la artropofauna en monocultivo y policultivo de maíz (*Zea mays*) y habichuela (*Phaseolus vulgaris*). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle, 6(1), 23-31.

Hewitt, G. B. (1979). Hatching and development of rangeland grasshoppers in relation to forage growth, temperature, and precipitation. *Environmental Entomology*, 8(1), 24-29.

Hopkinson, J. E., M. R. Zalucki & D. A. H. Murray. (2013). Host selection and parasitism behavior of *Lysiphlebus testaceipes*: Role of plant, aphid species and instar. *Biological Control*, 64, 283-290.

Humber R. A. (1997). Identification Fungi 153-186. En: Lacery L. (Ed). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, 409.

Humber R. A. (1998). Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Workshop. Recuperado el 5 de febrero del 2016, de: http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect_mycology.html

Kaczewer, J. (2009). Uso de agroquímicos en las fumigaciones periurbanas y su efecto nocivo sobre la salud humana. Grupo de Reflexión Rural: Pueblos Fumigados: Informe sobre la problemática del uso de plaguicidas en las principales provincias sojeras de la Argentina. Recuperado el 1 de mayo del 2016 de: <http://www.ecoscordoba.com>

Kevan, D. K. (1977). The American Pyrgomorphidae. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 36, 3-28.

Litsinger, J. A. & Ano-Moody, K. (1976). *Integrated pest management in multiple cropping systems*. In: Multiple Cropping, ASA Special Publication, No. 27, 45.

Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D. L., Langewald J., y Thomas M. (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 667-702.

Martínez, E. J., Sandino, V., Pérez, D., y Sánchez, D. (2011). Comparación de la incidencia poblacional de insectos plagas y beneficios en arreglos de monocultivo versus policultivos de

tomate (*lycopersicum esculentum* Mill.) pipian (*Cucúrbita pepo* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *La Calera*, 8(9), 5-11.

McClure, M. S. (1982). Factors affecting colonization of an orchard by leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) vectors of peach x-disease. *Environmental Entomology*, 11(3), 695-700.

Mendoza-Pérez, F. B. (2009). Regulación de insectos mediante el manejo de malezas. Actas del III Seminario Internacional de Cooperación y Desarrollo en Espacios Rurales Iberoamericanos, 139, 159.

Milner, R. J., Lozano, L. B., Driver, F., y Hunter, D. (2003). A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*—strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridum vittatum*. *BioControl*, 48(3), 335-348.

Milner, R. J., y C. Prior. (1994). Susceptibility of the australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*, and the wingless, grasshopper, *Phaulacridum vittatum*, to the fungi *Metarhizium* spp. *Biological Control*, 4, 132-137.

Montero, G. A. (2014). *Malezas e Invasoras de Argentina: ecología y manejo*. In: Fernandez O.A., Acciaresi H .A., Leguizamón E.S. editors. Ecología de las interacciones entre malezas y artrópodos. Capítulo X, 267-305.

Montiel-Aguirre, G., Krishnamurthy, L., Vázquez-Alarcón, A., y Uribe-Gómez, M. (2006). Opciones agroforestales para productores de palma de coco en el estado de Michoacán, México. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 557-564.

Monzon, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63, 95-103.

Motta-Delgado, P. A., y Murcia-Ordoñez B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente y Agua*, 6(2), 77-90.

Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.

Peréz, E., De la Cruz, E., Mapes, C., y Andrade, J. M. (2005). Las comunidades campesinas: Un importante reservorio de recursos para la humanidad. *Leisa Revista de Agroecología (Peru)*, 20(4), 27.

Risch, N. (1983). Estimating morbidity risks in relatives: the effect of reduced fertility. *Behavior genetics*, 13(5), 441-451.

Roberts, D.W. (1974). *Fungal infections of mosquitoes*. In: Aubin A., Belloncik S., Bourassa J.P., La Coursière E., Péllissier M. editors. *Le contrôle des moustiques/Mosquito control*: 143-193.

Rodríguez, J. L., y Lecuona, R. E. (2002). Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1), 67-84.

Ruiz-González, R. O., y Victorino-Ramírez, L. (2015). Respuesta del policultivo jamaica-frijol-maíz a tratamientos de fertilización en Villaflores, Chiapas, México. *Agrociencia*, 49(5), 545-557.

Safavi, S. A. (2012). Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. *Biologia*, 67(6), 1062-1068.

SAGARPA (2012). *Guía de plaguicidas Autorizados de Uso Agrícola*. Dirección Estatal de Sanidad Vegetal, 32.

SAGARPA-SEDAGRO. (2002). *Anuario estadístico de la producción agropecuaria, forestal y pesquera. Michoacán*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Social-Secretaría de Desarrollo Agropecuario-Alianza para el Campo, México.

Sarandón, S. J., y Chamorro, A. M. (2003). *Policultivos en los sistemas de producción de granos*. In: Satorre, E.H., R.L. Benech-Arnold, G.A. Slafer, E.B. editors. Producción de cultivos de granos. Bases funcionales para su manejo. Buenos Aires, Argentina, 353-372.

SENASICA (2015). Disponible en internet. Recuperado el 15 de marzo del 2016 de: <http://senasica.gob.mx>

Sepúlveda-Sanhueza, M. E. (2015). *Actividad enzimática e insecticida de seis cepas nativas de Metarhizium spp. para el control de Aegorhinus superciliosus (Coleoptera: Curculionidae)* (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción Facultad de Agronomía Programa de Magister en Ciencias Agronómicas).

SIAP (2015). Anuario estadístico de la producción Agrícola. Recuperado el 16 de mayo del 2016 de: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/

SIAP, (2014). Cierre de producción Agrícola por cultivo. Recuperado el 13 de marzo de 2016 de: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Soderlund, D., J. Clarck, L. Sheets, L. Mullins, V. Piccirillo, D. Sargent, Stevens J., y L. Weiner. (2002). Mechanisms of pyrethroids neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171, 3-59.

Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J., Luangsa-Ard, J., Shrestha, B., y Spatafora, J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies Mycology*, 57(1), 5-59.

Tamez, P. (2001). “Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México”, *Ciencia UANL*, 4, 143-152.

Toledo, V. M. (1995). *Campesinidad, agroindustrialidad, sostenibilidad: los fundamentos ecológicos e históricos del desarrollo rural*. Cuadernos de trabajo, 34.

Uribe-González, E., y Santiago-Basilio, M. Á. (2012). Contribución al conocimiento de enemigos naturales del chapulín (Orthoptera: Acridoidea) en el Estado de Querétaro, México. *Acta zoológica mexicana*, 28(1), 133-144.

- Vélez-Arango, P., Estrada-Valencia, M., González-García, M. T., Valderrama-Fonseca, A. M., y Bustillo-Pardey, A. E. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas*, 62(1), 38-53.
- Viglizzo, E. F., A. F. C. Frank., J. Bernardos., Buschiazzi D. E., & S. Cabo. (2006). A rapid method for assessing the environmental performance of commercial farms in the Pampas of Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 117, 109-134.
- Walstad, L. D., Anderson, R. F. & Stambaugh, W. J. (1970). Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal Invertebrate Pathology*, 16, 221-226.
- Wang, S. M., Fang, W., Wang, C. & R. J. Leger (2011). "Insertion of an Esterase Gene into a Specific Locust Pathogen (*Metarhizium acridum*) Enables It to Infect Caterpillars". *PLoS Pathog.* 7 (6): e1002097. doi:10.1371/journal.ppat.1002097.
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biological agent. *Pestic. Science*, 37, 375-379.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.

Artículo aceptado para publicación en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (REMEXCA). El texto está acorde con las normas editoriales de la revista.

Capítulo 3

Ortópteros (Caelifera) y sus hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en Erongarícuaro, Michoacán, México.

Venecia Quesada-Béjar^{1,3}, Miguel B. Nájera R.^{2,3}, Enrique Reyes-Novelo⁴ y Carlos E. González-Esquivel.³

¹Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 C. P. 97100 Mérida, Yucatán México. Tel. +52(443)3223878 eslabonmichoacan@hotmail.com.

²Campo Experimental Uruapan, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Latinoamericana No. 1101 Col. Revolución C. P. 60500, Uruapan, Michoacán, México. Tel. +52(452)5237392 minaj47@hotmail.com.

³Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES-Universidad Nacional Autónoma de México), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex Hacienda de San José de La Huerta C. P. 58190 Morelia, Michoacán, México. Tel. +52(443)3223878 cgesquivel@cieco.unam.mx*. Autor para correspondencia.

⁴Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Itzaes por 49 No. 490 Centro. C. P. 97000, Mérida, Yucatán, México. Tel. +52 (999)9255755 enrique.reyes@correo.uady.mx

RESUMEN

Los saltamontes son una plaga importante del maíz, uno de sus enemigos naturales son los hongos entomopatógenos (HEP). El manejo adecuado de este cultivo, que involucre cambios en el microhábitat puede contribuir al control de las poblaciones de saltamontes, así como la presencia de sus enemigos naturales. Se evaluó el efecto de dos tipos de manejo agrícola:

monocultivo (MC-I) de maíz y policultivo de maíz, calabaza y frijol (PC-I), así como de la vegetación de los márgenes del monocultivo (VMM) y la vegetación de los márgenes del policultivo (VMP), sobre la riqueza y abundancia de saltamontes y sus hongos entomopatógenos (HEP) asociados en Erongarícuaro, Michoacán. Se recolectaron saltamontes mensualmente con una red de golpeo de julio a diciembre de 2015 en dos parcelas de cada tipo de manejo y su vegetación marginal en tres sitios. La comunidad de saltamontes (CS) estuvo conformada por 17 especies, en donde *Sphenarium purpurascens purpurascens* Charpentier, fue la especie dominante (97.8% de la abundancia). El tipo de manejo agrícola no tuvo efecto sobre la riqueza de especies. La riqueza en la vegetación marginal de los cultivos no explicó la riqueza en el MC-I y PC-I, sin embargo la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en la vegetación marginal en los sitios explicó la abundancia encontrada en el MC-I y el PC-I. De 2 920 saltamontes colectados, el 0.41% estuvieron infectados por *Metarhizium* Sorokin o *Beauveria* Vuill. El HEP con mayor frecuencia de infección fue *Metarhizium*. La proporción de individuos infectados y las condiciones del PC-I se relacionaron positivamente, en comparación con la VMP. Los sitios con mayor diversidad vegetal tuvieron una mayor abundancia de saltamontes y mayor infección con HEP.

Palabras clave: saltamontes, *Sphenarium purpurascens purpurascens*, *Metarhizium*, *Beauveria*.

ABSTRACT

In maize crops, grasshoppers (Orthoptera: Caelifera) are an important pest. Crop management can contribute to their control by changing the microhabitat and favouring antagonist organisms. The effect of two types of agricultural management were evaluated; maize monocrop (MC-I) and policulture (PC-I) maize, beans and squash), as well as the surrounding vegetation (MVM and MVP, respectively) on the richness and abundance of grasshoppers and their associated entomopathogenic fungi (EPF) in Erongaricuaró, Michoacan. Grasshoppers were collected monthly with a net from July to December 2015 in two plots per management type and the marginal vegetation in three sites. The grasshopper community was formed by 17 species, in which *Sphenarium purpurascens purpurascens*

Charpentier, was the dominant one (97.8% abundance). The type of agricultural management did not have an effect on species richness. Richness in MVM and MVP did not explain species richness in MC-I or PC-I, however, density of *S. purpurascens purpurascens* in MVM and MVP in the sites explained the abundance in MC-I and PC-I. Out of 2 920 collected individuals, only 0.41% were infected by *Metarhizium Sorokin* or *Beauveria Vulli*. The EPF with highest frequency of infection was *Metarhizium*, with the proportion of infected individuals and the conditions in PC-I relating positively, compared to SVP. Sites with higher plant diversity had a greater abundance of grasshoppers and presence of infection with EPF.

Key words: grasshoppers, *Sphenarium purpurascens purpurascens*, *Metarhizium*, *Beauveria*.

INTRODUCCIÓN

En México, el maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo por la superficie que ocupa, ya que es sembrado en más de ocho millones de hectáreas, lo que representa el 39% de la superficie agrícola del país (González-Estrada *et al.*, 2008). El 72.1% de las unidades productoras de maíz en México son de 0–5 ha, conformadas por productores pequeños que operan con muy poca mecanización (SAGARPA, 2010).

Para producir maíz, las comunidades rurales emplean sistemas de manejo agrícola que son resultado de sus conocimientos y sus medios para la apropiación de recursos naturales (Toledo, 2010). Por ejemplo, en Napízaro, perteneciente al municipio de Erongarícuaro, Michoacán, dos de los sistemas de manejo agrícola que los productores utilizan son el monocultivo (MC) y la milpa o policultivo (PC), compuesta de maíz, frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y calabaza (*Cucurbita maxima* L.) (Del Val *et al.*, 2013). El sistema de MC se caracteriza por la aplicación de fertilizantes e insecticidas sintéticos y la minimización de la diversidad de especies vegetales (Nicholls y Altieri, 2006). Esto trae como consecuencia la simplificación del sistema y la disminución de la diversidad de organismos benéficos (Andow, 1991).

Se ha documentado que dadas las características mencionadas, en el MC se favorece la proliferación de herbívoros (Nicholls, 2008) que aumentan su densidad hasta causar daños

económicos en los cultivos, por lo que se considera una plaga. Dicha proliferación es mayor a medida que se incrementa la superficie cultivada con MC (Brechelt, 2004; Altieri y Nicholls, 2005). En contraste, existen estudios que muestran cómo las especies plaga, particularmente los insectos, tienen menor impacto en la producción agrícola cuando se emplean sistemas de PC en comparación con los de MC (Altieri y Nicholls, 2013). Las principales razones de esta diferencia son la heterogeneidad del hábitat, que repercute en una menor colonización de herbívoros; una menor tasa de reproducción a consecuencia de sustancias químicas producidas por las diferentes plantas que conforman el sistema; camuflaje; inhibición de alimentación por parte de plantas no-hospederas y por una mayor diversidad de especies que actúan como enemigos naturales de los herbívoros (Andow, 1991).

No obstante esto no siempre se cumple. Altieri (1995) consideró que el efecto resultante de las estrategias de manejo agrícola depende en gran medida de la biología de la especie plaga, de la abundancia de sus enemigos naturales, de la duración del cultivo en el agroecosistema y de la vegetación alrededor del cultivo. Los hongos entomopatógenos (HEP) son enemigos naturales de la mayoría de insectos considerados plagas de importancia económica (Dent 1999; Cañedo y Ames, 2004). Son escasos los estudios que han evaluado la distribución de insectos plaga y de sus HEP asociados en los cultivos. Es imprescindible el estudio de los componentes que involucran los tres niveles tróficos (planta, herbívoro y HEP), ya que estos componentes tienen implicaciones para el diseño de estrategias de manejo integrado de plagas (Altieri, 1995). Además los HEP se pueden utilizar como agentes de control biológico como parte del manejo integrado de plagas.

Los representantes de la superfamilia Acridoidea MacLeay (Orthoptera), conocidos comúnmente como saltamontes o chapulines, son un grupo importante entre los insectos que afectan a los cultivos de México, debido a que más de 12 especies presentan brotes poblacionales ocasionales, que provocan daños severos (Kevan, 1977; Barrientos-Lozano, 2001). Los HEP, como *Beauveria bassiana*. (Bals.-Criv.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metchn.) Sorokin y *Entomophaga grylli* (Fresen.), son enemigos naturales de los saltamontes y en algunos casos pueden regular sus poblaciones (Uribe-González y Santiago-

Basilio, 2012) cuando se usan como agentes de control biológico en agroecosistemas (Díaz *et al.*, 2006).

El Estado de Michoacán se considera uno de los más afectados por plagas de saltamontes en México (Fontana *et al.*, 2008). Sus brotes se presentan de forma cíclica en la temporada de lluvias, causando daños importantes en los cultivos, lo que demanda la implementación de campañas fitosanitarias, en las que la principal estrategia de control es la aplicación masiva de insecticidas sintéticos (Bahena-Juárez y Velázquez-García, 2012), a pesar de las consecuencias negativas que esto conlleva para la sostenibilidad de los agroecosistemas y el riesgo para la salud de los productores (Barrientos-Lozano y Almeguer-Sierra, 2009). A fin de desarrollar estrategias de manejo integrado para el control de estos insectos, es necesario conocer la respuesta de la plaga a la variación en las prácticas de cultivo de la región, por lo que este trabajo tuvo como objetivos evaluar el efecto del sistema de manejo agrícola (MC o PC) y la vegetación de los márgenes de los cultivos (VMM y VMP) sobre la riqueza y abundancia de saltamontes (CS) y sus HEP asociados en el municipio de Erongarícuaro, Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio y diseño de muestreo: El estudio se llevó a cabo en el municipio de Erongarícuaro, el cual forma parte de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro en el estado de Michoacán. La región tiene un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw). El rango de temperaturas oscila entre 5 y 26 °C con una precipitación pluvial promedio anual de 1 040.8 mm (INEGI, 2009). Cuenta con un tipo de vegetación de bosque de pino y encino (Díaz-Barriga *et al.*, 1988).

