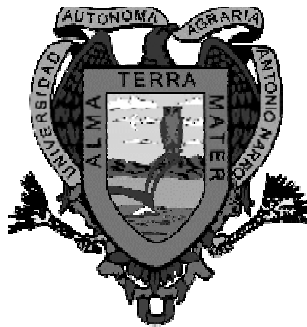


**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISION DE AGRONOMIA



DESARROLLO DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. EN MEDIOS LIQUIDOS PARA CONTROL DEL "PICUDO DE LA YEMA DEL MANZANO" DE ARTEAGA, COAHUILA. MÉXICO.

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

INGENIERO EN AGROBIOLOGIA

PRESENTA

CLAUDIA HUITRON ECHAVARRIA

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO.
NOVIEMBRE, 2003**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA

DESARROLLO DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. EN MEDIOS LIQUIDOS PARA CONTROL DEL "PICUDO DE LA YEMA DEL MANZANO" DE ARTEAGA, COAHUILA. MÉXICO.

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

INGENIERO EN AGROBIOLOGIA

PRESENTA

CLAUDIA HUITRON ECHAVARRIA

COMITE DE TESIS

Dr. Gabriel Gallegos Morales

PRESIDENTE

Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez

ASESOR

Dr. Melchor Cepeda Siller

ASESOR

Biol. Miguel Carranza Pérez

ASESOR

Coordinador de la División de Agronomía

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCIA

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO.

DEDICATORIA

A Dios agradezco primeramente por darme la salud y fuerza necesaria para poder concluir con mis estudios.

A mis padres:

Gracias por su apoyo incondicional así como su confianza que me han brindado durante todo este tiempo; los quiero mucho.

David Huitrón López
Ma. Diega Echavarría paredes

A mis hermanos:

David, Jorge, Silvia y Jesús por brindarme su ayuda y paciencia.

A mis amigos:

Aracely

Gracias por darme toda la fuerza necesaria por salir adelante ya que siempre estuvo apoyándome en los momentos más difíciles.

Juan

Por siempre estar presente cuando mas lo necesite y no solo eso gracias por brindarme su amistad. Eres una gran persona. Te admiro mucho.

Alfonso y Arturo

Gracias por brindarme su confianza y su amistad en todo este tiempo; son los mejores amigos. Los quiero mucho.

Angel

Gracias por ser una persona muy sencilla espero que nunca cambies.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por su amistad, confianza y sus consejos que siempre me brindo para la realización de mi tesis.

Al Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez por su paciencia y ayuda para mejorar mi trabajo de tesis.

Al MC. René P. Olayo Paredes por su apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de concluir mis estudios.

INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
INDICE.....	III
INDICE DE CUADROS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	4
Generalidades del Manzano.....	4
Origen del manzano.....	4
Importancia del cultivo a nivel nacional.....	4
Taxonomía del manzano.....	5
Descripción botánica del cultivo.....	5
Ciclo vegetativo del manzano.....	7
Plagas del manzano.....	8
El Picudo de la Yema del Manzano.....	10
Aspectos del picudo de la yema del manzano.....	10
Clasificación taxonómica.....	10
Descripción taxonómica del género Amphidees.....	11
Hábitos.....	12
Daños causados.....	12
Distribución.....	13
Control Biológico.....	14
Antecedentes del control microbiano.....	15
Hongos entomopatógenos.....	16

El futuro de los hongos entomopatógenos.....	17
Aspectos de <i>Beauveria bassiana</i>	18
Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	18
Características morfológicas.....	18
Modo de acción.....	20
Toxinas de <i>Beauveria bassiana</i>	22
Medios de cultivo para la producción de <i>Beauveria</i> . <i>Bassiana</i>	23
MATERIALES Y METODOS.....	25
Área de Estudio.....	25
Colecta.....	25
Aislamiento de la cepa.....	26
Identificación de <i>Beauveria bassiana</i>	27
Producción de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> . en diferentes medios líquidos.....	27
Conteo de blastosporas.....	28
Preparación de la solución madre y diluciones.....	29
Bioensayos.....	29
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
Respuesta de Mortalidad por Medio de Cultivo.....	32
Medio con harina de soya.....	32
Medio con harina de frijol.....	33
Medio con harina de haba.....	33
Medio con CDS.....	34
Comparación de Patogenicidad de Blastosporas de Diferentes Medios Líquidos.....	36
Respuesta Concentración – Mortalidad.....	36

CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA.....	41
APENDICE.....	47

INDICE DE CUADROS

		PAGINA
Cuadro 1.-	Concentraciones letals, límites fiduciales y proporción de eficiencia de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en cuatro medios líquidos sobre adulto de <i>Amphidees</i> spp. a 10 días de experimentación.....	37
Cuadro 2.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a tres días de post aplicación.....	47
Cuadro 3.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a tres días de post aplicación.....	47
Cuadro 4.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de frijol a tres días de post aplicación.....	48
Cuadro 5.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido de CDS a tres días de post aplicación.....	48
Cuadro 6.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a seis días de post aplicación.....	49
Cuadro 7.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a seis días de post aplicación.....	49

Cuadro 8.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a seis días de post aplicación.....	50
Cuadro 9.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a seis días de post aplicación.....	50
Cuadro 10.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a diez días de post aplicación.....	51
Cuadro 11.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a diez días de post aplicación.....	51
Cuadro 12.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a diez días de post aplicación.....	52
Cuadro 13.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a diez días de post aplicación.....	52
Cuadro 14.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a quince días de post aplicación.....	53
Cuadro 15.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a quince días de post aplicación.....	53

Cuadro 16.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a quince días de post aplicación.....	54
Cuadro 17.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a quince días de post aplicación.....	54
Cuadro 18.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a diecisiete días de post aplicación.....	55
Cuadro 19.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a diecisiete días de post aplicación.....	55
Cuadro 20.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a diecisiete días de post aplicación.....	56
Cuadro 21.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a diecisiete días de post aplicación.....	56
Cuadro 22.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a veinte días de post aplicación.....	57
Cuadro 23.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a veinte días de post aplicación.....	57

Cuadro 24.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a veinte días de post aplicación.....	58
Cuadro 25.-	Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de <i>Amphidees</i> spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a veinte días de post aplicación.....	58
Cuadro 26.-	Comparación de medias de mortalidad de adultos de <i>Amphidees</i> spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a diferentes días.....	59
Cuadro 27.-	Comparación de medias de mortalidad de adultos de <i>Amphidees</i> spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a diferentes días.....	59
Cuadro 28.-	Comparación de medias de mortalidad de adultos de <i>Amphidees</i> spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a diferentes días.....	60
Cuadro 29.-	Comparación de medias de mortalidad de adultos de <i>Amphidees</i> spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a diferentes días.....	60

INDICE DE FIGURAS

		PAGINA
Figura 1 .-	Desarrollo fenológico del manzano para la Sierra de Arteaga, Coahuila (Cepeda y Hernández, 1983).....	7
Figura 2 .-	Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> (Vuill.), tomada de Barnett y Hunter (1998).....	19
Figura 3 .-	Ciclo de infección de <i>Beauveria bassiana</i> (Vuill), según Casamayor, 1998.....	22
Figura 4 .-	Infección de <i>Beauveria bassiana</i> , en el picudo de la yema del manzano.....	26
Figura 5 .-	Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> , según las claves de Barnett y Hunter (1998).....	27
Figura 6 .-	Cepa de <i>Beauveria bassiana</i> SAA-1 (Bals) Vuill.....	31
Figura 7 .-	Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de <i>Amphidees</i> spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de soya	32
Figura 8 .-	Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de <i>Amphidees</i> spp. a diferentes concentraciones de p blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de frijol	33
Figura 9 .-	Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de <i>Amphidees</i> spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de haba	34

Figura 10.-	Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de <i>Amphidees</i> spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con Caldo Dextrosa Saboraud	35
Figura 11.-	Comparación de la patogenicidad de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. sobre adultos de <i>Amphidees</i> spp, cultivadas en diferentes medios líquidos	36
Figura 12.-	Líneas de respuesta concentración - mortalidad de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. cultivadas en diferentes medios líquidos a 10 días de ensayo sobre adultos de <i>Amphidees</i> spp.....	38
Figura 13.-	CL ₅₀ y límites fiduciales de blastosporas de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. propagadas en cuatro medios de cultivo líquidos sobre adultos de <i>Amphidees</i> spp.....	38

INTRODUCCION

El manzano *Pyrus malus* L., es un frutal caducifolio. Se cree que como fruta "moderna", se originó en el Suroeste de Asia, de donde una mezcla de especies nativas de género *Malus* pudo dar fruto de tamaño y calidad atractivos para el hombre. En informes recientes se especula que ni los romanos ni los griegos fueron pueblos que hayan desarrollado dicho fruto. Se piensa que ambos pueblos adquirieron, por herencia, los conocimientos sobre el manzano de otros pobladores desconocidos hasta ahora. Los primeros pasos en la proliferación de este frutal pudieron iniciarse en el Medio Este o Sureste de Europa por la tecnología utilizada por los griegos y romanos (Ramírez y Cepeda, 1993).

En nuestro país, el cultivo del manzano se ha propagado principalmente en las regiones de climas templado y frío de la República Mexicana donde destacan los estados de Chihuahua, Puebla, Durango, Coahuila, Sonora y Zacatecas (Cepeda y Hernández, 1986). Específicamente el estado de Coahuila ocupa el tercer lugar a nivel nacional con 8,282 Ha y el octavo en rendimiento con 9 Ton, ocupando la Sierra de Arteaga el 14 % del área total sembrada en México. (INEGI, 2001). En el estado de Coahuila el manzano proporciona una gran fuente de trabajo para la zona rural; además de abastecer de fruta a los mercados nacionales principalmente del Distrito Federal, Guadalajara, Tampico, Monterrey y Saltillo (Guerrero, 1991).

Una limitación para la producción de este frutal la constituyen las plagas, siendo en la actualidad un fuerte problema el picudo de la yema del manzano constituida por varias especies de *Amphidees*. Este insecto se caracteriza por producir un anillamiento en las yemas florales y vegetativas las cuales se secan y mueren, lo que ocasiona la

pérdida de por lo menos un fruto por yema floral afectada (Villalobos, 1992).

Para el control del picudo se ha recurrido al uso irracional de insecticidas exclusivamente; sin embargo, no se ha encontrado un control eficiente mediante el uso de los insecticidas que se encuentran en el mercado. Por lo que se convierte en un problema serio para los productores de manzana de la región.

Afortunadamente existen otras opciones para el control de insectos plaga, como es el uso de hongos entomopatógenos, estudios realizados en otros estados y con otros insectos indican que los hongos tienen mayor futuro, ya que, por contacto, infectan al insecto y penetran a través de la epidermis, por lo que el insecto muere días después (Lezama, 1991, Citado por Alfaro, 1995).

En México actualmente se realizan trabajos orientados hacia la búsqueda de cepas de hongos entomopatógenos con actividades tóxicas para insectos plaga (Hernández 1997), así como la búsqueda de procesos biotecnológicos que permitan obtener mayor rendimiento de agentes infectivos (esporas, blastosporas y micelio) en menor tiempo y a menor costo, comparado con la producción de esporas en medio de cultivos sólidos. Esta situación plantea la necesidad de buscar mejores métodos de producción de hongos en medio de cultivo líquido.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo:

Evaluar la eficiencia de las blastosporas de *Beauveria bassiana* en medios de cultivo líquidos con diferentes fuentes de proteínas en adultos de *Amphidees* spp.

