

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMIA**



Efecto de dos cofactores de crecimiento sobre el contenido de conidias producidas por *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin en un sistema tradicional sólido de producción bifásica.

Por:

Gabriela Tafoya Rodríguez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Diciembre de 1999.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMÍA**

Efecto de dos cofactores de crecimiento sobre el contenido de conidias producidas por *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin en un sistema tradicional sólido de producción bifásica.

Por

Gabriela Tafoya Rodríguez.

T E S I S

Que somete a consideración del H. jurado examinador como requisito para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Dr. Gabriel Gallegos Morales
Presidente del jurado

Dr. Melchor Cepeda Siller
Sinodal

Ing. José Luis Herrera Ayala
Sinodal

Coordinador de la División de Agronomía

Ing. MC. Reynaldo Alonso V.

Buenavista Saltillo, Coahuila, Diciembre de 1999.

INDICE DEL CONTENIDO.

PAGINA

DEDICATORIA	-----IX
AGRADECIMIENTOS	----- XIII
INDICE DE CONTENIDO	-----III
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS DEL CONTNIDO	----- VI
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	----- VIII
INTRODUCCION	----- 1
Objetivos	----- 3
Hipótesis	----- 3
RESUMEN	----- 4
REVISIÓN DE LITERATURA	----- 6
Antecedentes	----- 6
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	----- 8
Morfología	----- 8
Características Fisiológicas	----- 10
Clasificación Taxonómica	----- 10
Características de los Deuteromycetes	----- 11
Modo de acción	----- 12
Forma de penetración del hongo al hospedero	----- 12
Producción de enzimas	----- 12
Producción de toxinas	----- 13
Desarrollo del hongo	----- 15
Tipo de parasitismo	----- 16
Producción masiva de hongos entomopatógenos	----- 17

Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> -----	18
-----18	
Producción industrial de hongos entomopatógeno -----	18
Mejoramiento genético de los hongos entomopatógenos ----	19
USO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS -----	19
Entomopatógenos de gallina ciega <i>Phyllophaga sp</i> -----	20
Agente infeccioso -----	23
<i>Beauveria bassiana</i> como agente de control -----	24
Condiciones ambientales -----	24
Manejo integrado de plagas -----	25
Potencial agronómico -----	26
Formulaciones comerciales -----	27
MATERIALES Y MÉTODOS -----	28
Localización del área de trabajo -----	28
Método de aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> -----	28
Elaboración del inóculo -----	29
Preparación del sustrato -----	31
Producción de conidias de <i>Beauveria bassiana</i> -----	31
Método de extracción del ingrediente activo (conidias y micelio)	
de <i>Beauveria bassiana</i> -----	34
Conteo de esporas -----	34
Pruebas de patogenicidad -----	35
Análisis estadístico -----	36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	-----	37
Aislamiento e identificación de la cepa de <i>B. bassiana</i>	-----	37
Rendimiento total en peso de <i>B. bassiana</i> más sustrato		
a 32 días de incubación	-----	38
Recuperación de ingrediente técnico de <i>B. bassiana</i>	-----	40
Producción de conidios de <i>B. bassiana</i>	-----	41
Análisis de rendimiento de <i>B. bassiana</i>		
a 14 días de incubación	-----	42
Pruebas de patogenicidad	-----	43
CONCLUSIONES	-----	44
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	-----	45
APENDICE	-----	46

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS DEL CONTENIDO

Cuadro	Pagina
Cuadro 1. Especies de hongos reportados como patógenos de <i>Phyllophaga sp.</i> -----	21
Cuadro 2. Nombres de productos comerciales de <i>Beauveria bassiana</i> y plagas contra las cuales se emplean. -----	28
Cuadro 3. Nombres de productos comerciales y plagas que controlan otros entomopatógenos.-----	29
Cuadro 4. Análisis de varianza del peso de arroz, micelio – Esporas obtenidas por cada cofactor de crecimiento a 32 días de incubación.. -----	40
Cuadro 5. Análisis de varianza del contenido en peso de micelio, esporas – arroz por unidad experimental de producción a 32 días de incubación. -----	41
Cuadro 6. Datos de ingrediente técnico obtenido por unidad experimental de cada cofactor de crecimiento a 32 días de incubación. -----	42
Cuadro 7. Análisis de varianza de ingrediente técnico obtenido por cofactor de crecimiento por unidad experimental a 32 días de incubación. -----	42

Cuadro 8. Concentración de conidias de <i>Beauveria bassiana</i> BGC-I por miligramo obtenidas por cofactor De crecimiento a 32 días de incubación. -----	43
--	----

Cuadro 9. Datos de número de conidios producidos de <i>Beauveria bassiana</i> BGC-I por cofactor de crecimiento a 14 días de incubación. -----	44
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características Morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> reportada por Barnett y Hunter (1972) -----	9
Figura 2. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> en el medio de cultivo (ADS) a 72 horas de incubación . -----	31
Figura 3. Propagación de <i>Beauveria bassiana</i> en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) a 5 días de su inoculación. -----	32
Figura 4. Inoculación del soporte de crecimiento con su respectivo cofactor (Extracto de levadura, Extracto de malta, Agua destilada como testigo). -----	34
Figura 5. Bolsas con crecimiento micelial después de 32 días de incubación. -----	35
Figura 6. Extracción del ingrediente técnico en forma manual con ayuda de un tamiz. -----	36

INDICE DE CUADROS DEL APENDICE

Cuadro	Pagina
2.1. Análisis de varianza de los datos del peso, micelio- esporas resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos. -----	47
4.1. Análisis de varianza del ingrediente técnico obtenido por cada cofactor de crecimiento por unidad experimental a 32 días de incubación. -----	47
5.1. Concentración de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> BGC-I por miligramo obtenidas por cada cofactor de crecimiento a 32 días de incubación-----	48
6. Análisis de varianza de los datos obtenidos de ingrediente técnico obtenido por cada uno de los cofactores de crecimiento a 14 días de incubación. -----	48
7. Análisis de varianza de los datos de la concentración de conidios obtenidos por miligramo por cada cofactor de crecimiento a 14 días de incubación. -----	49

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haber sido mi guía y mi único amigo sincero que tengo y el que estuvo conmigo en los momentos más difíciles de mi carrera y de mi vida. **GRACIAS SEÑOR** por ser mi amigo y compañero.

A MIS PADRES

Sr. Miguel Tafoya González y Sra. Cerafina Rodríguez Tapia de T.

No tengo palabras para agradecerles tantas cosas en primera el haberme dado la vida. Gracias por ser mi razón de ser y por estar en este mundo a mi lado.

PAPA

Tu que eres la luz de mis ojos y la alegría de mi corazón gracias por la confianza puesta en mí, por todo tu apoyo, comprensión, cariño, tu brazo de apoyo cuando más lo necesite y sobretodo gracias por ser mi **PAPA**. Te Amo.

MAMA

Gracias por ser mi amiga a parte de ser mi madre y por ser la luz de mis ojos, también por el apoyo recibido de ti en los momentos cuando sentía desfallecer por levantar mi animo con una palabra dulce y cariñosa. Gracias por ser tan fuerte y darme valor para terminar mi carrera. **MAMA** te Amo.

A MIS HERMANOS

JUANITA, MIGUEL Y MARIANITA

Gracias por el apoyo que me dieron en el transcurso de mi carrera y por todo su cariño.

MARIANITA

Tu que con tu inocencia y cariño llegaste a alegrar nuestra casa con tus travesuras y sonrisas te quiero mucho como si fueras mi hermana.

JUANITA

Tu que siempre has estado conmigo como mi amiga, hermana también eres mi confidente y sobre todo que eres piedra angular en la unión de nuestra familia gracias por ello.

MIGUEL

Hermano gracias por tu apoyo, cariño y fortaleza. Que con tus consejos Gracias por ser como eres te quiero mucho.

De manera especial dedico este trabajo a mis abuelos los señores.

Jesús Tafoya Alvarado (+) y María del Carmen González (+), Esteban Rodríguez (+)

Que donde quiera que estén se sientan orgullosos de mi que con su sabio consejo hicieron de mi lo que soy. Los quiero mucho.

ABUELITA MARIA

Gracias por sus bendiciones que siempre han estado conmigo y han sido mi gran ayuda y sobre todo su cariño. La quiero mucho.

A MIS TIOS Y TIAS

A todos gracias por su apoyo y preocuparse por mí sobretodo por su cariño.

Mario y Elena

Eleazar y Margarita

Jesús y Margarita

Sabino y Pabla

Gustavo y Virginia

Francisco y Margarita

Juan y Juana
Angel (+) y Virginia

Carmen y Juan
Chavelo y Elvira

A MIS PRIMOS.

Por todo su apoyo y confianza y cariño depositado en mí de manera especial a:

Fabián, Erick, Carlos, Jesús y Martha, Alberto, Nancy, Diana y Adrián, Armando, Trina y Andrés.

A LUPITA.

No sé cómo agradeceré por todo este tiempo que compartimos juntas tantas cosas tanto buenas como malas y sobre todo por tu alegría que hacía que me alegrara al sentirme triste Lupita gracias. Te quiero mucho. .

CARMEN Y ANABEL

Se quedó en mi corazón y en mi mente sus consejos y sobre todo su cariño brindado para conmigo gracias por ser mis amigas aunque la distancia sea muy grande entre nosotras nuestra amistad moverá montañas hoy mañana y siempre.

SALVADOR, RUBEN Y VLADIMIR

Son pocos los amigos sinceros y ustedes son unos de ellos que con sus consejos hicieron de mí que creciera el amor por la agronomía y tratar de superarme día con día. Por eso **AGRICULTURA EN ESO ESTAMOS.....**

A LUIS FERNANDO (KALUSHA)

Gracias por esa mano amiga que siempre me brindó amistad, afecto y sobre todo respeto y sobre todo una amistad tan bella y sólida en la que no existen barreras ni

mentiras la que fue abierta y plena. También gracias por escucharme y sobretodo por la confianza y por ese hombro en el que yo podía llorar sin pena alguna que **DIOS** te llene de bendiciones.

A MIS AMIGOS.

De manera especial por haber estado con migo en todo momento de mi carrera a Cecilio, Hernán, Evaristo, Víctor, Josefina, Juan, Flavio, Erasmo, Daniel, Vicente, Bruno, Antonio, Erick, Peña, Onecimo, Jorge (Pollo), Gabriel Santos, Verónica, Gloria Gerardo Aurora y Camelia.

A LA GENERACION LXXXVI DE LA ESPECIALIDAD DE FITOTECNIA SEGUNDA SECCION.

Por tan gratos momentos que pasamos juntos en nuestra etapa de estudiantes que siempre lo llevare en mi mente y en mi corazón de manera especial a mis compañeros. Oswaldo, Roberto, Mauricio, Azuara, Angel, Antonio, Delsár, Carmen, Inés, Plutarco, Carmelo. Gracias por su amistad que llevare en mi mente y en mi corazón por siempre.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

En forma muy especial le doy Gracias por su apoyo, paciencia, amistad y sobretodo su confianza depositada, gracias por sus consejos y comentarios para la realización de este trabajo, le pido miles de disculpas por los momentos en los que lo hice desesperar. Espero conservar su amistad por siempre..... **Gracias.**

AL ING. JOSE LUIS HERRERA AYALA

Gracias por su amistad tan valiosa que conservare por siempre. gracias por el apoyo brindado por sus comentarios pertinentes para la realización de este trabajo.

AL DR. MELCHOR CEPEDA SILLER

Gracias por su colaboración y apoyo para la realización de este trabajo.

A. RENE.

De manera especial por que en el poco tiempo de conocerte me brindaste tu amistad, y que eres una persona muy agradable y sobre todo tu amistad que vale lo que pesa en oro. Muy especialmente te doy las gracias por el apoyo brindado para la realización de mi trabajo y te pido una disculpa por los momentos en los que te hacia desesperar..... **GRACIAS.**

A MI ALMA MATER.

Madre te doy las gracias por haberme recogido en tu seno y haberme cobijado bajo tus brazos por mucho tiempo en el que yo me hice profesionista y con muchas

ilusiones me boy de ti. Pero como todo hijo tiene que bolver a los brazos de su madre yo te prometo bolver a ti.

INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos constituyen un factor importante de regulación natural de poblaciones de especies de insectos plaga por lo que son considerados con un alto potencial como agentes de control biológico.

