

OBTENCIÓN DE CONIDIOS DEL AISLAMIENTO MA-002 DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN MEDIANTE UNA ALTERNATIVA DE CULTIVO BIFÁSICO

C.G. Barajas*, E.M. del Pozo**, Irma García**, A. Méndez**

*Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua, Carretera a Rosales km. 2½, Cd. Delicias, Chihuahua, México. C.P. 33000.

Correo electrónico: gbarajas@uach.mx; **Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana, Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

RESUMEN: En este trabajo se utilizó el aislamiento Ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, aislado de suelos de la localidad Santa Gertrudis en el Estado de Chihuahua, México, con el objetivo de producir masivamente dicho hongo por el método bifásico. Para la primera fase se utilizó un medio líquido a base de levadura (20 g.L⁻¹), sacarosa (20 g.L⁻¹) y agua corriente, inoculado con una suspensión de conidios a una concentración de 5 x 10⁶ conidios.mL⁻¹, evaluándose la dinámica de formación de propágulos del hongo a partir de las 12 horas. Para la fase sólida se utilizó arroz, se inoculó con la mezcla de medio de cultivo y propágulos del hongo obtenida en la fase líquida. Se demostró que el aislamiento Ma-002 es capaz de producir grandes cantidades de propágulos (superiores a 10⁷ propágulos.mL⁻¹) en un proceso de fermentación sumergida con un medio líquido basado en sacarosa y extracto de levadura, en 60 h, garantizando así el material necesario para la inoculación del sustrato sólido en el proceso bifásico. En la fase sólida, a los 12 días de incubación se logró un rendimiento superior a los 10⁹ conidios.g⁻¹ de arroz colonizado por el hongo. Lo anterior confirma que la producción de conidios del aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae* por el método bifásico es factible, con una reducción del tiempo total del proceso, por lo que también se logra economizar espacio.

(Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*; producción masiva; cultivo bifásico)

CONIDIA PRODUCTION BY THE ISOLATE Ma-002 OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN IN AN ALTERNATIVE OF BIPHASIC CULTURE

ABSTRACT: The isolate Ma-002 of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, obtained from soils in the locality of Santa Gertrudis in Chihuahua State, Mexico, was used with the objective of mass producing this fungus by a biphasic method. A liquid medium with yeast extract (20 g.L⁻¹), sucrose (20 g.L⁻¹) and tap water were used for the first phase. It was inoculated with a conidia suspension with a concentration of 5 x 10⁶ conidia.mL⁻¹ and the formation of propagules by the fungus was evaluated every 12 hours. Whole rice was used for the solid phase, which was inoculated with the mixture of the culture medium and propagules obtained in the liquid phase. The isolate Ma-002 was capable of producing a high yield of propagules (higher than 10⁷ propagules.mL⁻¹) in a fermentation process with a liquid medium based on sucrose and yeast extract in 60 hours, obtaining the material to inoculate the solid substrate in the biphasic process. In the solid phase, a yield of 10⁹ conidia.g⁻¹ of rice was achieved after 12 days of incubation. These results showed that the conidia production by the isolate Ma-002 of *M. anisopliae* using the biphasic method can be applied, with a reduction of the total time of the process and the space used.

(Key words: *Metarhizium anisopliae*; mass production; biphasic culture)

INTRODUCCIÓN

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes: Hypocreales) (1) es uno de los hongos entomopatógenos más conocidos, siendo la primera especie que se evaluó en condiciones de campo para el control de un insecto fitófago, lo cual aconteció en Rusia, en el año 1888 (2).

Esta especie presenta un alto potencial de uso en la regulación de plagas en todos los agroecosistemas del mundo, tanto en aplicaciones inundativas, como en estrategias de conservación (3,4,5). Ha sido recomendado contra una gran diversidad de insectos fitófagos, de diferentes órdenes y familias, así como de ácaros, en muchos cultivos, y regiones diferentes (6,7), lo que puede ser explicado por su carácter cosmopolita y su gran diversidad genética (8,9), además de ser un agente seguro, con mínimos riesgos para el hombre, los vertebrados y el medio ambiente (10,11).