Se seleccionaron tres sitios con parcelas para producción de maíz. El primer sitio se encuentra en la localidad de la Ex Hacienda Charahuén (19°31'23"-19°31'13" N y 101°42'32"-101°42'19" W), en tanto que los dos restantes están en la localidad de Napízaro (19°35'94"-19°35'54" N y 101°41'85"-101°41'51" W y 19°36'10"-19°36'00" N y 101°41'93"-101°41'56" W). En los tres sitios se verificó la presencia de saltamontes en el periodo de

barbecho (mayo del 2015), cuando la mayoría de sus especies están en fase de huevo. Las observaciones se confirmaron mediante entrevistas con los productores.

En cada sitio se seleccionaron arbitrariamente dos parcelas con una superficie de 9×200 m, una con el manejo agrícola de MC de maíz y su vegetación al margen del monocultivo (VMM) y otra de PC compuesto de maíz, frijol, calabaza y su vegetación al margen del policultivo (VMP). Se realizaron tres réplicas de cada tipo de manejo agrícola, con su respectiva vegetación al margen, dando un total de seis parcelas, a ninguna se les aplicó insecticida.

En cada parcela se realizaron colectas de saltamontes una vez por mes durante la temporada de cultivo (julio a diciembre del 2015). Las colectas se realizaron en transectos cubriendo longitudinalmente la parcela, una para el interior del MC (MC-I), otro para el PC (PC-I) y otra para la vegetación marginal de cada una (VMM y VMP). Las colectas se realizaron la tercera semana de cada mes, con una red de golpeo de 33 cm de diámetro, entre las 10 y las 13 h, mediante 200 golpes de red por transecto hasta una altura de 1.50 m. Los saltamontes colectados se introdujeron vivos en recipientes de plástico de un litro y se trasladaron al laboratorio. Un ejemplar de cada morfoespecie fue fijado en alcohol al 70% e identificado a nivel de especie tomando como base los criterios de Mariño *et al.*, (2011). Algunos ejemplares se identificaron hasta nivel de subfamilia, debido a la ausencia de especímenes machos en fase adulta. Las determinaciones fueron corroboradas por la Colección Nacional de Insectos del Instituto de Biología de la UNAM.

Aislamiento e identificación de HEP: Los saltamontes colectados en campo fueron confinados en recipientes de un litro a una densidad de diez ejemplares por recipiente a temperatura ambiente. Se les alimentó con hojuelas de avena comercial y lechuga desinfectada mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 20 min y posteriormente enjuagada con agua destilada. Este procedimiento se realizó durante dos semanas. Los individuos muertos fueron colocados en cámaras húmedas individuales, consistentes en un recipiente de plástico de 3.5×4.5 cm con tapa y un papel filtro en el fondo, humedecido cada 2 d con 100 μ L de agua destilada durante 10 d, con el fin de inducir la esporulación de HEP. El aislamiento de HEP se realizó en una campana de flujo laminar

y consistió en el raspado de conidios presentes sobre el cadáver y su siembra en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri, las cuales fueron incubadas a 27 °C durante cuatro a seis días. En este periodo se observó el crecimiento del micelio cada 48 h. Los cultivos puros se obtuvieron realizando reaislamientos del hongo a partir del cultivo original (Monzón, 2001). Los aislados obtenidos serán integrados a la colección de HEP del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). La identificación de HEP de saltamontes se realizó mediante la observación macro y microscópica de la morfología del crecimiento y estructuras del hongo (micelio, conidios y conidióforos). Se utilizaron claves dicotómicas (Samson *et al.*, 1988) para identificar los géneros de HEP. Se registró la riqueza de HEP y el número de saltamontes infectados.

Se realizó una matriz de Bray-Curtis con medidas de similitud de datos de la abundancia acumulada de los seis muestreos de cada especie utilizando el paquete Biodiversity Pro versión 2 (McAleece, 1997), con el fin de obtener las distancias ecológicas que expresan las diferencias en la estructura y composición de la comunidad de saltamontes entre parcelas (Bray y Curtis, 1957), así como una matriz de distancias geográficas entre las parcelas transformadas con log+1 para homogeneizar las distancias extremas (Su *et al.*, 2004; Manly, 2006). Con estas dos matrices se aplicó la prueba de Mantel (1967) con 10 000 permutaciones, mediante el software estadístico XLSTAT (Addinsoft, 2009) para Excel, para explorar la independencia espacial de las muestras y usarlas como réplicas en los análisis estadísticos.

Para probar el efecto de los tratamientos sobre la riqueza de especies de saltamontes y sobre la abundancia de la especie dominante, se empleó un modelo lineal mixto usando el software estadístico R versión 3.2.3. (Pinheiro y Bates, 2000). El modelo se ajustó empleando la función “lme” de la biblioteca “nlme” para R (Pinheiro *et al.*, 2007). Como predictores se incluyeron el tipo de manejo agrícola, el tiempo, tanto en término lineal (T) como cuadrático (T²) y su interacción. La riqueza observada de especies y la abundancia de la especie dominante en la vegetación marginal fueron incluidas como covariables (S) en los modelos de riqueza y abundancia, respectivamente. El sitio y la parcela fueron incluidos como factores aleatorios, con el fin de modelar la asociación espacial de los tratamientos y de las diferentes

colectas en el tiempo, respectivamente. Las ecuaciones del modelo para riqueza y abundancia fueron:

$$(1) \log(\text{riqueza}+1) = \text{tratamiento} + S + T + T^2 + \text{tratamiento} * T + \text{tratamiento} * T^2 + 1|\text{sitio/parcela}$$

$$(2) \log(\text{abundancia}+1) \sim \text{tratamiento} + S + T + (T^2) + \text{tratamiento} * T + \text{tratamiento} * (T^2)$$

Donde:

S = Covariables: Riqueza de especies de saltamontes y abundancia de la especie dominante en la vegetación marginal del monocultivo y policultivo.

T = Tiempo

En ambos casos la variable de respuesta se transformó con $\log(\text{respuesta}+1)$ con el fin de cumplir los supuestos de homogeneidad de varianza y de normalidad de los residuos. Finalmente, se exploró la asociación de la frecuencia de infección por HEP aislados en saltamontes con los tratamientos en los que fueron colectados, empleando una prueba de Chi cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la CS: Se recolectaron 2 920 saltamontes pertenecientes a dos familias, cuatro subfamilias, diez géneros y 17 especies. El 97.8 % del total de individuos recolectados pertenecieron a una sola especie, *Sphenarium purpurascens purpurascens* Charpentier (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de saltamontes y su abundancia en dos tipos de manejo agrícola y de la vegetación de los márgenes de las parcelas en Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. Covariables: VMM: Vegetación marginal del monocultivo y VMP: vegetación marginal del policultivo. Datos acumulados de muestreos con redes de golpeo realizados entre julio y diciembre de 2015.

Taxa	Tratamientos		Covariables		Total
	MC-I	PC-I	VMM	VMP	
Acrididae	10	5	32	17	64
Gomphocerinae					
<i>Boopedum diabolicum</i> Bruner	2	1	10	2	15
<i>Dichromorpha</i> sp.			4		4
Sp. 1			3	2	5
Sp. 2			1		1
Sp. 3		1	1		2
Melanoplinae					
<i>Melanoplus differentialis differentiali</i> Thomas	6		10	5	21
<i>Melanoplus regalis</i> Dodge				1	1
<i>Melanoplus sanguinipes sanguinipes</i> Fabricius			2		2
<i>Philocleon</i> sp.	1			1	2
Sp. 1	1		5	6	12
Sp. 2			1		1
Oedipodinae					
<i>Arphia conspersa</i> Scudder				1	1
<i>Encoptolophus otomitus</i> Saussure				1	1
<i>Spharagemon</i> sp.			1		1
Sp. 1		4	2		6
Sp. 2			1		1
Pyrgomorphidae					
Pyrgomorphinae					
<i>Sphenarium purpurascens purpurascens</i> Charpentier.	373	508	791	1184	2856
Riqueza	6	5	14	10	
Abundancia	393	519	864	1220	2920

La evidente dominancia de *S. purpurascens purpurascens* en los sitios de estudio implica que ésta es la especie económicamente más importante para los productores de maíz en la región. La prueba de Mantel mostró que la estructura y composición de la CS en las parcelas no se correlacionaron con las distancias geográficas entre ellas ($R = -0.178$, $P = 0.348$) por lo que se consideraron muestras independientes para el análisis comparativo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Matriz de similitud de distancia ecológica entre parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. PC: policultivo, MC: monocultivo.

	MC 1	MC 2	MC 3
PC 1	80.84	73.21	72.61
PC 2	90.57	98.51	66.24
PC 3	86.26	78.59	49.58

Evaluación del sistema de manejo sobre la riqueza de especies de saltamontes: La riqueza de especies cambió significativamente en el T, siendo el término cuadrático el que mejor describió dicho cambio ($P < 0.05$). El tipo de manejo agrícola no tuvo un efecto significativo sobre la riqueza de especies en general ($P > 0.05$), ni modificó la tendencia temporal de la riqueza ($P > 0.05$). La riqueza de especies en la vegetación marginal tampoco explicó la riqueza de especies en las parcelas ($P > 0.05$, Cuadro 3). La variación explicada por los efectos fijos del modelo fue del 29%. Los efectos aleatorios (sitio/parcela) no tuvieron una capacidad explicativa adicional.

Cuadro 3. Análisis de la riqueza de saltamontes mediante un modelo lineal mixto. En dos tipos de manejo agrícola y las condiciones particulares de la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. *S*: Covariables (vegetación marginal del monocultivo y vegetación marginal del policultivo). T: tiempo. T²: tiempo cuadrático. g.l: grados de libertad, *F*: de distribución F de Fisher.

Efecto	<i>g.l.</i> del numerador	<i>g.l.</i> del denominador	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamiento				
(MC-I y PC-I)	1	2	0.511	0.659
<i>S</i>	1	25	1.050	0.303
Tiempo	1	25	2.315	0.029*
T ²	1	25	3.343	0.002**
Tratamiento × T	1	25	0.522	0.606
Tratamiento × T ²	1	25	0.3	0.766

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

Abundancia de *S. purpurascens purpurascens*: La abundancia de *S. purpurascens purpurascens* cambió significativamente en el T. El termino cuadrático fue el que mejor describió este cambio ($P < 0.05$). El tipo de manejo agrícola no tuvo un efecto significativo sobre la abundancia de *S. purpurascens purpurascens*, ni modificó la tendencia temporal de la abundancia ($P > 0.05$, Cuadro 4). La abundancia de esta especie en la VMM y la VMP en los sitios determinó la abundancia en el MC-I y del PC-I ($P < 0.05$, Fig. 1 y Cuadro 4). La variación explicada por los efectos fijos del modelo fue del 57%. Los efectos aleatorios no tuvieron una capacidad explicativa adicional.

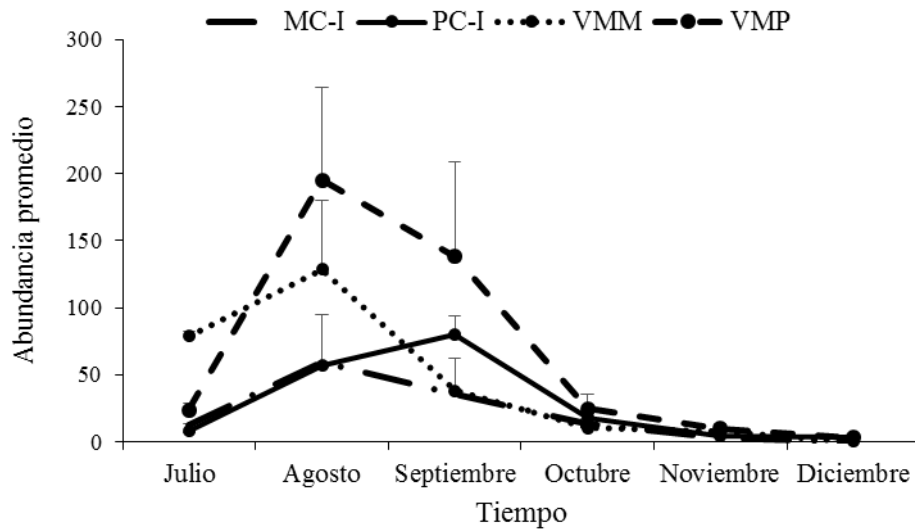


Figura 1. Abundancia promedio mensual de un muestreo con redes de golpeo realizado entre julio y diciembre de 2015. *Sphenarium purpurascens purpurascens* en dos tipos de manejo agrícola y la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. 2015. N = 72. Tratamiento: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo. Covariables: VMM: vegetación marginal del monocultivo y VMP: vegetación marginal del policultivo.

El PC-I no dificultó el ataque de *S. purpurascens purpurascens*, por lo que no se registraron abundancias bajas. De hecho en septiembre se registró mayor abundancia en este tipo de manejo agrícola que en el MC-I. Este insecto es considerado polífago (Cano-Santana y Oyama, 1994; Tamayo-Mejía, 2009), y de acuerdo con los resultados de este estudio la diversidad vegetal incrementó su abundancia, ya que VMM y la VMP presentaron mayores valores que los registrados en MC-I y PC-I. La abundancia de *S. purpurascens purpuascens* en la vegetación de los márgenes influyó sobre la abundancia encontrada en el MC-I y PC-I (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de la abundancia de *Sphenarium pupurascens pupurascens* en dos tipos de manejo agrícola y la vegetación de los márgenes de las parcelas de Erongarícuaro, Michoacán. Tratamientos: MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo *S*: Covariables la vegetación marginal del monocultivo y vegetación marginal del policultivo. T: tiempo, T²: tiempo cuadrático. g.l: grados de libertad, *F*: de distribución F de Fisher.

Efecto	<i>g.l.</i> del numerador	<i>g.l.</i> del denominador	<i>F</i>	<i>P</i>
Manejo agrícola (MC-I y PC-I)	1	2	0.510	0.549
<i>S</i>	1	25	16.314	0.004**
T	1	25	6.193	0.019*
T ²	1	25	24.05	0.001**
Tratamiento × T	1	25	0.737	0.398
Tratamiento × T ²	1	25	0.09	0.766

P* < 0.05. *P* < 0.01.

Cerritos y Cano-Santana (2008) registraron que la densidad de huevos de *S. pupurascens* fue 14.9 veces mayor en los bordes de las parcelas de alfalfa que dentro de las parcelas. Esto contrasta con lo que plantea Andow (1991) acerca de que una determinada plaga encontrará menos posibles hospederos en un hábitat más diverso y, por tanto los insectos plaga son menos dañinos en los policultivos en comparación a los monocultivos. Sin embargo, insectos con un amplio espectro de hospederos usualmente no reducen su población por la diversidad en los cultivos (Andow, 1991). Por lo tanto, se deben utilizar otras estrategias para su control.

La abundancia máxima de *S. pupurascens pupurascens* del PC-1 la VMM y la VMP se presentó en agosto, con excepción del MC-I que aumento en septiembre y posteriormente disminuyó. Cano-Santana (1994) reportó que las densidades máximas de *S.*

purpurascens se presentaron a principios de julio en sitios abruptos y planos de la Reserva del Pedregal de San Ángel en la Ciudad de México en 1990 y 1991. En 1991 se observó que después de alcanzar la densidad máxima, la población descendió drásticamente en los meses posteriores. La alta humedad combinada con temperaturas bajas pudo haber causado una alta mortalidad de los primeros estadios ninfales de *S. purpurascens*. Tamayo-Mejía (2009) reportó que los estadios ninfa 1 y ninfa 2 de saltamontes de *Melanoplus differentialis* (Thomas) y *S. purpurascens* presentaron una mortalidad en campo del 50%, causada por factores bióticos y abióticos. En base a los resultados de este estudio y de los citados anteriormente se infiere que la dinámica de poblaciones de *S. purpurascens purpurascens* es afectada por las condiciones ambientales y de la vegetación herbácea de los sitios de estudio (Cano-Santana, 1994; Cerritos y Cano-Santana, 2008; Tamayo-Mejía, 2009).

Es necesario el estudio puntual de la interacción entre *S. purpurascens purpurascens* y las arvenses que se encuentran en los márgenes de las parcelas, ya que puede ser útil para la manipulación de la composición de especies de arvenses en los bordes de los cultivos para que funcionen como vegetación trampa. Es importante realizar evaluaciones de plantas que han demostrado propiedades repelentes y manipular su presencia dentro de los cultivos, con el fin de alejar a *S. purpurascens purpurascens* del cultivo principal. Entre las especies que se pueden evaluar se encuentran la higuierilla (*Ricinus comunis* L.) el ajo (*Allium sativum* L.) y el cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) (Grainge y Ahmed, 1988; Rodríguez y Nieto, 1997; Vidal *et al.*, 2008). Lo anterior permitiría tener áreas que concentren mayor diversidad de plantas con un propósito específico dentro del agroecosistema, con el fin de minimizar el daño que el saltamontes ocasiona al cultivo principal.

En el presente estudio la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en la VMM y la VMP determinó la abundancia de esta especie en el interior de las parcelas independientemente del tipo de manejo agrícola utilizado (MC-I o PC-I). Además del manejo integrado de plagas, existe otra alternativa para regular las poblaciones de *S. purpurascens*, que consiste en su recolección para aprovecharlo como recurso alimenticio. En la actualidad este insecto se vende en mercados del Estado de México y de los Valles Centrales de Oaxaca, donde forma parte de la gastronomía regional (Marcos *et al.*, 2015).