El uso de grandes cantidades de agroquímicos ha provocado la contaminación del suelo, agua y productos vegetales. Al mismo tiempo el excesivo empleo de estos ha creado resistencia de plagas, misma que se hereda y se intensifica en las generaciones subsecuentes, con la aparición de plagas secundarias inducidas al eliminar enemigos naturales, acumulación en el medio ambiente de residuos, destrucción de la flora y fauna silvestre benéfica e intoxicaciones en animales y el hombre.

Las ventajas de utilizar enemigos naturales para el combate de insectos plaga está adquiriendo cada vez mayor interés en varios países del mundo. En México el uso de esta tecnología se ha empleado en diversas zonas, donde los productores cada día manifiestan un mayor empleo por el control biológico, permitiendo incorporarlo dentro de programas de manejo integrado de plagas. Los hongos entomopatógenos, se han empleado con muy buenos resultados en el control de mosquita blanca, mosca prieta, broca del café, langosta, gallina ciega entre otros.

Desde hace más de 30 años diferentes instituciones en el mundo han dirigido su atención en buscar técnicas efectivas y económicas que permitan producir masivamente hongos entomopatógenos. Desde el punto de vista económico, la producción de hongos se ha ido orientado en la producción de esporas. En el caso de México se encuentran algunas instituciones dedicadas a la producción e investigación a la producción de entomopatógenos. La Dirección de Sanidad Vegetal a través del Centro Nacional de

Referencia de Control Biológico en el Estado de Colima, así como la aparición de diversos laboratorios particulares dedicados a la producción y formulación de productos a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* por mencionar algunos.

En los últimos años se han obtenido resultados óptimos con el uso de los hongos entomopatógenos como factores de regulación de plagas agrícolas. Se puede señalar como ejemplo a Brasil que emplea *Metarhizium anisopliae* para el combate de la mosca pinta, *Manarva poticala* en caña de azúcar. En Africa se emplean formulaciones en aceite de conidias de *Metarhizium spp.* para el combate de *Schistocerca gregaria*. Aislados de *B. bassiana* se utilizan contra picudo algodonero en EUA.

Acorde a su forma de reproducción los hongos entomopatógenos pueden producir diferentes estados vegetativos de crecimiento, masa miceliar dispersa, agregados en forma de esferulas, blastosporas, conidos aéreos y conidios en cultivos sumergidos semejantes a los conidos aéreos.

Comúnmente es preferible la producción de conidios por ser, los estados reproductivos más infecciosos, para su producción se utilizan sustratos sólidos como cultivo, generalmente granos de cereales precocidos como es el arroz, trigo, salvado por ser estos más económicos.

En el caso de *B. bassiana* y *M. flavoviridae* se han logrado diseñar medios de cultivos para la obtención de conidios en cultivos sumergidos semejantes a los obtenidos en sustratos sólidos.

Desde el punto de vista económico la utilización del arroz como el mejor sustrato en la producción masiva de los hongos entomopatógenos es mejor para producir una mayor concentración de conidios en un menor tiempo, y costos obteniéndose un producto biológico de mejor calidad.

Si bien es cierto que el control biológico ha adquirido importancia en el combate de plagas agrícolas, esto se ha presentando más por una situación de conciencia ecológica. Actualmente existen más de 2500 especies de gérmenes entomopatógenos descritos, de estos menos del 10% son reproducidos masivamente y menos de 1% se comercializan. Dentro de este grupo de agentes potenciales del control biológico, los hongos del orden *Entomophthorales* y los *Hyphomycetes*, *Metarhizium anisopiae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*, están siendo fuertemente estudiados en todo el mundo.

A través de esta investigación se pretende demostrar el efecto de dos cofactores de crecimiento, el extracto de malta y el extracto de levadura sobre los niveles de producción de esporas de una cepa de *Beauveria bassiana*, empleando el substrato tradicional del grano de arroz como soporte de producción de micelio de este hongo entomopatógeno.

Para la realización del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

- ❖ El establecimiento de un procedimiento de crecimiento de *Beauveria bassiana*.
- ❖ Determinar el efecto del extracto de levadura y extracto de malta sobre los niveles de esporulación de *B. bassiana*
- ❖ Demostrar la actividad de las esporas recuperadas de *B. bassiana*

- ❖ **HIPOTESIS.**

Los cofactores de crecimiento, extracto de malta y el extracto de levadura incrementara la producción de esporas *B. bassiana*, manteniendo la actividad bioinsecticida de los conidios producidos.

RESUMEN

Se aisló una cepa de *Beauveria bassiana* a partir de una larva de *Phylophaga sp* recuperada del municipio de Jerecuaro Guanajuato.

A partir de este aislado se efectuaron experimentos para determinar el efecto que el extracto de levadura y el extracto de malta tienen sobre los niveles de conidias producidas por *Beauveria bassiana* BGC-I. El trabajo experimental se efectuó por cultivos bifásicos de producción, el primero de micelio y el segundo de producción de conidios.

Para producir las conidias infectivas, este hongo se propagó en matraces con Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) en una primera fase con lo cual se obtuvo masa micelial que se diluyó 1:3 en una solución estéril de caldo extracto de levadura o caldo extracto malta. Este inóculo fue utilizado para sembrar bolsas conteniendo arroz, previamente desinfectado con hipoclorito de sodio y esterilizado, se utilizó como diluyente agua destilada estéril en igual proporción que los cofactores de crecimiento para diluir el micelio y utilizando como testigo comparativo. Los matraces de propagación para producir el inóculo se agitaron a 150 rpm durante 5 a 7 días a temperatura de laboratorio.

Las bolsas conteniendo el soporte (arroz) para el crecimiento del hongo y una vez inoculadas fueron incubadas a 26°C durante 32 días en un primer experimento y 14 días para el segundo experimento. Al finalizar este periodo de incubación cada bolsa fue pesada y el contenido de arroz fue tallado manualmente para extraer las conidias y la masa micelial, ambos datos fueron analizados a través de una comparación de medias por Tukey ($P= 0.05$) en un diseño completamente al azar.

Se demostró que no hay razón estadística suficiente como para considerar que existe un efecto marcado en el rendimiento en peso obtenido de micelio - arroz - ingrediente técnico y el número de conidios producidos ($P=0.05$) en los dos cofactores de crecimiento (extracto de levadura y extracto de malta), respecto al testigo y en los dos tiempos de incubación, se acepta por lo tanto que no hay efecto de los dos cofactores en los niveles de rendimiento (micelial, ingrediente técnico y número de conidios).

Las medias de rendimiento obtenidas en peso de ingrediente técnico por bolsa de arroz (140gr) fueron para extracto de levadura 4.7 ± 0.876 gr/ bolsa para el extracto de malta 5.2 ± 1.0383 gr/bolsa y para el testigo 5.7 ± 0.638 gr/ bolsa.

De manera similar los rendimientos de conidios fueron $9.12 \pm 1.782 (10^5)$ esporas /mg del extracto de malta, para el extracto de levadura $3.16 \pm 0.7331 (10^5)$ esporas /mg y para el testigo fue de $8.4 \pm 4.813 (10^5)$ esporas /mg de extracto técnico obtenido a 32 días de incubación.

Resultados estadísticamente similares fueron obtenidos al obtener los rendimientos de ingrediente técnico de *B. bassiana* y reducir a 14 días el periodo de incubación, obteniéndose de ingrediente técnico 141.98 ± 82.21 en extracto de levadura, en el extracto de malta 148.15 ± 10.06 gr/ bolsa y en el testigo 132.48 ± 7.308 gr/ bolsa. En cuanto al rendimiento de conidios se obtuvieron igualmente datos similares por miligramos de ingrediente técnico en extracto de malta, $4.0325 \pm 1.388 (10^5)$ conidios / mg, extracto de levadura $3.225 \pm 1.297 (10^5)$ conidios/mg y en el testigo $4.25 \pm 2.9021 (10^5)$ conidios / mg.

REVISION DE LITERATURA

Antecedentes

Los hongos fueron los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedades sobre los insectos, debido a su evidente crecimiento sobre la superficie de su hospedero, sin embargo algunos hongos entomopatógenos no presentan ese crecimiento visible a la superficie o frecuentemente presenta estructuras no evidentes o insignificantes que dificulta su detección, ahunado a que en algunas ocasiones su crecimiento y desarrollo es limitado por condiciones ambientales no propicias (Tanada y Kaya, 1993). Para su colecta es necesario conocer aspectos como su biología, hábitos del insecto plaga y sus hospederos alternos, además de contar con información acerca de los hongos reportados como patógenos de insecto, también es necesario conocer sus características morfológicas, capacidad de esporulación y mecanismos de acción entre otros (Smith,1994).

El uso de patógenos de insectos no es un medio nuevo, desde el siglo pasado Agostino Bassi demostró que la enfermedad denominada “Muscardina blanca” del gusano de seda *Bombyx mory* era a consecuencia del hongo *Beauveria bassiana* (Subramanian, 1971).

Beauveria bassiana es el agente causal de la muscardina blanca. En un principio este hongo fue descrito con el nombre de *Botrytis bassiana*, después por *Sporotrichum bassiana*, *Beauveria densum*, *Sporotrichum blobuliferum* y *Beauveria globulifera* (Domsch *et. al*,1980).

Entre los años de 1888 y 1896, en el estado de Kansas EUA, se estableció una estación experimental con el objeto de producir *B. bassiana* para el control de la chinche *Blissus leucopterus*, los primeros reportes fueron favorables, pero la incidencia natural de la enfermedad fue frecuente y efectiva reduciendo la población del insecto, por lo que se concluyó que la distribución artificial del hongo tubo poco valor por la presencia de *B. bassiana*.

En el presente siglo los primeros trabajos sobre *Beauveria bassiana* contra insectos plaga datan desde 1931, donde se trató de combatir al insecto *Tyrauster nubilalia* (Lefebvre, 1931).

Se ha comprobado que el hongo *Beauveria bassiana* penetra a la cutícula del insecto por medio de quitinasas, lipasas y proteasas (Rebollar, 1991).

En Rusia *B. bassiana* es producido con el nombre comercial de **Boverin**, y se menciona que en los últimos años se han desarrollado técnicas combinadas de cultivos sumergidos y de superficie para la producción de conidias. En medio líquido que contiene blastosporas del cultivo sumergido, se utiliza para inocular medios secos en bases de cereales para promover el desarrollo más rápido de una cepa micelial que producirá conidioforos. La preparación comercial de conidiosporas contiene 1×10^{10} conidias/gramo en un substrato inerte de kaolín (Ferron, 1978).

En Cuba *B. bassiana* se multiplica satisfactoriamente en medios líquidos que contienen levaduras, peptona, extracto de malta germinada y glucosa con altos contenidos de biomasa después de 72 horas de incubación. Por otro lado los medios semisólidos son los más utilizados para la reproducción de entomopatógenos a gran escala, esto es basado en la fermentación difásica con una primera fase de producción de micelio fungico y otro sometido a una incubación para la producción de conidias de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *V. lecanii* e *H. thompsonii* (Garza, 1992).

HONGOS ENTOMOPATOGENOS.

El potencial de los hongos entomopatógenos, se encuentra dentro de 700 especies de hongos de la clase *Deuteromycetes* y *Entomophthorales*, donde cerca de 90 géneros son patógenos a los insectos (Charney, 1989). Hasta la fecha se han investigado como mycoinsecticidas a los patógenos *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Erynia (Zoophthora)*, *Nomuraea*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*. Actualmente los hongos de producción masiva son; *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* (Brady, 1979).

Beauveria bassiana se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillo cremoso. En medio de cultivo alcanza su desarrollo en 21 días a 27°C. Los hospederos de este género son principalmente Lepidopteros, Coleópteros y Heminopteros pero también pueden presentarse en Hymenopteros (Hernández y Berlanga, 1996).

B. bassiana se encuentra ampliamente distribuido por tener un amplio rango de hospederos. Rombach y Gillespie (1988) mencionan que este hongo se ha encontrado infectando a *Tetranychus urticae*. Por otro lado se sabe que puede infectar a insectos de los ordenes Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, y Orthoptera (Rombach *et. al.*, 1986; Ferron y Robert, 1975; Hayden *et. al.*, 1992; Woods y Grula, 1984; Marcandier y Kachatourians. 1987 y De la Rosa, 1993). Además, este hongo se encuentra muy frecuentemente en suelo y la madera (Domsch *et. al.*, 1980)

Morfología.