Especialmente, se ha enfatizado en la importancia de *M. anisopliae* como agente de control biológico de locústidos y saltamontes en diversas regiones del mundo (12,13,14,15), y se ha demostrado que puede provocar epizootias tempranas a partir del inóculo aplicado el año anterior (transmisión vertical) (16) y que el hongo presenta una alta persistencia cuando es aplicado al suelo (17). En tratamientos aéreos, en China, se logró un 90% de mortalidad de la langosta migratoria, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), en 11-15 días (18). En el estado de Chihuahua, México, recientemente se ha informado la obtención de aislamientos autóctonos de *M. anisopliae*, con potencialidad como agentes de control biológico de *Brachystola magna* Girard (Orthoptera: Romaleidae), una importante plaga del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y otros cultivos (19).

M. anisopliae es una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo en relación con su producción masiva y comercialización como bioplaguicida (3,20). La producción de conidios en gran escala se puede realizar sobre diferentes sustratos de origen vegetal, como papa, trigo, soya, arroz y el salvado en diferentes formas (21,22).

La composición del medio de cultivo, así como el «estrés hídrico» y el «estrés osmótico» tienen un marcado efecto sobre la germinación, crecimiento, virulencia, características de la superficie de los propágulos y otras propiedades de *M. anisopliae* (23,24,25).

Los medios de cultivo líquidos pueden elaborarse a partir de sustratos relativamente baratos y de fácil obtención, que combinen una fuente de carbono, una de nitrógeno y algunos microelementos (21,26,27,28). En

el cultivo sumergido generalmente se producen blastosporas que, aunque no son apropiadas para ser aplicadas en campo, son de mucha utilidad para la producción bifásica (29,30).

La selección del sustrato depende de un número de factores, incluyendo la disponibilidad local, los costos, y la preferencia del hongo a cultivar (27). Por otro lado, el contenido de humedad del sustrato sólido afecta sensiblemente el proceso de esporulación de *M. anisopliae*, ubicándose el óptimo entre 57 y 58% (31).

Para obviar las desventajas que presenta la producción masiva de hongos entomopatógenos en cultivo sumergido o sobre un sustrato sólido, con frecuencia se recurre a un proceso de producción en dos fases (cultivo bifásico), en el que los cultivos sumergidos son usados para producir una gran cantidad de biomasa, la cual se inocula sobre un sustrato sólido para obtener los conidios necesarios (29).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar alternativas para la producción masiva de un aislamiento de *M. anisopliae* mediante el cultivo bifásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dinámica de producción de propágulos en un medio líquido

En este ensayo se utilizó el aislamiento fungoso Ma-002, de *M. anisopliae*, obtenido a partir de muestras de suelo y conservado en el Centro de Investigación, Conservación y Reproducción de Organismos Benéficos (CICROB), de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en Ciudad Delicias, Chihuahua, México. Se seleccionó un medio líquido que ha sido ampliamente utilizado en procesos de producción masiva de diferentes hongos, incluyendo la especie *M. anisopliae* (26,27), el cual tiene la siguiente composición: levadura, 20 g.L⁻¹; sacarosa comercial, 20 g.L⁻¹ y agua corriente, ajustándose a pH 6.5 con soluciones de NaOH 0,1N ó HCl 0,1N (32).

Para el ensayo se diseñó un sistema de aireación utilizando un compresor que, con los filtros correspondientes, permitió alimentar una línea de suministro de aire estéril a las unidades de reproducción.

Una vez preparado el medio de cultivo se vertieron 750 mL del mismo en frascos erlenmeyers de 1 L de capacidad, y se procedió a la esterilización en autoclave, a 121°C durante 25 minutos.

Cuando el medio de cultivo se enfrió se realizó la inoculación con 10 mL de una suspensión de conidios en agua destilada estéril más Tween 80 al 0,05%, con

una concentración de 5×10^6 conidios.mL⁻¹, preparada a partir de una colonia del hongo de 14 días de edad sobre Sabouraud Dextrosa Agar + Extracto de Levadura (SDAY). Una vez inoculados, los frascos se conectaron al sistema de aireación, el cual se reguló para suministrar, aproximadamente, 1 VVM (volumen de aire por volumen de medio de cultivo, por minuto) de aire estéril. Como tratamientos se consideraron los diferentes momentos de evaluación (6), cada 12 h a partir del momento de la inoculación, con cuatro repeticiones. La temperatura ambiente en el laboratorio fue de $24,9 \pm 1,2^\circ\text{C}$.

Para la evaluación, se extrajeron 10 mL del caldo de cultivo y se vertieron en frascos erlenmeyers de 200 mL que contenían 90 mL de agua destilada estéril más Tween 80 al 0,05%. Con esta suspensión se realizó el conteo de los propágulos del hongo (fundamentalmente blastosporas) utilizando la cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como número de propágulos.mL⁻¹ de caldo de cultivo.