Cerritos y Cano-Santana, (2008) compararon el impacto de la aplicación del insecticida malatión con la captura de *S. purpurascens* para el consumo humano sobre la densidad de ootecas/m² en el interior del cultivo de alfalfa y de sus bordes en dos años. La densidad de ootecas fue menor en parcelas donde se aplicó malatión con respecto a las de control mecánico mediante recolección. Sin embargo, la densidad de ootecas del control mecánico fue menor en contraste con el control. La densidad de huevos en los bordes de las parcelas fue 14.9 veces mayor que los encontrados en el interior de las parcelas. Las áreas de ovoposición de las hembras de *S. purpurascens purpurascens* se encontraron con mayor frecuencia en los bordes de las parcelas, ya que en estas áreas el suelo es menos compacto (Cerritos y Cano-Santana, 2008). El método de control mecánico es una alternativa viable para regular las poblaciones de *S. purpurascens purpurascens*, además de que es un producto rentable para las regiones antes mencionadas (Cerritos y Cano-Santana, 2008).

HEP aislados en *S. purpurascens purpurascens*. De 2 920 individuos colectados, se encontraron 12 ejemplares de *S. purpurascens purpurascens* infectados por algún HEP, lo que corresponde al 0.41% del total (Cuadro 5). Todos los HEP fueron aislados de individuos adultos, excepto dos ninfas en el sitio de la VMM infectadas con *Metarhizium* sp. Sorokin. El 75% del total de saltamontes infectados tuvieron *Metarhizium* sp. y el 25% restante se encontraron infectados por *Beauveria* sp. Vuill. El 16.7% de los saltamontes infectados por HEP fueron colectados en el MC-I, el 41.7% en el PC-I, el 16.6% en la VMM y finalmente 25% en la VMP. De manera general, el hongo con mayor frecuencia de infección en los saltamontes de la región fue *Metarhizium* sp., encontrándose una asociación entre la proporción de saltamontes infectados con este HEP en el PC-I, respecto a los que se encontraron infectados en la VMP ($\chi^2 = 3.84$, $P = 0.04$). Para el caso de los demás sitios no se encontró asociación significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. *Sphenarium purpurascens purpurascens* infectados con hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz de la región de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro. MC-I: interior del monocultivo, PC-I: interior del policultivo, VMM: la vegetación de los márgenes del monocultivo, VMP: vegetación de los márgenes del policultivo

Hongos Entomopatógenos	Sitios de colecta				
	MC-I	PC-I	VMM	VMP	Total
Número de saltamontes revisados	373	508	791	1184	2856
<i>Beauveria</i> sp.	1	1	0	1	3
<i>Metarhizium</i> sp.	1	4	2	2	9

Los HEP que se encontraron infectando a *S. purpurascens purpurascens*, tuvieron mínima presencia en los agroecosistemas de maíz. Es conocido que *Metarhizium* y *Beauveria* presentan niveles bajos de infección natural en las CS en comparación a *E. grylli*, la cual es una especie que se esperaba encontrar en este estudio, ya que se ha documentado infectando distintas poblaciones de saltamontes tanto en México como en otros países del continente americano (Sánchez *et al.*, 2011; Uribe-González y Santiago-Basilio, 2012). No obstante, en este trabajo se presentó una asociación entre *Metarhizium* y el PC-I, comparado con a la VMP, por lo que la infección de *Metarhizium* parece verse favorecida por la diversidad vegetal también, ya que en estos sistemas, el microclima cambia incrementándose principalmente la humedad relativa, favoreciendo la presencia de HEP (Van Huis, 1997).

CONCLUSIONES

Se encontraron 17 especies, de las cuales la más abundante fue *S. purpurascens purpurascens*. La abundancia de esta especie en la vegetación de los márgenes de los cultivos influyó sobre la abundancia del interior de los cultivos. La frecuencia de infección por HEP fue baja. *Metarhizium* sp. tuvo una mayor frecuencia de infección en el PC-I en comparación de la VMP. De los aislamientos de HEP tres correspondieron a *Beauveria* sp. y nueve a *Metarhizium* sp.

Los resultados del presente estudio muestran un efecto positivo de la diversidad vegetal sobre la comunidad de saltamontes y en particular sobre *S. purpurascens purpurascens*, una especie económicamente importante por el daño que ocasiona al maíz en la región. Estos hallazgos muestran la necesidad de profundizar en la manipulación experimental de la composición de plantas dentro de estos agroecosistemas para minimizar el daño de este saltamonte, potenciar la presencia y acción de enemigos naturales tales como los HEP. De esta forma mejorar la sustentabilidad de estos sistemas de producción a través del manejo agroecológico de los recursos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto SEP-CONACYT 2012-179319, “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz” Los autores agradecemos a Enrique Mariño Pedraza de la Colección Nacional de Insectos del Instituto de Biología de la UNAM por su colaboración en la identificación de las especies de saltamontes. V.Q.B. agradece al CONACYT por la beca de estudios de posgrado (444-081). A Francisco Mora Ardila y Víctor Arroyo Rodríguez por su asesoría en los análisis estadísticos. A Virginia Meléndez, Luis Abdala Roberts y Juan Pinzón por sus comentarios a las primeras versiones de este trabajo.

LITERATURA CITADA

Addinsoft. 2009. XLSTAT versión 2009. <http://www.xlstat.com>.

Altieri, M. A. 1995. Agroecology: The science of sustainable agriculture. First edition. Westview Press Boulder. United States. 30-45 pp.

Altieri, M. A. y Nicholls, C. I. 2000. Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Primera edición. Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe. México. 13-43 pp.

Altieri, M. A. y Nicholls, C. I. 2005. Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture. First edition. United Nations Environmental Programme, Environmental Training Network for Latin America and the Caribbean. México. 13-27 pp.

Altieri, M. A. y Nicholls, C. I. 2013. Diseños agroecológicos para incrementar la biodiversidad de entomofauna benéfica en agroecosistemas. Primera edición. SOCLA. Medellin, Colombia. 83 pp.

Andow, D. A. 1991. Vegetational diversity and arthropod population response. Annual review of entomology. 36:561-586.

Bahena-Juárez, F. y Velázquez-García, J. D. J. 2012. Manejo agroecológico de plagas en maíz para una agricultura de conservación en el valle de Morelia-Querendaro, Michoacán. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3541>.

Barrientos-Lozano, L. 2001. El problema de la langosta (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) en México y Centro América. In: Barrientos Lozano, L. (ed.). Memoria del Curso 1 Internacional. Ecología, manejo y control de la langosta voladora (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker). Altamira, Tamaulipas, México. 1-11 pp.

Barrientos-Lozano, L. y Almaguer-Sierra, P. 2009. Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia (México)*. 13(2):51-56.

Bray, J. R. y Curtis, J. T. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs (United States)*. 27(4):325-349.

Brechelt, A. 2004. El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Primera edición. Red de acción de plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAP-AL). Chile. 36 pp.

Cano-Santana, S. Z. 1994. La Reserva del Pedregal como ecosistema: estructura trófica. *Reserva Ecológica El Pedregal de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF*, 149-158.

- Cano-Santana, S. Z. y Oyama, K. 1994. *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae): un mosaico de recursos para sus insectos herbívoros. *Acta Botánica Mexicana*, 28:29-39.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Primera edición. Lima, Perú. 1-60 pp.
- Cerritos, R, y Cano-Santana, Z. 2008. Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: a comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*, 27(3), 473-480.
- Del Val, E.; Arnés, E.; Gaona, J. A. y Astier, M. 2013. Incidencia de gallina ciega, sistemas de manejo campesino y variabilidad climática en la comunidad de Napízaro, Michoacán, México. *Agroecología (México)*. 1(8):53-62.
- Dent, D. 1999 Biological agents as biopesticides. CABI Bioscience Biopesticide Programme. Programme Briefing Paper. 15 pp.
- Díaz, M. P.; Macías, A. F.; Navarro, S. R. y De La Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América (Venezuela)*. 31:856-860.
- Díaz-Barriga, H.; Guevara-Fefer, F. y Valenzuela, R. 1988. Contribución al conocimiento de los macromicetos del estado de Michoacán. *Acta Botánica Mexicana (México)*. 12(31):21-44.
- Fontana, P.; Buzzetti, F. M. y Mariño-Pérez, R. 2008. Chapulines, langostas, grillos y esperanzas de México: guía fotográfica. México. Primera edición. Editado por asociación mundial de la biodiversidad (Italia). 266 pp.
- González, E. A.; Gutiérrez, J. I.; Calderón, A. E.; Vázquez, J. C. y Wood, S. 2008. Impacto económico del mejoramiento genético del maíz en México: híbrido H-48. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Primera Edición. Coyoacán, Ciudad de México, México. 78-85 pp.

Grainige, M. y Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. First edition. Ilustrada Minnesota. 470 pp.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2009. Prontuario de información geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Erongarícuaro, Michoacán de Ocampo. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos>.

Kevan, D. K. 1977. The American Pyrgomorphidae (Orthoptera). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 36(4):3-28.

Manly, B. F. 2006. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Third Edition. Chapman & Hall/CRC. New York. 480 pp.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research (Gran Bretaña). 2(27):209-220.

Marcos, Y. S.; Pacheco, R. P.; Pérez, G. E. G.; Manzanero, G. I. y Medina, G. R. O. 2015. Conocimiento tradicional y valor cultural de *Sphenarium* spp. en valles centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Agroecosistemas. 2(2):75-86.

Mariño, R.; Fontana P. y Buzzetti, F. M. 2011. Taxonomía y bioecología. In: García C. y Lozano J. (coords.). Control biológico de plagas de chapulín en el norte ~ centro de México. Primera edición. Universidad autónoma de Zacatecas. México. 13-56 pp.

McAlece, N. 1997. Bio Diversity Professional version 2. <http://www.sams.ac.uk/peterlamont/biodiversity-pro>.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 63:95-109.

Nicholls, C. I. 2008. Bases agroecológicas para diseñar e implementar una estrategia de manejo de hábitat para control biológico de plagas. Agroecología. 1:37-48.

- Nicholls, C. I. y Altieri, M. A. 2006. Manejo de la fertilidad de suelo e insectos plaga: armonizando la salud del suelo y la salud de las plantas en los agroecosistemas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 77:8-16.
- Pinheiro, J. C. y Bates, D. M. 2000. *Mixed-effects models in S and S-Plus*. Springer. 3-56 pp.
- Pinheiro, J.; Bates, D.; DebRoy, S. y the R Core team. D. S. 2007. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3. 1-83.
- Rodríguez, H. C. y D. Nieto. 1997. Anonáceas con propiedades insecticidas. In: Rebouças, S. J.; A. I. Vilas Boas.; O. Magalhaes y Hojo R. (eds.). *En Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)*. Primeira edição. Nobel. Bahía Brasil. 15-35 pp.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2010. Retos y oportunidades del sistema agroalimentario de México en los próximos 20 años. <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/pablo/retosyopportunidades.pdf>.
- Samson, R. A.; Evans, H. C. y Latgé, J. P. 1988. *Atlas of entomopathogenic Fungi*. Primer edición: Springer Science y Business Media. New York. 5-17 pp.
- Sánchez, S. E. M.; Humber, R. A. y Freitas, A. L. 2011. El complejo *Entomophaga grylli* (Fresenius 1856) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales) infectando saltamontes (Orthoptera: Acrididae) en Ilhéus (Bahia). *Entomotropica (Brasil)*. 24(2):71-81.
- Su, J. C.; Debinski, D. M.; Jakubauskas, M. E. y Kindscher, K. 2004. Beyond species richness: Community similarity as a measure of cross-taxon congruence for coarse-filter conservation. *Conservation Biology (United States)*. 1(18):167-173.
- Tamayo-Mejía, F. 2009. Control biológico de *Sphenairum purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentiales* (Thomas) (Orthoptera: acrididae) con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Guanajuato, México. *Vedalia (México)*. 13(2):85-90.
- Toledo, V. 2010. *La biodiversidad de México: Inventarios, manejos, usos, informática, conservación e importancia cultural*. Primera edición. FCE CONACULTA. México. 356 pp.

Uribe-González, E., y Santiago-Basilio, M. Á. 2012. Contribución al conocimiento de enemigos naturales del chapulín (Orthoptera: Acridoidea) en el estado de Querétaro, México. *Acta Zoológica Mexicana* (México). 1(28):133-144.

Van Huis, A. 1997. Manipulating crop diversity to control pest. *Entomology*. 26th International Course on Integrated Pest Management. Wageningen, the Netherlands. 21-22 pp.

Vidal, J., Carbajal, A., Sisniegas, M., y Bobadilla, M. 2008. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Revista Peruana de Biología* (Perú). 2(15):103-110.

Artículo sometido a BioControl. El texto está acorde con las normas editoriales de la revista.

Capítulo 4

Susceptibility of *Sphenarium purpurascens purpurascens* instars to a commercial strain of *Metarhizium acridum* in Michoacan, Mexico

Abstract

The objective of this study was to evaluate the performance of a commercial strain of the entomopathogenic fungi *Metarhizium acridum* (Driver and Milner) J.F. Bisch., Rehner and Humber, on the different instars of the grasshopper pest *Sphenarium purpurascens purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Pyrgomorphidae), as well as its sporulation via bioassays under laboratory conditions. The most susceptible instars were nymphs one, two and four, with an average survival time less than 6.91 days. The least susceptible was the adult, with a survival time of 8.36 days. The instars with the highest post mortem sporulation were nymphs one, two and three. A moderate negative association was registered between the instars of *S. purpurascens purpurascens* and the sporulation of *M. acridum*, in advanced instars (nymph 4 and adult). Sporulation was lower compared to early instars. All instars showed survival rates below 5%, hence *M. acridum* is considered a viable option to control this pest.

Keywords: *Sphenarium purpurascens purpurascens*; Orthoptera; *Metarhizium acridum*; instars; sporulation rates

Introduction

The grasshopper *Sphenarium purpurascens purpurascens* Charpentier is the most abundant orthoptera in Mexico. It is widely distributed across much of the center and south of the country (Castellanos-Vargas and Cano-Santana 2009). This species feeds on and harms a great variety of crops like maize (*Zea mays* L.) (Tamayo-Mejía 2009), beans (*Phaseolus*

vulgaris L.), squash (*Cucurbita* L.), oats (*Avena sativa* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), wheat (*Triticum* sp. L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), clover (*Trifolium repens* L.), peas (*Cicer arietinum* L.), and various grasses (SENASICA 2012), hence being recognized as an economically important species (Anaya et al. 2000). To control this and other grasshoppers, insecticides like cypermethrin, malathion, methyl parathion, chlorpyrifos, diazinon, dimethylphosphate, deltamethrin, lambda cyhalothrin and fipronil are commonly used (Forestaes and Ebano 2005), having high economic and environmental costs (Neme et al. 2010). The sale and distribution of many of these products are forbidden in other countries because of their potential harm to the environment (Bejarano 2001).

There are alternative methods for grasshopper control, such as biocontrol through entomopathogenic fungi (EPF), which are microorganisms infecting a great variety of arthropod groups and are found in many land environments (Dent 1999). The use of EPF represents minimal risk to humans, domestic animals and the environment (Goettel and Johnson 1991), which is why their management as bioinsecticides to control grasshoppers and locusts is sanitary and environmentally viable (Lomer et al. 2001). Most commonly used EPF in a commercial scale include *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, and *Metarhizium acridum* (Driver and Milner) J.F. Bisch., Rehner and Humber (Rodríguez and Lecuona 2002; Pariona et al. 2007).

A relevant example of the use of EPF in Mexico is the CHE-CNRB 213 strain of *M. acridum*, isolated by the National Reference Center for Biological Control and used in the biocontrol program of the locust *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Walker) in Socorro Island, Revillagigedo (Hernández-Velázquez and Berlanga-Padilla 1997). Commercial formulations based on this strain are currently available for the biocontrol of grasshoppers and locusts. Nevertheless, its pathogenicity and virulence for the control of species of orthoptera other than the one from which it was isolated must be evaluated. For example, most strains of *B. bassiana* tend to show high virulence over its original host, or on closely related species, but there are exceptions (Feng et al. 1994).

In order for EPF to perform efficiently as bioinsecticides, it is recommended to evaluate the susceptibility of local insect populations at different development stages, so they can be used efficiently at the most critical stages on the field (Espinell and Torres 2009). In this

context, there are few studies evaluating the susceptibility of development stages of orthoptera towards pathogen agents and the subsequent sporulation in dead individuals, as well as taking into account the biology, ecology and population dynamics of the pest insect (Barrientos-Lozano and Almeguer-Sierra 2009).

The *S. purpurascens* insect has an average life cycle of 252.4 days (Serrano-Limón and Ramos-Elorduy 1989). It presents four stages of postembryonic development before reaching adulthood (Cheaírez-Hernández and Gurrola-Reyes 2009). Two hatching periods for oothecae have been observed in Central Mexico: early nymphs at the end of May and late ones in the second half of July (Camacho-Castillo 1999). Adults appear gradually from August and they all die between December and January, leaving the oothèques buried in the ground (Márquez-Mayaudón 1968; Cano-Santana and Oyama 1992).

The occurrence of this grasshopper in the north of Michoacán during 2014 registered an average of 65 individuals per m² (CESAVEMICH 2014), generating important damage to the crops of the region, particularly maize.

In the context of the need for integrated management of these grasshoppers, and with the goal of generating strategies and recommendations for local farmers, the objective of this study was to evaluate the performance of a commercial formulation of *M. acridum* on different stages of *S. purpurascens purpurascens* through bioassays in the laboratory.