El genero de *Beauveria* es un entomopatógeno imperfecto con hifas septadas contienen las estructuras reproductivas denominadas conidioforos sobre las cuales se desarrollan conidias (Tanada y Kaya, 1993). *Beauveria* ramifica su micelio para formar conidioforos que son simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos, la base de la célula conidiogena es globosa o abultada presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, (Figura 1) los cuales son

globosos de 2.0 – 2.0 μ m, los esterigmas son curvados en forma irregular o dispuestos en forma de zig – zag (Hernández y Berlanga, 1996).

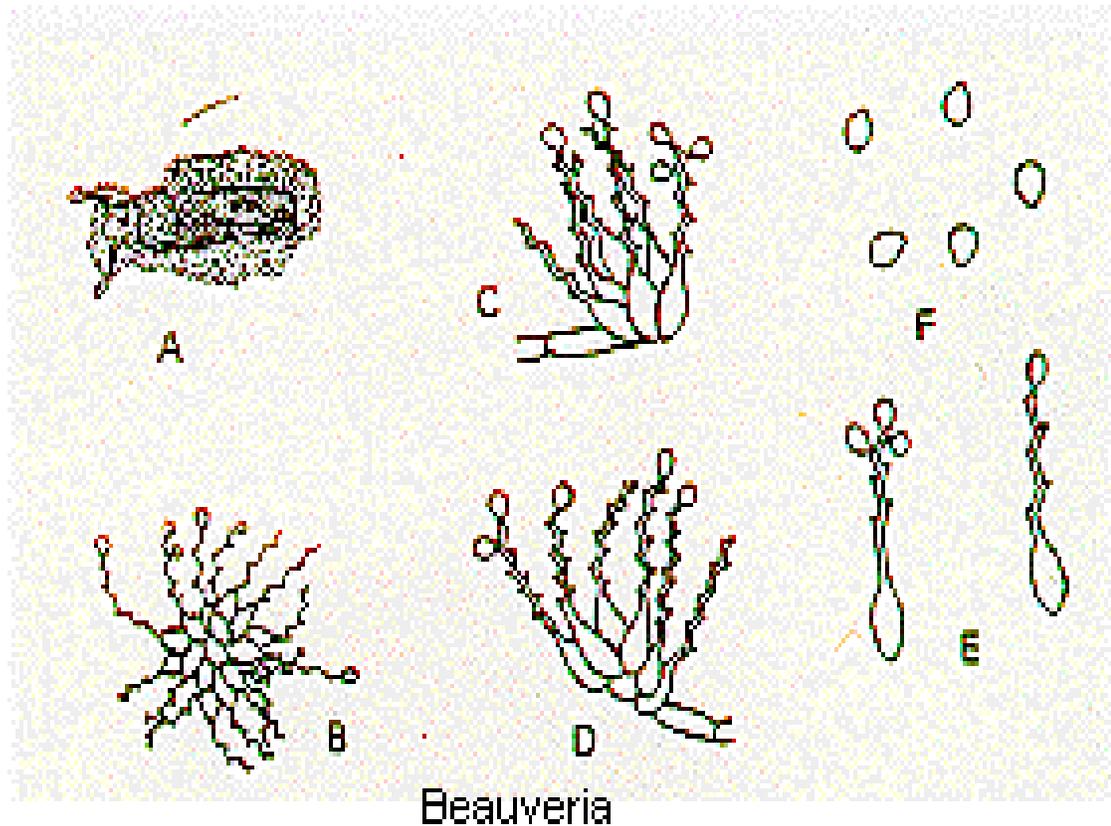


Figura 1. Características Morfológicas de *Beauveria bassiana* reportada por Barnett y Hunter (1972) .

De Bach (1985), menciona que *B. bassiana* se observa como un hongo que emerge del cuerpo del insecto parasitado recordando a la forma del bombón francés o menta dulce (muscardin french).

Días (1986), hace una descripción del hongo entomopatógenos *B. bassiana* como una cepa de micelio blanco envolviendo al insecto que a mayor aumento se observa como granulaciones pequeñas del mismo color. Así mismo describe a este hongo al reproducido en medio de cultivo, como una colonia blanca de apariencia algodonosa y

esponjosa, en la que se denotan pequeñas esferas entre las hifas (con aspecto de nieve) con un color crema pálido, observado en la parte inferior de la caja petri.

Coppel (1977), menciona que *B. bassiana* y *Metharizium anisopliae*, son entomopatógenos facultativos y han sido producidos en masa, en insectos vivos y en medio artificial.

Otras de las características de los hongos entomopatógenos, es que pueden ser capaces de iniciar epizootias a densidades altas y bajas del huésped. Esto ha sido demostrado, como es el caso específico de *Beauveria sp.* y *Entomophoraceos* (Billings, 1911, citado por Burges, 1981)

Características Fisiológicas.

Los hongos entomopatógenos inician su ataque cuando las esporas se ponen en contacto con el cuerpo del insecto. Al germinar la espora emite un tubo germinativo que atraviesa la piel de la plaga e invade su interior, colonizando los diversos órganos. Como consecuencia de la infección, el insecto muere, su cuerpo se endurece y al cabo de varios días se observa un crecimiento algodonoso de color blanco que se puede asumir que se trata de *B. bassiana*, cuando el crecimiento algodonoso es de color verde se asume que se trata de *Metharizium anisopliae*.

Los insectos muertos por el ataque del hongo infectando por contacto a otros insectos sanos y si el ambiente es favorable para el desarrollo del hongo, la enfermedad se disemina rápidamente entre la población. (González *et. al*, 1998).

Clasificación Taxonómica.

Existen numerosas especies de hongos entomopatógenos reportados en los diferentes grupos taxonómicos los cuales ofrecen posibilidades de usarse como factores de regulación de insectos. La mayoría de los hongos entomopatógenos se encuentran en

la división Mycota (Ainsworth.1973). Caracterizados por presentar fase asimilativa típicamente filamentosa y representadas por 5 subdivisiones.

Astogomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina

REINO: Mycota

DIVISION: Amastigomicotina

SUBDIVISION: Deuteromycotina

CLASE: Deuteromicetes

SUBCLASE: Hypomycetes

ORDEN: Moniliales

FAMILIA: Moniliaceae

GENERO: *Beauveria*

ESPECIE: *bassiana*

Adaptada por McCoy et al.,(1988) y Samson et al., (1988).

Características de los Deuteromicetes

Las clases de esta subdivisión se caracteriza por no presentar estado sexual, por lo cual se les conoce con el nombre de hongos imperfectos. La clase *Hyphomycetes* es la más importante ya que incluye a la mayoría de las especies conocidas como patógenos de insectos. Los *Hyphomycetos* se caracterizan por formar micelio septado con conidioforos simples o agrupados y la identificación de los géneros se basa en la forma en que se originan las conidias en el conidoforo (Hernández y Berlanga, 1996).

Modo de acción.

Los hongos entomopatógenos usualmente causan la muerte del hospedero por deficiencia nutricional, invasión digestión de los tejidos, y/o la liberación de toxinas. Solo unas pocas especies son capaces de invadir a través de heridas en el integumento (*Fusarium*, *Mucor*, *Penicilium*) las especies entomopatógenas usualmente penetran la

cutícula del hospedero y algunas veces lo invaden por la cavidad bucal o a través de los espiráculos. Las infecciones son usualmente iniciadas por esporas o conidios (Zygomycotina, Deuteromycotina) aunque en Mastigomycotina y Ascomycotina, las zoosporas y ascosporas son las responsables.

El desarrollo de la micosis puede ser separada en tres fases: Adhesión y germinación de las esporas sobre la cutícula del insecto, la segunda es la penetración en el homocelo y la tercera es el desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto. (Hernández y Berlanga, 1996).

Forma de penetración del hongo al hospedero.

La espora germina en la epicutícula del insecto, el tubo germinal resultante de algunas especies de hongos penetra a la cutícula directamente y en otros produce un botón adhesivo llamado apresorio que se encuentra bien anclado y que penetra en la cutícula por lo general con la ayuda de fuerzas mecánicas y de enzimas. Esta penetración es frecuentemente seguida de una reacción mecánica del insecto en los sitios de infección, probablemente cambios causados por el hongo en la actividad de fenoloxidasas (Casamayor, 1998)

Producción de enzimas

La producción de enzimas es una característica propia de hongos, ya que por medio de ellas pueden desdoblar y asimilar materiales de su hospedero. Las más importantes son las del grupo de las lipasas, quitinasas y amilasas (Roberts *et.al*, 1981 y Starnes *et. al*, 1993).

El integumento del insecto está compuesto esencialmente de proteínas y quitinas asociados con lípidos y compuestos fenólicos. La epicutícula o capa externa del integumento contiene lípidos, ácidos grasos y parafinas, cuyas actividades antifúngicas

se han demostrado, pero en concentraciones más altas que aquellos presentes en el integumento del insecto (Starnes *et. al*,1993).

Una vez que el hongo invade el homocelo por la combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, agotamiento de nutrientes o por toxemia. La importancia relativa de estos mecanismos varía con el aislamiento del hongo y el hospedero (Hajek y St. Leger, 1994; St Leger *et. al*, 1992).

La penetración en el homocelo es rápida en muchos de los casos, el hongo pasa del crecimiento hifal al crecimiento por gemación produciéndose toxinas y enzimas. Durante el proceso de invasión del homocelo el hongo tiene que recuperarse a la reacción de las defensas celulares del huésped. Los plasmocitos normalmente dispersos en la hemolinfa se acumulan alrededor del hongo y dan lugar a la melanización y encapsulación llamado granuloma.

Producción de toxinas

Los hongos que se encuentran en el homocelo de los insectos (también aquellos que se propagan en medios de cultivo) tienen la capacidad de producir algunas sustancias tóxicas cuya función principal es evitar la reacción de las células hemocíticas e incluso pueden ser causantes de la muerte del insecto antes de producir una invasión total (Kucera, 1971; Kucera y Samsinakova, 1968).

Tanada y Kaya (1993) mencionan que tanto el micelio de *Verticilium lecanii* como el de *Beauveria bassiana* producen la toxina **bassianolide** que causa una alteración en el núcleo de las células y puede funcionar como un antibiótico al igual que **bauvericin** al prevenir la invasión de bacterias, lo que hace que exista una momificación del insecto hospedero.

Después de algunos días esta formación de gránulos se agranda y se hace visible. Si la infección se bloquea, el insecto sobrevive, en aquellos hongos verdaderamente

patogénicos la formación del granuloma se inhibe (probablemente por la producción de toxinas llamadas **Beauverolides**, **Isarolides**, Acido oxalico y los pigmentos **Tenellin** y **Bassianin**), y el micelio reanuda su crecimiento normal e invade al homocelo a través de las blastosporas por lo que se considera que el papel de las toxinas es de mucha importancia, posteriormente el insecto muere. Puede suceder, en los casos de que el hongo no presente toxinas, que maten al insecto al conseguir todos los nutrientes o por destrucción física de los órganos internos (Ferron, 1981 y Robert, 1981).

La germinación de una spora en la superficie de la cutícula del insecto tiene que ser considerada estrechamente sujeta a los factores macroclimáticos especialmente humedad y temperatura. Por ejemplo para *Beauveria bassiana* se menciona que tiene un crecimiento óptimo a una temperatura de 23–25°C, además las conidias requieren de un 92% de humedad relativa para que ocurra su germinación (Ferron, 1981).

Starnes *et. al.*, (1993), mencionan que algunos hongos usualmente asociados con algún insecto causan serias enfermedades en sus hospederos, pero muy pocos utilizados comercialmente como agentes de control y la perspectiva para su uso en el futuro es incierto. Por otra parte se habla de que existen patógenos fungales para virtualmente todos los grupos de organismos multicelulares por lo que los fitopatólogos y entomólogos se encuentran sumamente interesados en las enfermedades fungales de sus respectivos grupos de hospederos. Inicialmente los fitopatólogos estuvieron interesados en la producción de cultivos contra las enfermedades fungosas y recientemente estos hongos son utilizados para el control de malezas. Igualmente los entomólogos estuvieron interesados en la producción de abejas y gusanos de seda, pero actualmente existe un considerable interés en utilizar patógenos fungales para el control de plagas de insectos (Roberts y Aist, 1984).

Desarrollo del hongo.