Determinar la CL_{50} Y CL_{95} de las blastosporas *Beauveria bassiana* producidas en cada medio de cultivo líquido en adultos de *Amphidees* spp.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del Manzano

Origen del manzano

Se desconoce el origen exacto del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos.

Según Ponomarenko es *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem., una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media, podría ser esta especie de la que se habrían originado, hace 15,000-20,000 años, los primeros cultivares de manzano.

El manzano fue introducido en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península; La propagación de esta especie durante esa época fue por semilla, dada su facilidad de transporte (Infoagro, 2003).

Importancia del cultivo a nivel nacional

El manzano es uno de los frutales de mayor importancia económica en las regiones de clima templado y frío de México. Ocupando una superficie de 66,738 ha, de los cuales el 83%, de la producción se encuentra reportada en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango y Puebla (INEGI, 1998). México pasó del décimo lugar en producción a ocupar el vigésimo segundo lugar a nivel mundial con una producción de 457,889 Ton. (FAO, 2001). En el estado de Coahuila el manzano proporciona una gran fuente de trabajo para la zona rural; además de abastecer de fruta a los mercados nacionales principalmente del Distrito Federal, Guadalajara, Tampico, Monterrey y Saltillo. (Guerrero, 1991).

Taxonomía del manzano

Sinnot y Wilson (1975), ubican al manzano dentro de la siguiente clasificación:

Reino-----Vegetal
 División-----Traqueofitas
 Subdivisión----- Pteropsidas
 Clase----- Angiospermas
 Subclase-----Dicotiledoneas
 Orden-----Rosales
 Familia-----Rosaceas
 Género-----*Pyrus*
 Especie-----*malus* L

Descripción botánica del cultivo

El manzano es un árbol de tercera dimensión, con una altura de 6 a 10 m, presentando una copa globosa, con ramas largas y flexibles que presentan buena fructificación (Infoagro, 2003).

Sistema radicular.- La raíz del manzano es típica, rastrera, ramificada, con derivaciones secundarias extendidas y una masa de raicillas que, en conjunto, forman la cabellera, poseen cofia y pelos absorbentes que alcanzan una longitud vertical de 1.5 a 2m y una longitud horizontal de 3 a 6m (Ramírez y Cepeda, 1993).

Tallo.- Es un órgano que se desarrolla a partir del embrión de la semilla, inicialmente tiene forma herbácea lo cual pierde al lignificarse y constituirse en un tronco (Calderón, 1977).

Hojas.- Son ovales, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandos, por el envés se presentan de color verde claro con pubescencias ramificadas que se enredan, mientras que por el haz se presenta un color verde oscura; están formadas por pecíolo y el limbo (Tamaro, 1974).

Flores.- Son de tipo pentámero, con estambres insertados en la parte alta del pistilo, ovario con cinco alvéolos con dos óvulos en cada uno de ellos, grandes, casi sentadas o cortamente pedunculadas, hermafroditas de color blanco o rosa pálido y en número de tres a seis unidades en corimbo (Tamaro, 1974).

Floración.- Tiene lugar en primavera, generalmente por abril o mayo, las manzanas más precoces maduran en junio, aunque existen razas que mantienen el fruto durante la mayor parte del invierno e incluso se llegan a recoger en marzo o abril (Infoagro, 2003).

Fruto.- Es una denominada carnosa tipo pomo, fruto completo procedente de un ovario sincarpico, la parte carnosa la constituye el tálamo desarrollado grandemente (Thomas-Domerech, 1975). El fruto presenta un pseudofruto, pues el mesocarpo está formado del receptáculo, donde la manzana, alojan los carpelos apergaminados formando celdas (Kramer, 1982).

Semillas.- Es un óvulo que ha alcanzado su maduración conteniendo dos partes esenciales; una externa, constituida por tegumentos y la interna llamada almendra que forma su mayor parte. Las semillas son pequeñas aplanadas con testa de color café, contenidas en los carpelos (Ruiz, 1979).

Embrión.- Se encuentra en la radícula, el talluelo y dos cotiledones, siendo aprovechados como reservas nutritivas (Calderón, 1977).

Ciclo vegetativo del manzano

El ciclo vegetativo del manzano (Figura 1), comienza con la caída de las hojas a mediados de octubre hasta el 15 de noviembre, siendo este el período invernal del árbol que se prolonga hasta febrero; continúa después el desborre en marzo cuando se manifiesta la renovación de la actividad vegetativa, al principio de abril y la floración y aparición de las primeras hojas del cuajo o amarre del fruto a finales del mismo mes. Posteriormente de mayo a septiembre empieza el período de máxima vegetación en el que tiene lugar el desarrollo de las hojas y los frutos, así como la acumulación de reservas nutritivas para el siguiente ciclo; la cosecha se inicia a finales de agosto y se alarga en algunas regiones hasta finales de septiembre; después el árbol se prepara para la caída de hojas nuevamente (Ramírez -Cepeda, 1993).

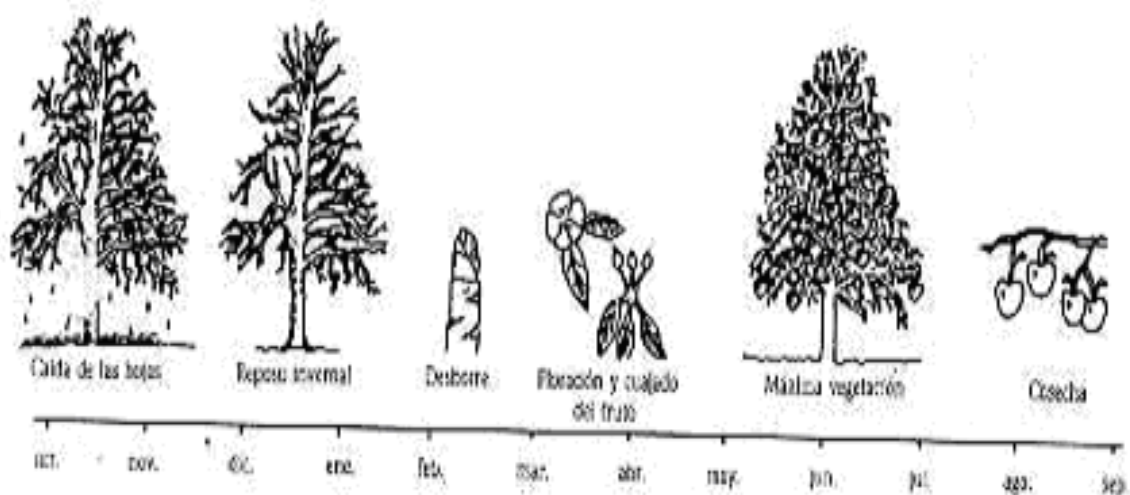


Figura 1.- Desarrollo fenológico del manzano para la Sierra de Arteaga, Coahuila (Cepeda y Hernández, 1983).

Plagas del manzano

Metcalf y Flint (1981), señalaron la importancia de las plagas al considerarlas como un factor limitante para la producción de manzana. Siendo este un problema para los productores así como a las personas que se proveen de estas fuentes de empleo, por lo cual surge la necesidad de conocer más acerca de su comportamiento y biología para poder tener buenos resultados en cuanto a su control.

De acuerdo a los catálogos publicados por Sanidad Vegetal, se reportan para el cultivo del manzano las principales plagas de insectos (Sánchez, 1991; Hernández, 1997).

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
Pulgón lanigero	<i>Eriosoma lanigerum</i> (Asuman)
Palomilla del manzano	<i>Cydia pomonella</i> (Linneo)
Frailecillo	<i>Macrodatylus infuscatus</i> Bates <i>M. variipes</i> Bates <i>M. nigriipes</i> Bates
Mosca de la fruta	<i>Anastrepha ludens</i> (Loew) <i>A .serpentina</i> (Wied) <i>Rhagoletis pomonella</i> (Wlas)
Pulgón verde	<i>Aphis</i> sp
Trips	<i>Frankliniella insulari</i> (Franklin)
Pulgón del manzano	<i>Aphis pomi</i> De Geer
Chicharrita	<i>Empoasca maligana</i> (Cher)
Barrenador	<i>Cyllene erythroa</i> (Cher)
Escama San José	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Com
Araña roja	<i>Panonychus ulmi</i> (Koch)
Picudo de la yema	<i>Amphidees latifrons</i> Sharp * <i>Amphidees macer</i> Sharp <i>Amphidees</i> sp.

* Estos insectos plaga citados por Sánchez (1991), Perales (1992), Domínguez (1995) y Calderón (1995).

El Picudo de la Yema del Manzano

Aspectos del picudo de la yema del manzano

El picudo de la yema del manzano ha sido citado con diferentes nombres técnicos, así Sánchez (1991), cita dos especies como *Amphidees macer* Sharp y *Amphidees major* Sharp. Posteriormente Perales (1992), Domínguez (1995) y Mendoza (1995), lo cita con el nombre de *Anametis granulatus* (Say), sin embargo Calderón (1999) en un estudio taxonómico sobre los picudos presentes en la Sierra de Arteaga reporta géneros ya citados, señala que el reporte para *Anametis* corresponde a *Amphidees* sin señalar especies. Sin embargo actualmente se conoce que es un complejo de tres especies del género *Amphidees* las que están presentes en el cultivo del manzano en la regio de Arteaga, Coahuila que son; *A. latifrons*, *A. macer* y *Amphidees* sp. (Lezcano, 2000).

Clasificación taxonómica

Blatchley y Leng (1996), Borrór *et al.* (1989); ubican a estos insectos dentro de la siguiente clasificación:

Reino-----Animal
 Clase-----Hexapoda
 Orden-----Coleoptera
 Suborden-----Polyphaga
 Superfamilia-----Curculionidea (Rynchophora)
 Familia-----Curculionidae
 Subfamilia----- Otorhynchinae (Brachyrhininae)
 Genero-----*Amphidees*
 Especies-----*latifrons*
 macer
 sp.

Descripción taxonómica del género *Amphidees*

Blatchley y Leng (1996). Describen taxonómicamente al género *Amphidees* de la siguiente manera:

Rostro.- Tan largo, o un poco mas largo que la cabeza, ensanchado en el ápice, con impresiones, o sin ellas; poco notorias, con orificio interocular. Placa rostral (Epistoma) muy pequeña.

Escrobas antenales.- Moderadamente hondas en la parte inferior, evanescentes en las partes posteriores, curvas y dirigidas hacia el borde ventral. Antenas casi delgadas, poco, poco engrosados en el ápice o pasa al ojo. Funículo antenal con los dos primeros artejos alargados más grandes que los demás, el tercero y cuarto más largos que anchos, quinto y sexto redondeados y séptimo engrosado hacia el ápice. Maza oval alargada y acuminada.

Ojos.- Redondeados, laterales pero cerca al borde dorsal, deprimidos o poco prominentes.

Cabeza.- Levemente convexa antes del rostro.

Protórax.- Casi mas largo que ancho, con los lados poco redondeados, borde anterior angosto, el borde dorsal recto; el borde apical casí recto, poco curvo, lado dorsal convexo, con ponteados , o granulados finos. Escudete: triangular, pequeño.

Elitros.- Oval alargados, no se ensanchan en la base, pero si inmediatamente después, son más largos que el protórax; el borde basal levemente escotado, casi recto. Lados levemente ensanchados, ápice acuminado; estrías con punteada leve, o bien marcado a veces con una seda en cada puntura. Interestrías planas, o poco convexas,

pueden ser anchas con punteado y sedas finas decumbentes, o casi erectas.