Materials and methods

Viability of the commercial product

The commercial strain was formulated on diatomaceous earth. The viability of the product was determined by the Vélez et al. method (1997), which considers conidia density, their viability at 16 hours and purity.

Collection and maintenance of biological material

The grasshoppers used were collected with an entomological sweep net in Erongarícuaro, Michoacán (19°31'23" - 19°31'13" N and 101°42'32" - 101°42'19" W). They were confined

in one liter plastic containers with modified lids that had a circular cutout. A one mm diameter mesh was placed in the cutout to allow for gaseous exchange, in order to transport them alive to the laboratory.

The grasshoppers were kept in quarantine in the containers during eight days at a density of ten individuals. They were fed lettuce disinfected with sodium hypochlorite at 5% for 20 minutes and rinsed with distilled water, as well as oat flakes. Excreted were removed every other day.

All nymphal stages of *S. purpurascens purpurascens* were taken into account: nymph one (N1), two (N2), three (N3), four (N4) and adult. These were identified through measurements of the length of the individuals; N1 with a length of 0.5 - 0.7 cm, N2 of 0.5 – 1.1 cm, N3 of 0.88 – 1.12 cm, N4 of 1.4 – 1.8 cm, and the adult with a length of 1.88 – 2.12 cm (Serrano-Limón and Ramos-Elorduy 1989; CESAVEG 2003).

Bioassays

The design of bioassays was done in the following way: each stage of *S. purpurascens purpurascens* was exposed through a ten second long immersion (Cañedo and Ames 2004) in a solution with 2.5×10^6 conidio/mL of the commercial strain (dosage recommended by the manufacturer) in distilled water with 0.01% of Tween 80® dispersant. The density was adjusted according to the previously obtained percentage of viability. A control for each of the stages was carried out, which consisted of sterile distilled water with 0.01% Tween 80®. Each treatment was repeated five times and each replicate included ten grasshoppers, totaling 500 experimental units. Subsequently the insects were placed in individual plastic containers, with a modified lid so as to allow air flow. The grasshoppers were fed with the aforementioned diet, every other day post-application. Survival was registered daily until day 14.

Each dead grasshopper was placed in an individual humid chamber, which consisted of a 3.5 x 4.5 cm plastic container with a lid and filter paper in the bottom, dampened every other day with 200 µl of distilled water. The humid chambers were incubated at 27°C in order to induce

the sporulation of EPF on the insect. The chambers were checked daily for ten days to register sporulation.

Statistical analyses

To evaluate the effect of the commercial strain of *M. acridum* over the stages of *S. purpurascens purpurascens*, a comparison was made between the total accumulated survival rates of the stages exposed to *M. acridum* vs. the control subjects. To complement this, the survival rates of each stage exposed to *M. acridum* were compared to the control subjects. To determine the most and least susceptible stages to the commercial product, there was a comparison between survival rates between the different treated stages, and the survival rates of the different control subjects were compared separately. The comparison of survival rates was done using the Kaplan-Meier method with a logarithmic adjustment (Fernández 1995). The averages of grasshoppers with or without sporulation between the different stages were compared by a Bonferroni test (Westfall and Young 1989). To find out the association between the stages of *S. purpurascens purpurascens* and sporulation, a Spearman correlation coefficient was used (Martínez Ortega et al. 2009). All statistical procedures were carried out using the SPSS® software version 22 (SPSS 2013).

Results

The commercial strain of *M. acridum* presented a density of 2×10^7 conidios/mL, similar to that reported by the manufacturer, a viability of 56.34%, which is considered well below quality standards, and a purity of 96.68%, acceptable under such standards (Vélez et al. 1997).

Regarding the susceptibility of the stages of *S. purpurascens purpurascens*, the rates of survival time between the commercial strain and the control subject presented significant differences globally ($X^2 = 398.49$, d.f. = 1, $P < 0.001$), as well as when comparing the effect of the strain on each stage with its respective control subject ($X^2 = 395.52$, d.f. = 1, $P < 0.001$).

N1, N2 and N4 were the most susceptible stages, showing significant differences with N3 and the adult (Fig. 1 and Table 1). The survival time of the N3 individuals was greater in comparison to N1 and N2, being statistically different (Fig. 1 and Table 1). The differences

in survival time of all nymphal stages in relation to the adults were significant. It was observed that survival of grasshoppers in nymphal instars decreased more than 50% between days 6 and 8 post-treatment. The maximum survival time in adults was 14 days, with a survival rate of 5%, in comparison with the survival time of nymphs, which was less than 11 days and with a survival rate less than or equal to 2.32%. The survival time of grasshoppers in the control treatments of the different stages did not differ statistically between each other (Fig. 1 and Table 1).

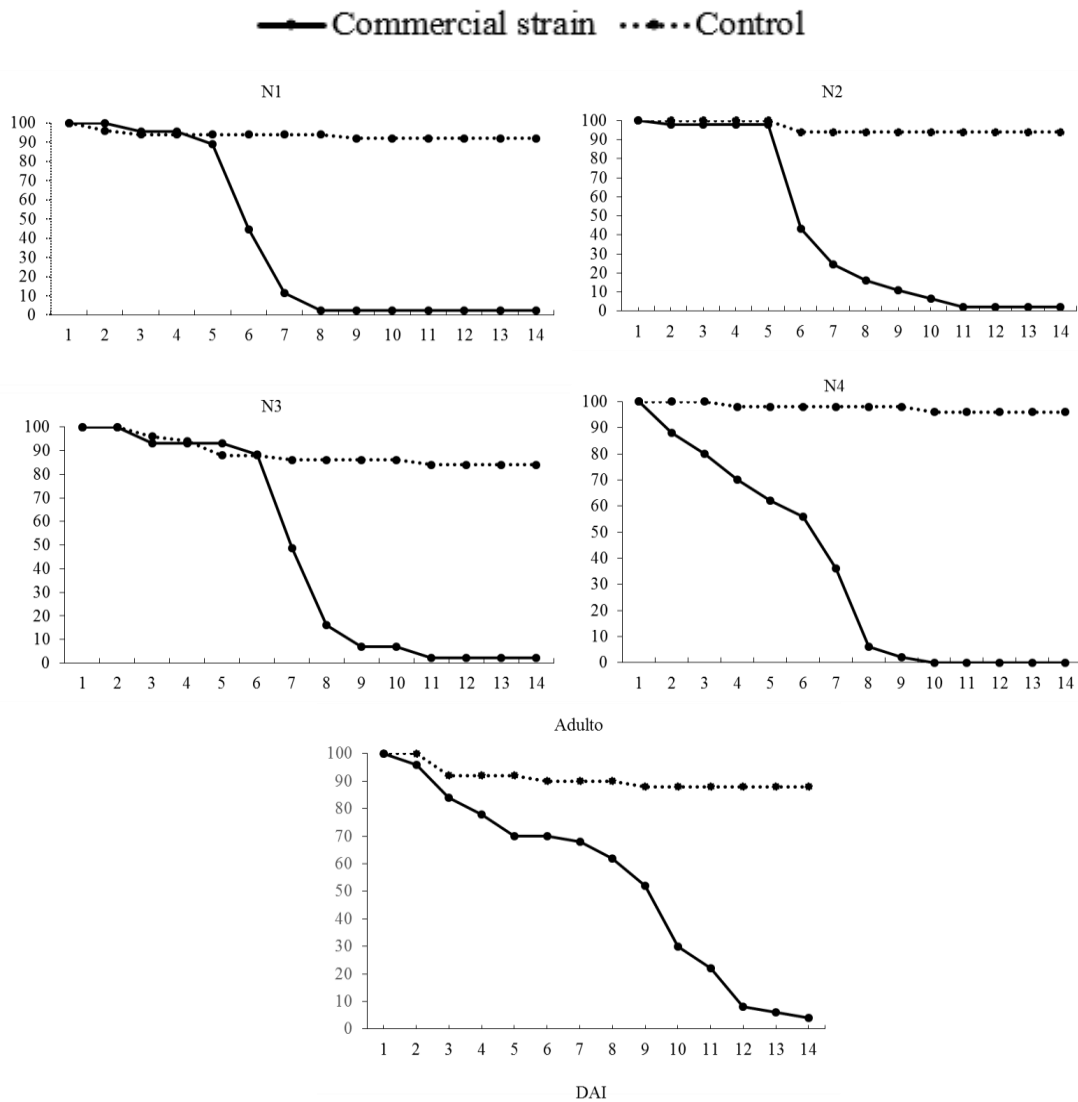


Fig. 1 Accumulated survival percentage of *Sphenarium purpurascens purpurascens* instars inoculated with a commercial strain of *M. acridum*. +: Inoculated. -: Control. N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four. DAI – Days after inoculation

Table 1 Pairwise comparison (Kaplan-Meier) of survival curves of different stages of *Sphenarium purpurascens purpurascens* individuals inoculated with a commercial strain of *Metarhizium acridum*. Different letters show statistical differences ($P < 0.05$). N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four

Treatment	Instar	Survival time (days)	Standard error	Pairwise comparison
<i>M. acridum</i>	N1	6.42	0.18	A
	N2	6.91	0.25	A
	N3	7.46	0.25	B
	N4	6.00	0.32	A
	Adult	8.36	0.49	C
Control	N1	10.40	0.30	A
	N2	10.70	0.17	A
	N3	11.68	0.42	A
	N4	9.86	0.15	A
	Adult	12.78	0.45	A

The highest sporulation rate was obtained in N2 and N3, both with 80.43% and N1 with 75.5% of individuals, being statistically different from N4 and adults. These two stages were the ones with lowest sporulation rates in comparison with N1, N2 and N3 (Fig. 2 and Table 2). The association level between stages and sporulation rates was moderate ($r = -0.47$, $P = .018$). It was observed that in N4 and the adult sporulation of *M. acridum* was low (50%) (Fig. 2). The grasshoppers from control groups did not present sporulation.

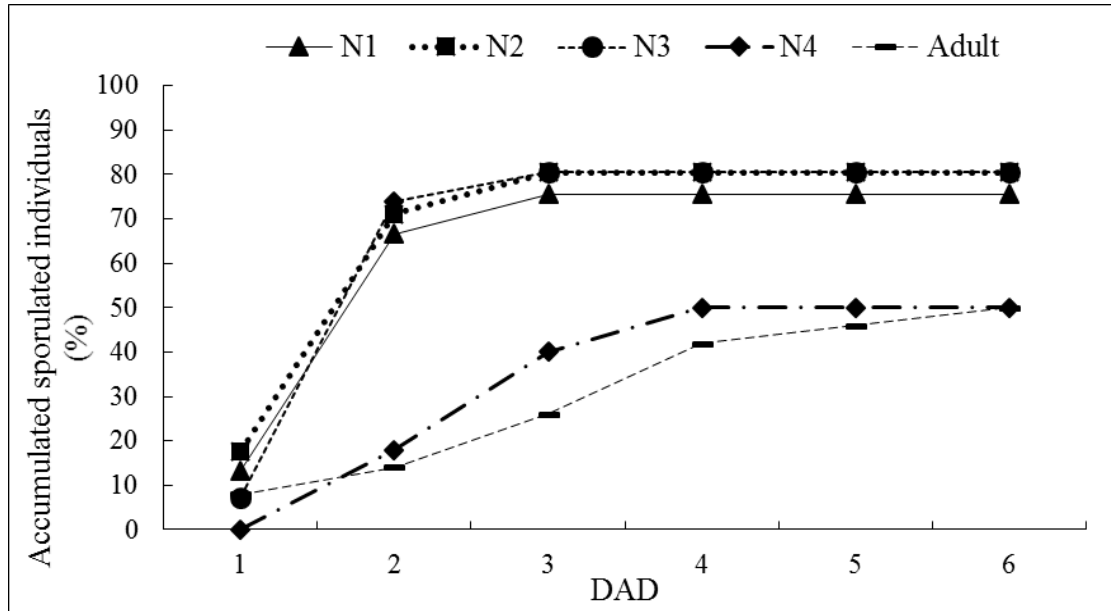


Fig. 2 Accumulated post mortem sporulation percentage of *Metarhizium acridum* on *Sphenarium purpurascens purpurascens*. N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four. DAD - Days after death

Table 2 Pairwise comparison (Bonferroni test) of *Sphenarium purpurascens purpurascens* specimens sporulated by *Metarhizium acridum*. Different letters show statistical differences ($P < 0.05$). N1- nymph one; N2 – nymph two; N3 - nymph three; N4 – nymph four

Instar	Sporulated		Pairwise Comparison
	Individuals	Standard error	
N1	0.76	0.06	A
N2	0.79	0.06	A
N3	0.86	0.05	A
N4	0.49	0.07	B
Adult	0.49	0.06	B

Discussion

The most susceptible stages of *S. purpurascens purpurascens* to *M. acridum* were N1, N2 and N4, as they presented the lowest survival times. The adults were the least susceptible stage. The differences in survival times between stages can be attributed to physical differences such as changes in the constitution of the proteins forming the cuticle, which are essential for the germination of conidia (Hegedus and Khachatourians 1995), as well as the different enzymes secreted by the immune system of the insect (Khachatourians 1996). N1, N2, and N3 were the stages with the highest accumulated sporulation percentage. All stages treated with *M. acridum* presented a very low survival rate, less than 4%. Nevertheless, it was observed that sporulation was lower in more advanced stages of *S. purpurascens purpurascens*.

There is few information available on the susceptibility of the five stages of *S. purpurascens* to EPF. Nonetheless, there are studies about the susceptibility of some stages. In the study by Vázquez et al. (2016), there was an evaluation of the susceptibility of N2 and N4 of *S. purpurascens* under laboratory conditions to four densities of *B. bassiana*. It was determined that N4 was the most susceptible stage, presenting a survival rate of 0% at the sixth day post-application, in comparison to N2, which reached this rate on the seventh day. These results coincide with the findings of this study, although the differences were not statistically significant.

A field study reported that adults of *S. purpurascens* were less susceptible to *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin in comparison to N2 and N3. Nymphs had a survival rate of 15 days post-application, compared to the adults with 35 days (Tamayo-Mejía 2009).

As well as knowing the most susceptible stage of the pest insect, it is necessary to understand its population dynamics and its ecological interactions with biotic and abiotic factors, as they regulate population growth (Barrientos-Lozano and Almeguer-Sierra 2009) In *S. purpurascens* and *Melanoplus differentialis*, 50% of grasshoppers in N1 and N2 died due to biotic and abiotic factors in the field (Tamayo-Mejía 2009). From N3 to adults, population densities remained constant. Another characteristic of *S. purpurascens* that determines the dynamics of populations is that, as was previously mentioned, it has two

ootheca hatching periods in the field; early and late nymphs (Camacho-Castillo 1999). Thus, it is important that the application of bioinsecticides is carried out when the totality of the oothecae have hatched and the definite population is present.

Regarding sporulation of *M. acridum* over *S. purpurascens purpurascens*, N1, N2 and N3 were the stages with the highest rates. Upon performing a correlation between the different stages and the sporulation of *M. acridum*, a negative association was found. It was observed that in the most advanced stages of *S. purpurascens purpurascens*, N4 and adult, sporulation was low. One of the possible explanations is the reduction of essential nutrients for conidia growth (Gottwald and Tedders, 1984). This would imply the need for annual field applications of bioinsecticide, given the observed limited ability of *M. acridum* to reproduce itself.

Conclusions and recommendations

This study determined that the inoculation of the commercial strain CHE-CNRCB 213 of *M. acridum* resulted in very low survival rates of *S. purpurascens purpurascens* under controlled conditions, therefore being a viable option to regulate its populations. The most susceptible stages of *S. purpurascens purpurascens* to *M. acridum* were N1, N2 and N4, the least susceptible one being the adult. The stages with the highest sporulation rates were N1, N2 and N3. Although the survival time in N4 was lower, the sporulation capacity of *M. acridum* was higher in the early stages of the grasshopper.

Field experiments are required to confirm the results of the present study. It is recommended to start the application of *M. acridum* on the field when *S. purpurascens purpurascens* is at N3, thus preventing an accumulated population, as well as having a higher probability of sporulation in dead individuals. In this way, it would be possible to avoid wasting product on individuals in N1 and N2, as it has been reported that half of them die because of biotic and abiotic factors. Furthermore, in these development phases grasshoppers are found in the borders of maize crops. It is equally recommended to perform a second application on N4, as it is one of the most susceptible stages. With these two applications, the definite population of *S. purpurascens purpurascens* would be treated.

Acknowledgements

This study was funded by the SEP-CONACYT project 2012-179319, “Importance of beneficial microbes of the rhizosphere in sustainable maize production”. V.Q.B. thanks CONACYT for the postgraduate scholarship (444-081). We thank Francisco Mora Ardila for his help with statistical analyses.