Después de cruzar la barrera que representa el integumento, el hongo se desarrolla en el homocelo en presencia de reacciones defensivas celulares, los

plasmotocitos, normalmente dispersos en la hemolinfa se acumulan alrededor del micelio formando un pseudo tejido o granuloma. La fagocitosis también ha sido observada como reacción defensiva del hospedero. Si la infección es bloqueada, el insecto continúa con su desarrollo normal y pocos días después el granuloma puede ser visible externamente. En el caso de patógenos como *B. bassiana* producen toxinas que erosionan el granuloma y permiten que las blastosporas invadan y los cuerpos hifales proliferan solamente después de la muerte del hospedero, así el papel de las toxinas entomógenas es de particular importancia en el proceso de infección. El hongo se desarrolla en el interior del homocelo en forma de levadura (cuerpos hifales o blastosporas).

La muerte del insecto marca el fin de la fase parasítica pero el resultado letal de la enfermedad es solamente un aspecto de la infección, ya que se han observado disturbios secundarios en la fecundidad, sobrevivencia en diapausa y resistencia a frío en insectos que sobreviven a la infección. Una vez en el interior del insecto, el hongo se desarrolla en forma de cuerpos hifales o en forma de blastosporas, invadiendo tejidos y órganos del insecto, la muerte del insecto se produce por medio de la producción de una toxina producida por el hongo en el metabolismo de los aminoácidos, esta toxina recibe el nombre de **Beauverina**. (Turner, 1971; Cheung y Grula, 1982; Deacon, 1988).

Ferron (1978), menciona que los estados de desarrollo del insecto que puede atacar en estado de huevecillo, larva, pupa e imago, son generalmente susceptibles a micosis.

Se considera que los hongos entomopatógenos de insectos chupadores (como pulgones, mosca blanca, chicharras entre otras), pueden ingerir otros microbios que los infecten a través de la pared intestinal. También los hongos particularmente son importantes en el control de coleópteros, pues enfermedades vírales y bacterianas son raras en escarabajos (Hajek y Leger, 1994).

Tipo de parasitismo.

Los hongos son parásitos facultativos, emiten normalmente haustorios dentro de las células de sus huéspedes, carecen de este al desarrollados en medios de cultivo artificial.

Las sustancias segregadas por hongos (parásito y patógeno) son enzimas hidrolizantes u oxidantes que actúan sobre los azúcares (Rodríguez, 1988).

La clase Deuteromycete incluye saprófitos simbióticos, parásitos predatorios con micelio septado, sin reproducción sexual y produce conidias, excepto algunas especies que no producen ningún tipo de esporas (De la Garza, 1996).

Ignoffo (1981), menciona que en el caso de los hongos Hyphomycetes entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *P. lavanicus*, presentan su ciclo en dos partes, una es la parasitaria y otra no parasitaria. En la primera las esporas germinan en la superficie de la cutícula de insecto hospedero emitiendo un tubo germinativo el cual penetra al insecto mediante dos mecanismos, uno físico (haustorios) y el otro es enzimático, (endotoxinas) antes mencionados.

Alatorre (1999), menciona que dentro de los hongos entomopatógenos se encuentran especies que han sido considerado como generalistas (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*). Considerando que los generalistas tienen la capacidad de infectar diferentes ordenes de insectos.

Producción masiva de hongos entomopatógenos

Por mas de 30 años, distintas instituciones han dirigido su proyecto de investigación en encontrar técnicas efectivas y económicas que permitan la producción masiva de hongos entomopatógenos. Económicamente, la producción de hongos se orienta a la producción de esporas en medios líquidos en fermentación, los cuales en 5

días permitan obtener rendimientos importantes de material fungoso. Pocos son los resultados exitosos de este procedimiento ya que cada hongo presenta requerimientos específicos para su germinación y esporulación. En la mayoría de los casos bajo este procedimiento no se producen esporas sino blastosporas que son muy sensibles a la deshidratación y poco persistencia en el campo.

Es por lo que en algunos países como es el caso de México se han puesto en marcha técnicas de reproducción masiva de hongos a nivel semi industrial produciendo cantidades considerables de esporas en granos de cereales como arroz y salvado (Lezama, 1991).

Mendoza, (1988), reporta la producción de esporas de entomopatógenos en bolsas de plástico con 400 gramos de arroz remojado, lavado, escurrido y esterilizadas a una temperatura de 120°C con una presión de 20 libras. Una vez esterilizadas y frías las bolsas fueron inoculadas con una suspensión de esporas y fueron puestas a incubar por espacio de 15 a 21 días con una temperatura de 26°C.

La misma técnica fue utilizada para la producción de hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus*. Para la obtención de material experimental para los cultivos de sandía, melón y maíz contra pulgones, mosquita blanca, gusano cogollero, gusano del melón y diabrotica principalmente en los estados de Michoacán y Colima (Lezama, 1991)

Los hongos entomopatógenos han sido producido en el *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Paecilomyces spp*, *Aschersonia sp* y *Verticillium lecanii* Centro Nacional de Referencia Control Biológico (CNRCB) utilizando granos de arroz como sustrato bajo una metodología con algunas modificaciones para algunas especies en particular.

Medios de cultivo para el crecimiento de *B. bassiana*.

Las especies de *Beauveria bassiana* se desarrollan con facilidad en medios de cultivo de (PDA), Agar Dextrosa Saboraud (SDA) y Agar Morfológicas para Levaduras (YMA). En el caso de producir en estos medios los costos de producción son muy altos.

Se ha 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 algunos arroz, trigo, salvado entre otros cereales. El más utilizado, y en el cual se ha obtenido los mejores resultados es el arroz (Kuno *et. al*, 1982).

Producción industrial de hongos entomopatógenos.

Algunos de los factores que se deben de considerar cuando se produce un micoinsecticida es la producción de esporas en forma abundante y rápida y con un alto grado de patogenicidad contra el insecto hospedero y deben tener capacidad de para iniciar una epizootias (Roberts *et.al.*, 1991). El método más adecuado para la producción de esporas a gran escala y que permita utilizarlas como micoinsecticida es el de fermentación sumergido (Sánchez *et. al*, 1993).

El procedimiento más común en la producción a gran escala se realiza sobre medios vegetales como salvado, arroz y cebada. Los conidios resultantes con o sin sustrato vegetal son introducidos al campo generalmente por medio de equipo de aplicación de plaguicidas convencionales (Roberts *et. al.*, 1991; Martignoni, 1985).

Goettel, (1984), reporta un método simple y barato basado en salvado para la producción en bolsas de celofán esterilizadas.

Mejoramiento genético de hongos entomopatógenos

El rango de hospederos, la patogenicidad y características tales como la germinación, crecimiento y producción de enzimas, varía para la mayoría de los hongos entomopatógenos. De esta manera se pueden resaltar y aumentar las características deseables mejorando la efectividad de algunos hongos patógenos a través de su manipulación genética (Starnes *et. al*, 1993; Roberts, 1989). Los sistemas de transformación y técnicas de ADN recombinante están siendo usadas para estudiar los mecanismos de patogenicidad, virulencia, selección y mutación de cepas a un nivel molecular (Hajek y St. Leger, 1994).

USO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

A pesar de que las infecciones fúngicas en insectos son comunes, no se ha logrado un manejo consistentemente exitoso, debido a que la mayoría requieren condiciones precisas de humedad y temperatura para su desarrollo. Hoy en día se carece de formulación comercial que contengan conidios que resistan largos periodos de almacenamiento. El uso de los hongos es promisorio, especialmente cuando se integre con otras medidas de control ya que por si solos no pueden tener un papel dominante en el control de plagas. Las características de la población del insecto hospedero que deben ser consideradas en estudios epizootiológicos son, la susceptibilidad, la densidad, el movimiento y la distribución espacial (Carruthers *et. al*, 1991), Se ha observado que en una población de insectos sensibles a un agente infeccioso, la tasa de enfermedad de una población se incrementa con el aumento de la población de insectos. Los virus, las bacterias y los protozoarios, infectan por vía oral, los hongos y los nematodos, su principal vía de infección es a través del integumento (Bustillo, 1989).

Tomando en cuenta la densidad de población de un insecto, la sensibilidad de un patógeno y su dispersión, tienen impacto en el desarrollo de epizootias, su distribución espacial puede ser un factor más importante que el número de individuos, ya que una agregación de insectos limita la dispersión de la enfermedad.

La sensibilidad de un insecto a una especie de hongo, en sus diferentes estados biológicos pueden variar, los insectos con ciclos biológicos largos tienen mayor probabilidad de contacto con hongos y otros patógenos (Ignoffo, 1992).

Entomopatógenos de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).

En México las larvas de *Phyllophaga spp.*, *Anomala spp.*, *Cyclocephala spp.* y otros géneros de la familia Melolonthidae agrupando en 560 especies de larvas edáficas (plagas de suelo), rizófaga, saprófita o facultativa conocida como “gallina ciega” (GC) (Morón, 1983), las cuales representan un serio problema en varias regiones del país, ya que se alimentan de raíces de gramíneas, papa, cafeto, hortalizas, Plántulas árboles frutales y forestales, reportándose daños más importantes en maíz (Rodríguez, 1988). Las pérdidas estimadas para el estado de Jalisco se ubican con un mínimo conservador de 350kg/Ha, lo que equivale a 3.85% y 16.5% respectivamente del promedio de producción de maíz en este estado (Nájera, 1993).

Los mayores esfuerzos para el combate de esta plaga se enfocan hacia el control químico, generándose problemas de contaminación ambiental, impacto sobre enemigos naturales, resistencia de la plaga a insecticidas e intoxicaciones de trabajadores. El control biológico es una alternativa con potencial aún no explotado, especialmente lo referente al control microbiano ya que debido al hábitat subterráneo de estos insectos durante su ciclo de desarrollo larval, son susceptibles a la infección por microorganismos como virus, bacteria, protozoarios, nematodos y hongos.

Las especies de hongos que se han reportado como patógenos de gallina ciega, son incompletos, ya que los hongos descritos hacen referencia a coleoptero o escarabajo. (Glare 1992). En México, los hongos entomopatógenos de melolóntidos han sido identificados tanto en el huésped como el patógeno, reportándose a *Metharizium anisopliae* (Metchinikoff) Sorokin (Villalobos 1992 y Hernández *et.al*, 1996), *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Peth (Hernández *et.al*, 1996) y *Cordyceps sp* (Villalobos, 1992)

como patógenos de *Phyllophaga sp*, actualmente en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CNRCB.(Centro Nacional Referencia Control Biológico, 1999).

Cuadro 1. Especies de hongos reportados como patógenos de *Phyllophaga spp*.

<i>Ascomycetes</i>	<i>Cordyceps aphodii</i> Mathieson <i>C. barnesii</i> Thw <i>C. brittlebankii</i> McLennan & Cookson <i>C. geotrumpis</i> Teng <i>C. Melolonthae</i> (Tull) Sac <i>C. neovolkiana</i> Kobayasi <i>C. ravenelii</i> Berkle y & Curtis <i>C. superficialis</i> (Pexk) Sacc <i>C. stylophora</i> Berk & Br
<i>Coelomycetes</i>	<i>Entoderma colletosporium</i> Hanula <i>Andreadis</i> & Blackwell
<i>Deuteromycetes</i>	<i>Akanthomyces angustipora</i> Mains <i>Beauveria amorpha</i> (Hoehnel) Samson & Evans <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Viullemmin <i>Hirsutella styphora</i> Mains <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschikoff) Sorokin <i>Paecilomyces canadensis</i> (Vuillemin) Brown & Smith <i>P. fumosoroseus</i> (Wize) Brown & Smith <i>Penicillium sp</i> <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viegas.
<i>Zygomycetes</i>	<i>Pandora brahminae</i> (Bose & Metha) Humber

(Glare, 1992), Tomado de Ficha técnica del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) CB- 04, 1999.

Agente infeccioso

Las propiedades con que debe contar un agente entomopatógeno son: un elevado nivel de virulencia, rango de hospederos, capacidad de dispersión, persistencia en el medio ambiente de su hospedero, sobrevivencia del inóculo, y distribución espacial, atributos que debe presentar los agentes infecciosos.

Virulencia.- Este término se refiere a la intensidad de la enfermedad causada por un patógeno, ya sea invadiendo, dañando el tejido o matando a su hospedero. En la mayoría de los patógenos de insectos estos presentan alta virulencia, característica de que el ciclo de la enfermedad es corto y produce grandes cantidades de inóculo, por lo que pueden causar un incremento rápido de la enfermedad dentro de la población. En contrario con los agentes infecciosos de baja virulencia por consiguiente la multiplicación y la propagación será muy lenta.