Lado ventral.- Primero sutura abdominal recta, o ligeramente curva; el primero de casi la mitad de la suma del segundo y el tercero.

Patas.- Fémures claviformes. Tibias redondeadas, rectas, mucronadas, pueden ser algo cavernosas.

Hábitos

Los picudos de la yema tienen hábitos nocturnos, su alimentación la realizan durante la noche, con el propósito de protegerse de los rayos del sol y a primeras horas del día estos comienzan a descender de los árboles ocupando el suelo como refugio, escondiéndose bajo los terrones, maleza, piedras ranuras de los árboles y bandas de cartón. Cuando hay exceso de agua por efecto de la lluvia, tienden a subir al árbol manteniéndose en el envés de las hojas y grietas o bandas de cartón evitando así la luz directa donde no llegan los rayos del sol (Perales, 1992; Mendoza, 1995 y Ávila, 1998).

Daños causados

Los picudos de la yema del manzano pueden causar daños en dos etapas fenológicas: la primera etapa la realizan durante el mes de mayo a septiembre cuando el árbol tiene mayor follaje, aquí los picudos se alimentan de las hojas, observándose mordeduras en forma de "U" (Quechulpa, 1998).

El segundo daño y considerado el principal, se da cuando el árbol, comienza a quedar sin follaje, a partir de octubre a abril, en este período es cuando el árbol presenta yemas florales y vegetativas ,

durante estas fechas el picudo ocasiona un anillamiento de las yemas, rompiendo los haces de conducción de nutrientes y por consecuencia cada yema se seca y causen la pérdida de por lo menos un fruto por yema afectada Mendoza (1995) y Ocaña (1996); en caso de las yemas vegetativas afecta la formación de ramas terciarias y daña en su parte juvenil la correcta formación del árbol (Sánchez, 1992).

Distribución

Los picudo de la yema se encuentra ampliamente distribuido en los cañones de la Carbonera, el Tunal, Los Lirios, Jamé y San Antonio de las Alazanas, encontrando que este picudo se encuentra distribuido en toda la Sierra de Arteaga, y que en estos cañones, de julio a septiembre, en Jamé y la Carbonera presentaron una baja incidencia poblacional de *A. latifrons*, mientras que en los Lirios y el Tunal, la densidad del picudo fue alta, presentando una densidad intermedia en San Antonio (Ocaña, 1996).

Control Biológico

Infoagro (2003), señala que el control biológico se define como una actividad en la que se manipulan una serie de enemigos naturales, también llamados parásitos, con el objetivo de reducir o incluso llegar a combatir por completo a parásitos (plaga) que afecten a una plantación determinada, siendo estos microorganismos inofensivos; el método de control biológico puede ser muy eficaz, hay que considerar algunos puntos en la utilización de enemigos naturales en la plantación:

1. Se debe identificar bien el parásito (plaga) que afecta al cultivo.
2. Identificación del enemigo natural.
3. Estimación de la población del parásito.
4. Estimación de la población del enemigo natural.
5. Comprar correctamente a los enemigos naturales.
6. Supervisar correctamente la eficacia de estos enemigos.

Dentro de este concepto se encuentra el control microbiano, el cual se define como una fase del control biológico en la cual el hombre hace uso de organismos entomopatógenos, tales como virus, algas, bacterias, micoplasmas o *rickettsias*, protozoarios, hongos y organismos emparentados aun derivados de la ingeniería genética (Garza, 1997).

Lecont en 1873 presentó la primera recomendación bien definidas apoyando el uso de enfermedades como medio de control de insectos (Estrada, 1986).

Aunque los insectos microbiales comprenden menos del 1% del total de los insecticidas en el mercado, este tipo de control ha ganado importancia, ya que su crecimiento ha sido muy rápida (10- 15 % /año) comparándolo con los insecticidas químicos (1-2 %/año) (Starnes *et al.*, 1993).

Dentro de los grupos de patógenos que existen para control microbioal se ha dicho que los hongos son los de mayor futuro; ya que a diferencia de los virus y bacterias no necesitan ser ingeridos por los insectos para ser efectivos, sino que matan al hospedero atacándolo tan sólo por contacto (Estrada, 1986).

El control microbioal se ha fortalecido por el desarrollo de la investigación de instituciones de enseñanza y transferencia de tecnología de instituciones oficiales, en la actualidad presenta acciones de combate de plagas de importancia económica como es el caso de la broca de cafeto *Hipotenemus hampei*, mosca blanca de alas nebulosas en cítricos *Dialeurodes citrifolii*, mosca blanca de las hortalizas *Bemisia tabaci*, mosca pinta o salivazo en caña de azúcar *Aeneolamia postica* y plagas del suelo *Phyllophaga* spp, la implementación de estos organismos son en base al uso de aislamientos virulentos de los hongos de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Garza, 1996).

Antecedentes del control microbioal

Los primeros trabajos sobre hongos entomopatógenos son acreditados en 1835 cuando Agostino Bassi demostró por vez primera que una enfermedad de insecto era ocasionada por un hongo, que resultó ser *B. bassiana*, al confirmar en forma experimental que la enfermedad denominada muscardina blanca del gusano de seda, (*Bombix mori*), era ocasionada por un parásito vegetal (Hongo). Posteriormente el potencial entomopatógeno de los hongos producidos masivamente para el control de plagas se inició con los estudios del ruso Metchnikoff quien utiliza *M. anisopliae* para el control de poblaciones de *Anisoplia austriaca* (Herbst) y Krassiltchick en 1888, quién continúa las investigaciones. Posteriormente *B. bassiana* fue utilizado con éxito en Kansas en 1890 para el control de *Blissus*

leucopterus (Say) donde adquirió un gran interés para ser usado durante los dos años posteriores, en los cuales lograron reducir drásticamente las poblaciones de la plaga. (Berlanga y Hernández, 1997).

Hongos entomopatógenos

Los microorganismos constituyen medios biológicos que han demostrado ser una alternativa valiosa para resolver los distintos problemas de plagas que se presentan en la agricultura (Valenzuela, 1987; Roberts, 1989; McCoy, 1990; Taborsky, 1992; Tanada y Kaya, 1993), a la vez que resultan inocuos al medio ambiente, el hombre y los animales (Taborsky, 1992; Goettel y Johnson, 1992, Tanada y Kaya, (1993). Estas particularidades hacen de los entomopatógenos una de las líneas principales de investigación en la lucha contra los insectos (Primo Yufera, 1991).

Los hongos entomopatógenos muestran gran potencial para su desarrollo comercial como agentes de control de plagas (Roberts, 1989; Tanada y Kaya, 1993).

De acuerdo a Lezama (1992), las propiedades de los hongos entomopatógenos que los hacen interesantes como una alternativa más de uso en el control de plagas son:

1. Su alto poder patogénico.
2. La conservación de la virulencia en la preparación, antes de su aplicación y después de un período de almacenaje.
3. La especificidad que presentan (definida como la adaptación recíproca entre el entomopatógeno y su hospedante, en relación con las condiciones del medio en el cual se encuentran).
4. Sus posibilidades de multiplicación y conservación en condiciones económicamente rentables.

5. Su gran poder de persistencia.
6. Su inocuidad para insectos parasitoides, depredadores, peces y vertebrados.

El futuro de los hongos entomopatógenos

Garza (1997) señala que el desarrollo de las investigaciones a nivel mundial y en México sobre agentes de control microbiano se han incrementado notablemente, esto gracias a las ventajas que tienen los microorganismos sobre las moléculas quimiosintéticas, tales como:

1. No contaminan al ambiente
2. No representan un peligro a insectos benéfico, aves y mamíferos incluido al hombre.
3. No generan resistencia
4. No dejan presencia de residuos tóxicos en los alimentos, por lo que las cosechas pueden realizarse sin ningún cuidado.

Aspectos de *Beauveria bassiana*

Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Según Barnett y Hunter, (1972), la clasificación de *Beauveria bassiana* es la siguiente:

Reino-----Mycetae
 División-----Amastigomycota
 Subdivisión-----Deuteromycotina
 Clase-----Deuteromycetes
 Orden-----Moniliales
 Familia-----Monilliaceae
 Género-----*Beauveria*
 Especie-----*bassiana*

Características morfológicas

El género *B. bassiana* es un entomopatógeno imperfecto y sus hifas son septadas (Tanada y Kava 1993).

La apariencia de *B. bassiana* es blanca algodonosa o amarilla cremosa con aspecto polvoroso. Al ramificarse, el micelio forma las estructuras llamadas conidióforos que son simples e irregulares terminando en vértices en forma de racimos. La base de la célula es globosa o abultada con un adelgazamiento en el área de inserción de los conidios, de 2 a 3 μ o 2 a 2.5 μ , con esterigmas curvados en forma irregular o dispuestos en forma de zigzag (Berlanga y Hernández 1999).

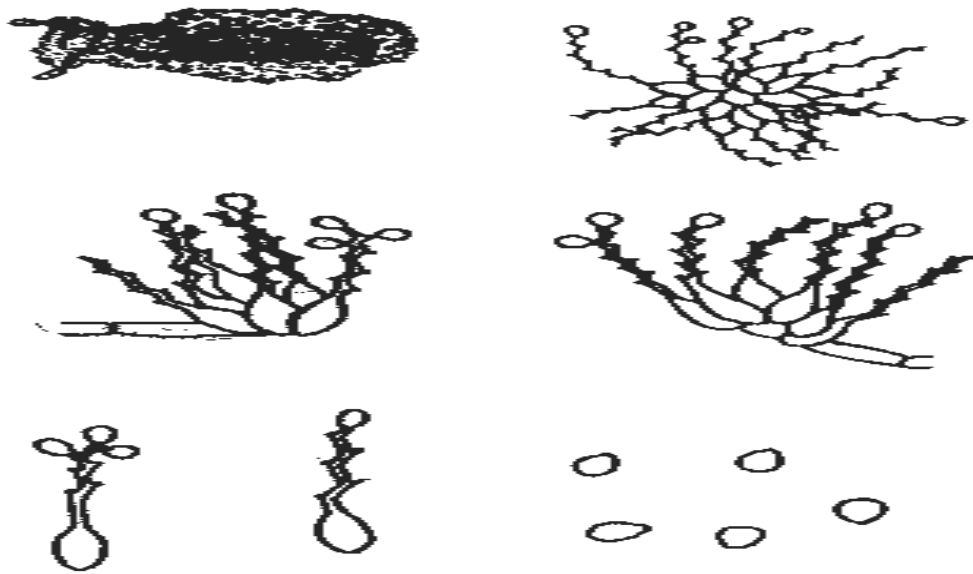


Figura 2.- Características morfológicas de *Beauveria bassiana* (Vuill.), tomada de Barnett y Hunter (1998).

Las condiciones óptimas para su desarrollo son: temperatura de 25 a 30 °C y humedad relativa superior a 90%. Generalmente, el hongo se introduce al insecto mediante penetración del integumento con ayuda del tubo germinativo, con ayuda de actividad mecánica-enzimática la que se realiza en dos días. Durante la penetración la quitina es disuelta o parcialmente digerida mediante acción de varias enzimas como lipasas y proteasas. El hongo al crecer produce toxinas como la Beauverisin. Cuarenta y ocho horas posteriores a la invasión, los cuerpos hifales del hongo circulan por la hemolinfa del insecto. A los 12-15 días, una colonia de *B. bassiana* en cultivo puro presenta una esporulación abundante y cremosa. Para esporular, el hongo emerge a través de sus costados y por la región bucal, cubriendo casi todo el cuerpo (Méndez, 1990; de la Rosa, 1993).