References

Anaya-Rosales RS, Romero-Nápoles JN, López-Martínez VR (2000) Manual de Diagnóstico para las Especies de Saltamontes (Orthoptera: Acridoidea) del Estado de Tlaxcala y Estados adyacentes. Colegio de Postgraduados, México. Montecillos, Méx. 266

Barrientos-Lozano L, Almeguer-Sierra P (2009) Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia* 13 2:51-56

Bejarano, F (2001) “Plaguicidas: Docena sucia en México”. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM)

Camacho-Castillo E (1999) Demografía y movilidad de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) en la reserva del Pedregal de San Ángel, D.F. (México). Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Cano-Santana Z, Oyama K (1992) Variation in leaf trichomes and nutrients of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) and its implications for herbivory. *Oecologia* 92:405-409

Cañedo V, Ames C (2004) Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>. Citado el 10 julio del 2016

Castellanos-Vargas I, Cano-Santana Z (2009) Historia natural y ecología de *S. purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México 337-346

CESAVEG (2003) Programa de sanidad vegetal SAGARPA-CESAVEG. <http://www.cesaveg.org.mx>. Citado el 20 de marzo del 2017

Cheaírez-Hernandez I, Gurrola-Reyes JN (2009) Modelos para simular la fenología del chapulín (Orthoptera: Acrididae) con base en unidades calor en pastizales de Durango, México. *Vedalia* 13(2):65-73

Comité Estatal de Sanidad Vegetal Michoacán (CESAVEMICH) 2014. Evaluación de la campaña “manejo fitosanitario del maíz”, operado con recursos del componente de sanidad del programa sanidad e inocuidad agroalimentaria 2014, en el estado de Michoacán

Dent D (1999) Biological agents as biopesticides. CABI Bioscience Biopesticide Programme. Programme Briefing Paper

Espinel C, Torres T (2009) Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Rev Colomb Cienc Pec* 35(1):18-21

Feng MG, Poprawsky TJ, Khachatourians GC (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current Status. *Bicontrl Sci Techn* 4:3-34

Fernández S (1995) Análisis de supervivencia. Unidad de Epidemiología Clínica. http://www.fisterra.com/mbe/investiga/supervivencia/analisis_supervivencia2.pdf. Citado el 20 agosto del 2016

Forestales AYP, Ebano CE (2005) El chapulín *Melanoplus* sp. y su manejo en la planicie Huasteca. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/147.pdf>. Citado el 20 mayo del 2016

Goettel MS, Johnson DL (1991) Environmental impacts and safety of fungal biocontrol agents. In Lomer CJ Prior C (eds.) *Biological Control of Locust and Grasshoppers. Proceedings of Workshop Held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Benin*

- Gottwald TR, Tedders WL (1984) Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. *Entomology* 13:557-560
- Hegedus D, Khachatourians G (1995) The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol Adv* 13:455-490
- Hernández-Velázquez VM, Berlanga-Padilla AM, Garza-González E (1997) Detección de *Metarhizium flavoviride* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia* 4:45-46
- Khachatourians GG (1996) Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Howard DH, Miller JD (eds) *The Mycota*. Berlin
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Rev of Entomol* 46(1):667-702
- Márquez-Mayaudón, C (1968) Contribución al estudio de los ortópteros de México. IV. Ortópteros del Pedregal de San Ángel, Villa Obregón, D.F. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ser Zool* 39:107-112
- Martínez Ortega, RM, Tuya Pendás LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, Cánovas AM (2009) El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habn Cien Méd* 8(2):1-19
- Neme C, Ríos M, Zaldúa N, Cupeiro S (2010) Aproximación a la normativa vigente sobre plaguicidas y sus impactos ambientales. *Vida Silvestre Uruguay*
- Pariona N, Castellanos P, León E (2007) Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). *Rev Peru Biol* 14(2):253-258
- Rodríguez JL, Lecuona RE (2002) Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *Rev Invest Aropecuarias* 31(1):67-84

Serrano-Limón G, Ramos-Elorduy J (1989) Biología de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y algunos aspectos de su comportamiento (Orthoptera: Acrididae). Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ser Zool 59:139–152

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Dirección General de Sanidad Vegetal (SENASICA) (2012). Campaña contra el Chapulín. www.senasica.gob.mx/?id=4523. Citado el 10 junio del 2016

SPSS, I (2013). IBM SPSS statistics 22. Algorithms. Chicago: IBM SPSS Inc

Tamayo-Mejía F (2009) Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentialis* (Thomas) (Orthoptera: Acrididae) con *Metarhizium Anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, en Guanajuato, México. Guanajuato, México. *Vedalia* 13(2):85-90

Vázquez Jorge MDLÁV, García AA, Martínez MDB, Hernández DC, Galicia SBN, Torres BCP (2016) Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Rev Mex Cienc Agric* 7(2):235-247

Vélez P, Posada FJ, Marín MT, González E, Osorio E, Bustillo A (1997) Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia

Westfall, PH, Young, SS (1989). P value adjustments for multiple tests in multivariate binomial models. *Journal of the American Statistical Association*, 84(407):780-786

Capítulo 5

Evaluación de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* y una cepa comercial de *Metarhizium acridum* (Sordariomycetes: Hypocreales) para el control biológico de *Sphenarium purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro, Michoacán

Resumen

En México una de las principales plagas de los pastizales y cultivos de granos básicos son los saltamontes, una de las especies que ocasionan más daños al alimentarse de los cultivos de maíz es *Sphenarium purpurascens*. Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de los saltamontes y poseen potencial para ser empleados como agentes de control biológico. Este estudio tuvo como objetivo evaluar a dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae*, sobre *Sphenarium purpurascens purpurascens*. Se calcularon sus concentraciones letales 50 y 90 (CL50 y CL90) mediante bioensayos en el laboratorio. Se evaluó la virulencia de la cepa nativa con mayor patogenicidad sobre *S. purpurascens purpurascens* junto con una cepa comercial de *Metarhizium acridum*, en condiciones de campo en Erongarícuaro, Michoacán, mediante análisis de supervivencia acumulada de saltamontes. También se evaluó la esporulación de los hongos entomopatógenos sobre los saltamontes muertos. La CL50 y CL90 de la cepa 6MaEM fue de 1.7×10^5 y de 1.0×10^6 conidios/mL, de la cepa 9MaEM fue de 1.7×10^6 y 7.1×10^6 conidios/mL. Al evaluar la cepa 6MaEM y la cepa comercial, se registró una supervivencia acumulada de saltamontes tratados con la cepa nativa del 53.99% y de la cepa comercial 2.06% en un periodo de 28 días después de la aplicación en el campo. La esporulación de la cepa nativa fue de 8.3% y de la cepa comercial del 27.63%. La cepa comercial de *M. acridum* es una opción viable para el control biológico de *S. purpurascens purpurascens* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán.

Introducción

Los saltamontes pertenecen al orden Orthoptera, son artrópodos de importancia económica para la agricultura en México ya que 12 especies son consideradas plagas de los cultivos básicos y pastizales ganaderos (Barrientos-Lozano y Almeguer-Sierra, 2009). En particular, el saltamonte *Sphenarium purpurascens* Charpentier, conocido coloquialmente como chapulín de la milpa (por ser abundante en agroecosistemas donde se cultiva maíz), causa pérdidas económicas importantes en una gran variedad de cultivos como: calabaza, cebada, frijol, maíz y sorgo (Tamayo-Mejía, 2009; Fontana *et al.*, 2008). Debido a los brotes poblacionales de esta especie se han establecido campañas para su control en varias zonas agrícolas (algunos ejemplos se pueden consultar en el estudio de Anaya *et al.*, 2000).

En el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán el cultivo de maíz es el más importante por superficie, de un total de 3,628 ha de superficie sembrada, 2,505 son de cultivos de maíz, con un rendimiento aproximado de 2.45 ton/ha (SIAP, 2016). Una de las plagas más importantes en esta región es el saltamonte (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy, 1989; CESAVEG, 2003). En Michoacán la ocurrencia durante el año 2014 fue en promedio de 65 saltamontes por m² en 24 municipios del norte del estado (CESAVEMICH, 2014), generando daños importantes a los cultivos de la región, al sobrepasar el umbral económico de 15 saltamontes/m², particularmente en los cultivos de maíz (Fontana *et al.*, 2008; SENASICA, 2015).

En Erongarícuaro, Michoacán, existe un complejo de 17 especies de saltamontes asociados al cultivo de maíz, de las cuales *Sphenarium purpurascens purpurascens* Charpentier es la especie dominante, constituyendo el 98% de la abundancia total (Quesada-Béjar *et al.*, 2017, en prensa). El control más común para dicha especie de saltamontes es mediante insecticidas sintéticos (Forestales y Ebano, 2005), los cuales, como se ha documentado extensivamente, tienen una serie de efectos indeseables tanto en las personas que los manejan, el ambiente (Kaczwer, 2009; Soderlund *et al.*, 2002), e incluso en la propia plaga que controlan, por efecto de la selección de poblaciones resistentes a su efecto letal. (Hemingway y Ranson, 2000). Se ha registrado un incremento del número de huevos contenidos en las ootecas de *S. purpurascens* desde 1962, con 15-20 huevos/ooteca (Marquez, 1962). En 1990 se reportaron 20 huevos/ooteca (Ramos-Elorduy, 1990). Alfaro (1995) reportó 35 huevos/ooteca. En el

2001 y 2002 se encontraron 39.8 y 36.6 huevos por ooteca, respectivamente (Cerritos y Cano-Santana, 2008). La hipótesis generada por estos últimos autores es que el aumento de la densidad de huevos es por la selección que ejerce el uso de los insecticidas (Cerritos y Cano-Santana, 2008). En este contexto, se han generado estrategias de control y manejo de alternativas a los insecticidas sintéticos, entre las que se encuentra el control biológico, a través de la búsqueda de enemigos naturales nativos para que con el manejo apropiado e incremento del tamaño de sus poblaciones, se regulen las poblaciones de insectos plaga (De Bach, 1968; Delbene, 2003).

Los hongos entomopatógenos (HEP) como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin y *Metarhizium acridum* (Driver y Milner) J.F. Bisch., Rehner y Humber son enemigos naturales de saltamontes y langostas (Uribe-González y Santiago-Basilio, 2012; Gandarilla *et al.*, 2013). Estos HEP se pueden utilizar para producir bioinsecticidas (Gandarilla *et al.*, 2013). Actualmente, algunas formulaciones se pueden encontrar en los mercados locales (García *et al.*, 2015).

En 2015 se realizó una búsqueda de HEP asociados a *S. purpurascens purpurascens* en el municipio de Erongarícuaro, Michoacán, obteniéndose nueve aislados de *Metarhizium* sp. y tres de *Beauveria* sp. (Quesada-Béjar *et al.*, en prensa). Este estudio tuvo como objetivo seleccionar dos de estos, identificarlos genéticamente y evaluar su patogenicidad sobre *S. purpurascens purpurascens* en el laboratorio. Posteriormente, se evaluó la virulencia de la cepa nativa con mayor patogenicidad junto con una cepa comercial (CHE-CNRCB 213) de *M. acridum* sobre *S. purpurascens purpurascens* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán.

Materiales y métodos

Cultivos de HEP

Los HEP de *Metarhizium*, con claves 6MaEM y 9MaEM fueron obtenidos de dos saltamontes de la subespecie *S. purpurascens purpurascens*, recolectados en la localidad de Napízaro, municipio de Erongarícuaro, Michoacán. El saltamonte con el HEP 6MaEM fue recolectado en 19°35'94"-19°35'54" N y 101°41'85"-101°41'51" W y el 9MaEM en 19°36'10"-19°36'00" N y 101°41'93"-101°41'56" W. Los aislados de HEP se realizaron en una campana de flujo

laminar y consistió en el raspado de conidios del HEP a partir del saltamonte, el cual se sembró en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri y fueron incubadas a 27 °C durante cuatro a seis días. En este periodo se observó el crecimiento del micelio cada 48 horas. Los cultivos puros se obtuvieron realizando reaislamientos del hongo a partir del cultivo original (Monzón, 2001).

Asignación genética de HEP nativos. La extracción de ADN se realizó a partir de 2 ml de conidios de las cajas Petri de los HEP 6MaEM y 9MaEM. Se transfirieron 500 µl de la suspensión de conidios a un microtubulo de 2 ml. Para el aislamiento de ADN de las conidios se utilizó la técnica de buffer con la metodología de Wu *et al.*, (2002). Para la amplificación de genes se utilizaron los primers NS1 y NS8 de ADN ribosomal, que han funcionado adecuadamente (White *et al.*, 1990). Para las reacciones de PCR se utilizó una mezcla de 275 µl de agua destilada, 100 µl de buffer, 10 µl de solución Stock DnTP, 10 µL de la mezcla de primers y 5 µl de Taq polimerasa. Se añadió 50 µl de esta mezcla en cada tubo con 1 µL de ADN, se diluyeron con dos gotas de aceite mineral y se microcentrifugó 1 min. Las condiciones del termociclador consistieron en 25 ciclos, cada uno de 2 a 3 min a 95 °C, 30 s de 50° a 60 °C, 1 min a 72 °C, 30 s a 95 °C y 10 min a 71°C (White *et al.*, 1990). Se centrifugó brevemente y se tomó una muestra de 5 µl para analizarla mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%. Las secuencias fueron enviadas a Macrogen en Corea para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un análisis de alineamiento de tipo local (BLAST) de las secuencias en el sitio del NCBI para compararlas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank y buscar la identidad de las mismas.

Colecta y mantenimiento de material biológico para el experimento de laboratorio. En la localidad de la Ex Hacienda Charahuén (19°31'23"-19°31'13" N y 101°42'32"-101°42'19" W) se recolectaron 720 saltamontes de *S. purpurascens purpurascens* en ninfa 1, con una longitud de 0.6 ± 0.1 cm (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy, 1989), para los bioensayos de patogenicidad de las dos cepas nativas sobre *S. purpurascens purpurascens* en el laboratorio. Se confinaron en recipientes de plástico de un litro de capacidad con tapas modificadas con un corte circular en la que se colocó una malla fina de 1 mm de diámetro para permitir el

intercambio gaseoso y fueron trasladados vivos al laboratorio. Los saltamontes se mantuvieron en un periodo cuarentenario de ocho días en los recipientes a una densidad de diez individuos. Se alimentaron con lechuga desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos y enjuagada con agua destilada, además de hojuelas de avena. Sus excretas se retiraron cada segundo día. Posteriormente se seleccionaron saltamontes en ninfa 2; con una longitud de 0.8 ± 0.3 cm (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy, 1989).

Preparación de los inóculos. Se adicionó agua destilada estéril de cada uno de los cultivos y se realizó un raspado suave con un asa estéril. En un vaso de precipitado de 250 ml se vertieron 50 ml de agua destilada con Tween 80® al 0.01%, y se le adicionaron los conidios. A partir de la solución madre se prepararon las concentraciones de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL de cada cepa. Los conteos de los conidios se realizaron con una cámara de Neubauer.

Evaluación de la patogenicidad de dos cepas nativas sobre *S. purpurascens purpurascens* en el laboratorio. Para los bioensayos en laboratorio se realizaron cuatro repeticiones por concentración, cada repetición con diez individuos en ninfa 2, para un total de 360 unidades experimentales, en un diseño completamente al azar. Los saltamontes fueron inoculados mediante inmersión de diez segundos en la solución (Cañedo y Ames, 2004). Posteriormente los individuos fueron colocados en recipientes individuales de plástico de un litro de capacidad y se alimentaron cada segundo día durante ocho días, de igual forma que en el periodo cuarentenario. Se registró la supervivencia diaria durante ocho días. Los individuos muertos se colocaron en una cámara húmeda individual, la cual constó de un recipiente de plástico de 3.5×4.5 cm con tapa y un papel filtro en el fondo del recipiente, el cual fue humedecido con 200 μ l de agua destilada cada segundo día y se incubaron a 27 °C para inducir la esporulación del HEP. Se registró la esporulación durante diez días.

Preparación de la cepa nativa en sustrato para el experimento en campo. La cepa nativa 6MaEM, que presentó mayor patogenicidad en el bioensayo anterior se reprodujo en arroz con el siguiente procedimiento: de las cajas Petri de la cepa, se adicionaron 60 mL de agua destilada estéril y se rasparon suavemente las conidios con una asa, hasta formar una suspensión de conidios homogénea a una densidad aproximada de 1×10^8 conidios/mL

(Monzón, 2001). Se colocaron 300 gramos de arroz en cada bolsa de 25×35 cm y se esterilizaron en autoclave a 16 libras de presión y 120 °C por 15 min. Posteriormente, cuando el arroz tuvo una temperatura entre 28 y 30 °C las bolsas se inocularon con 10 mL de la suspensión de la cepa nativa obtenida a partir de los conidios cosechados de las cajas Petrí. Las bolsas se incubaron a una temperatura de 27°C y 88% de humedad por un periodo de 16 días (Nájera-Rincón y López-Mora, 2007).

Calidad de las cepas. La cepa comercial de *M. acridum* está formulada en tierra de diatomeas. La calidad de las cepas se determinó con la metodología de Vélez *et al.*, (1997) la cual considera la evaluación de la densidad de conidios, la viabilidad de estas a las 16 horas y la pureza.

Colecta y mantenimiento del material biológico del experimento de campo. Para evaluar la virulencia de la cepa nativa y la cepa comercial en campo se recolectaron 1,200 saltamontes de la subespecie *S. purpurascens purpurascens* en la Ex Hacienda Charahuén (19°31'23"-19°31'13" N y 101°42'32"-101°42'19" W) con una longitud de 0.8 +/-0.3 cm (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy 1989, CESAVEG, 2003) correspondiente a ninfa 2. Los saltamontes fueron trasladados al laboratorio y sometidos a un periodo cuarentenario de igual forma que en el bioensayo del laboratorio. Transcurrido este periodo se seleccionaron los saltamontes en ninfa 3 con una longitud de 1.0+/- 1.2 cm (Serrano-Limón Ramos-Elorduy, 1989, CESAVEG, 2003).