Especificidad.- En forma general los agentes infecciosos presentan un amplio rango de hospederos, por lo que la posibilidad de persistir dentro del ecosistema es alta y puede producir cantidades de inóculo suficiente como para desatar una epizootia.

Persistencia.- Dentro del medio ambiente de sus hospederos, la persistencia de un agente infeccioso se asegura por que tienen la capacidad de formar estructuras que les permita sobrevivir por largos periodos de tiempo, cuando las condiciones son desfavorables o de ausencia del hospedero. También, pueden permanecer en el suelo. La persistencia de un entomopatógeno depende en gran medida de los factores ambientales, como es temperatura, luz ultravioleta, tipo de suelo y practicas agrícolas que se realizan, afectando de manera inicial la cantidad de inóculo y el posible desarrollo de una epizootia.

Capacidad de dispersión.- Este factor es importante para la rápida dispersión de la enfermedad, en él seno de una población de insectos, los factores bióticos y abióticos como la lluvia, aire o los insectos contaminados y enfermos, pueden transportar el

inoculo de un lugar a otro. La colonización del insecto antes de morir, en la parte superior de una planta, permite que las conidias o esporas sean dispersadas por el viento o por la lluvia fácilmente. En laboratorio está bien documentada la relación entre la cantidad de inoculo y el porcentaje de mortalidad y en campo son pocos los trabajos realizados sobre este aspecto (Hajek y Lager, 1994).

***Beauveria bassiana* como agente de control.**

B. bassiana ha sido reconocido en muchas especies de insectos en climas templados y regiones tropicales y es usado para el control de plagas en una moderada escalas en Europa del este y en China (Starnes *et. al*, 1993). Por otro lado Méndez (1990) menciona que existen muchos reportes de la incidencia natural de *B. bassiana* causando epizootias que varían en magnitud sobre insectos de importancia agrícola y forestal en su mayoría.

Condiciones ambientales

La humedad, temperatura y radiación solar afectan a las poblaciones de insectos y la inestabilidad de los entomopatógenos (Carruthers y Hural, 1991) y pueden ser determinantes para que una enfermedad ocurra o no. Estos factores afectan al patógeno en cuanto a la supervivencia y la habilidad de infectar, al hospedero, en cuanto a la susceptibilidad o resistencia, incluyendo la activación de enfermedades latentes y durante un proceso de infección.

La mayoría de los hongos crece a temperaturas optimas al rededor los 25°C y sus actividades se pueden desarrollar desde los 15 y 38°C. Condiciones desfavorables para su desarrollo son por de bajo de 15 y por encima de 38°C. Su rango optimo se encuentra entre los 20 a 30°C esto tiende a variar dependiendo del tipo de patógeno.

La temperatura es uno de los factores abióticos que juega un papel muy importante para los hongos entomopatógenos. De forma general los rangos de

temperatura para las diferentes cepas de *B. bassiana* se encuentra entre los 22 a 26°C y para *M. anisopliae* es de 24 a 30°C (Casamayor, 1998).

La temperatura del suelo es uno de los principales factores que afectan la permanencia de *B. bassiana* en condiciones de campo, cuando las condiciones de temperatura son altas y la saturación del suelo la supervivencia de sus conidios es menor. Para su conservación como producto elaborado es a una temperatura ambiente de 30°C por un mes sin perder sus características.

En congelador a (4°C) se mantiene por 8 meses. Debiéndose cuidar que no se rompa el empaque a fin de que se introduzca agua que a su vez pueda provocar contaminación (Hanako y Méndez, 1998).

Manejo integrado de plagas.

La Academia Nacional de Ciencias (1989) menciona que el control integrado debe estar basado en principios ecológicos directos, combinados y armonizando con diferentes técnicas adecuadas para resolver problemas de plagas, teniendo como resultado, la máxima eficiencia de los agentes de control natural en un sistema ecológico y cuando sea necesario hacer uso de un plaguicida. En un sistema de manejo integrado de plagas, se utilizan todos los métodos y técnicas de control de una manera que congenien lo más posible, para que mantenga una población de plagas bajo control (Metcalf y Luckman, 1990).

Para un manejo integrado de plagas se tiene que tener en cuenta ciertos criterios como son los ecológicos, las ventajas económicas y un mínimo riesgo tomando en cuenta algunos puntos clave del agroecosistema como; control natural, Biología y ecología de los microorganismos, el cultivo como enfoque central, muestreo y uso de niveles críticos, uso de tácticas compatibles, integración de disciplinas y los efectos secundarios de fitoprotección (Andrews, 1989).

Potencial agronómico.

El uso de los primeros intentos por controlar insectos plaga con el uso de hongos entomopatógenos se realizó en los años de 1888 y 1896 en Kansas, EUA, donde se estableció una estación experimental con el objetivo de producir *B. bassiana* y ser distribuido libremente entre los productores para el control de la chinche de los cereales *Blissus leucopterus* (Say); Los primeros reportes fueron favorables, sin embargo la incidencia natural de la enfermedad fue frecuente y efectiva reduciendo la población de insectos. Para esto se concluyó que este hongo tuvo muy poco valor por la presencia natural de *B. bassiana* (Steinhaus, 1956).

En países asiáticos los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces sp* han sido utilizados contra plagas como la chinche negra del arroz *Scotinophara coartata* insecto que pertenece a la misma familia de la chinche café del sorgo. Otros reportes indican que se han obtenido buenos resultados en aspersiones de *B. bassiana* en aplicaciones de campo con una concentración de 2.5×10^{12} conidas por hectárea (Rombach *et. al.*, 1986).

La ex Unión Soviética desde hace 20 años se emplea para el control del escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata*. El **Boverin** toxina de *B. bassiana*, es recomendado en dosis reducidas de insecticidas químicos, oscilo entre 85.7 y 97.6%. cepas de *B. bassiana* con alta virulencia se han empleado para Lepidopteros de la fruta (Coppel, 1977).

Ferron (1985), menciona que en la ex URSS. *B. bassiana* se asperjaba en combinaciones con dosis bajas de insecticidas utilizando 1.2×10^{12} conidias /ha o en dosis altas/ha sin insecticida para el control del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Para el control de la palomilla de la manzana, *Cydia pomonella*, aplican 7×10^3 conidias/ha encontrando ataque de 1% de frutos donde se aplico el hongo contra el 11% en el área testigo.

En México, desde 1990 se evaluó y se usa *B. bassiana* para el control microbiano de la broca del café *Hypotenemus hampei*. Actualmente el Centro Reproductor de Entomófagos y Entomopatógenos del Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca N° 23 (ITAO) produce hongos para 15.500Has (Méndez, 1990 y Córdoba, 1995). En 1996 el ITAO N° 23 produjo para 6.655 has mientras que el Comité Regional de Sanidad Vegetal de Productores de Café del Soconusco en Tapachula, Chiapas elabora entomopatógenos para 6.611 has.

Por otra parte Rombach *et. al*, (1986), publica los resultados obtenidos en bioensayos de laboratorio, con conidas y micelio deshidratado de *B. bassiana*, observando diferencias mínimas en el control de la chinche negra del arroz *S. coartata* en programas de control biológico.

Burges *et al.*, (1981) menciona que en la actualidad existe un gran interes en los sistemas enzimáticos y de producción de toxinas de *B. bassiana*.

Uno de los desafíos más difíciles en los programas de control biológico, es el desarrollo de dietas económicamente viables destinadas a la cría de insectos y hongos benéficos que constituyen los enemigos naturales de ciertas plagas, de modo que puedan ser producidos a gran escala (Jess, 1996).

Formulaciones comerciales.

Actualmente se produce formula y comercializa hongos entomopatógenos en varios países para el control de insectos plaga. En México el interés por este hongo se ha incrementado sustancialmente a partir de las primeras evaluaciones contra la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1990).

Una limitante de mucha importancia en el desarrollo de los hongos como alternativa para el control de insectos es la falta de disponibilidad de preparaciones formuladas comercialmente (Hernández y Carrillo 1997).

Las unidades infectivas formuladas actualmente deben ser protegidas de los efectos negativos de las condiciones ambientales, tanto en su germinación como en su estabilidad en campo. No obstante, la formulación de micoinsecticidas es una de las áreas menos exploradas en el proceso de explotación de los hongos como agentes de control de insectos (Fuxa, 1987 y Roberts, 1989).

El desarrollo de productos biológicos como feromonas, hongos y bacterias que se encuentran disponibles en el mercado que son ofrecidos por compañías como es el caso de AgrEvo, CIBA, Abbot, Ecogen, Mycogen, Sandoz, Zeneca y algunas otras más con otros nombres comerciales algunos como insecticidas o plaguicidas biológicos (Jess, 1998).

Algunos de estos productos son elaborados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico y la Universidad Autónoma de Colima para el control de plagas del suelo de caña de azúcar, maíz, sorgo, melón, chile, pastos, café etc., por acción de contacto o de ingestión. Su efecto sobre las plagas es multiplicativo (donde una plaga contaminada esta a su vez contamina a otra y así sucesivamente) y por su protección residual después de 3-4 aplicaciones es por varios años dependiendo del clima, tipo y manejo del suelo (CNRCB, 1999).

Cuadro 2. Nombres de productos, comerciales de *Beauveria bassiana* y plagas contra las cuales se emplean.

LUGAR DE PROCEDENCIA	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	PLAGA QUE CONTROLA	CULTIVO
CESAVERG Comité estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato.	Bio fung Fito San – F	<i>B. bassiana</i>	Chinche café Mosquita blanca Gallina ciega	Sorgo Principalment e plaga de suelo
AGROBIONSA, Culiacán Sin.	Bea – Sin	<i>B. bassiana</i>	Picudo del algodón, Picudo del chile	Algodón, chile etc.
México	Biosep-23Bb	<i>B. bassiana</i>		
CP Ciencias Agrícolas campus Córdoba	Beauverina - CP	<i>B. bassiana</i>	Caña de azúcar, Café	Lepidoptera, Coleoptera, específica para la broca de café Caña de azúcar Coleptero (Broca del café)
Rep. De China	-----			
EX URSS	Boverin	<i>B. bassiana</i>		
EUA	Biotrol FBB ABG – 6178 Micotrol Naturalis – L	<i>B. bassiana</i> <i>B. bassiana</i> <i>B. bssiana</i> <i>B. bassiana</i>		Mosquita blanca, Hipotenemus hampe, Letinotarsa decemlineata
BIOSAV Miramar Habana Cuba	Basisav – 1	<i>B. bassiana</i>	Plátano, caña de azúcar, cítricos, arroz	Picudo negro, Picudo verde azul, Bórrer de la caña, Falso medidor
CNRCB Y U. COLIMA	Fungus *C Bio- Zentla	<i>B. bassiana</i>	Plagas de suelo, coleopteros, lepidopteros, específico para broca del café	Caña de azúcar, maíz, sorgo, café

Obtenida de diferentes fuentes de información. (Tafoya, 1999)

Cuadro 3. Nombre de productos comerciales y plagas que controlan otros entomopatógenos.

LUGAR DE PROCEDENCIA	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	PLAGA QUE CONTROLA	CULTIVO
CESAVEG GTO	Fitosan - M	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Phylophaga sp	Plagas de suelo
AGROBIONSA Culiacán Sinaloa	Meta- sin	<i>M. anisopliae</i>	Picudo del algodón, picudo del chile, mosquita blanca	Algodón, chile,
EUA	Biotrol- FMA	<i>M. anisopliae</i>		
ECONOVA COLIMA	Ecoman	<i>M. anisopliae</i>	Plagas de suelo, barrenadores	Hortalizas, limón, arroz
	Bios- Cobi	<i>M. anisopliae</i>	Mosca pinta, salivazo, picudos, gusanos de palomillas, broca del café, mosquita blanca	Pastos, caña de azúcar, maíz, chile, algodón, café, melón, tabaco
BRASIL	Mataquino	<i>M. anisopliae</i>		
Ex URSS	Metarhizium	<i>M. anisopliae</i>		
INGLATERRA	Vertelpac Micotol	<i>Vericillium lecanii</i>		
	Verticillín	<i>V. lecanii</i>		
CHECOSLO -VAQUIA	Verticón	<i>V. lecanii</i>		
ECONOVA	Ecopae	<i>Paecilomyces</i>		
URSS	Peocilomín	<i>P. farinosus</i>		

Obtenida de diferentes fuentes de información (Tafoya, 1999).