Modo de acción

A diferencia de bacterias y virus, los hongos pueden infectar insectos no sólo a través del intestino, sino también por espiráculos y particularmente en forma directa por penetración del integumento; esta propiedad le ofrece la posibilidad de infectar huéspedes independientemente de los hábitos alimenticios del insecto (Ferron, 1977).

En general, el desarrollo de *B. bassiana* sobre insectos se muestra en la Figura 3 y puede ser dividido en varias etapas de acuerdo a Roberts y Humber (1981), las que se describen a continuación:

- a) Contacto de la conidia con la cutícula del insecto.-** La conidia de los hongos entomopatógenos aparentemente está adaptada, para adherirse a los artrópodos aunque depende de sus características físicas y químicas, así como de la superficie de la cutícula, que en ocasiones son las responsables de que el hongo no se establezca en el artrópodo.
- b) Germinación de la conidia en la cutícula del artrópodo.-** En general la humedad relativa requerida para la germinación de la conidia es alta (mayor del 90%), aunque el microambiente del follaje, particularmente en períodos de rocío, con frecuencia proporcionan las condiciones propicias para la germinación, aún en climas secos.
- c) Penetración en la cutícula.-** En la invasión cuticular se involucran las actividades enzimáticas y físicas. El tubo germinativo puede penetrar directamente hacia el interior de la cutícula por medio de un apresorio. Provocando el crecimiento del hongo en el homocelo; produciendo cuerpos hifales que son

parecidas a levaduras, eventualmente se desarrollan en gran proporción en el cuerpo del artrópodo.

- d) La producción de toxinas.-** Muchos hongos entomopatógenos se encuentran infectando a su hospedero, y segregando toxinas cuando el insecto muere antes de que la invasión sea extensiva, se presume que las toxinas son las responsables de su muerte, al ser distribuidas en el homocelo del artrópodo.
- e) Muerte del hospedero.-** Esta es precedida por cambios en la conducta del hospedero, por ejemplo: vibraciones semejantes a temblores, pérdida de la coordinación, en ocasiones los hospederos infectados trepan a lugares altos, cesan de alimentarse, etc.
- f) Crecimiento de la fase micelial al ser invadidos todos los órganos del hospedero.-** A causa del remplazamiento en el interior del insecto de micelio por los órganos, el artrópodo inmediatamente después de que muere su apariencia es casi normal, excepto por pequeños puntos mecanizados en los sitios de infección; sin embargo, en algunos casos su coloración es rojiza como en *B. bassiana*, detectada en el hospedero.
- g) Salida de las hifas al exterior del insecto a través de la cutícula.-** Producción de las unidades infectivas (conidias) en el exterior del hospedero (condiciones de alta humedad). El último paso del proceso es la dispersión de las conidias hacia otros lugares, donde probablemente encuentren insectos susceptibles para el inicio de nuevos casos de enfermedad.

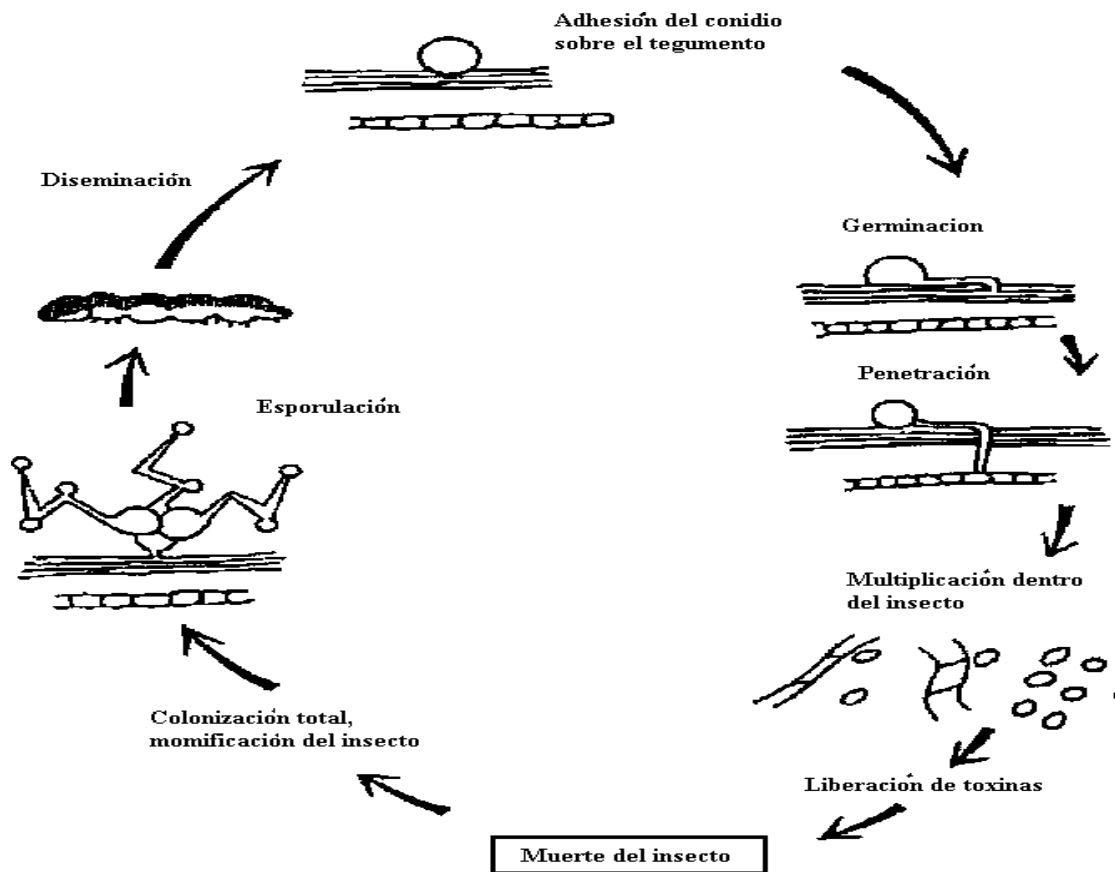


Figura 3.- Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* (Vuill), según Casamayor, 1998.

Toxinas de *Beauveria bassiana*

B. bassiana, producen toxinas las cuales erosionan el granuloma y permiten a las blastosporas invadir el homocelo, la fagocitosis también ha sido observada como reacción defensiva del huésped; los cuerpos hifales proliferan solamente después de la muerte del huésped, así el papel de las toxinas entomógenas es de particular importancia en el proceso de infección (Ferron 1981). Las toxinas aisladas de *Beauveria* son beauverisin, beauverolides, bassianolides, ácido oxálico y los pigmentos tenellin y bassianin (Roberts, 1981).

Medios de cultivo para la producción de *Beauveria bassiana*

Todos los medios de cultivos utilizados en micología han de contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.). El pH ha de ser ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

Se añadirán antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras. Los más usados son el Cloranfenicol y la Gentamicina. Se añade también actidiona (Cicloheximida) que inhibe el crecimiento de hongos saprofitos ambientales.

Generalmente utilizamos varios medios de cultivo diferentes, ya sea en placa o en tubo.

Los medios en placa tienen la ventaja de ofrecer una gran superficie para el aislamiento pero, para soportar la deshidratación durante el largo período de incubación a que van a ser sometidos (un mes o más), ha de contener una gruesa capa de medio (25 a 40 ml). Son más peligrosos a la hora de su manipulación y fáciles de contaminar. Por el contrario, los medios de cultivo en tubo tienen una superficie de trabajo mucho más pequeña, pero ofrece máxima seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación (Danival, 2003).

Medios para el aislamiento y propagación de *Beauveria bassiana*:

La especie de *Beauveria bassiana* se desarrolla en medios sólidos como papa dextrosa agar (PDA), Caldo Dextrosa Saboraud (CDS),

arroz, trigo, y medios líquidos ricos en carbono y nitrógeno, (De la Rosa y López, 1998).

Se han reportado también la producción a gran escala de *B. bassiana* en medios sólidos utilizando como soporte substratos de origen vegetal como fuente de soporte para el crecimiento, por mencionar el arroz, trigo, salvado entre otros cereales. En el caso del salvado la producción se haría en bolsas de celofán esterilizadas, es un método simple y barato (Goettel 1984).

MATERIALES Y METODOS

Area de Estudio

El presente trabajo de investigación se llevo acabo en el mes de septiembre del 2002, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el Departamento de Parasitología; con la propagación del hongo *Beauveria bassiana* en diferentes medios líquidos y bajo condiciones controladas.

El material utilizado fue una cepa de *Beauveria bassiana* (SAA-1) recuperada del picudo de la yema del manzano (Olayo, 2003) en el medio de cultivo Papa Dextrosa Saboraud (PDA).

Colecta

La colecta de adultos de picudos de la yema del manzano se llevo acabo en el ejido de San Antonio de las Alazanas, en la huerta el Conejo, cuyas coordenadas son las siguientes: latitud 25° 16' 17", longitud 100° 34' 39" y una altitud de 2200msnm. Ubicado en el complejo montañoso de la Sierra de Arteaga, al Sureste del estado de Coahuila; formando parte de la Sierra de Madre Oriental.

Se tomaron al azar árboles, los cuales ya tenían colocados bandas de cartón corrugados de 15 cm de ancho por 50 cm de largo, sujetos por alambres a una altura de 20 a 30 cm del suelo con el fin de capturarlos, ya que los picudos las utilizan como refugio- trampa durante el día.

Los insectos capturados se colocaron en un recipiente de plástico de 18 litros de capacidad; donde se les proporciono yemas y hojas del manzano como alimento.

Estos insectos desarrollan su mayor actividad en la noche, por lo cual durante el día se ocultan en los diferentes refugios naturales de los árboles como corteza y suelo.

Aislamiento de la cepa

El aislamiento se llevo a cabo en el laboratorio en una cámara de flujo laminar, primeramente se hizo la preparación del medio sólido PDA (Papa Dextrosa Agar), el cual se vació en cajas Petri y se dejó solidificar. Al día siguiente se tomo con una asa el crecimiento fungico que se observa en el picudo del manzano (Figura 4) y se depositaron en forma directa en las placas que contenían el medio sólido, las placas fueron selladas con Kleen Pack y etiquetadas; después se colocaron en una incubadora a una temperatura de 27 ± 2 °C durante 7 días aproximadamente que es cuando el hongo alcanzó un crecimiento en la mayor parte de la caja Petri; se revisaron las cajas y se procede a realizar la purificación del micelio con el mismo medio y bajo las mismas condiciones; para posteriormente realizar las observaciones morfológicas del hongo para su identificación.



Figura 4.- Infección de *Beauveria bassiana*, en el "picudo de la yema del Manzano".

Identificación de *Beauveria bassiana*

Una vez llevada acabo la purificación se procedió a la identificación de *Beauveria bassiana*, esto se hizo con la ayuda de preparaciones semipermanentes con lactofenol en un portaobjetos donde se colocó el hongo, se observó al microscopio y se hizo la identificación de acuerdo con las características morfológicas (Figura 4), el crecimiento del micelio, la formación de los conidióforos en forma de botella y conidias que caracterizan este hongo según las claves de Barnett y Hunter (1998).



Figura 5.- Características morfológicas de *Beauveria bassiana*, según las claves de Barnett y Hunter (1998).

Producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* en diferentes medios líquidos

Una vez identificada la cepa se procedió a la preparación de los siguientes medios; 1) Harina de soya + extracto de malta + dextrosa, 2) Harina de Frijol + extracto de malta + dextrosa, 3) Harina de haba + extracto de malta + dextrosa y CDS. En matraces Erlenmeyer de 0.5 L se colocan 250 ml de cada uno de los medios antes mencionados, a cada

matraz se le puso un tapón de algodón, después se esterilizan los matraces con los distintos medio a 15 lbs. de presión por 15 min, se dejan enfriar por varias horas y se inoculan con el hongo. Estos matraces se pusieron en agitación constante a 150 rpm en un agitador rotatorio por un período de tres a cinco días; una vez transcurrido el tiempo se tomaron muestras de los diferentes medios para observar formación de blastosporas, esto con la ayuda de un microscopio.

El indicador de que existe una elevada masa micelial es el cambio de tonalidad blancuzca de los diferentes medios.

Conteo de blastosporas

Después de obtener el crecimiento en los diferentes medios se procedió a obtener el conteo; para hacer la suspensión de blastosporas se agregaron 5 ml de agua destilada en un vaso de precipitado mas 5 ml de muestra con el crecimiento de blastosporas y dos gotas del dispersante tween 20; agitándolo durante unos segundos. Después se tomar una gota con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro del hemacitómetro, para enseguida colocar un cubreobjeto cuidando que no quedaran burbujas y que la gota no se derrame ni se salga de los campos de conteo.

El hemacitómetro consta de dos campos de conteo; en cada campo se tienen nueve cuadros, que a su vez esta dividido en cuadros mas pequeños. Tanto los cuadros grandes como los pequeños tienen dimensiones conocidas, de tal modo que se pueden obtener el número de blastosporas por ml, lo más conveniente es contar en los cuatro cuadros de la esquina (A, B, C, D) más el cuadro del centro (E). El conteo se realizara por lo menos 6 veces y se sacara un promedio.

Con los datos obtenidos se reporta el valor de la media ; este se multiplica por 25 (que son los cuadrantes totales de la cámara de hemacitómetro), por 5 (cantidad de agua destilada utilizada) y por 10,000 (que nos da la proporción de medida de la cámara : blastosporas/ ml).

De esa manera se obtuvo la concentración de blastosporas / ml, para cada medio evaluado para la cepa SAA-1.

Preparación de la solución madre y diluciones

Una vez realizado el conteo de las de las blastosporas se preparó la solución madre, para la cantidad de blastosporas producidas en cada uno de los medios con base a la formula $C_1 V_1 = C_2 V_2$; para las blastosporas producidas en medio con harina de soya se ajusto a la concentración 1×10^6 ; para el caso de la harina de frijol, haba y CDS la concentración fue de 1×10^7 .

Bioensayos

Una vez realizadas las diluciones se procedió a realizar los bioensayos por inmersión; para ello en cinco vasos precipitados se colocaron las diferentes concentraciones de mayor a menor dependiendo del medio utilizado; los bioensayos consistieron en preparar cajas Petri con papel filtro circular humedecido y comida (yemas del manzano) para colocar 10 picudos, antes fueron puestos en una tela de tul para su mejor manejo al momento de sumergirlos en las diferentes soluciones durante 20 segundos y así estar seguros de un mejor contacto con el hongo .

Se realizaron cinco repeticiones (unidades de observación) por concentración y por cada uno de los medios, teniendo en total 50 picudos por concentración mas un testigo absoluto (agua).

Las cajas Petri con los picudos ya tratados fueron etiquetadas cada una con sus concentraciones correspondientes. Las cajas se colocaron en una cámara bioclimática en condiciones de asepsia y con temperatura a 27 ± 2 °C, la toma de datos se realizó a; 3, 6, 10, 15, 17 y 20 días después de ser tratados. Se tomó como insectos muertos a causa del hongo, aquellos picudos que no presentaron ningún movimiento y con presencia algodonosa blancuzca característica del hongo a estudiar que se observó a partir del día 10.

Análisis estadístico

Para el análisis de los bioensayos se utilizó un programa Probit computarizado el cual nos permitió obtener la CL_{50} y CL_{95} para *Beauveria bassiana*; así como datos para graficar los resultados en papel Logaritmo – Probit.

En caso de mortalidad en el testigo la mortalidad se corrigió de acuerdo a la fórmula de Abbott (1925).

$$\% \text{ MC} = \frac{\% \text{ De mortalidad del tratamiento} - \% \text{ de mortalidad en el testigo}}{\text{Mortalidad en el testigo (100)}} \quad (100)$$

También los datos obtenidos se corrieron en un programa estadístico de la Universidad de Nuevo León, bajo un diseño completamente al azar para estimar la DMS (Diferencia Mínima Significativa).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se purificó una cepa de *B. bassiana* aislada e identificada por Olayo (2003) con clave de cepario SAA-1 (Figura 5).

Como ya se señaló este aislado fue inoculado en diferentes medios de cultivo líquido conteniendo por separado harina de soya, harina de frijol, harina de haba y Caldo Dextrosa Saboraud (CDS), para su crecimiento y producción de blastosporas.

El grado de virulencia de las blastosporas extraídas fue determinado empleando picudos de la yema del manzano colectados en huertos de manzana en San Antonio de las Alazanas, Arteaga, Coahuila.



Figura 6.- Cepa de *Beauveria bassiana* SAA-1 (Bals) Vuill.

Respuesta de Mortalidad por Medio de Cultivo

Medio con harina de soya

En la figura 7 se observa que la mortalidad de los picudos provocada por las blastosporas de *B. bassiana* producida en medio líquido de soya a una concentración 8.7×10^6 blastosporas/mL alcanzó un 92% de mortalidad a los 10 días después de la inmersión; para el caso de concentraciones menores como 8.7×10^5 la mortalidad fue de 56% , para la concentración de 8.7×10^4 de 68% , y en lo que respecta a la concentración de 8.7×10^3 y 8.7×10^2 la mortalidad fue de 58 y 40%, lo cual podemos mencionar que la concentración mayor presento mejor poder patogénico que el resto. Por otro lado, a medida que el tiempo de exposición se incrementa la mortalidad de picudos del manzano aumenta en todas las concentraciones de blastosporas de *B. bassiana*; sin embargo, dado que a partir del día 15 la mortalidad en los testigos aumenta notoriamente, quizá a causa de vejez , estos resultados es mejor compararlos a los 10 días.

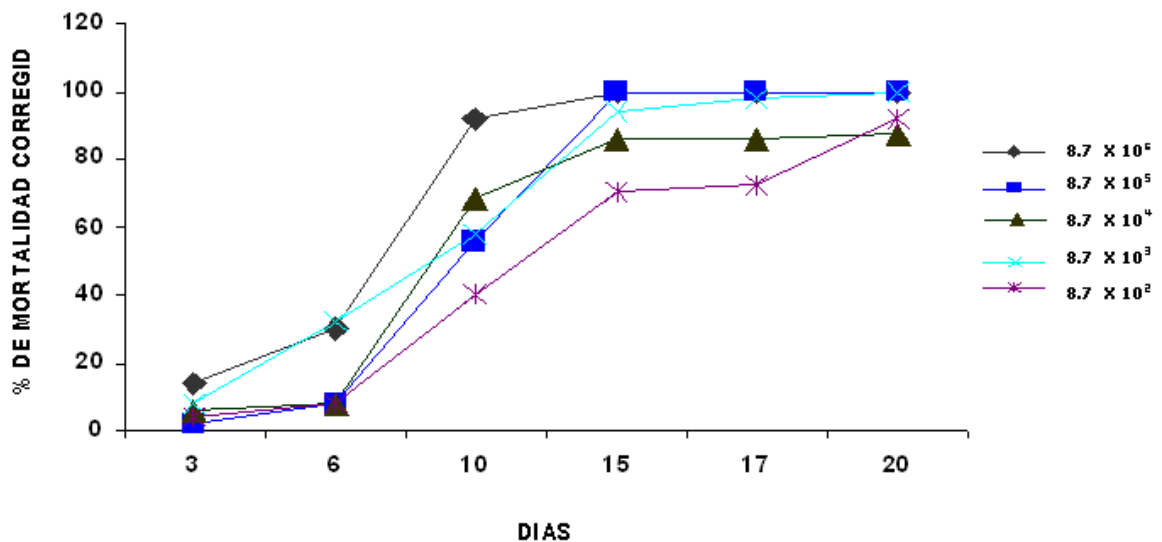


Figura 7.- Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de *Amphidees* spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de soya.

Medio con harina de frijol

En relación al medio líquido con harina de frijol, de nuevo la concentración mas alta que fue de 2.9×10^7 blastosporas /mL a los diez días alcanzó una mortalidad del 85.4 %; mientras que el resto de las concentraciones de 2.9×10^6 a 2.9×10^3 presentaron una mortalidad de alrededor del 50%. Es notorio que a los 4 y 6 días no se tiene una diferenciación clara del efecto de las concentraciones de blastosporas, por lo que considerando lo ya citado respecto a la mortalidad en testigos a 15 días, el mejor punto de referencia para ver los efectos de los picudos fue a los diez días.

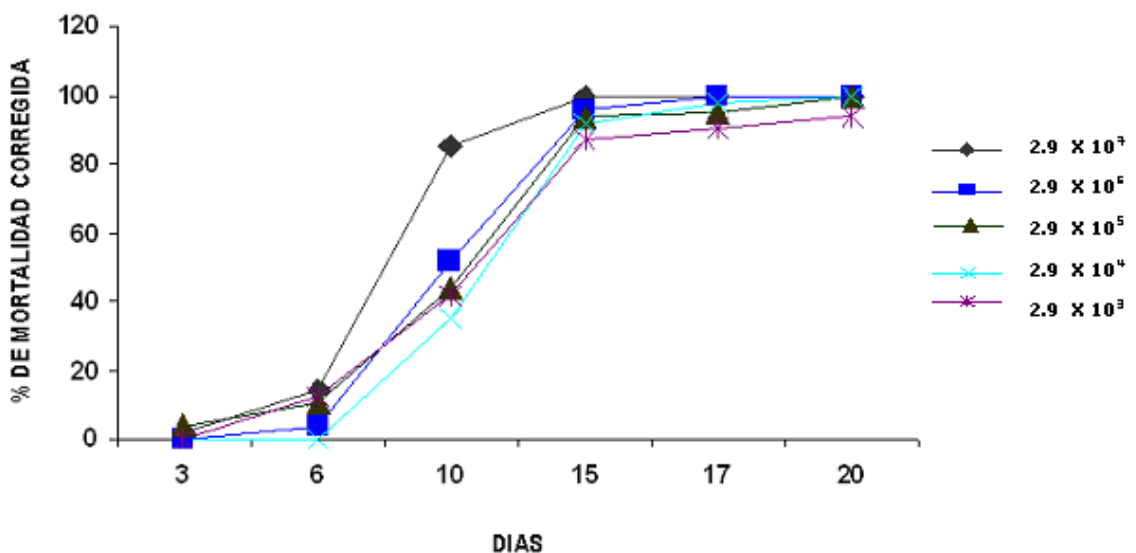


Figura 8.- Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de *Amphidees* spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de frijol .

Medio con harina de haba

El comportamiento de la respuesta en cuanto a la mortalidad del picudo de la yema del manzano por blastosporas de *B. bassiana* de la cepa SAA-1 producidas en caldo con harina de haba, fue muy similar a las obtenidas en los anteriores medios de propagación, dado que a los

diez días de exposición se alcanzó el 85.91% de mortalidad con con 3.0×10^7 .