Los datos obtenidos se transformaron según la expresión $\log_{10}(x)$, y procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple, comparando las medias mediante la Prueba de Tukey al 5% (33).

Dinámica de producción de conidios en un sustrato sólido

El inóculo (mezcla del medio líquido y propágulos del hongo) se obtuvo siguiendo el procedimiento derivado del ensayo anterior, con 60 h de incubación, cuando la concentración fue superior a 10^7 propágulos.mL⁻¹.

Como sustrato sólido se utilizó arroz entero, el cual fue remojado con agua corriente durante 2 h, y se dejó escurrir por 1 h, después de lo cual se colocó el equivalente a 100 g del mismo en bolsas de polipropileno, y se procedió a la esterilización en autoclave, a 121°C durante 30 minutos. Pasadas 24 h, las bolsas con arroz se inocularon con 15 mL del inóculo líquido y se incubaron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del $70 \pm 5\%$, con fotoperiodo natural en el laboratorio.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones. Como tratamientos se consideraron los diferentes momentos de evaluación (9), cada 2 días, a partir del cuarto día después de la inoculación del sustrato.

Para la evaluación, de cada bolsa se extrajo 1 g del sustrato cubierto por el hongo, el cual se suspendió en 100 mL de agua destilada estéril más Tween 80 al 0,05%, en un frasco erlenmeyer de 200 mL de capacidad, el cual se agitó fuertemente durante 1 minuto. Con esta suspensión se realizó el conteo de conidios

del hongo (haciendo diluciones cuando fue necesario) en la cámara de Neubauer, expresando los resultados como número de conidios.g⁻¹ de sustrato. Los datos obtenidos se transformaron según la expresión $\log_{10}(x)$, y procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple, comparando las medias mediante la Prueba de Tukey al 5% (33).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica de producción de propágulos en un medio líquido

El análisis estadístico realizado mostró que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, para la producción de propágulos del aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae*. Como puede observarse en la Figura 1, a partir del primer momento de evaluación (12 h) la concentración de propágulos aumentó muy poco hasta las 24 h, no existiendo diferencias significativas entre estos dos momentos.

A partir de las 24 horas comienza la fase de crecimiento exponencial de la curva, obteniéndose valores de concentración de propágulos para las 36, 48 y 60 h que difieren estadísticamente entre sí. La concentración de propágulos obtenida a las 72 h es similar estadísticamente a la lograda a las 60 h, por lo que a partir de este último momento comienza la llamada «fase de meseta» de la curva de crecimiento. Es de destacar que ya a partir de las 48 h de incubación la concentración en el medio líquido es superior a 10^7 propágulos.mL⁻¹. El tiempo en que se alcanza la máxima producción de propágulos de *M. anisopliae* en el presente trabajo es muy inferior a lo informado por otros autores, que lo lograron a las 169 h (32). Con los aislamientos del género *Metarhizium*, en general, se obtienen altas cantidades de propágulos en sustratos líquidos (34, 35), destacándose aquellos resultados donde la concentración de carbono fue de 36 g.L⁻¹ y la relación C:N de 10:1 (36).

Los resultados presentados en este ensayo, con las condiciones nutritivas y el volumen de oxígeno utilizado, demuestran las potencialidades del aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae* para ser reproducido masivamente mediante un proceso de fermentación sumergida. La modificación de la relación carbono-nitrógeno en el proceso de producción masiva de *M. anisopliae* puede alterar morfológica y fisiológicamente de forma favorable la producción de propágulos, y con pequeños ajustes lograr, incluso, un producto apropiado para su aplicación directa en el campo (22,37), capaz de lograr buenos resultados en el control de ninfas del segundo instar de *Schistocerca gregaria* Forskal (36).