Virulencia de la cepa nativa y la cepa comercial sobre *S. purpurascens purpurascens* en campo. El experimento de campo se llevó a cabo en el mismo sitio donde se colectó el material biológico, el cual se caracteriza por presentar un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw). Las temperaturas oscilan entre 5°C y 26°C con una precipitación pluvial promedio anual de 1 040.8 milímetros (INEGI, 2009). Para evaluar la virulencia de la cepa nativa vs. la cepa comercial, se utilizó un diseño de bloques al azar con los siguientes tratamientos: cepa nativa, cepa comercial y control. De cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones, cada repetición con 50 saltamontes en ninfa tres. Los saltamontes se colocaron en jaulas de 1×1×0.50 m con una densidad de 50 individuos por jaula, dando un total de 12 jaulas, las cuales se colocaron sobre bases de plástico de 0.30×0.30×0.47 m con una separación de 25 m entre jaulas dentro de un monocultivo de maíz. Los saltamontes fueron

alimentados cada segundo día con lechuga desinfectada y hojuelas de avena. La aplicación de los tratamientos se realizó asperjando un volumen de 120 mL con una bomba mecánica desde el exterior de la jaula. De la cepa comercial se aplicó una solución con una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL (dosis recomendada por el fabricante) con Tween 80 al 0.01%, mientras que de la cepa nativa se aplicó la dosis para la CL_{90} de 1×10^6 conidios/mL, con Tween 80® al 0.01% obtenida en el bioensayo en el laboratorio. Estas concentraciones fueron ajustadas tomando en cuenta el porcentaje de viabilidad obtenido. Al control se le aplicó una solución acuosa estéril y Tween 80® al 0.01%. Para la aspersión de cada tratamiento se utilizaron bombas diferentes. Se registró la supervivencia acumulada cada 48 horas durante 28 días. Los individuos muertos fueron colocados en cámaras húmedas de igual manera que el bioensayo en el laboratorio y se registró la esporulación de los HEP sobre los individuos diariamente, durante diez días.

Análisis estadístico. Para evaluar el efecto de las dos cepas nativas sobre *S. purpurascens purpurascens*, se compararon las curvas de supervivencia acumulada total de los saltamontes expuestos a las diferentes concentraciones de la cepa 6MaEM vs. el control y de forma separada el 9MaEM vs. el control. Para determinar la cepa nativa más patógena se compararon las curvas de supervivencia de la cepa 6MaEM vs. 9MaEM de cada una de las concentraciones con el método de Kaplan-Meier con ajuste logarítmico (Fernández, 1995). Posteriormente con el número de individuos muertos y expuestos se calcularon las concentraciones letales 50 y 90 (CL_{50} y CL_{90}) de cada uno de las cepas, mediante un análisis Probit, con el programa Statgraphics Centurion XV (Stat, point, inc., 2006). El promedio de saltamontes con esporulación de los HEP se comparó entre las dos cepas nativas con una prueba de Bonferroni en cada una de las concentraciones. Para evaluar el efecto de los tratamientos de la cepa nativa y la cepa comercial sobre *S. purpurascens purpurascens*, se compararon las curvas de supervivencia acumulada de los saltamontes expuestos a la cepa nativa vs. el control, de forma separada se compararon las curvas de supervivencia de la cepa comercial vs. el control. Posteriormente, se compararon las curvas de supervivencia de los saltamontes tratados con la cepa nativa vs. la cepa comercial y se calculó el tiempo letal 50 (TL_{50}) de la cepa nativa y la comercial en campo. La evaluación de las curvas de supervivencia fue realizada con el método de Kaplan-Meier y la prueba log rango con el

programa SPSS® versión 22 (Fernández, 1995). El TL50 fue calculado con Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06. Para evaluar la esporulación de la cepa nativa vs. la cepa comercial sobre *S. purpurascens purpurascens* se compararon las medidas de individuos con esporulación utilizando una prueba de Bonferroni con el programa SPSS® versión 22.

Resultados

Asignación genética de HEP nativos. El análisis BLAST de la secuencia obtenida para el gen 18S de ácido ribonucleico ribosomal determinó que los dos HEP correspondían a la especie *M. anisopliae*. El HEP 6MaEM tuvo una máxima identidad del 98% con un valor esperado (valor E) de 0.0. EL 9MaEM presentó una identidad del 96% con un valor E de 0.0.

Patogenicidad de dos cepas nativas en laboratorio. Las curvas de supervivencia de los saltamontes expuestos a las cepas 6MaEM y 9MaEM fueron diferentes al control, con una mayor supervivencia de este último ($X^2=48.78$, *g. l.* = 1, $P < 0.001$ y $X^2=27.95$, *g. l.* = 1, $P < 0.001$ respectivamente). Se observaron diferencias entre las cepas en el tiempo de supervivencia de los saltamontes inoculados con la cepa 6MaEM en las concentraciones 1×10^5 y 1×10^6 conidios/mL, el cual fue menor en comparación a la cepa 9MaEM; mostrándose también que a mayor dosis del HEP menor supervivencia de *S. purpurascens purpurascens* (Fig. 1 y Cuadro 1).

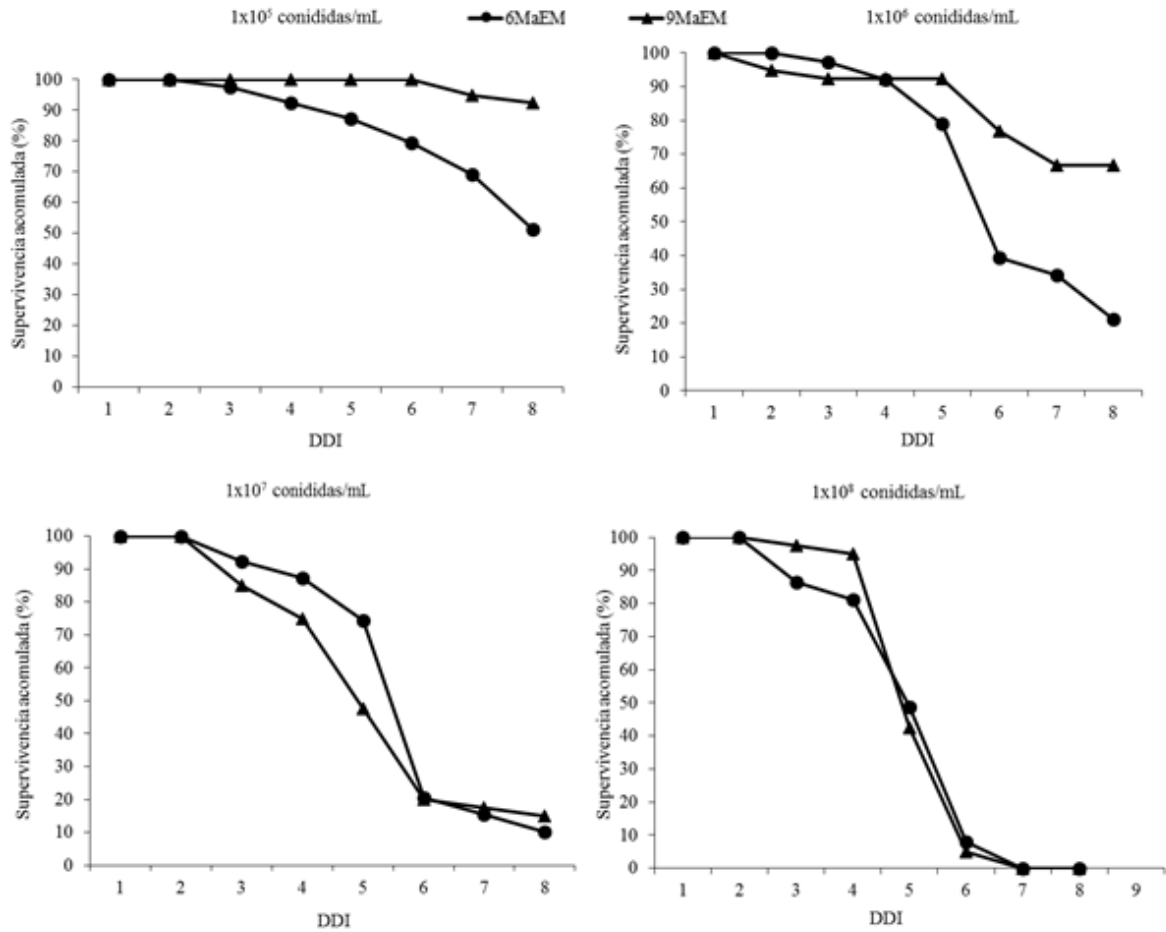


Fig. 1. Porcentaje de supervivencia acumulada de saltamontes infectados con dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones. Días después de la infección (DDI).

Cuadro 1. Comparación por parejas de las curvas de supervivencia diaria de individuos de *Sphenarium purpurascens purpurascens* inoculados con diferentes concentraciones de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae*, con el método de Kaplan-Meier.

Concentración Conidios/mL	6MaEM	9MaEM	<i>P</i>
	Tiempo medio (días)	Tiempo medio (días)	
1×10⁵	7.25+/- 0.22	7.94+/- 0.04	0.001**
1×10⁶	6.42+/- 0.22	6.97+/- 0.27	0.006**
1×10⁷	5.89+/- 0.21	5.35+/- 0.24	0.160
1×10⁸	5.27+/- 0.21	5.40+/- 0.11	0.669

** indica diferencias significativas ($P < 0.01$). * indica diferencias significativas ($P < 0.05$). Error estándar (E. E.).

CL50 y CL90 de las cepas nativas. Con respecto a las concentraciones letales, la cepa 6MaEM requirió una menor concentración del inóculo para matar al 50 y 90% de la población tratada, en comparación con la cepa 9MaEM. La ecuación de la recta de 6MaEM fue $Y = -0.242431 + 0.0000014112 \cdot \text{dosis}$. Utilizando esta ecuación, se obtuvo una CL50 de 1.7×10^5 y una CL90 de 1.0×10^6 conidios/mL ($X^2=86.69$, g.l.=1, $P < 0.001$). La ecuación de la recta de la cepa 9MaEM fue $Y = -0.423049 + 2.37336E-7 \cdot \text{dosis}$, la CL₅₀ fue de 1.7×10^6 y la CL₉₀ de 7.1×10^6 ($X^2=100.65$, $P < 0.001$).

Esporulación de las cepas nativas. La cepa 6MaEM presentó mayor esporulación que la cepa 9MaEM en las concentraciones 1×10^5 y 1×10^6 conidios/mL. Sin embargo la cepa 9MaEM tuvo mayor esporulación en la concentración de 1×10^8 conidios/mL, presentando diferencias significativas. Los HEP dejaron de esporular sobre los saltamontes a partir del día cinco después de la muerte de los individuos. El grupo control no presentó esporulación (Fig. 2 y Cuadro 2).

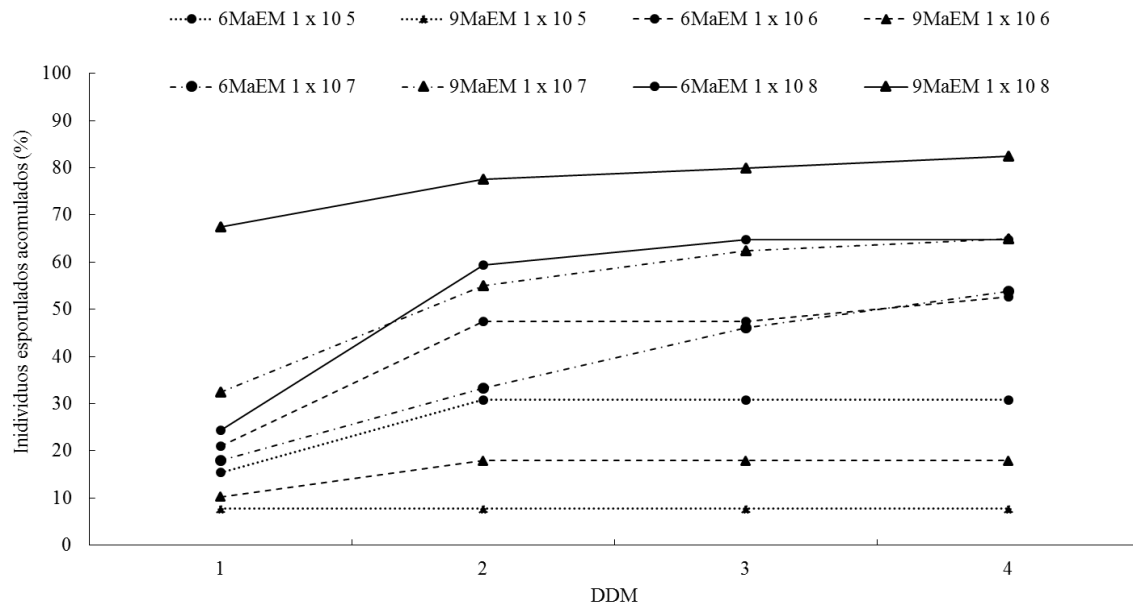


Fig. 2. Porcentaje acumulado de individuos de *Sphenarium purpurascens purpurascens* que presentaron esporulación post mortem de dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* cuantificados en días después de la muerte del individuo (DDM).

Cuadro 2. Comparación mediante la prueba de Bonferroni, del promedio de saltamontes *Sphenarium purpurascens purpurascens* esporulados post mortem a la infección por dos cepas nativas por parejas de *Metarhizium anisopliae* a diferentes concentraciones de conidios.

	6MaEM	9MaEM	
Concentración	Medias	Medias	<i>P</i>
1 x 10 ⁵	0.30 +/-0.08	0.07 +/-0.09	0.01*
1 x 10 ⁶	0.51 +/-0.10	0.17 +/-0.10	0.01*
1 x 10 ⁷	0.71 +/-0.10	0.65 +/-0.10	0.51
1 x 10 ⁸	0.62 +/-0.09	0.82 +/-0.09	0.04*

*Indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Viabilidad de la cepa nativa y la cepa comercial. Se seleccionó la cepa nativa 6MaEM por presentar mayor patogenicidad sobre *S. purpurascens purpurascens*. Al evaluar la viabilidad

de la cepa nativa este presentó una densidad de 8.7×10^6 conidios/mL, viabilidad del 85% y una pureza de 98.68%. La cepa comercial presentó una densidad de 1.92×10^7 conidios/mL, una viabilidad del 65.67%, la cual no es aceptable de acuerdo a las normas de Vélez *et al.* (1997) y una pureza de 96.68%.

Virulencia de la cepa nativa y la cepa comercial sobre *S. purpurascens purpurascens* en campo. Al comparar las curvas de supervivencia de *S. purpurascens purpurascens*, la del grupo control fue mayor que la cepa nativa, con diferencias significativas ($X^2 = 4.77$, g. l. = 1, $P < 0.029$), así como al comparar el efecto de la cepa comercial vs. el control ($X^2 = 333.94$, g. l. = 1, $P < 0.001$) (Fig. 3). Al comparar las curvas de supervivencia de los saltamontes tratados con la cepa nativa vs. la cepa comercial se observó que los individuos de la cepa comercial presentaron un tiempo de supervivencia menor en comparación a los individuos de la cepa nativa, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($X^2 = 4.77$, g. l. = 1, $P < 0.029$). La supervivencia de los individuos del tratamiento de la cepa comercial fue de 2.06%, el mayor número de decesos se presentó entre los días 8 y 15, el TL50 fue de 10 días y 6 horas. La cepa nativa presentó una supervivencia de 53.99%, a los 28 días post tratamiento, el TL50 fue de 7 días con 18 horas (Fig. 3).

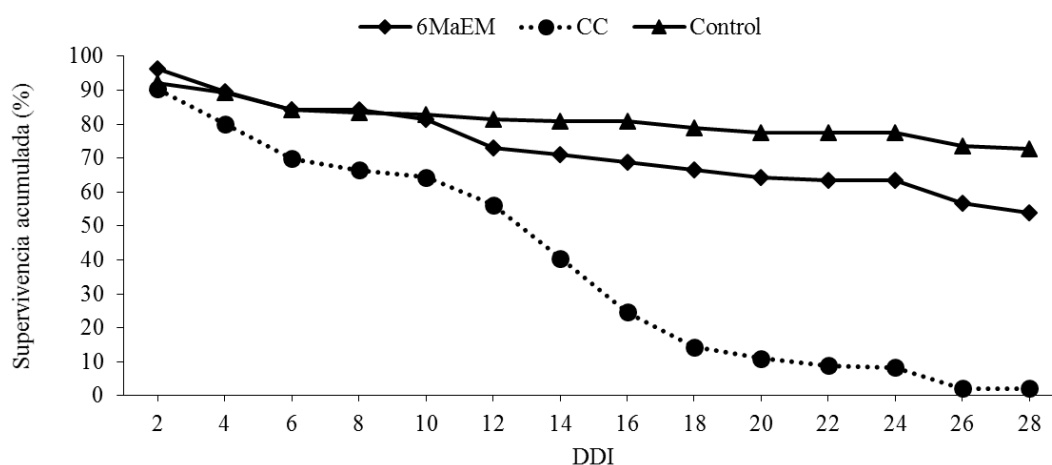


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia acumulada de saltamontes infectados con una cepa nativa de *Metarhizium anisopliae*, una cepa comercial de *Metarhizium acridum* y el control. 6MaEM: cepa nativa; CC: cepa comercial; DDI: días después de la infección.