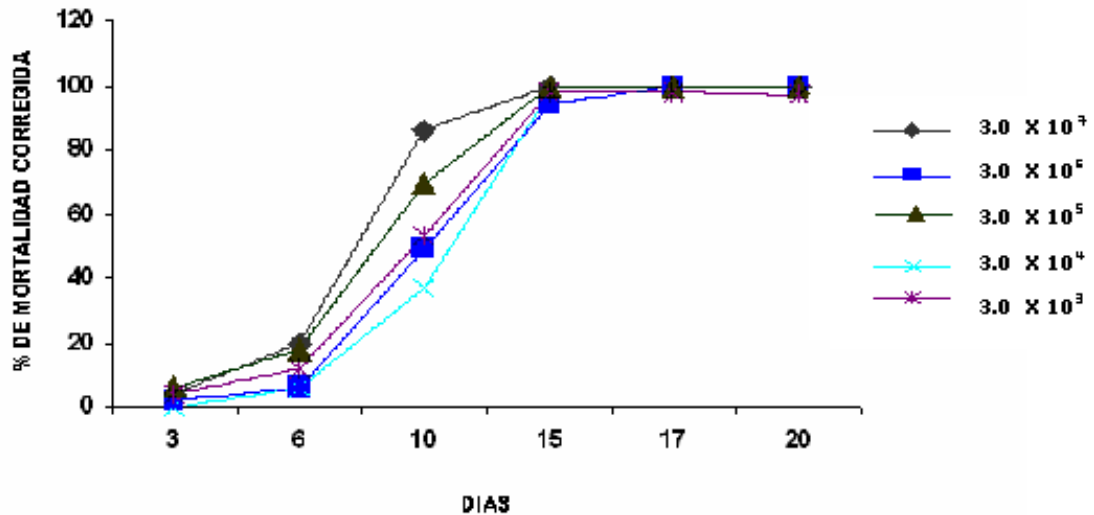


Figura 9.- Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de *Amphidees* spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido con harina de haba .

Medio con CDS

Las blastosporas de *B. bassiana* de la cepa SAA-1 cultivadas en CDS fueron menos patógenas o virulentas que las empleadas en caldo con harina de soya, haba o frijol, dado que a una concentración 3.2×10^7 a los diez días de exposición solo alcanzaron el 78 % de mortalidad, las concentraciones menores muestran un porcentaje de mortalidad que varía del 30 al 50%.

Es notorio que el efecto de las blastosporas de *B. bassiana* de la cepa SAA-1 sobre la mortalidad de adultos de *Amphidees* spp. fue muy similar en cuanto a que las concentraciones mayores a los diez días expresan los mejores resultados. Las observaciones a 3 y 6 días no permiten ver con claridad el efecto en cuanto a mortalidad, y que a 15 días no es posible tomar los datos como referencia por el incremento de mortalidad en los testigos.

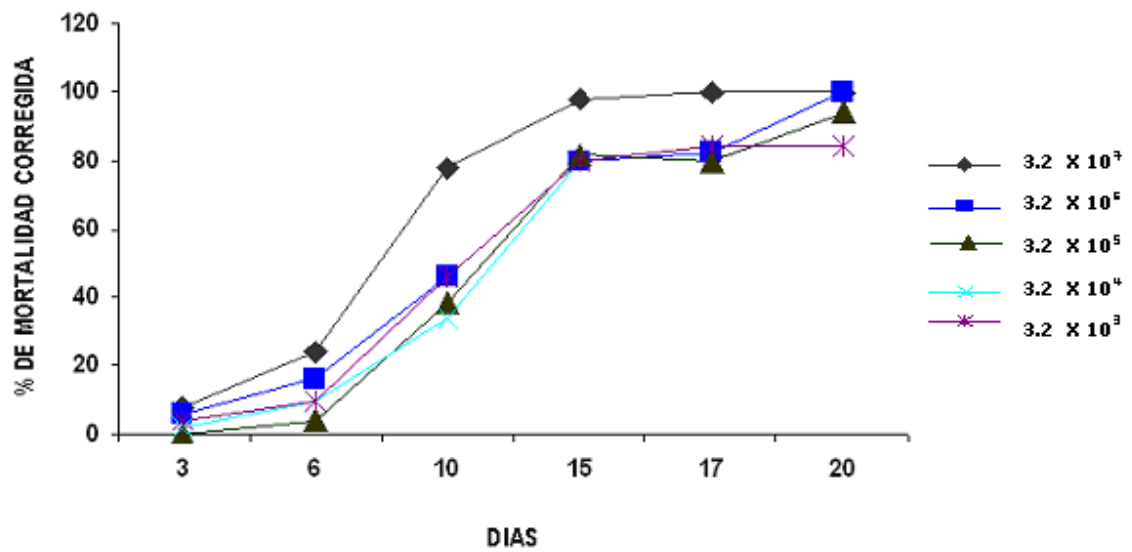


Figura 10.- Líneas de mortalidad obtenidas de adultos de *Amphidees* spp. a diferentes concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en medio líquido en Caldo Dextrosa Saboraud .

Comparación de Patogenicidad de Blastosporas de Diferentes Medios Líquidos

En la figura 10 se comparara la patogenicidad de las blastosporas de *B. bassiana* de la cepa SAA-1 entre los cuatro diferentes medios líquidos con las concentraciones que resultaron más virulentas a los 10 días. El medio líquido que causó mayor mortalidad fue el de soya que registró hasta un 92% y a los 15 días se observó hasta el 100 % de mortalidad a una concentración de 8.7×10^6 blastosporas /mL, siguiéndolo en orden el medio suplementado con harina de frijol y harina de haba y por último el CDS.

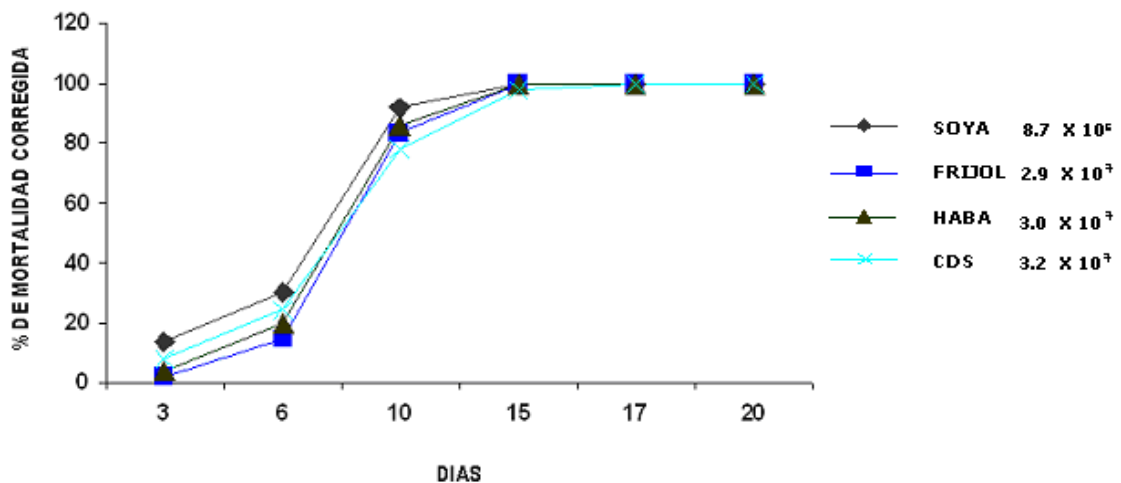


Figura 11.- Comparación de la patogenicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en adultos de *Amphidees* spp., cultivadas en diferentes medios líquidos a las concentraciones mayores.

Respuesta Concentración – Mortalidad

En el cuadro 1 se muestran los resultados del análisis para estimar concentraciones letales a 10 días; así la concentración media letal (CL_{50}) para blastosporas de *B. bassiana* producidas en los diferentes medios de cultivo contra el picudo del manzano, resultó mejor el de

soya con 3.6×10^3 blastospras /mL seguido del de haba con para el haba con 7.6×10^4 blastospras /mL; mientras que para la CL₉₅ de nuevo el caldo con harina de soya fue el mejor lográndose una mortalidad del 95 por ciento de la población con tan solo 4.6×10^7 blastospras /mL.

En el mismo cuadro 1 se observa que las blastosporas que derivan del caldo con harina de soya fue notablemente superior al resto de los caldos evaluados, ya que fue 20.5X mejor que el de haba, 78.5X mas eficiente que el de frijol y hasta 173.4X mejor que el CDS, esto señala claramente que las blastosporas ejercen un mejor control de los picudos al nivel de CL₅₀, posiblemente debido a que estas blastosporas por los nutrientes que provee la soya los torna mas virulentos. aspecto similar se observa al nivel del CL₉₅, ya que las blastosporas fueron 6.04X, 15.7X y 133.9X mas eficientes con respecto a haba, frijol y CDS respectivamente.

Cuadro 1.- Concentraciones letales, límites fiduciales y proporción de eficiencia de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en cuatro medios líquidos sobre adulto de *Amphidees* spp. a 10 días de experimentación.

Medio de Cultivo	CL ₅₀	Blastosporas/ mL			Proporción de Eficiencia	
		Límites Fiduciales 95 %		CL ₉₅	(CL ₅₀)	(CL ₉₅)
		Inferior	Superior			
Soya	3.6×10^3	1.2×10^3	8.3×10^3	4.6×10^7	-----	-----
Haba	7.6×10^4	2.5×10^4	1.7×10^5	2.8×10^8	20.5 X	6.04 X
Frijol	2.9×10^5	1.3×10^5	6.1×10^5	7.3×10^8	78.5 X	15.7 X
CDS	6.4×10^5	2.7×10^5	1.5×10^6	6.2×10^9	173.4 X	133.9 X

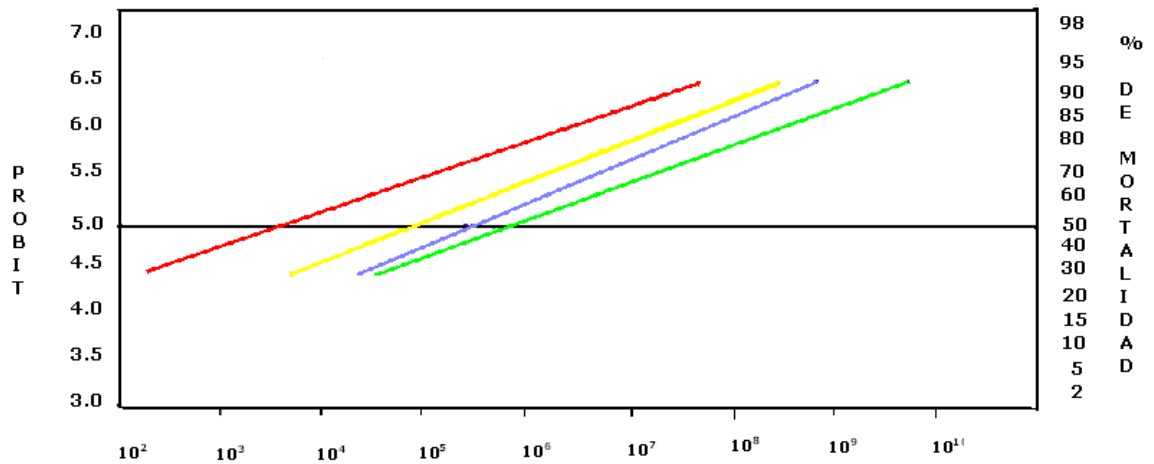


Figura 12.- Líneas de respuesta concentración – mortalidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cultivadas en diferentes medios líquidos a 10 días de ensayo sobre adultos de *Amphidees* spp.