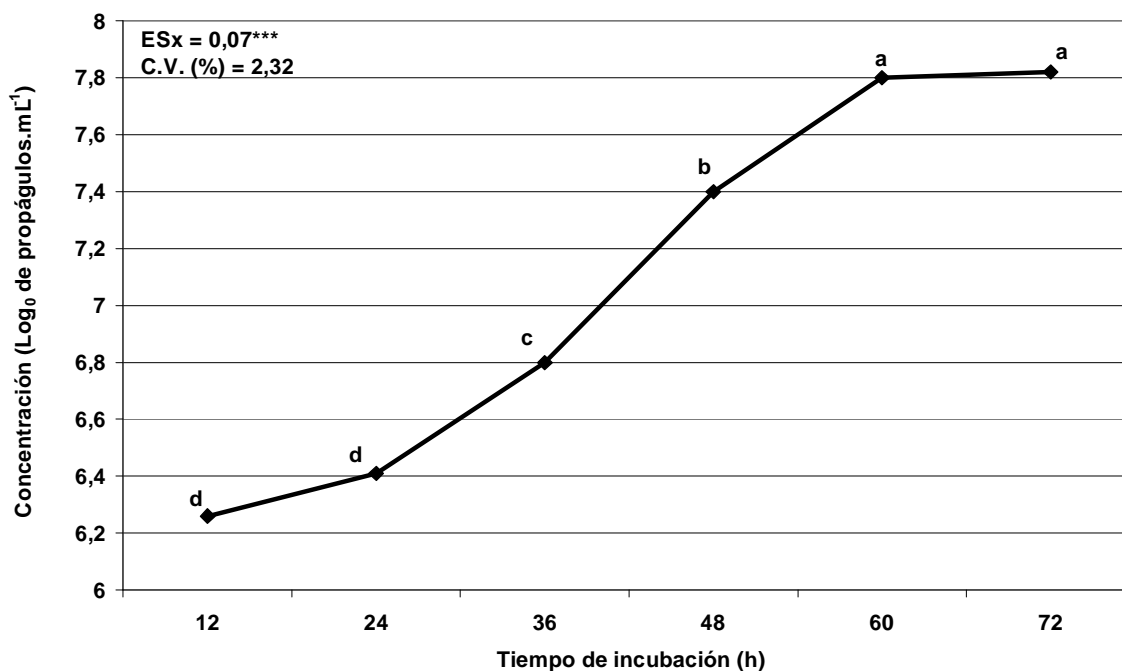


FIGURA 1. Dinámica de producción de propágulos del aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae* en un cultivo líquido./ *Dynamics of propagule production by the isolate Ma-002 of M. anisopliae in a liquid medium.*

Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Tukey ($p < 0,05$).

En este experimento se demostró que el aislamiento Ma-002 es capaz de producir grandes cantidades de propágulos en un medio líquido basado en sacarosa y extracto de levadura, insumos estos de fácil adquisición y bajo costo, en un proceso de fermentación sumergida que en 60 h puede garantizar el material necesario para la inoculación del sustrato sólido en un proceso bifásico.

Dinámica de producción de conidios en un sustrato sólido

En este ensayo, el análisis estadístico mostró que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Como se aprecia en la Figura 2, a los cuatro días de la inoculación del sustrato sólido con el material obtenido en el cultivo sumergido, se observó una apreciable cantidad de conidios, superior a 10^7 conidios.g⁻¹ de arroz colonizado, y a partir de ese momento se manifestó un rápido crecimiento del rendimiento, expresado en los valores obtenidos para cada momento de evaluación, hasta el día 12, que difirieron estadísticamente entre sí.

En la evaluación del día 12, el rendimiento mostró valores superiores a 10^9 conidios.g⁻¹, y a partir de ese momento se alcanzó la «fase de meseta» de la curva, en la que los valores obtenidos fueron estadísticamente

similares. Los rendimientos logrados, superiores a los alcanzados en estudios similares (27), indican que el arroz resulta un sustrato adecuado para la fase sólida del proceso de producción bifásica, tal y como lo han informado varios autores (21,38). Al parecer, el arroz con 2 h de remojo alcanza el contenido de humedad inicial requerido para lograr una alta producción de conidios de *M. anisopliae* (31,39).

Los resultados del ensayo indican que a los 12 días se puede detener la fase de fermentación sólida, lo cual resulta un periodo de tiempo inferior a lo establecido para esta misma especie fungosa en el proyecto Lubilosa (40). En otros estudios se ha sugerido un periodo de hasta 21 días para obtener la mayor producción de conidios en procesos de producción masiva con hongos entomopatógenos (3).

Lo anterior confirma que la producción de propágulos mediante fermentación sumergida puede ser integrada a un método bifásico de producción masiva de hongos entomopatógenos, con lo cual se logra reducir el tiempo de colonización del sustrato sólido, con producción de conidios aéreos en un menor tiempo, y en un menor espacio (22,36). Con ello, pueden disminuir también los gastos en el proceso de producción masiva, lo cual es un requerimiento para que un entomopatógeno pueda utilizarse como bioplaguicida (41).