La esporulación de los HEP sobre los saltamontes mostró que la cepa nativa tuvo 8.3% de esporulación acumulada y la cepa comercial el 27.63%, diferencias estadísticamente significativas ($X^2=16.53$, $g.l.=1$, $P < 0.001$). Se observó que a partir del sexto día post mortem los HEP no esporularon. Los individuos del grupo control no presentaron esporulación de HEP.

Discusión

Las dos cepas nativas evaluados en laboratorio presentaron una patogenicidad alta en concentraciones de 1×10^8 conidios/mL, al sexto día de la aplicación ninguno de los saltamontes tratados sobrevivió. Se observó que la cepa 6MaEM tuvo mayor patogenicidad sobre el *S. purpurascens purpurascens* en comparación a la cepa 9MaEM.

Estos resultados coinciden con el estudio de Jorge *et al.* (2016) en el que reportan una sobrevivencia de 0% de *S. purpurascens* en ninfa 4 a los 6 días de la inoculación con *B. bassiana* a concentraciones de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios/mL en laboratorio, este patógeno fue aislado de especímenes de esta misma especie.

Con respecto a la esporulación de HEP los saltamontes inoculados con concentraciones 1×10^5 y 1×10^6 conidios/mL, la cepa 6MaEM presentó mayor esporulación en comparación a 9MaEM. Sin embargo en la concentración 1×10^8 conidios/mL la esporulación de la cepa 9MaEM fue mayor.

En el experimento de campo se observó que los saltamontes tratados con la cepa comercial de *M. acridum* a una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL presentaron una menor supervivencia (2.05%), en comparación a la cepa nativa 6MaEM a una concentración de 1.0×10^6 conidios/mL, y una supervivencia de 58.95% a los 28 días de la aplicación. La cepa comercial tuvo mayor esporulación sobre *S. purpurascens purpurascens* en comparación a la cepa nativa. En otro estudio se aplicó *M. acridum* a concentraciones de 2.5×10^4 conidios/insecto para el control biológico de la langosta *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera: Acrididae) en condiciones de semicampo. Las langostas después de haber sido infectadas se

colocaron en jaulas de incubación a 19-29 °C. El 0% de la supervivencia de langostas se presentó a los 9 días después de su aplicación (Collar *et al.*, 2002). En nuestro estudio la cepa comercial *M. acridum* en campo provocó la muerte de los saltamontes a los 28 días con una supervivencia del 2.06%. La muerte de los saltamontes fue lenta en comparación al estudio citado, posiblemente a causa de que las condiciones climáticas de Erongarícuaro no fueron las ideales. Sin embargo encontramos viable el uso de esta cepa comercial para el control de *S. purpurascens purpurascens* en este sitio, ya que los saltamontes tuvieron una supervivencia de solo el 2.06%. Para el caso de la cepa nativa este problema también se presentó. Sin embargo este patógeno mostró una virulencia menor en comparación a la cepa comercial.

Una alternativa para acelerar la mortalidad de los saltamontes es la aplicación de mayores concentraciones del hongo entomopatógeno, se ha documentado que el TL50 disminuye cuando se aplican concentraciones más altas de los patógenos. Un ejemplo de esto es un estudio donde se aplicó una concentración de 1×10^7 conidios/mL de *M. anisopliae* y se observó un TL50 de cinco días en termitas *Microcerotermes* sp. (Silvestri). A una concentración de 9.64×10^3 conidios/mL, el TL50 fue de seis días. Con la concentración de 1×10^3 conidios/mL de ocho días y con la concentración más baja de 1×10^1 conidios/mL el TL50 se prolongó hasta los 14 días (Sterling *et al.*, 2011).

La cepa comercial de *M. acridum* es específica de saltamontes, las cepas nativas de *M. anisopliae* no lo son (Gao *et al.*, 2011). Aunque el origen de estas cepas fue *S. purpurascens purpurascens* y son susceptibles a estos, la virulencia de *M. acridum* fue mayor. Por lo tanto, esto explica que en el estudio previo (en prensa) la prevalencia de infección fue baja. En el estudio de Collar *et al.*, (2002) se evaluó un aislado de *M. acridum* sobre *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) y *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera: Acrididae). La mortalidad del 100% se tuvo a los 22 días postratamiento, los días más pronunciados fueron del 8 al 15. Este estudio es similar a esta investigación en donde los efectos de *M. acridum* se observaron a mayor número de días de la aplicación del bioinsecticida.

Conclusiones

Los dos HEP de *M. anisopliae* nativos, aislados de *S. purpurascens purpurascens* en concentraciones de 1×10^8 conidios/mL, presentaron una patogenicidad alta en el laboratorio, con una supervivencia del 0% de los saltamontes a los seis días de la inoculación. Las cepas nativas con concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/mL, presentaron una esporulación mayor al 50%. A 1×10^5 conidios/mL la esporulación sobre *S. purpurascens purpurascens* fue menor a 30%.

Los saltamontes tratados con la cepa comercial de *M. acridum* presentaron una menor supervivencia (2.06%), a comparación de la cepa nativa seleccionada 6MaEM de *M. anisopliae*, con una supervivencia de 58.95% a los 28 días postramiento en campo. La cepa comercial de *M. acridum* es una opción viable para el control biológico de *S. purpurascens purpurascens*, en Erongarícuaro, Michoacán.

Literatura citada

Alfaro, A. L. (1995). Biología de *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Acrididae) y patogenicidad de *Beauveria bassiana* en laboratorio. Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.

Anaya-Rosales, S., Romero-Nápoles, J., y López-Martínez, V. (2000). *Manual de Diagnóstico para las Especies de Saltamontes (Orthoptera: Acridoidea) del Estado de Tlaxcala y estados adyacentes*. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Méx. 266.

Barrientos-Lozano, L., y Almaguer-Sierra, P. (2009). Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia*, 13, 51-56.

Cañedo V., y Ames C. (2004) Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>. (Accesada en febrero del 2017).

Cerritos, R., & Cano-Santana, Z. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: a comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*, 27(3), 473-480.

Collar Urquijo, J. L., Celma Calamita, J., Blandford, S., y Thomas, M. B. (2002). Control de *Dociostaurus maroccanus* y *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) mediante aplicaciones en campo de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 28(2), 185-192.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato (CECAVEG). (2003). Programa de sanidad vegetal SAGARPA-CESAVERG. Ficha técnica CH01. <http://www.cesaveg.org.mx/new/fichastecnicas/fichatecnicasphenariumpurpurascens.pdf> (Accesada en febrero del 2017).

Comité Estatal de Sanidad Vegetal Michoacán (CESAVEMICH). (2014). *Evaluación de la campaña “manejo fitosanitario del maíz”, operado con recursos del componente de sanidad del programa sanidad e inocuidad agroalimentaria 2014, en el estado de Michoacán.*

De Bach, P. (1968): *Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. Compañía Editorial Continental, edición autorizada por Chapman y Hall LTD. London, Copyright 1964.

Delbene, J. A. (2003). *Evaluación de cepas nativas de los hongos entomopatógenos Beauveria sp. y Metarhizium sp. sobre el control de polilla del tomate Tuta absoluta Meyrick*. Tesis de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 56-75.

Fernández, S. (1995). Análisis de supervivencia. *Unidad de Epidemiología Clínica*. http://www.fisterra.com/mbe/investiga/supervivencia/analisis_supervivencia2.pdf. (Accesada en febrero del 2017).

Fontana, P., Buzzetti F. M., y R. Mariño-Pérez. (2008). *Chapulines, langostas, grillos y esperanzas de México: Guía fotográfica*. WBA Handbooks, Verona.

Forestales A. Y. P., Ebanó C. E. (2005) El chapulín *Melanoplus* Sp. y su manejo en la planicie Huasteca. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/147.pdf>. (Accesada en mayo del 2016).

Gandarilla-Pacheco, F. L., Galán-Wong, L. J., Arévalo-Niño, K., Elías-Santos, M., y Quintero-Zapata, I. (2013). Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255-266.

García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., y Martínez, R. F. M. (2015). Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *Kuxulkab'*, 15(27), 25-27.

Hemingway. J., y Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of humandisease. *Annual Review of Entomology*, 45, 371–391.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009). Prontuario de información geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Erongarícuaro, Michoacán de Ocampo. Clave geoestadística, <http://www.inegi.org.mx>, (Accesada en mayo del 2016).

Kaczewer, J. (2009). *Uso de agroquímicos en las fumigaciones periurbanas y su efecto nocivo sobre la salud humana*. Grupo de Reflexión Rural: Pueblos Fumigados: Informe sobre la problemática del uso de plaguicidas en las principales provincias sojeras de la Argentina, 177-207.

Márquez, M. C. (1962). Estudio de las especies del género *Sphenarium* basado en sus genitalia (Acrididae-Orthoptera) con la descripción de una especie nueva. *Anales del Instituto de Biología de la UNAM*, 33, 247-258

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)*, 63, 95-103.

Quesada-Béjar, V., Nájera-Rincón, M., Reyes-Novelo, E., y Gonzales-Esquivel, C. (en prensa). Ortópteros (Caelifera) y sus hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en Erongarícuaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6).

Ramos-Elorduy, J., y Pino, M. J. (1990). Contenido calórico de algunos insectos comestibles de México. *Sociedad Química Mexicana*, 34(2), 56–68.

SENASICA (2015). Disponible en internet. <http://senasica.gob.mx>. (Accesada en mayo del 2016).

Serrano-Limón, G., y Ramos-Elorduy, J. (1989). Biología de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y algunos aspectos de su comportamiento (Orthoptera: Acrididae). Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. *Serie Zoológica*, 59, 139-152.

SIAP (2016). Anuario estadístico de la producción Agrícola. Recuperado el 16 de mayo del 2016 de: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/. (Accesada en febrero del 2017).

Soderlund, D. J. Clarck, L. Sheets, L. Mullins, V. Piccirillo, D. Sargent, Stevens, J., y L. Weiner. (2002). Mechanisms of pyrethroids neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171, 3-59.

Sterling, A. (2011). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) in *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 36-42.

Tamayo Mejía, F. (2009). Control biológico de *Sphenairum purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentiales* (Thomas) (Orthoptera: acrididae) con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Guanajuato, México. *Vedalia*, 13(2), 85-90.

Uribe-González, E., y Santiago-Basilio, M. Á. (2012). Contribución al conocimiento de enemigos naturales del chapulín (Orthoptera: Acridoidea) en el Estado de Querétaro, México. *Acta zoológica mexicana*, 28(1), 133-144.

Vélez, P., Posada, F. J., Marin, M. T., González, E., Osorio, Y., y Bustillo, A. E. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos, *Boletín Técnico* No. 17. Cenicafé, 37.

White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., & Taylor J. A. W. (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis N, Gelfand J & White T (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. 315-322.

Discusión general

Al evaluar el efecto del manejo agrícola policultivo, monocultivo y la vegetación de los márgenes de los cultivos sobre la comunidad de saltamontes y sus hongos entomopatógenos asociados, se obtuvo que la comunidad de saltamontes estuvo conformada por 17 especies, en donde *Sphenarium purpurascens purpurascens* fue la especie dominante. Este estudio realizó la primera contribución de la riqueza de especies de saltamontes y de hongos entomopatógenos en Erongarícuaro, Michoacán, así como la base de la evaluación de la riqueza y abundancia de saltamontes plaga y de sus hongos entomopatógenos, en cultivos con diferentes tipos de manejo y en la vegetación de los márgenes de los cultivos.

El saltamonte *Sphenarium purpurascens* es uno de los ortópteros más abundantes de México, considerándose una plaga, que se alimenta de cultivos de granos básicos y de pastizales, por lo que se han establecido campañas para su control poblacional en cuatro entidades del país (Anaya-Rosales *et al.*, 2000). El policultivo conformado por frijol, calabaza y maíz no disminuyó la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en comparación al monocultivo. *Sphenarium purpurascens purpurascens*, por ser un insecto polífago dificultó la disminución de la abundancia, ya que se ha registrado que los insectos plaga con hábitos polípagos no siempre tienen menor abundancia en el policultivo al compararlos con el monocultivo (Bastos *et al.*, 2003). Este efecto es consistente con insectos especialistas, debido a que no encuentran un hábitat continuo para su desarrollo (Sloderbeck y Edwards, 1979, Helenius, 1991, Altieri y Nicholls, 2004). Por ejemplo, los insectos polípagos como el *Thrips tabaci* Lindeman y *Pseudoplusia includens* (Walker) se han registrado con una mayor densidad en policultivos de maíz intercalado con frijol (Bastos *et al.*, 2003). Para el caso de las plagas especialistas *Dalbulus maidis* DeLong y *Diabrotica speciosa* Germar hubo una mayor densidad de *D. maidis* en el monocultivo de maíz y de *Diabrotica speciosa* en el de frijol (Bastos *et al.*, 2003).

Esta investigación evaluó dos sistemas de manejo agrícola que se utilizan en Erongarícuaro, no se seleccionaron cultivos específicos para la reducción de *S. purpurascens purpurascens*.

Estudios mencionan que la reducción de insectos plaga es resultado de mezclas de cultivos específicos (Root, 1973; Bach, 1980; Rich, 1981). Se observó que la combinación de maíz, calabaza y frijol en el policultivo no fue adecuada para la regulación del *S. purpurascens purpurascens*, ya que esta especie presenta preferencia en alimentarse de cultivos de hoja ancha como el frijol y la calabaza (Tamayo-Mejía, 2009). Es necesario explorar las preferencias de plantas hospederas de *S. purpurascens purpurascens*, las cuales se podrán colocar en los márgenes de los cultivos como plantas trampa, así como de plantas repelentes dentro del cultivo con el objeto de diseñar agroecosistemas enfocados al manejo integrado de este insecto. Esto permitiría tener áreas que concentren mayor diversidad de plantas con un propósito específico dentro de los agroecosistemas, con el fin de minimizar el daño que este saltamonte ocasiona al cultivo principal. En estudios posteriores se recomienda tomar en cuenta otros factores como: la reducción de la concentración del recurso, cultivos trampa, abundancia de siembra y la acción de enemigos naturales para diseñar agroecosistemas enfocados al manejo integrado de este insecto (Altieri y Nicholls, 2013).

Se registró que la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en la vegetación marginal de los dos sistemas de manejo explicó la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* encontrada dentro del monocultivo y del policultivo. Hay insectos plaga polífagos que además de alimentarse del cultivo de maíz se alimentan de arvenses que se encuentran en los márgenes de los cultivos relacionadas botánicamente (Van Emden, 1965). Otros insectos polífagos se alimentan de plantas de los márgenes no relacionadas botánicamente con el cultivo y del cultivo (Altieri y Nicholls, 2013). Es claro en este estudio que *S. purpurascens purpurascens* prefirió áreas con arvenses. Además, en el estudio de Cerritos y Cano-Santana (2008) está documentado que los márgenes de las parcelas soportan una alta densidad de ootecas de *S. purpurascens* a comparación del interior de las parcelas. Al parecer los sitios de ovoposición se encuentran en estas áreas ya que el suelo es menos compacto en comparación con el del interior de las parcelas, por lo que la oclusión de los saltamontes es donde se encuentra la vegetación de los márgenes de las parcelas y que posteriormente sirven de alimento. Al igual que este insecto, se ha documentado en otros trabajos que las plantas

silvestres son importantes reservorios de pulgones plaga y de otros áfidos (Bertolaccini *et al.*, 2004; Zumoffen *et al.*, 2015).

Sphenarium purpurascens, por ser un insecto polífago dificulta el control de sus poblaciones con el diseño agroecológico, se deben de implementar junto a el diseño agroecológico, otras estrategias como es el control por recolección, ya que es un producto rentable que se vende en mercados del Estado de México y de Oaxaca, donde forma parte de la comida regional (Marcos *et al.*, 2015). Cerritos y Cano-Santana (2008) compararon el impacto sobre la densidad de ootecas/m² de *S. purpurascens* por la aplicación de malation y por la recolección de este saltamonte para el consumo humano, durante dos años consecutivos en parcelas de alfalfa. Registraron que el tratamiento con mayor impacto fue la aplicación de malation, seguido por el control por recolección del saltamontes y finalmente el grupo control.

Con respecto a los hongos entomopatógenos asociados a los saltamontes, se registró una infección de solo 0.41% en los saltamontes recolectados. La baja frecuencia de infección por hongos entomopatógenos se ha registrado en otros estudios (Rodríguez y Leucuona, 2002), ya que requieren humedad alta para poder infectar a los huéspedes y por lo tanto para generar epizootias naturales (Ortiz-Catón *et al.*, 2011). Se aislaron nueve hongos entomopatógenos de *Metarhizium* sp. y tres de *Beauveria* sp., los cuales son candidatos para usarse como agentes de control biológico de *S. purpurascens purpurascens* y los cuales formaran parte de la colección de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Se presentó un mayor porcentaje de hongos entomopatógenos en el policultivo, comparado con el monocultivo, la vegetación de los márgenes del monocultivo y la vegetación de los márgenes del policultivo. Se encontró una asociación entre la proporción de saltamontes infectados con *Metarhizium*, en el sitio del policultivo, respecto a los que se encontraron infectados en la vegetación marginal del policultivo. La infección de *Metarhizium* parece verse favorecida por tipo de manejo de policultivo, ya que en estos sistemas, el microclima cambia incrementándose principalmente la humedad relativa, favoreciendo la presencia de HEP (Van Huis, 1997). No existen estudios de presencia de hongos entomopatógenos en sistemas con diferentes tipos de manejo agrícola, por lo que no

se puede hacer una comparación con otras investigaciones. Los hongos entomopatógenos aislados en esta investigación son candidatos para ser utilizados como agentes de control biológico de *S. purpurascens purpurascens*.