En la figura 12 se observan las líneas de respuesta concentración mortalidad (blastosporas/mL), en las que se aprecia la mayor eficiencia en el medio líquido soya empleado para propagar a *B. bassiana* y aplicada sobre *Amphidees* spp. Ya que las líneas de la Soya alcanzan una dosis menor que la de los demás medios; por lo que se puede señalar que para poder tener el 95% de mortalidad (CL_{95}) se requiere una concentración de 4.63×10^7 en el caso de la soya, en tanto que para el haba, frijol y CDS se requerirán concentraciones de 2.8×10^8 , 7.3×10^8 y 6.2×10^9 .

En la figura 13 se muestran los cinturones de confianza de la mortalidad de picudos causada por las blastosporas de *B. bassiana* de la cepa SAA-1 provenientes del medios de cultivo con harina de soya, que se comporta con mayor patogenicidad que las producidas en los demás medios de propagación. Siendo por tanto estadísticamente diferentes a los demás. Los límites fiduciales de la CL_{50} para *Amphidees* spp. de blastosporas de los medios con harina frijol, haba y CDS estadísticamente iguales entre si.

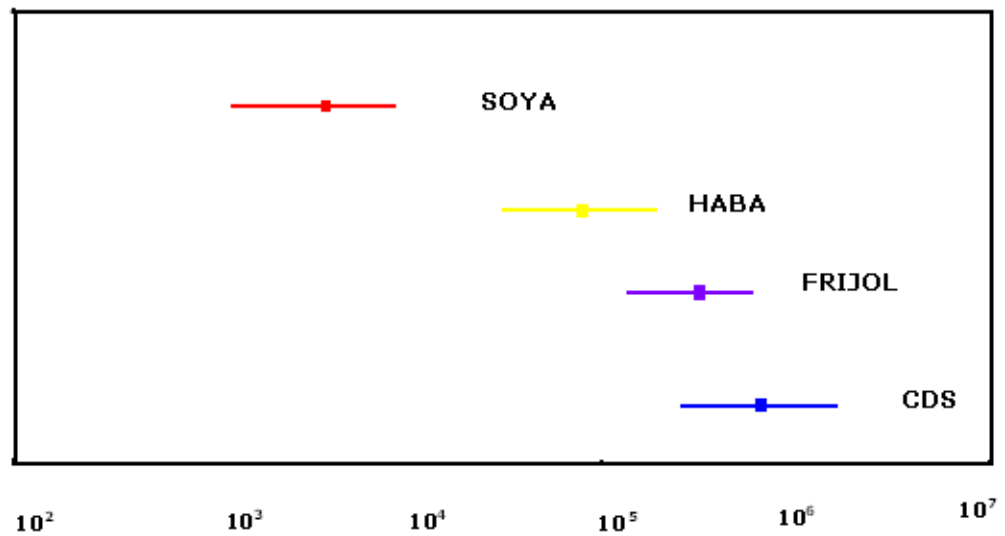


Figura 13.- CL₅₀ y límites fiduciales de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. propagadas en cuatro medios de cultivo líquidos sobre adultos de *Amphidees* spp.

Estos resultados de mortalidad por blastosporas de cepa SAA-1 de *B. Bassiana* obtenidos principalmente con medio líquido con harina de soya, indican ser muy prometedores para su evaluación en campo, ya que a concentraciones muy inferiores en comparación a los determinados por Olayo (2003) con una CL₅₀ de 7.8×10^7 muestran altos niveles de mortalidad por lo pronto a nivel de laboratorio.

De manera general, cualquiera de los medios evaluados pueden utilizarse para producir blastosporas de *B. bassiana* para combatir en campo al picudo de la yema del manzano. A diferencia de las conidias producidas sobre sustrato sólido de arroz, que tienen que formularse, las blastosporas producidas en medio líquido pudieran emplearse directamente, lo cual facilitaría su uso y empleo en campo.

CONCLUSIONES

El cultivo de *B. bassiana* SAA-1 en medios líquidos conteniendo harina de soya, harina de frijol y harina de haba generan blastosporas de este hongo, infectivos al complejo del picudo de la yema del manzano de Arteaga, Coahuila, México en bioensayos de laboratorio.

Concentraciones en rango de 1×10^2 a 1×10^7 generan mortalidad similares hasta de un 100 % a partir de los 15 días del bioensayo. La patogenicidad de las blastosporas es confiable entre los 3 y los 10 días de exposición, siendo las blastosporas más efectivas las cultivadas en medio suplementado con harina de soya.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- Alfaro, A.M. 1995. Efecto de aplicación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre plagas de maíz, gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) y gusano elotero *Helicoverpa zea* (Boddie). Tesis de Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. Pp . 11-12.
- Avila, A.R. 1998. Fluctuación poblacional de parasitoides de los picudos del manzano *Paranametis* sp y *Amphidees* sp. (Coleoptera: Curculionidae) en la Sierra de Arteaga . Tesis de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. 70 p.
- Barnett, G.J. and Hunter B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. McMillan Publishing Company. USA. 218 p.
- Blatchley, W.S. and C.W. Leng. 1916. Rhynchophora or weevils of north eastern America. The Nature Publishing Company. Indianapolis, U. S. A. 745 p.
- Borror, D.J., C.A. Triplehorn y N.F. Johnson. 1989. An introduction to the study of insects. Sixth edition. Saunder College Publishing. U. S. A. 827 p.
- Calderón, A.M. 1997. Fruticultura general. Editorial ECA. México. 581 p.
- Calderón, B.J. 1999. Descripción de los principales géneros de picudos (Coleoptera: Curculionidae) asociados al manzano de la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah. México. 45 p.
- Casamayor, A. 1998. Control microbiano de las plagas. Instituto Albert Einstein. Venezuela. Iwww.lacapital.net.com.or/agustino/feria.htm.
- Cepeda, S.M. y Hernández C. 1983. Revisión bibliográfica de enfermedades asociadas al cultivo del manzano (*Pyrus malus* L.).. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Boletín No. 8.
- Cepeda, S.M. y Hernández C. 1986. La roña del manzano *Venturia inaequalis* (cke) Wint. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. Folleto de Divulgación. No. 11. vol. 1. 16 p.
- Danival. 2003. Medios de cultivo.
http://danival.org/fungi/fungi_medios.html

- De la Rosa R., W. 1993. Manejo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Y su efecto sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) y su parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* Betrem. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México, 100 p.
- De la Rosa, R.W. y López M.M. 1998. Producción de Unidades infectivas de *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) en medios líquidos y determinación de parámetros de control de calidad de productos biológicos. Memoria, XXI Congreso Nacional de Control Biológico. SMCB. Tapachula, Chiapas. Pp. 244-246.
- Domínguez. G.R. 1995 efecto de mezclas de insecticidas de diferentes grupos toxicológicos sobre el picudo del manzano *Anametis granulatus* de la Sierra de Arteaga, Coah. Tesis de Licenciatura. UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah. México Pp 35-36.
- Estrada, A.P.H. 1986. Enemigos naturales de las principales plagas de maíz. Monografía de Licenciatura. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 87 p.
- FAO. 2001. Anuario de producción. Food and Agriculture Organization 142 p.
- Ferron, P. 1977. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23: 409-442.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. In: H.D. Burgues (Ed.). Microbial Control of Pests and Plant Diseases. 1970-1980. Academic press, New York, Pp. 465, 482.
- Garza, G. E. 1996. Control microbiano de plagas agrícolas en México. Memorias, I Curso Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano. SMCB. Tecomán, Colima, México. Pp. 1-5.
- Garza. G. E. 1997. Control Microbiano de las plagas agrícolas en México. Memoria del II Curso Taller de Producción de Agentes de Control Microbiano. CNRCB-SMCB. Tecomán, Colima, Mexico Pp. 1-7.
- Guerrero, G.V. 1991. El efecto de la época y diferentes niveles de poder sobre la brotación lateral en manzano *Malus domestica* cv. "Golden Delicious". Tesis de Licenciatura UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 50 p.

- Goettel, M.S. and D.L. Johnson. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents: Biological Control of Locusts and Grasshoppers Proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, p 356-361.
- Hernández, M.J.L. 1997. Control biológico de plagas del manzano. VII Conferencia Internacional de Plagas del manzano. Asociación de Productores de Manzana de Arteaga, Coah. México .P 36.
- Hernández, V:V:M. y Berlanga P.A.M. 1997. Producción masiva en sustrato sólido y formulación de hongos entomopatógenos. Memorias del II Curso Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Biológico. Tecomán, Colima, México. Pp 31-40.
- Hernández, V:V:M. y Berlanga P.A.M.1998. Avances en el control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons* en México; 9-11. Memoria de XXI Congreso Nacional de Control Biológico, Río Bravo, Tam., 377p.
- INEGI. (1998). Ficha informativa. Instituto nacional de Estadística Geográfica e Informática. Internet. www.inegi.org.mx.
- INEGI, 2001. Anuario estadístico; Coahuila de Zaragoza. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Pp. 331-349.
- Infoagro. 2003. El manzano.
http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm
- Infoagro. 2003. Control Biologico. Internet
http://www.infoagro.com/abonos/control_biologico.asp
- Jiménez, M.S.A. 1996. Evaluación en campo de insecticidas para el control del picudo de la yema del manzano *Anametis granulatus* (Say.) de la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 52 p.
- Kramer. S.1982. Fruticultura 1ª Ed. Continental. México. 276 p.
- Lezama, G. R. y R. M. Medellín. 1991. Efecto de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre gusano del melón *Diaphania byalinata* en condiciones de laboratorio. Congreso Nacional de Control Biológico. Saltillo, Coahuila. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Pp 261-269.

- Lezama, G. R. 1992. Biología y aplicación de los hongos entomopatógenos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Autónoma de México. p 166.
- Lezcano, B.J.A. 2000. Biología de *Amphidees latifrons* (Sharp) y susceptibilidad de larvas a insecticidas (Coleoptera: Curculionidae) en la Sierra de Arteaga. Tesis de Maestría. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 111 p.
- Méndez L., I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *hyporthemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 135 p.
- Mendoza, M.A. 1995. Determinación de efecto sinérgico del ácido fúlvico en insecticidas de diferentes grupos toxicológicos sobre el picudo de la yema del manzano *Anametis granulatus* Say. San Antonio de las Alazanas, Arteaga, Coah. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coah. México. 54 p.
- McCoy, C. W., R. A. Samson and D.G. Boucias. 1990. Entomogenous fungi. In CRC Handbook of Natural Pesticides. Microbial Insecticides. Part A. Entomogenous Protozoa and Fungi. Vol 5:151-236.
- Molina, O. J., González, R. M. & Lezama, G. R. 1997. Producción, formulación, comercialización y perspectivas de los nematodos entomopatógenos. Memoria del II Curso taller de producción de agentes de control microbiano. CNRCB-SMCB. Tecomán, Colima. Pp. 60-67.
- Ocaña R.O. 1996. Distribución e incidencia poblacional del picudo de la yema del manzano *Anametis granulatus* Say. (Coleoptera: Curculionidae), en la Sierra de Arteaga, Coah. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coah. México. 52 p.
- Olayo P.R.P. 1993. Evaluación y formulación de aislados nativos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el control del complejo de picudos del manzano *Amphidees* spp. (Coleoptera: Curculionidae) de la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Maestría. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 102 p.