MATERIALES Y METODOS.

Localización del área de trabajo

El presente estudio se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, Coahuila, en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología.

El material utilizado fue una cepa de *Beauveria bassiana* recuperada de gallina ciega *Phyllophaga sp*; en un medio de cultivo Saboraud Dextrosa Agar (SDA). Las larvas infectadas de gallina ciega de la cual se aisló la cepa de *Beauveria bassiana* fue colectada en la localidad de Puragua, municipio de Jerecuaro, Guanajuato, localizado sobre las coordenadas de Latitud Norte de 20° 05" y con una latitud Oeste de 100° 27" y encontrándose a una altura de 2000 msnm.

Método de aislamiento de *Beauveria bassiana*.

Para la recuperación del hongo de la larva de la gallina ciega se auxilió de una asa bacteriológica tomándose muestras de la larva de la gallina ciega infectada y se depositaron en forma directa en placas de Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) y Papa Dextrosa Saboraud (SDA). Realizada la siembra, las placas fueron selladas con Kleen Pack. Después de haberse registrado las cajas fueron pasadas a la incubadora a una temperatura de 24 a 25°C aproximadamente por 5 días. Del crecimiento algodonoso del hongo se purificó en el mismo medio para posteriormente realizar las observaciones morfológicas y de crecimiento del hongo para su identificación.



Figura .2. Crecimiento de *Beauveria bassiana* en el medio de cultivo (ADS)

Elaboración del inóculo

De una caja petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) inoculado con el aislado de *Beauveria bassiana* de gallina ciega BGC- I, previamente esterilizado, se tomó un cm² agar de 72 horas de crecimiento de manera séptica con bisturí del centro de la placa para inocular un matraz Erlen Meyer de 500mililitros con 250 mililitros de Caldo Dextrosa Saboraud (CDS), el cual fue incubado a 150 rpm por espacio de 5 a 7 días a temperatura de laboratorio.

El micelio producido durante este periodo de incubación se utilizó para inocular el substrato de producción (bolsas de Arroz) de conidios del hongo entomópato. Se tomó como tiempo óptimo de crecimiento del inóculo el hecho de haber cambiado la tonalidad del crecimiento micelial de un color crema a un color rojo ladrillo.



Figura 3.. Propagación de *Beauveria bassiana* en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) a 5 días de incubación.

Beauveria bassiana BGC-I creció de manera uniforme en el medio de cultivo sin formar grumos o pelotas miceliales., lo cual facilito su empleo al momento de inocular el substrato de producción. Se observo también que en más de 5 días de incubación el micelio contenido en el matraz tendía a formar natas de micelio lo cual dificultaba la inoculación del substrato. El tiempo optimo de incubación del micelio se correlaciono con el cambio de color de la masa miceliar de la cepa de *Beauveria bassiana*.

15 mililitros del inoculo de *Beauveria bassiana* BGC-I fueron diluidos con 5ml de cofactor de crecimiento Caldo Extracto de Malta y Caldo Extracto de Levadura (0.5% P/V), por separado para ser agregados al substrato de producción (Arroz colocado en bolsas plásticas ya esterilizadas).

Una vez inoculados fueron incubados a 26°C por 32 días para la producción de esporas. Al termino de la incubación las bolsas fueron pesadas para el análisis

estadístico (Cuadro. 4). Las esporas fueron extraídas por tallado manual en un tamiz N. 0.42mm de diámetro, posteriormente cada extracto fue pesado para su análisis en cuanto al rendimiento de ingrediente técnico (Cuadro 5). Este ensayo por sexduplicado y los datos estadísticos de la comparación de medias por Tukey se muestra en el (Cuadro 5).

Preparación del sustrato

Primeramente se puso a remojar 2kg de arroz en 2 litros de agua con 25ml de hipoclorito de sodio (cloralex) dejándolo por espacio de 30 minutos agitándolo constantemente, transcurrido este tiempo el arroz fue lavado con suficiente agua y después fue puesto a escurrir. Posteriormente se procedió a embolsarlo aproximadamente 150 gramos por bolsa, grapando cada una de las bolsas. Posteriormente fueron sometidas a esterilización por 30 minutos a 120° C y 20 libras de presión.

Producción de conidias de *B. bassiana*.

Ya fríos los sustratos de producción (el arroz en bolsa) se realizó la inoculación en una campana de flujo laminar perfectamente bien desinfectada con alcohol al 70% (v/v). Hecha esta labor fueron inoculados con (20ml) los paquetes con ayuda de una jeringa, marcando con un punto el lugar por donde se inoculo después se le puso un pedazo de cinta con la referencia del tratamiento (cofactor utilizado) realizado de igual manera el mismo procedimiento para los otros tratamientos, con extracto de malta y extracto de levadura. (Figura 4).



Figura 4. Inoculación del soporte de crecimiento con su respectivo cofactor (Extracto de levadura, Extracto de malta, agua destilada como testigo).

Una vez inoculado el sustrato de producción se sometió a incubación por 32 días a 26°C en una incubadora, con el objeto de mantener la Humedad Relativa alta fue colocado en el interior un recipiente con agua destilada, las bolsas que presentaran el crecimiento fueron mezcladas a los 10 y 20 días con el objeto de mantener uniforme la presencia del hongo en todo el arroz. Al término del tiempo de incubación cada bolsa con hongo fue pesada con el objeto de encontrar diferencias en cuanto a los rendimientos obtenidos.

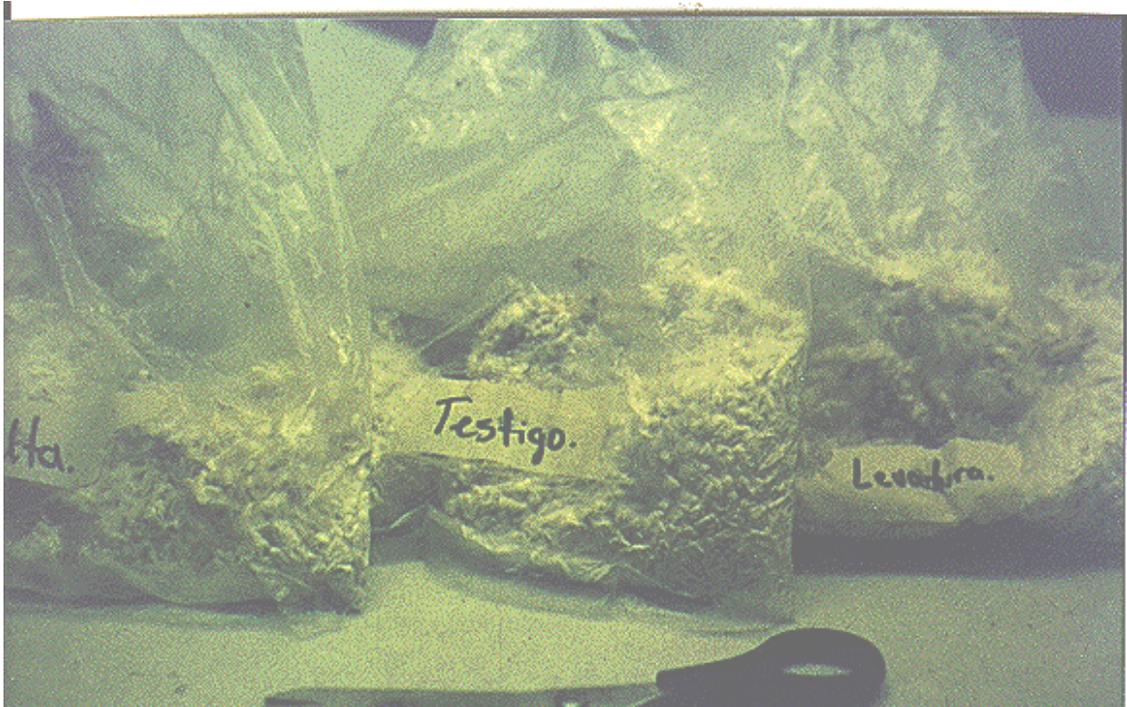


Figura 5. Bolsas con crecimiento micelial después de 32 días de incubación.

Las bolsas de arroz conteniendo el crecimiento de *Beauveria bassiana* BGC-I fue tallado dos veces de forma manual. Primeramente en maya mosquitera y posteriormente en un tamiz de 0.42mm de diámetro. El peso del principio activo obtenido se registro con el objeto de observar diferencias estadísticas en los rendimientos del ingrediente activo en los diferentes tratamientos.

Método de extracción del principio activo (conidias y micelio de *B. bassiana*)



Figura 6. Extracción de conidias en forma manual con ayuda de un tamiz

Conteo de esporas

Se tomo una muestra de 40 miligramos del ingrediente técnico y se coloco en un tubo de ensayo con 100ml de agua destilada estéril con unas gotas de tween 20% la suspensión obtenida se agito vigorosamente agregándole unas gotas de aceite de pino para cortar la espuma. Con ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una muestra de la suspensión y se coloco en la cámara de Neubauer, para hacer los respectivos conteos de conidios por a cuadrante y determinar el numero de esporas presentes en dicha muestra. De cada tratamiento y cada repetición, realizando los conteos por cuadruplicado y tomándose el promedio como el número de conidios obtenidos por cada conteo.

La manera de realizar los conteos en la cámara de Neubauer, se efectuó de la siguiente manera.

La cámara de Neubauer consta de dos campos de conteo, en cada campo tiene 9 cuadros grandes y a su vez presenta 25 cuadros de 16 cuadrados más pequeños donde cada grupo es de 0.2mm. El campo utilizado dependerá del tamaño de la espora, pero para este caso se utilizara el campo donde la cuadrícula sea pequeña denominando a los cuadros de conteo como (a, b, c, d), para esto el conteo por muestra se repetirá 4 veces para posteriormente sacarse un promedio. Posteriormente con los datos obtenidos se sustituirán a la formula para obtener la concentración de esporas por miligramo.

Total de conteo (5 cuadros chicos) * 50*1000*0.25 = esporas/mgr.

Pruebas de patogenicidad.

Para la realización de este bioensayo se colectaron hormigas adultas del género *Atta spp*, colectadas en un bote de plástico con algodón embebido de una solución de sacarosa al 10% (P/V), colocado en el interior del bote para la atracción del insecto. De manera individual cada hormiga fue impregnada de una solución de conidias procedentes de cada una de las bolsas de producción perteneciente a cada cofactor de crecimiento y el testigo de referencia para ello 200 mg de ingrediente técnico (extracto de conidias de los sistemas de producción) se mezcló en 100ml de agua destilada estéril con tween 80 (0.01% V/V). Cada tratamiento fue repetido tres veces y cada bioensayo consto de cuando menos 7 repeticiones Las hormigas de cada tratamiento fueron colocados en cajas petrí estériles conteniendo papel húmedo y follaje suave, se incubaron por siete a diez días hasta observar el crecimiento del hongo sobre el cuerpo de la hormiga confirmando con ello la patogenicidad de *Beauveria bassiana* producida en cada cofactor y el testigo.

Análisis estadístico.

Los experimentos de crecimiento y de producción de *Beauveria bassiana* BGC-I fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con tres tratamiento con seis y cuatro repeticiones. Las medias (\bar{X}) experimentales se compararon a través de la prueba de Tukey ($P=0.01$ y 0.05) usando la diferencia mínima significativa (DMS), para estratificar los tratamientos efectuados en el diseño experimental.

Los datos utilizados fueron el peso final de las repeticiones de cada tratamiento de producción de masa micelial y conidios producidos peso del ingrediente técnico recuperado de cada tratamiento y número de conidios producidos por unidad de peso en cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Aislamiento e identificación de la cepa de *Beauveria bassiana*.

A partir de una muestra de larva de gallina ciega *Phyllophaga sp.* infectada y con crecimiento fungoso superficial procedente de Jerecuaro, Guanajuato se logró el aislamiento de un hongo en el medio de cultivo Agar Dextrosa Saboraud (ADS). La cepa aislada presentó las siguientes características.

Crece de forma algodonosa tal y como se manifestó inicialmente en la larva recuperada de Jerecuaro, (Figura 4), presentó micelio septado y de color blanco en la superficie del medio de crecimiento, en el fondo del medio, crece de color cremoso en las primeras 48 a 72 horas y posteriormente cambia a un color amarillo pálido.

