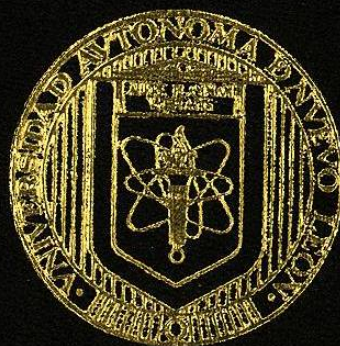


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



EMPLEO DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATOGENOS
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MOSCA
DOMESTICA (MUSCA DOMESTICA)

T E S I S

QUE EN OPCION AL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A

M. V. Z. JUAN JOSE ZARATE RAMOS

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE 1997

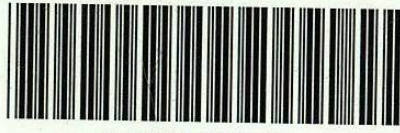
TM

Z5320

FCB

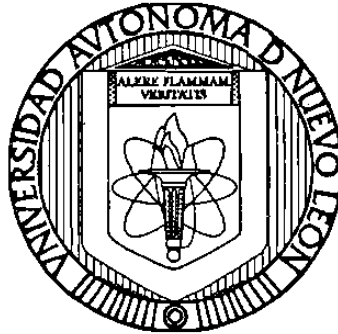
1997

Z3



1020121315

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EMPLEO DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATOGENOS PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE LA MOSCA DOMESTICA (*MUSCA DOMESTICA*)**

T E S I S

**QUE EN OPCION AL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

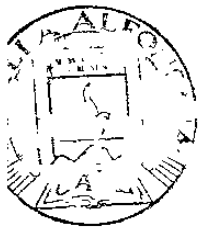
**P R E S E N T A :
M. V. Z. JUAN JOSE ZARATE RAMOS**

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE DE 1997

TM
25320
FCB
1997
23

0131-19360



FONDO TEG.S

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Empleo de microorganismos entomopatógenos para el control biológico de mosca
doméstica (*Musca domestica*)

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

PRESENTA

M.V.Z. JUAN JOSE ZARATE RAMOS

MONTERREY, N.L., NOVIEMBRE DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TITULO

Empleo de microorganismos entomopatógenos para el control biológico de mosca
doméstica (*Musca domestica*)

TESIS QUE EN OPCION A TITULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

M.V.Z. JUAN JOSE ZARATE RAMOS

COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE



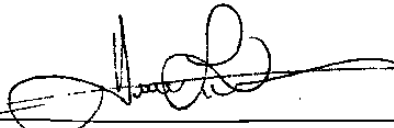
DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA

SECRETARIO



DRA. ADRIANA ELIZONDO HERRERA

VOCAL



M.C. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

MONTERREY, N.L., NOVIEMBRE DE 1997

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todas las facilidades para la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco al Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y al Laboratorio de Central de Diagnostico Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L.

Mi más sincero agradecimiento a mi Directora de Tesis la Dra. Patricia Tamez Guerra por su gran disposición y valiosos consejos para la elaboración del trabajo.

A la Dra. Adriana Elizondo Herrera y al M.C. Hugo Alberto Luna Olvera, por su constante apoyo y sus valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.

Al Dr. Roberto Lezama Gutiérrez por sus invaluable aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta Tesis.

DEDICATORIA

A DIOS: Por que hasta en los momentos mas difíciles de mi vida me ha brindado muestras claras de su existencia.

A mis abuelos: Juan Zárate Reyes por enseñarme los mas finos secretos del trabajo.

Ma. del Refugio Santos[†] por brindarme su cariño.

Florentino Ramos Gallardo[†] por inculcarme su cariño hacia todos los seres vivientes y compartir conmigo su gran conocimiento.

María Martínez de Ramos[†] por su ejemplo de dedicación.

A mis padres: José Angel y América por brindarme la vida, por darme lo mejor de ellos, por compartir las alegrías y las tristezas y por lo que me han enseñado.

A mi esposa e hijas: Nilda, Carolina e Itzel, por ser mi mayor inspiración.

A mis hermanos: Aracely, Miguel Angel y Lorena por compartir conmigo los mejores momentos de mi vida.

A mi tío: Humberto Rizzi, por ser un ejemplo de dedicación, empeño y sabiduría.

A mis amigos: Ramiro Avalos, Ricardo García, Luis Jorge García, Jaime Hernández, Daniel Miller, Francisco Santoyo, Sergio Temblador, Josefina García, Luis Rodríguez, Jorge Kawas, Roque Ramírez, Alicia Nevarez, Guillermo Dávalos, Mario Guzmán, Martha Garza, Rogelio Ledezma, Victor Riojas, Rodolfo Niño, Francisco Picón, Nancy Reina, Claudia Salinas, Kaleph Cardenas y Juvel Hernández.