- Perales, G.M.A. 1992. Parasitismo de la palomilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptero: Tortricidae) y el picudo de la yema del manzano *Anametis* sp. (Coleoptera: Curculionidae) en la Sierra de Arteaga, Coah. Tesis de Maestría. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. Pp 23-25.
- Quechulpa, M.F. 1998. Actividad de hongos entomopatógenos contra el picudo de la yema del manzano *Crocidema* sp. (Coleoptera: Curculionidae), plaga del manzano en la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila. México. 64 p.
- Ramírez R. H., M. Cepeda, S. 1993. El manzano. Segunda edición. Editorial Trillas. México. Pp 1-30.
- Roberts, D. W and R. A. Humbert. 1981. Entomogenous fungi. In: Colwell G.T., and Kedrick B (eds). Biology of Conidial Fungi. New York: Academic press.
- Roberts, D.W. 1989. Word picture of biological control of insects by fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84:89-100.
- Ruiz. O.M. 1979, Tratado elemental de botánica. 15ª Edición. ECLALSA. México. 730 p.
- Sánchez, V. V. 1992. Ecuaciones predictivas de daño en base a la densidad y tiempo de exposición de *Anametis* sp. (Coleoptero: Curculionidae) en manzano. XXVII Congreso Nacional de Entomología, San Luis Potosí, México. P 266.
- Sánchez, V. V. 1991. Estudio ecológico preliminar de la entomofauna asociada al cultivo del manzano (*Pyrus malus* L.) en la sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista Saltillo, Coahuila, México. Pp 46,50.
- Sinnott, E. y K. Wilson. 1975. Botánica: principios y problemas. Ed. Continental, México. P15.
- Starnes, R.L., Chi L.L. and Marrone P.G. 1993. History use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol. 39 (2):83-91.
- Taborsky, V. 1992. Small scale processing of microbial pesticides. FAO Agricultural Services Bulletin No. 96.
- Tamaro. O.Y. 1974. Tratado de fruticultura. Editorial Gustavo Gil. Barcelona, España. 939 p.

- Tanada, Y.& H.K. Kaya .1993. Insect pathology. Academic Press. EUA. 664 p.
- Thomas y Domerech. 1975. Atlas de botánica. Editorial Jover. Barcelona, España. 323 p.
- Valenzuela, L.E. 1987. Microorganismos entomopatógenos: Su uso en el control biológico de plagas de insectos. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Villalobos, F, J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grubs pests old corn in Mexico In: Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Ed. T.A. Jackson and T.R. Glare. Intercepted, England. Pp.253-260.
- Yufera, E.1991. Ecología química: Nuevos métodos de lucha contra insectos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

APENDICE

Cuadro 2.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a tres días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
8.7 ²	50	2	4
8.7 ³	50	4	8
8.7 ⁴	50	3	6
8.7 ⁵	50	1	2
8.7 ⁶	50	7	14

Cuadro 3.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a tres días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.0 ³	50	2	4
3.0 ⁴	50	0	0
3.0 ⁵	50	3	6
3.0 ⁶	50	1	2
3.0 ⁷	50	2	4

Cuadro 4.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a tres días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	1	--
2.9 ³	50	1	0
2.9 ⁴	50	1	0
2.9 ⁵	50	3	4.08
2.9 ⁶	50	1	0
2.9 ⁷	50	2	2.04

* Corregido por Abbot

Cuadro 5.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a tres días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.2 ³	50	2	4
3.2 ⁴	50	1	2
3.2 ⁵	50	0	0
3.2 ⁶	50	3	6
3.2 ⁷	50	4	8

Cuadro 6.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a seis días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
8.7 ²	50	4	8
8.7 ³	50	16	32
8.7 ⁴	50	4	8
8.7 ⁵	50	4	8
8.7 ⁶	50	15	30

Cuadro 7.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a seis días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.0 ³	50	6	12
3.0 ⁴	50	3	6
3.0 ⁵	50	9	18
3.0 ⁶	50	3	6
3.0 ⁷	50	10	20

Cuadro 8.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a seis días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	1	--
2.9 ³	50	7	12.24
2.9 ⁴	50	1	0
2.9 ⁵	50	6	10.20
2.9 ⁶	50	3	4.08
2.9 ⁷	50	8	14.28

* Corregido por Abbot

Cuadro 9.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a seis días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.2 ³	50	5	10
3.2 ⁴	50	5	10
3.2 ⁵	50	2	4
3.2 ⁶	50	8	16
3.2 ⁷	50	12	24

Cuadro 10.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a diez días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
8.7 ²	50	20	40
8.7 ³	50	29	58
8.7 ⁴	50	34	68
8.7 ⁶	50	46	92

Cuadro 11.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a diez días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	1	--
3.0 ⁴	50	19	36.73
3.0 ⁵	50	35	69.38
3.0 ⁷	50	43	85.71

* Corregido por Abbot

Cuadro 12.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a diez días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	2	--
2.9 ⁴	50	19	35.41
2.9 ⁵	50	23	43.75
2.9 ⁷	50	43	85.40

* Corregido por Abbot

Cuadro 13.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a diez días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.2 ⁴	50	17	34
3.2 ⁵	50	19	38
3.2 ⁷	50	39	78

Cuadro 14.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a quince días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
8.7 ²	50	35	70
8.7 ³	50	47	94
8.7 ⁴	50	43	86
8.7 ⁵	50	50	100
8.7 ⁶	50	50	100

Cuadro 15.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a quince días de post aplicación

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	1	--
3.0 ³	50	48	97.95
3.0 ⁴	50	49	97.95
3.0 ⁵	50	50	100
3.0 ⁶	50	47	93.87
3.0 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 16.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a quince días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	2	--
2.9 ³	50	44	87.50
2.9 ⁴	50	46	91.6
2.9 ⁵	50	47	93.75
2.9 ⁶	50	48	95.83
2.9 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 17.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a quince días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad
T	50	0	--
3.2 ³	50	40	80
3.2 ⁴	50	40	80
3.2 ⁵	50	41	82
3.2 ⁶	50	40	80
3.2 ⁷	50	49	98

Cuadro 18.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de soya a diecisiete días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	7	--
8.7 ²	50	38	72.09
8.7 ³	50	49	97.60
8.7 ⁴	50	44	86
8.7 ⁵	50	50	100
8.7 ⁶	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 19.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de haba a diecisiete días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	7	--
3.0 ³	50	48	97.67
3.0 ⁴	50	49	97.67
3.0 ⁵	50	50	100
3.0 ⁶	50	50	100
3.0 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 20.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a diecisiete días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	8	--
2.9 ³	50	46	90.47
2.9 ⁴	50	49	97.61
2.9 ⁵	50	48	95.23
2.9 ⁶	50	50	100
2.9 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 21.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a diecisiete días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	5	--
3.2 ³	50	43	84.44
3.2 ⁴	50	42	84.44
3.2 ⁵	50	41	80
3.2 ⁶	50	42	82.20
3.2 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 22.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a veinte días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	11	--
8.7 ²	50	47	92.30
8.7 ³	50	50	100
8.7 ⁴	50	45	87.10
8.7 ⁵	50	50	100
8.7 ⁶	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 23.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a veinte días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	17	--
3.0 ³	50	48	96.96
3.0 ⁴	50	49	96.96
3.0 ⁵	50	50	100
3.0 ⁶	50	50	100
3.0 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 24.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido con harina de frijol a veinte días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	17	--
2.9 ³	50	48	93.93
2.9 ⁴	50	50	100
2.9 ⁵	50	50	100
2.9 ⁶	50	50	100
2.9 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 25.- Mortalidad obtenida en laboratorio de adultos de *Amphidees* spp. expuestos a concentraciones de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio liquido de CDS a veinte días de post aplicación.

Concentración de Blastosporas	Individuos Observados	Individuos Muertos	% De Mortalidad Corregida
T	50	18	--
3.2 ³	50	45	84.37
3.2 ⁴	50	44	84.37
3.2 ⁵	50	48	93.75
3.2 ⁶	50	50	100
3.2 ⁷	50	50	100

* Corregido por Abbot

Cuadro 26.- Comparación de medias de mortalidad de adultos de *Amphidees* spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de soya a diferentes días.

CONCENTRACIONES	DIAS					
	3	6	10	15	17	20
8.75 ⁶	1.4 A	3.0 A	9.2 A	10 A	10 A	10 A
8.75 ⁵	0.2 A	0.8 B	5.6 B	10 A	10 A	10 A
8.75 ⁴	0.6 A	0.8 B	6.8 AB	8.6 AB	8.8 AB	9.0 B
8.75 ³	0.8 A	3.2 A	5.8 B	9.4 A	9.8 A	10 A
8.75 ²	0.4 A	0.8 B	4.0 B	7.0 B	7.6 B	9.4 AB
T	0.0 A	0.0 B	0.0 C	0.0 C	1.4 C	2.2 C

* DMS al 0.5 % de confianza

Cuadro 27.- Comparación de medias de mortalidad de adultos de *Amphidees* spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de haba a diferentes días.

CONCENTRACIONES	DIAS					
	3	6	10	15	17	20
3.0 ⁷	0.4 A	2.0 A	8.6 A	10 A	10 A	10 A
3.0 ⁶	0.2 A	0.6 BC	5.0 BC	9.4 A	10 A	10 A
3.0 ⁵	0.6 A	1.8 A	7.0 AB	10 A	10 A	10 A
3.0 ⁴	0.0 A	0.6 BC	3.8 C	9.8 A	9.8 A	9.8 A
3.0 ³	0.4 A	1.2 AB	5.2 BC	9.6 A	9.6 A	9.6 A
T	0.0 A	0.0 C	0.2 D	0.2 B	1.4 B	3.4 B

* DMS al 0.5 % de confianza

Cuadro 28.- Comparación de medias de mortalidad de adultos de *Amphidees* spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido con harina de frijol a diferentes días.

CONCENTRACIONES	DIAS					
	3	6	10	15	17	20
2.9 ⁷	0.4 A	1.6 A	8.6 A	10 A	10 A	10 A
2.9 ⁶	0.0 A	0.6 A	5.4 B	9.6 A	10 A	10 A
2.9 ⁵	0.6 A	1.2 A	4.6 B	9.4 A	9.6 A	10 A
2.9 ⁴	0.2 A	0.2 A	3.8 B	9.2 A	9.8 A	10 A
2.9 ³	0.2 A	1.4 A	4.4 B	8.8 A	9.2 A	9.6 A
T	0.2 A	0.2 A	0.4 C	0.4 B	1.6 B	3.4 B

* DMS al 0.5 % de confianza

Cuadro 29.- Comparación de medias de mortalidad de adultos de *Amphidees* spp. por diferentes concentraciones de blastosporas/mL de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. en medio líquido de CDS a diferentes días.

CONCENTRACIONES	DIAS					
	3	6	10	15	17	20
3.2 ⁷	0.8 A	2.4 A	7.8 A	9.8 A	10 A	10 A
3.2 ⁶	0.6 A	1.6 AB	4.6 B	8.0 B	8.4 B	10 A
3.2 ⁵	0.0 A	0.4 BC	3.8 B	8.2 AB	8.2 B	9.6 A
3.2 ⁴	0.2 A	1.0 BC	3.4 B	8.0 B	8.4 B	8.8 A
3.2 ³	0.4 A	1.0 BC	4.6 B	8.0 B	8.6 B	9.0 A
T	0.0 A	0.0 C	0.0 C	0.0 C	1.0 C	3.6 B

* DMS al 0.5 % de confianza