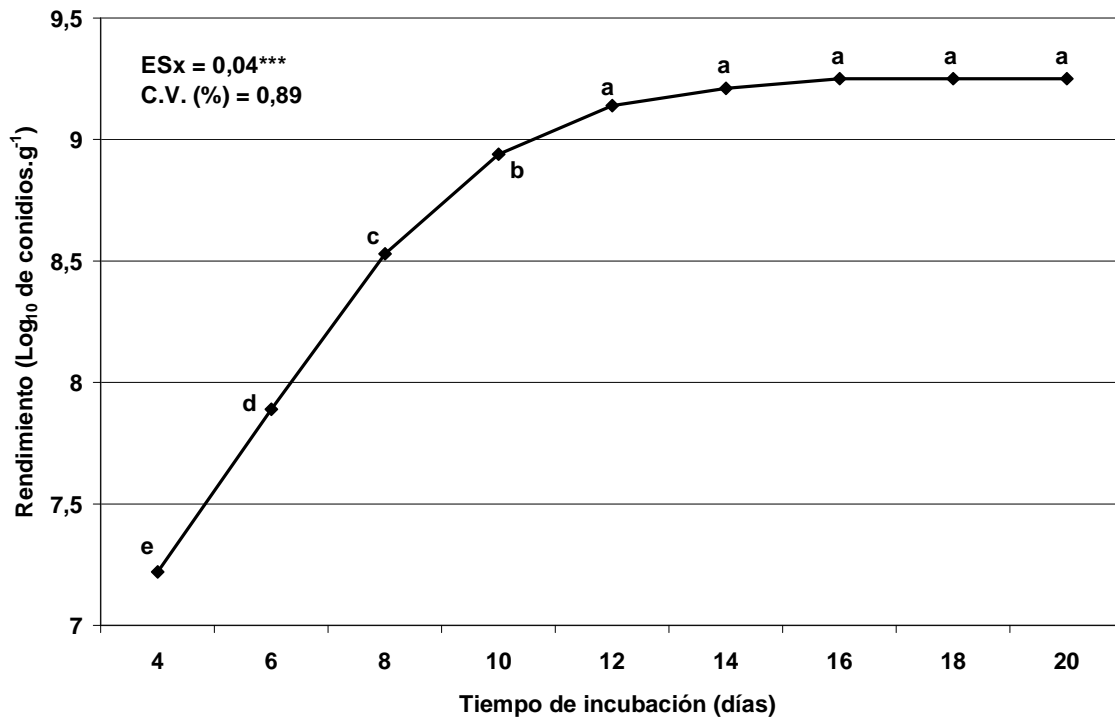


FIGURA 2. Dinámica de producción de conidios del aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae*, en arroz./ *Dynamics of conidia production on rice by the isolate Ma-002 of M. anisopliae.*

Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Tukey ($p < 0,05$).

En resumen, se demostró que el aislamiento Ma-002 de *M. anisopliae* pudo ser reproducido mediante el método bifásico, donde se utilizó un medio líquido basado en levadura y sacarosa y un sustrato sólido a base de arroz, lográndose un producto con una alta concentración de conidios, en un tiempo menor que el requerido para el proceso convencional sobre un sustrato sólido. Los resultados obtenidos constituyen aportes a futuras metodologías para la producción masiva y formulación de este aislamiento.

REFERENCIAS

- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa JJ, Shrestha B, Spatafora, JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 2007;57(1):5-59.
- Lord JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol*. 2005;89:19-29.
- Faria M, Wraight SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*. 2007;43:237-256.
- Meyling NV, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control*. 2007;43(2):145-155.
- Jabbour R, Barbercheck M. Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biol Control*. 2009;51(3):435-443.
- Copping LG. *The Manual of Biocontrol Agents*. Third Edition. The British Crop Protection Council, Aston, UK. 2004.
- Shi WB, Zhang LL, Feng MG. Field trials of four formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for control of cotton spider mites (Acari: Tetranychidae) in the Tarim Basin of China. *Biol. Control*. 2008;45(1):48-55.
- CAB International. *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK, CAB International. 2006.