Al realizar microcultivos para facilitar la observación de los conidios de este hongo se encontró que los esterigmas se desarrollan en los vértices de micelio donde forma una roseta, a partir de la cual crecen los conidios de forma o apariencia a limón.

Basado en estas características y el hecho de haber sido aislado de un insecto enfermo provocando micosis superficial tipo muscardina blanca, este aislado concuerda con las características morfológicas del entomopatógeno *Beauveria bassiana* según Barnett y Hunter (1972), a este aislado se le asignó la clave BGC-I.

Rendimiento total en peso de *b. bassiana* más sustrato a 32 días de incubación.

El aislado de *Beauveria bassiana* se propagó en Caldo Dextrosa Saboraud (CDS) por espacio de cinco a siete días. En este tiempo la cepa desarrolla su

crecimiento micelial cambiando de una tonalidad blancuzca a una apariencia de color rojo ladrillo. Este micelio fue posteriormente inoculado al sustrato de producción de conidias (bolsas de arroz) los cuales se incubaron a 26°C por 32 días, tiempo en el cual se realizó la extracción de los conidios, raspando el arroz sobre la malla de tamiz de 0.42mm de diámetro.

El contenido en peso de cada bolsa una vez inoculada incubada y pesada se muestra en el (cuadro 4), donde se observa que no existe razón suficiente ($P = 0.05$) como para considerar que los pesos son diferentes en los tratamientos (Extracto de malta, Extracto de levadura y agua destilada). Esto es que los dos tratamientos en comparación con el testigo en el cual solo se empleo agua como diluyente micelial producen similares pesos de sustrato, crecimiento micelial, por lo tanto se considera que en base al peso de cada repetición, los tratamientos se comportaron como iguales. Por tal motivo se considera que el peso del sustrato micelio, proveniente del crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* no se ve afectado por el cofactor utilizado es decir, el peso del sustrato y el crecimiento del hongo, no se ve afectado por el cofactor en comparación con el testigo. Por lo tanto los cofactores no estimulan el rendimiento del micelio - esporas dado que la media (\bar{x}) del peso de las bolsas es semejante con o sin cofactor del crecimiento al menos estadísticamente ($P = 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza del peso de arroz, micelio- esporas obtenidos por cada cofactor de crecimiento a 32 días de incubación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	S	CV	X ± ES
TESTIGO	6	8.4071	0.0604	1.40± 3.759 a
EXT. LEVADURA	6	9.675	0.075	128.1± 4.351 a
EXT. MALTA	6	7.951	0.058	136.5± 3.555 a

***a** Cada uno de los tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares ($P=0.05$)

El análisis de varianza (Cuadro 5) nos comprueba que en los tratamientos no existe evidencia estadística como para considerar que son diferentes al testigo o que el comportamiento fue diferente en las distintas repeticiones del ensayo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza del contenido en peso del micelio, esporas- arroz por unidad experimental de producción.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADO	CUADRADO MEDIO	F. CALCULADA	P>F
COF'S. CREC.	2	338.687500	169.343750	1.7983	0.198
ERROR	15	1412.531250	94.168747		
TOTAL	17	1751.218750			

C.V = 7.20%

Recuperación del ingrediente técnico de *beauveria bassiana*.

Del crecimiento de *B. bassiana* BGC-I sobre el sustrato (arroz) se recuperó el micelio y los conidios raspando manualmente sobre un tamiz de .42 mm de diámetro. Al polvo recuperado se le denominó ingrediente técnico, al peso de este material se le analizó estadísticamente. Este ingrediente técnico contiene tanto micelio como esporas y restos de partículas de arroz (Cuadro 6). Se encontró que al evaluar los datos no existe evidencia suficiente como para considerar que los rendimientos de ingrediente técnico en cada uno de los cofactores sean diferentes en relación con el testigo, es decir que los rendimientos no se ven afectados (mayor producción) por el cofactor, se acepta por lo tanto que son iguales.

Cuadro 6. Datos de ingrediente técnico obtenido por unidad experimental de cada cofactor de crecimiento a 32 días de incubación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	S	CV	X± E S *
TESTIGO	6	1.424	0.2495	5.7 ± 0.638 a
EXT. LEVADURA	6	1.954	0.4157	4.7 ± 0.876 a
EXT. MALTA	6	2.3218	0.448	5.2 ± 1.0383 a

*a Cada uno de los tratamiento pertenecen al mismo grupo estadístico (P=0.05)

* Gramos de ingrediente técnico/ bolsa de arroz.

El análisis de varianza muestra que estadísticamente entre los tratamientos no haya evidencia como para considerarlos como diferentes, (P= 0.05) se comportan por lo tanto de manera similar.(Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza del ingrediente técnico obtenido por cofactor de crecimiento por unidad experimental a 32 días de incubación.

F. DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADO	CUADRADO MEDIO	F. CALCULADA	P>F
COF. CREC.	2	3.041962	1.520981	0.4637	0.643
ERROR	15	49.206360	3.280424		
TOTAL	17	52.248322			

CV =34.86%

Producción de conidios de *Beauveria bassiana*.

Al igual que los rendimientos obtenidos en ingrediente técnico, el contenido de este en cuanto al número de conidios presentes se cuantifico en este mediante el conteo en una cámara de Neubauer, se obtuvo que no existe diferencia estadística significativa en el contenido de conidios por gramo. (Cuadro 8). Por lo que los rendimientos de estos son semejantes en los tres tratamientos. No existió un evento estimulativo por parte de los cofactores para incrementar los niveles de conidios producidos en comparación con el testigo al cual solo se le agregó agua, se acepta por lo tanto que son idénticos, el número de conidios presentes en los tratamientos.

Cuadro 8. Concentración de conidias de *Beauveria bassiana* BCG-I por miligramo de peso obtenidas por cofactor de crecimiento a 32 días de incubación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	S	CV	X ± E S *
TESTIGO	6	10.764	1.281	8.40 ± 4.813 a
EXT. LEVADURA	6	1.6394	0.5177	3.16 ± 0.7331 a
EXT. MALTA	6	2.41091	0.6088	4.12 ± 1.782 a

* 1×10^5 conidios/ mg

a Grupos con la misma letra son iguales estadísticamente (P= 0.05)

De lo anterior se puede deducir que los cofactores de crecimiento de extracto de malta, el extracto de levadura no incrementan los rendimientos en peso del hongo la cepa de *Beauveria bassiana* BGC-I y que por consiguiente el sustrato utilizado (arroz) fundamentalmente fue utilizado como fuente de Carbono y Nitrógeno para el crecimiento del hongo.

Análisis de los rendimientos de *B. bassiana* a 14 días de incubación.

Se encontró que existe una producción similar en cuanto a rendimientos en peso de gramos de micelio - arroz, cantidad de ingrediente técnico (Polvo obtenido de la separación del micelio – esporas del soporte de crecimiento) y del contenido o producción de conidios producidos en el segundo experimento de incubación de *Beauveria bassiana* BGC-I a 14 días de incubada en el sustrato de producción (bolsas de arroz). Para estas tres variables, se encontró que no existe evidencia estadística (P=0.05) que permita separar a los rendimientos de conidios, o ingrediente técnico, como diferentes al testigo debido a que produjeron rendimientos semejantes estadísticamente, se acepta por lo tanto como iguales.

Cuadro 9. Datos de número de conidios producidos de *Beauveria bassiana* BGC-I por cofactor de crecimiento a 14 días

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	S	CV	X± E S*
TESTIGO	4	2.9021	0.682	4.25± 2.9021 a
EXT. LEVADURA	4	2.247	0.696	3.225± 1.297 a
EXTT. MALTA	4	2.4056	1.000	4.0325±1.3889 a

* 1×10^5 conidios /mg

a Correspondiendo al mismo grupo estadísticamente son similares (P=0.05)

Se encontró por lo tanto que no es necesario incubar mas de catorce días las bolsas de arroz de producción de conidios de *B. bassiana* tal y como se hace actualmente, dado que la producción de estos puede estar definida a los catorce días de incubación o antes de este tiempo, siempre y cuando se inocule el sustrato de producción con micelio de *B. bassiana* producido en un medio liquido e inoculando el sustrato de soporte en bolsas de arroz en proporción al 10% basándose en el peso del sustrato.

También es de resaltar que los cofactores de crecimiento empleados como estimulantes de la formación de conidias (Extracto de levadura, Extracto de malta) no incrementan significativamente las conidias que se producen en el sustrato de producción (bolsas de arroz) en comparación con el testigo en el que se empleo agua destilada estéril como diluyente micelial.

Pruebas de patogenicidad.

Se confirmo que el hongo aislado *Beauveria bassiana* GC-I mostró patogenicidad entre los 7 y 10 días de haber impregnado hormigas (*Atta mexicana*) en una solución de ingrediente técnico a razón de 2mg/ml comprobando la patogenicidad del hongo por micosis externa o crecimiento del hongo en las hormigas. Sin embargo, no se observo efecto en tiempo y apariencia de la micosis entre los tratamientos extracto de levadura y extracto de malta, en comparación con el testigo, por lo que consideramos

que no hay efecto marcado en patogenicidad, pérdida o incremento de esta por el uso del cofactor de crecimiento o por su ausencia.

CONCLUSIONES

Se aisló una cepa de un hongo entomopatógeno que pertenece a la especie de *Beauveria bassiana* de una larva muerta y con micosis superficial externa de color blanco, sus características.

Esta cepa manifestó crecimiento rápido en el medio (SDA). Al propagarlo en substratos tradicionales (arroz) impregnados con dos diferentes cofactores de crecimiento (Extracto de Malta y Extracto de Levadura). Se encontró que estos no estimulan la producción de micelio, ni la de producción de conidias encontrando que el hongo se manifiesta en su patogenicidad de manera similar en hormigas arrieras (*Atta Mexicana*), al ser impregnadas por inmersión en una solución de conidios de *Beauveria bassiana* BGC-I, no manifestándose diferencias en patogenicidad en los tratamientos empleados, ni en los tiempos de incubación usados.

Al demostrar la patogenicidad de los conidios producidos de *B. bassiana* BGC-I, no se encontró un efecto marcado dependiendo del cofactor sobre su viabilidad y virulencia sobre hormigas del género *Atta sp.*

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Academia Nacional de Ciencias. 1988. Control microbiano de insectos. In: Control de plagas de plantas y animales. Ed. LIMUSA. México. D.F. 189-219.
- Ainsworth, G.C. 1973. Introduction any keys to higher taxa. En. Ainsworth, G.C. Sparrow, F.K, Saussan, A.S. The fungi an advaneed trestisc New York Academic Press Inc. Vol. IV A. 621pp.
- Alatorre, R.R.1999. Hongo Entomopatógenos. X Curso de Control Biológico. Colegio de Postgraduados Montecillos Estado de México. pp 137-145.
- Barnett, H. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi Burgess Publishing Co Minnesota USA. pp. 90--97.
- Berlanga, P. A. M^a. 1997. Aislamiento, Identificación de Hongos Entomopatógenos. Memoria. II Curso Taller de Producción de Agentes de Control Biológico.
- Biosol de México, 1998. Boletín técnico Producción de Hongos Entomopatógenos. Culiacán, Sinaloa.
- Bio-Zentla, 1998. Bb (*Beauveria bassiana*). Laboratorio Reproducción de Hongos entomopatógenos de Zentla. Huatusco, Veracruz.
- Burges, H.D. 1981. Microbial control of pest and plants of diseases. 1ra edition. Academic press London. pp. 93-102.