Al evaluar la susceptibilidad de *S. purpurascens purpurascens* a una cepa comercial de *Metarhizium acridum* (CHE-CNRCB 213) tomando en cuenta los diferentes estadios de desarrollo postembrionario de este insecto (Barrientos-Lozano y Almaguer-Sierra, 2009), los estadios más susceptibles de *S. purpurascens purpurascens* fueron la ninfas 1, 2 y 4, con un tiempo de supervivencia medio de 6.42, 6.91 y 6 días postratamiento, respectivamente, y una supervivencia menor al 5%.

La edad de los insectos es considerada uno de los factores que determinan la mortalidad (Boucias y Pendland, 1984). Los primeros estadios de desarrollo son mayormente afectados por la infección de los hongos entomopatógenos, ya que la capacidad de encapsular cuerpos extraños en estadios tempranos es baja (Sagarra *et al.*, 2000). Esto pudiera deberse a que la capacidad del hongo para infectar al insecto puede estar influenciada por el estado fisiológico del hospedero, infectando un estadio en particular (Boucias y Pendland, 1984), como la ninfa 4, el cual fue uno de los estadios más susceptibles. El estadio más resistente fue el adulto con un tiempo medio de supervivencia de 8.36 días postratamiento y una supervivencia del 5%. Los estadios maduros pueden eliminar patógenos invasores ya que su sistema inmunológico es más eficaz (Mohan *et al.*, 1999).

En la investigación de Vázquez *et al.* (2016), al evaluar la susceptibilidad de *S. purpurascens* de los estadios de ninfa 2 y ninfa 4 con concentraciones de conidios de *B. bassiana* en el laboratorio, se registró a la ninfa 4 como el estadio más susceptible con una supervivencia del 0% al sexto día postaplicación, en comparación con la ninfa dos que fue al séptimo día. Estos resultados confirman que la ninfa 4 es el estadio que presenta un menor tiempo de supervivencia. Tamayo-Mejía (2009) registró que la ninfa 2 y la ninfa 3 de *S. purpurascens* son más susceptibles a *Metarhizium anisopliae* en comparación de los adultos al presentar un tiempo de supervivencia de 15 días postaplicación y los adultos de 35 días.

De acuerdo a los estudios anteriormente citados, estos concuerdan en que la ninfa 2 y la 4 son los estadios más susceptibles y que el adulto es el menos susceptible, ya que los estadios tempranos de los insectos presentan un menor número de hemocitos, tal es el caso del segundo estadio larva de *Euxoa* Hübner que tiene 4 000 hemocitos y 240 000 en el sexto estadio (Chapman, 1998). Con respecto a la esporulación de *M. acridum* sobre *S. purpurascens purpurascens* se observó que hay mayor esporulación en las ninfas 1, 2 y 3 en comparación a los estadios de ninfa 4 y adulto. Este parámetro no había sido evaluado en otros estudios.

Para el control biológico de una plaga se recomienda utilizar hongos entomopatógenos nativos que presenten una alta patogenicidad y virulencia sobre la especie de insecto plaga en cuestión (Meyling y Eilenberg, 2007), adaptados a temperaturas y condiciones de campo (Berlenga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2002). Se seleccionaron dos cepas nativas de Erongarícuaro: 6MaEM y 9MaEM de *Metarhizium anisopliae* y se comparó su patogenicidad sobre *S. purpurascens purpurascens* en laboratorio. La cepa 6MaEM presentó mayor patogenicidad en comparación con 9MaEM, ya que necesitó una concentración menor para ocasionar la mortalidad del 50 y 90% de la población de *S. purpurascens purpurascens*. Además, se observó que los saltamontes infectados con la cepa 6MaEM presentaron un tiempo medio de supervivencia diaria menor en comparación con la cepa nativa 9MaEM. Rosa *et al.* (2002) mencionan que la agresividad de una cepa está determinada en base al tiempo letal medio, considerándose una cepa con mayor agresividad y aquella que ocasiona la mortalidad a su hospedero en menor tiempo (Maniania y Ondulaja, 1998).

Posteriormente se comparó la virulencia de la cepa nativa 6MaEM de *M. anisopliae* y una cepa comercial de *M. acridum* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán. La virulencia de la cepa nativa de *M. anisopliae* fue baja sobre *S. purpurascens purpurascens* en comparación a la cepa comercial de *M. acridum*, al igual que la esporulación. Se registró una supervivencia acumulada de saltamontes tratados con la cepa nativa del 53.99% y de la cepa comercial 2.06% en un periodo de 28 días después de la aplicación en el campo. Esto se atribuye a que la cepa comercial de *M. acridum* es específica de saltamontes, mientras que

los aislados nativos de *M. anisopliae* no lo son (Gao *et al.*, 2011). Aunque el origen de estos aislados fue *S. purpurascens purpurascens* y son susceptibles a estos, no fue mejor su desempeño frente la virulencia de *M. acridum*, por lo tanto, eso explica porque en el estudio previo (Quesada, *et al.*, en prensa) la prevalencia de infección fue baja.

En el estudio de Barrientos-Lozano *et al.* (2002), esta misma cepa de *M. acridum* (50 g de conidios formuladas en aceite mineral fueron aplicadas en una hectárea), mostró ser muy eficiente para el control biológico de *Shistocerca piceifrons piceifrons* (Walker) en campo. Las bandas de langosta tratadas se redujeron un 90% a los 10 días después del tratamiento. En el estudio de Peng *et al.* (2008), durante el 2002-2006 se realizó la aplicación de 5×10^{12} conidios/ha de *M. acridum* sobre *Locusta migratoria manauensis* (Meyen) en jaulas, las cuales se encontraban dentro de parcelas. Se estimó una mortalidad causada por *M. acridum* de 90% entre los 9-13 días después del tratamiento. Es evidente en la literatura que para el control biológico de saltamontes y langostas se aplica en la mayoría de los estudios aislados de *M. acridum* en comparación con *M. anisopliae* ya que la patogenicidad y virulencia es mayor (Milner y Priori, 1994). Tal es el caso de la cepa comercial de *M. acridum* evaluada en esta investigación, la cual es considerada una de las más virulenta de la colección de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia y Control Biológico para el control de saltamontes y langostas en México (Barrientos-Lozano *et al.*, 2002).

Con respecto a la reducida esporulación de los hongos entomopatógenos sobre los saltamontes muertos en campo una de las probables causas fue la baja temperatura y humedad relativa en el ambiente (Gottwald y Tedders, 1984; Rodríguez *et al.*, 2006). La Cuenca de Lago de Pátzcuaro se caracteriza por tener un clima templado (INEGI, 2009). De acuerdo Roberts, (1970) los requerimientos de temperatura de *Metarhizium* para la esporulación son de 15 °C a 35 °C. Berlenga-Padilla y Hernández-Velázquez (2002), mencionan que *M. acridum* se desarrolla mejor en temperaturas altas de áreas tropicales y subtropicales. Una de las probables soluciones para disminuir la supervivencia de los saltamontes tratados con *M. acridum* en un periodo de tiempo más corto en el campo es la formulación de *M. acridum* en aceites como la citrolina, para evitar que se deshidrate la conidia (Milner, 2000; Hernández,

2003), así como aplicar concentraciones más altas de hongos entomopatógenos y así reducir el daño a los cultivos (Tamayo-Mejía *et al.*, 2016).

Debido a que se registró una supervivencia de los saltamontes tratados con la cepa comercial de *M. acridum* de 2.06% en un periodo de 28 días después de su aplicación en el campo se considera que es una opción viable para el control biológico de *S. purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro, Michoacán.

Conclusiones generales

En los agroecosistemas de maíz se encontró una comunidad de 17 especies de saltamontes, de las cuales la más abundante fue *Sphenarium purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro, Michoacán. La abundancia de esta especie fue igual en el policultivo en comparación con el monocultivo.

La abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en la vegetación de los márgenes del monocultivo y la vegetación de los márgenes del policultivo explicó la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* encontrada en el monocultivo y el policultivo.

Los hongos entomopatógenos presentaron un porcentaje mínimo (0.41%) de infección de manera natural en las poblaciones de *S. purpurascens purpurascens*. Se encontró una mayor proporción de individuos infectados de *Metarhizium* sp. en las condiciones del policultivo en comparación de la vegetación marginal del policultivo.

Los estadios más susceptibles de *S. purpurascens purpurascens* a una cepa comercial de *Metarhizium acridum* fueron las ninfas 1, 2 y 4. El estadio menos susceptible fue el adulto. La esporulación de *M. acridum* fue mayor en estadios tempranos, ninfa 1, 2 y 3 de *S. purpurascens purpurascens* y disminuyó en estadios tardíos ninfa 4 y adulto. De las dos cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* evaluados sobre *S. purpurascens purpurascens*, la 6MaEM, presentó mayor patogenicidad en comparación con la 9MaEM, bajo condiciones del laboratorio.

La cepa comercial de *M. acridum* tuvo mayor virulencia sobre *S. purpurascens purpurascens* en comparación a la cepa nativa de *M. anisopliae* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán, siendo una alternativa viable para el control de *S. purpurascens purpurascens* en Erongarícuaro Michoacán.

Para disminuir la abundancia de *S. purpurascens purpurascens* en los agroecosistemas de maíz de Erongarícuaro, se deben de incluir especies vegetales repelentes a este insecto plaga, junto a esta estrategia realizar aplicaciones de bionsecticidas en las ninfas 1, 2 y 4 de *S. purpurascens purpurascens*, y recolectar este insecto para el consumo humano. Una alternativa viable para ser usada como bioinsecticida sobre *S. purpurascens purpurascens* en condiciones de campo de Erongarícuaro, Michoacán es la cepa comercial de *Metarhizium acridum*.

En estudios posteriores se recomienda aislar hongos entomopatógenos de *M. acridum* de las poblaciones de *S. purpurascens* que se encuentran en México y evaluarlos junto a la cepa comercial de *M. acridum*. Así como también probar estos hongos entomopatógenos formulados en aceite citrolina en condiciones de campo.

Literatura citada

Altieri, M. A., y Nicholls, C. I. (2004). Una base agroecológica para el diseño de sistemas diversificados de cultivo en el trópico. Recuperado el 10 de marzo del 2017 de: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6873>

Altieri, M. A., y Nicholls, C. I. (2013). *Diseños agroecológicos para incrementar la biodiversidad de entomofauna benéfica en agroecosistemas*. Primera edición. SOCLA. Medellin, Colombia. 83.

Anaya-Rosales, S., Romero-Nápoles, J., y López-Martínez, V. (2000). *Manual de Diagnóstico para las Especies de Saltamontes (Orthoptera: Acridoidea) del Estado de Tlaxcala y estados adyacentes*. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Méx. 266.

Bach, C. E. (1980). Effects of plant density on the population dynamic of a specialist herbivore, the striped cucumber beetle, *Acalymma vittata* (Fab.). *Ecology*, 61, 1515-1530.

Barrientos-Lozano, L., & Almaguer-Sierra, P. (2009). Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia* (México), 13(2), 51-56.

- Barrientos-Lozano, L., Hernández-Velázquez, V. M., Milner, R. J., & Hunter, D. M. (2002). Advances in biological control of locusts and grasshoppers in Mexico. *Journal of Orthoptera Research*, 11(1), 77-82.
- Bastos, C. S., Galvão, J. C. C., Picanço, M. C., Cecon, P. R., & Pereira, P. R. G. (2003). Insect phitophagous and predators incidence on maize and bean cultivated in exclusive and intercropped systems. *Ciencia Rural*, 33(3), 391-397.
- Berlanga Padilla, A. M., y Hernández Velázquez, V. H. (2002). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 51-55.
- Bertolaccini, I., Núñez-Pérez, E., y Tizado, E. J. (2004). Plantas hospedadoras alternativas de áfidos plaga de cultivos de leguminosas, sus parasitoides e hiperparasitoides en la provincia de León (España). *Asociación Española de Entomología*, 28(4), 33-47.
- Boucias D. G., y Pendland J. C. (1984). *Host recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi*. In: Roberts D. and Aist, J. (eds.) *Infection Process of Fungi*. The Rockefeller Foundation. USA, 185-196.
- Cerritos, R., y Cano-Santana, Z. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: a comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*, 27(3), 473-480.
- Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press. 45.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., y Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, 7(1), e1001264.
- Gottwald, T. R., & W. L. Tedders. (1984). Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on

pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. *Environmental Entomology*, 13, 557-560.

Helenius, J. (1991). Insect numbers and pest damage in intercrops vs. monocrops: concepts and evidence from a system of faba bean, oats and *Rhopalosiphum padi* (Homoptera, Aphididae). *Journal. Sustainable Agriculture*, 1, 57-80.

Hernández, V. V. M. (2003). Efecto del contenido de humedad de conidios formulados de *Metarhizium anisopliae* *Acridum* (Hyphomycete) sobre la viabilidad y producción de exudados en almacenamiento y virulencia sobre *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae). Tesis de doctorado. Universidad de Colima, Colima.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2009). Prontuario de información geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Erongarícuaro, Michoacán de Ocampo. Recuperado el 17 de mayo del 2016 de: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos>

Maniania, N. K., & Ondulaja, A. (1998). Effect of species, age, and sex of tse-tse on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 43, 311-323.

Marcos, Y. S., Pacheco, R. P., Pérez, G. E. G., Manzanero, G. I., y Medina, G. R. O. (2015). Conocimiento tradicional y valor cultural de *Sphenarium* spp. en valles centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 2, 33-35.

Meyling, N. V., y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological control*, 43(2), 145-155.

Milner, R. J. (2000). Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information*, 21(2), 47-50.

Milner, R. J., y C. Prior. (1994). Susceptibility of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*, and the wingless grasshopper, *Phaulacridum vittatum*, to the fungi *Metarhizium* spp. *Biological Control*, 4, 132-137.

Mohan M. C., Lakshmi A. K., y Devi K. U. (1999). Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Science Technoly*, 9(1), 29-33.

Ortíz-Catón, M., Alatorre-Rosas, R., Valdivia-Bernal, R., Ortíz-Catón, A., Medina-Torres, R., y Alejo-Santiago, G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos Entomopatógenos. *Revista Bio Ciencias*, 1(2), 43-51.

Peng, G., Wang, Z., Yin, Y., Zeng, D., y Xia, Y. (2008). Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protection*, 27(9), 1244-1250.

Quesada-Béjar, V., Nájera-Rincón, M., Reyes-Novelo, E., y Gonzales-Esquivel, C. (en prensa). Ortópteros (Caelifera) y sus hongos entomopatógenos en agroecosistemas de maíz en Erongarícuaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6).

Rich, S. J. (1981). Insect herbivore abundance in tropical monocultures and polycultures: an experimental test of two hypotheses. *Ecology*, 62, 1325-1340.

Rodríguez, J. L., y Lecuona, R. E. (2002). Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1), 67-84.

Rodríguez, S., Gerding, P., y France, A. (2006). Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultura técnica*, 66(2), 151-158.

Root, R. B. (1973). Organization of a plantarthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collard (*Brassica oleracea*). *Ecological Monographs*, 43, 951-1024.

- Rosa, W., López, F., & Liedo, P. (2002). *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Journal Economic Entomology*, 95(1), 36-43.
- Sagarra, L. A., Peterkin, D. D., Vincent, C., y Stewart, R. K. (2000). Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Insect Physiology*, 46(5), 647-653.
- Sloderbeck, P. E., y Edwards, C. R. (1979). Effects of soybean cropping practices on Mexican bean beetle and redlegged grasshopper populations. *Journal of Economic Entomology*, 72(6), 850-853.
- Tamayo-Mejía, F. (2009). Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentiales* (Thomas) (Orthoptera: Acrididae) con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Guanajuato, México. *Vedalia (México)*, 13(2), 85-90.
- Tamayo-Mejía, F., P. Tamez-Guerra, A. W. Guzmán-Franco, and R. Gomez-Flores. (2016). Developmental stage affects survival of the ectoparasitoid *Tamarixia Triozae* exposed to the fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 93: 30–36.
- Van Emden, H. F. (1965). The role of uncultivated land in the biology of crop pests and beneficial insects. *Scientific Horticulture*, 17, 121-136.
- Van Huis, A. 1997. *Manipulating crop diversity to control pest*. Entomology. 26th International Course on integrated pest management. Wageningen, the Netherlands. 21-22.
- Vázquez J. M. D. L. Á.V., García A. A., Martínez M. D. B., Hernández D. C., Galicia S. B. N., y Torres B. C. P. (2016). Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 235-247.
- Zumoffen, L., Rodriguez, M., Gerding, M., Salto, C. E., y Salvo, A. (2015). Plantas, áfidos y parasitoides: interacciones tróficas en agroecosistemas de la provincia de Santa Fe,

Argentina y clave para la identificación de los Aphidiinae y Aphelinidae (Hymenoptera) conocidos de la región. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74(4), 133-144.