9. Inglis GD, Duke GM, Goettel MS, Kabaluk JT. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *J Invertebr Pathol.* 2008;98(1):101-113.
10. Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol.* 2007;17(9):879-920.
11. Torriello C, Pérez A, Vega F, Navarro H, Pérez A, Lorenzana M, et al. Lack of pathogenicity and toxicity of the mycoinsecticide *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* following acute gastric exposure in mice. *Ecotoxicology and Environ. Safety.* 2009;72(8):2153-2157.
12. Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas MB. Biological control of locusts and grasshoppers. *Ann Rev Entomol.* 2001;46:667-702.
13. Milner JR, Hunter M. Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. *J Orthoptera Res.* 2001;10:271-276.
14. Castrillo LA, Roberts DW, Vandenberg JD. The fungal past, present, and future: Germination, ramification and reproduction. *J Invertebr Pathol.* 2005; 89:46–56.
15. Entz SC, Johnson DL, Kawchuk LM. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycol Res.* 2005;109(11):1302-1312.
16. Bak J, Fisker EN, Kooyman C. Evaluating the importance of residual effects from previous years treatment on the efficiency of different strategies for control of Sahelian grasshoppers with *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Biocontrol Sci Technol.* 2007;17(4):413-422.
17. Bruck DJ, Donahue KM. Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus* in container-grown ornamentals. *J Invertebr Pathol.* 2007;95(2):146-150.
18. Peng G, Wang Z, Yin Y, Zeng D, Xia Y. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protect.* 2008; 27(9):1244-1250.
19. Barajas CG, Morales MD, Del Pozo EM, Rodríguez ML, Núñez JJ. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de Chapulín frijolero. *Revista Tecnociencia Chihuahua.* 2009;3(1):33-38.
20. Kabaluk T, Gazdik K. Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Agriculture and Agri-Food Canada, 2005. (En línea). Disponible en: http://www.agr.gc.ca/env/pest/index_e.php??s1=pub&page=micro. (Consultado: 12 octubre 2009).
21. Rao NS. Commercialization of bioagent mass production technologies in intensive cotton districts, 2007. (En línea). Disponible en: <http://www.cicr.nic.in/TMC-0405/3.3.pdf>. (Consultado: 31 mar 2008).
22. Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, et al. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res.* 2008;112(5):583-591.
23. Ypsilos IK, Magan N. Impact of water-stress and washing treatments on production, synthesis and retention of endogenous sugar alcohols and germinability of *Metarhizium anisopliae* blastosporas. *Mycol Res.* 2004; 108(11):1337-1345.
24. Rangel DE, Alston DG, Roberts DW. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol Res.* 2008;112(11):1355-1361.
25. Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res.* 2008;112(11):1362-1372.
26. Jenkins NE, Heviefó G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol. News Info.* 1998;19(1):21N-31N.

27. Desphande M, Chandele A, Nahar P, Hadapad A, Patil G, Ghormade V. Entomopathogenic fungi: Mycoinsecticides useful against lepidopteran pests in pulses. *Bull OILB/SROP*. 2003;26(1):27-30.
28. Kao SS. Current Status of Bio-Pesticides Development, Farmer's Acceptance and Utilization, and Future Perspective in Taiwan. 2008. (En línea). Disponible en: http://kmintra.coa.gov.tw/coa/InternetDownloadFileServlet?file_id=124228&actor_info_id=0. (Consultado: 15 jul 2009).
29. Wraight SP, Jackson MA, Kock SL. Production, Stabilization and Formulation of fungal Biocontrol Agents. En: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, London, 2001. p. 253-287.
30. Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res*. 2007;111(2):240-249.
31. Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 2005; 40(3/4):1037-1043.
32. Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*. 2005; 40(3/4):1425-1431.
33. SAS Institute. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, N.C. 2004.
34. Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J. Microbiol Biotechnol*. 2003;19(4):363-368.
35. Jaronski ST, Jackson MA. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Sci Technol*. 2008;18(8):849-863.
36. Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Vega F, Mercadier G, et al. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 2002; 154(3):27-138.
37. Leland JE, Mullins DE, Vaughan LJ, Warren HL. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Part 1: Comparison of cell wall characteristics and drying stability among three spore types. *Biocontrol Sci Technol*. 2005; 15(4):379-392.
38. Bhanu GV, Padmaja V, Siva RR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. *Bioresource Technol*. 2008;99(6):1530-1537.
39. El-Damir M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Biol Sci*. 2006;6(2):269-274.
40. Cherry AJ, Jenkins NE, Heviefio G, Bateman R, Lomer CJ. Operational and Economic Analysis of a West African Pilot-scale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Sci Technol*. 1999;9:35-51.
41. Van Driesche R, Hoddle S, Center T. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET), United States Department of Agricultura (USDA). 2007; p. 431-442.

(Recibido 28-5-2010; Aceptado 14-10-2010)