- Burges, H.D. and N.W. Hussey. 1971. Microbial Control of Insects and Mites. Published by Academic Press INC. New York.
- Bustillo, A.E 1989. Utilización de Agentes microbiológicos. Capítulo 13. Pp. 211 –228.
- Andrew, K. L y J. R. Quezada. 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura (Estado Actual y Futuro) Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras Centroamericano 623. p 196.
- Carruthers, R.I. and A.J. Sawyer y K. Hural. 1991. Use of fungal pathogeny for biological control of insect pests. En: Sustainable Agriculture Research and Education in the Field. Aproceeding Nacional Academic Press, Washington. P. 336-372.
- Casamayor, A. 1998. Control Microbiano de las Plagas. Instituto Albert Einstein. Venezuela. [Http://www.lacapitalnet.com.or/agustinc/feria.htm](http://www.lacapitalnet.com.or/agustinc/feria.htm).
- Castelan, H.C. 1999. Efecto de Entomopatógenos en Laboratorio con *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Paecilomyces fumosoroceus*, contra el picudo de la yema del manzano, *Anphidees latifrons* en Arteaga Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.
- Centro Nacional de Control Biológico. 1999 Ficha técnica. CB-03. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Dirección General de Sanidad Vegetal CNRCB y CNRF.
- Centro Nacional de Control Biológico. 1999 Ficha técnica. CB-04. Hongos Entomopatógenos para el combate de gallina ciega (Coleoptera Melolonthidae). Dirección General de Sanidad Vegetal CNRCB y CNRF.
- Coppel, H. O. R. and H. W. Martins. 1977. Biological Insects Pest Suppresions. 1ª Edition. Edit Springer Verlang, Germany. pp. 130-158.

- Cheung, P.Y.K y E.A. Grula.1982. In vivo Events Associated with Entomopathology of *Beauveria bassiana* for the Corn Earworm *Heliothis zea* J. Invertebr. Pathol. (39) 303-313.
- De Bach, P. 1985. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Décima segunda impresión. CIA Editorial Continental, México. pp. 616 – 734.
- De la Garza, G. J. L. 1996. Fitopatología general. UANL. Monterrey, Nuevo León.
- 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 Maestría. Univ. Autónoma Chapingo. Chapingo Méx. 100.
- Deacon, J.W. 1988. Introducción a la Microbiología Moderna, Editorial Limusa, S.A de C.V. México D.F. 313.
- Días, C. G. 1996. Plagas de Sorgo en el Bajío. SARH INIFAP. Folleto técnico N° 3.
- Domsch, K.H; Gams, W. And Anderson, T- H. 1980. Compendium of soil fungi. Vol.2 Gran Bretaña, Ltd. Academic. Press.
- Ennis, J. 1996. Nuevos Ejércitos para combatir las plagas. Productores de Hortalizas. p. 6.
- Espiricueta, M. P. 1997. Efecto de aplicaciones conidiales de *Beauveria bassiana* (Bal.) Vuill. Sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* (BODDIE), y su Relación con el rendimiento de Maíz en Buenavista Saltillo, Coah. Tesis, Maestría UAAAN.

- Ferron, P and Robert, H. P.1975. Virulence of entomopathogenic fungi (fungi imperfecti) for the adults of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidea) J. Invertebr. Pathol. 25: 379-388.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. USA. 23:409-472.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, In microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. Burges, H.D. (Ed) Academic Press. pp. 3-13.
- Ferron, P. 1985. Pest control En: Comprehensive insect, physiology biochemistry and pharmacology kerkut GA y Gilber, L. I (ed) Academic Press, Toronto. p. 315.
- Fuxa, J.R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Ann. Rev. Entomol. (32) 225-251.
- Garza, G. E. 1992. Control microbiológico de mosquita blanca. Métodos de control de mosquita blanca en hortalizas. SARH. Dirección General de Sanidad Vegetal. CNRCB. Universidad Autónoma de California, Mexicali, B.J. pp. 99-110.
- Gilchrist, S. L., D. G. Fuentes, C. C. Martínez. 1995. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Programa de trigo. México D.F. CIMMYT.
- Glare, T. R. 1992. Fungal pathogens of scarabs pp 63-77, In; Jackson T.A & T.R. Glare (eds) Use of pathogens in scarab pest management intercept Gran Bretaña. p 298.

- Goettel, M. S. 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic hypomyces fungi In: Rev. Of Aool. Entomol. USA. (Series A) 1985. 73 (8): 668.
- González, G. E., M. L. Reyes, E. F. J Robles. 1998 Control Microbiano de Plagas Agrícolas con Hongos. INIFAP. CREROB. Fundación PRODUCE Aguascalientes.
- Guevara, M. M^a. M. 1977. Bioensayos Preliminares de la Muscardina Verde *Metarhizium anisopliae* (Metch) Son. Para determinar su eficiencia contra el Complejo Mosca Pinta. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autonomía de Nuevo León. pp. 3-10.
- Hajek, A. E. and J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Ann. Rev. Entomol. Ithaca- New York. 34: 17-52.
- Hanako, R G., P. M. P. Méndez. 1998. Boletín informativo. *Beauveriana*- CP Insecticida Biológico. Unidad reproductora de hongos entomopatógenos. Córdoba, Ver.
- Hayden, T.P, Bidochka, M.J. and Khachatourian, G.G. 1992. Entomopathogenicity of several fungi toward the english grain aphid (Homoptera Aphididea) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. J. Econ. Entomol. (85) 58-64.
- Hernández, V. V. M. y A. M. Carrillo. 1997. Producción Masiva en Sustrato Sólido y Formulación de Hongos entomopatógenos. Memoria. II Curso Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Biológico Tecoman. pp. 31 – 40.
- Hernández, V. V. M., P. A. M^a. Berlanga. 1996. Control Microbiano con Hongos Entomopatógenos. Memoria. II Curso de Actualización en Control Biológico. Tecoman, Colima. Mayo. pp. 94-106.

- Ignoffo, C. M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide En: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Burgues. H.D (ed.) Academic Press, NY. pp. 541-580.
- Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens Fla. Entomol. 75 (4) 516-525.
- Kucera, M. 1971. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana* effect of nitrogen sources of formation of the toxic protease in submerged culture. J. Invertebr. Pathol. (17): 211-215.
- Kucera, M. And Sansinakova, A. 1968. Toxins of the entomophagous fungi *Beauveria . bassiana* J. Invertebr, Pathol. (12): 316-320.
- Kuno, K. J. M. y M. Hernández. 1982. Patología de insectos. Universidad del Valle, 2ª ed Cali, Colombia. p. 212.
- Lefebvre, C. L. 1931. Preliminary observations on two species of *Beauveria bassiana* Attacking the corn Borer *Pyrausta nubilalis* Humber, Phytopathol . 21. 1115-1128.
- Lezama, G. R. y O. J.. Molina. 1997. Epizootiología de Agentes de Control Biológico Tecoman, Colima. 9 – 11. pp. 10 – 17.
- Lezama, G. R., O. J. Molina, R. M. González. 1986. Conceptos básicos de Control Microbiano de insectos. Memoria. II Curso de Actualización en Control Biológico. Tecoman, Colima. Marzo. pp. 88-93.
- Lezama, G.R. 1991. Comunicación personal. Universidad de Colima (CUIDA). Tecomán, Col.

- Marcandier, S. and Khachatourians, G.G. 1987. Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (FAB) (Orthoptera: Acrididae) to *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Hyphomycete) Influence of relative humidity. Can. Ent. 119: 901-907.
- Martignoni, E.M. 1985. Producción masiva de patógenos de insectos. In: Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. De Bach, P. (Ed), México. D.F. 679-713.
- McCoy, R. A., Samson and D. G Boucias. 1988. Entomogenous In Burges HD (ed.) Microbial control of pests.
- Méndez, A.F. 1990. Manejo Integrado de plagas de caña da acucar. Conf de Misión de Asist. Tec. A Honduras y México. P. 8.
- Méndez, L. I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del caféto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolitidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas. Tesis Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Méndez, M. P. y S. G. H. Rosas. 1978. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* como una alternativa de control de termitas. Memoria. XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Río Bravo, Tamaulipas.
- Mendoza, A.F. 1988. Innovaciones tecnológicas en la producción del hongo *Metarhizium anisopliae* utilizando bolsas plásticas. II Jornada Int. De la lucha biológica en el cultivo de la caña de azúcar. Palacio de Convenciones. Habana, Cuba (Resumen).
- Metcalf, y R. L. W. H Lauckmon. 1990. Introducción al manejo de plagas e insectos, primera edición. Editorial LIMUSA.

- Morón, M. A. 1983. Introducción a la biosistemática y ecología de los melolonthidae edafícolas de México (Ins, Coleoptera) En; Memoria Segunda mesa redonda sobre plagas del suelo, Chapingo, México SIME- CENA- CP, México pp. C1-C14.
- Nájera, R. H. B. 1993. Coleópteros rizofagos asociados al maíz de temporal del estado de Jalisco, México. Identificación, ecológica y control pp 143-154 En; Morón M.A (compilador) Memoria de la IV mesa redonda sobre plagas subterráneas. Xalapa . Ver. p. 261.
- Nucles, E.M and Kuc, C. 1994. Use of a Hemocytometer. Laboratory Plant Pathology. APS Press App 3-1.
- Olivares, S.E. 1993. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.4 Facultad de Agronomía UANL. Marín. N.L.
- Pineda, G.S. 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith y *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Como alternativa para el manejo de la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Tesis de Maestría en Entomología y Acarología. Montecillos , Estado de México.
- Ramos, G. J. L., M. L. Reyes. 1988. Control Microbiano de Plagas Agrícolas con Hongos. Boletín informativo No. 28 INIFAP, Secretaria de Agrícolas, Ganadería y Desarrollo Rural, Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental Pabellón Aguascalientes.
- Rebollar, T. E. A. 1991. Aspectos fisiológicos y bioensayos de Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin Hacia larvas de tercer estadio *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Tesis. UANL Monterrey Nuevo León. p. 47.

- Roberts, D.W. 1981. Toxins of Entomopathogenic fungi In Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980 . In Bures, H.D. (ed), Academic Press, London, New York 441-464.
- Roberts, D. R. and J.R. Aist. 1984. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenic site. J. Fargues. Infection Processes of fungi. The Rockefeller Foundation. USA.
- Roberts, D.W. 1989. World picture of biological control of insect by fungi. Mem. Int. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro Vol. 84, Supl. III pp 89-100.
- Roberts, W.D.; Fuxa, R.J.; Gaugler, R. Goetell, M.; Jaques, R. and Maddox, J. 1991. Use of pathogens in insect control. In: Handbook of pest management in agriculture, 2nd ed. Vol. 2. D. Pimentel, D. (ed), CRC. Press, Boca Raton, FL. 243-278.
- Rodríguez, B. L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* (Burmeister); Historia de una plaga del suelo (1955-1988) pp. 53-80. Memoria. III mesa sobre plagas del suelo, México.
- Rombach, M. C., R. M. Aguda, B. M. Shepard and D.W. Roberts. 1986. Entomopatogenic fungi (Deuteromicotina) in the control of the black bug of the rice *Scotinophara coartata* (Hemipterta; Pentatomidae) J. Of Invert Pathology. pp. 174-179.
- Rosas, S. G. 1994. Sensibilidad y Rapidez de Mortalidad de *Oebalus mexicana* (Sailer) En cuatro Estados Biológicos, Contra 11 Aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hiphomicetes: Moniliales). Tesis de Licenciatura Fitotecnia Instituto de Ciencias Agrícolas Irapuato Universidad de Guanajuato. pp. 3- 13.

- Sánchez, M; Méndez, E.T. y Almazán, O. 1993. Comportamiento de un biopreparado en polvo de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotyna: Hyphomycetes) durante el almacenamiento. Rev. Lat. Amer. Microbiol 35: 59-63
- Smith, C. M. 1994. An overview of the mechanisms and bases of insect resistant maize. Recent advances and utilization Centro Internacional de Mejoramiento en Maíz y Trigo (CIMMYT). México. p. 3.
- Starnes, R. L., Liu, Ch. L. and Marrone P.G. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. American Entomolol. USA. (39): 83-90
- St. Leger, R; Hajek, A.E.; Staples, R.C. and Roberts, D.W. 1992. Fungi for the biocontrol of insects: Tools and trends. In Molecular biology of filamentous fungi. Tudzynski, P. y Stalil, O (eds), UCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinheim, FRG. 1-16
- Steinhaus, E.A. 1956. Producción masiva de patógenos de insectos. In: Control Biológico de insectos y malas hierbas. De Bach P. México D.F. pp 679-713.
- Subramanian, C.V. 1971. Hyphomycetes, Vol. I Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- Tanada y Kaya, H.K. 1993. Insect Pathologu. San Diego, Academic Press. Tecoman, Col. Abril. pp. 18-30.
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pest of corn in Mexico. pp. 253-260. In Jackson T.A & T.R Glare (eds.) Use of pathogens in scarab pest management intercep Gran Bretaña. p. 258.

Woods, P.S. and Gula, A.E. 1984. Utilizable surface nutrients on *Heliothis zea* available for grow on *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. (43): 259-269.