Y de manera muy especial a mi alumno y amigo, Ernesto Landeros Villegas[†]

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE	iii
Lista de tablas	Vi
Lista de figuras	Vii
RESUMEN	Viii
I INTRODUCCION	1
II HIPOTESIS	5
III OBJETIVOS	5
IV ANTECEDENTES	6
1 Clasificación taxonómica de <i>M. domestica</i>	6
1.1 Ciclo evolutivo.....	6
1.2 Transmisión de patógenos.....	7
1.3 Moscas eusinantrópicas.....	7
1.4 Moscas endofílicas.....	8
2 Alternativas de control para moscas endofílicas	8
2.1 Plantas entomopatógenas.....	8
2.2 Depredadores vertebrados.....	9
2.3 Insectos predadores.....	9
2.4 Hongos entomopatógenos.....	10
2.5 Bacterias entomopatógenas.....	10
2.6 Agentes vírales.....	10
3 Hongos entomopatógenos	11
3.1 Ventajas y deventajas en el uso de hongos entomopatógenos.....	12
3.2 El hongo entomopatógeno <i>Metarhizium</i>	13
3.3 Insectos hospederos de <i>M. anisopliae</i>	14
3.4 Mecanismos de infección.....	14
3.5 Producción de metabolitos.....	16
3.6 Toxinas producidas por los hongos entomopatógenos.....	16
3.7 Condiciones ambientales para la reproducción.....	17
3.8 Patogenicidad, virulencia y agresividad.....	18
3.9 El hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	19
3.10 Hospederos.....	20
3.11 Mecanismos de infección.....	21
3.12 Síntomas.....	23
4 Bacterias entomopatógenas	24
4.1 La bacteria entomopatógena <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
4.2 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
4.3 La bacteria entomopatógena <i>Bacillus sphaericus</i>	26

4.4 Toxinas de <i>Bacillus sphaericus</i>	26
V MATERIAL Y METODOS	28
5 Establecimiento de la colonia de <i>Musca domestica</i>	28
5.1 Dietas para larvas y adultos.....	29
5.2 Preparación de la dieta para larvas.....	30
5.3 Selección de la dieta utilizada en el trabajo.....	30
5.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos con dietas artificiales.....	32
5.5 Mantenimiento de la colonia.....	32
6 Obtención de cepas de hongos entomopatógenos	33
6.1 Propagación de los hongos.....	34
6.2 Titulación de conidios.....	35
6.3 Cuantificación de conidios.....	35
6.4 Reproducción de los insectos.....	35
6.5 Bioensayos.....	36
6.6 Análisis estadístico.....	37
7 Obtención de cepas bacterianas	37
7.1 Aislamiento de bacterias esporuladas (<i>Bacillus ssp.</i>).....	38
7.2 Identificación de cepas.....	38
7.3 Dieta para el bioensayo.....	39
7.4 Bioensayos para medir actividad tóxica de aislados y cepas de colección de <i>B. thuringiensis</i> sobre larvas de tres días de <i>M. domestica</i>	39
7.5 Selección preliminar de los aislados.....	40
VI RESULTADOS	41
8 Evaluación de dietas para la cría de <i>M. domestica</i>	41
9 Actividad tóxica de hongos entomopatógenos	42
9.1 Actividad tóxica de <i>Beauveria bassiana</i>	42
9.2 Actividad tóxica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	43
10 Evaluación de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	45
10.1 Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i>	46
10.2 Actividad tóxica de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas.....	48
VII DISCUSION	49
VIII CONCLUSIONES	53
IX. BIBLIOGRAFIA	54

Lista de tablas

	Páginas
Tabla 1 Componentes específicos de cada una de las dietas para larvas	31
Tabla 2a Origen de las cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Tabla 2b Origen de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	34
Tabla 3 Cepas HD utilizadas en el trabajo.....	38
Tabla 4 Resumen global de los porcentos de eclosión, pupación y emergencia.....	41
Tabla 5 Resumen global de los parámetros de pesos y medidas.....	42
Tabla 6a Por ciento de mortalidad de larvas de tres días de <i>M.domestica</i> a 12 días de inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> , a una dilución de 1×10^7 conidias/ml.....	43
Tabla 6b Por ciento de mortalidad de larvas de tres días de <i>M.domestica</i> a 12 días de inoculados con <i>Metarhizium anisopliae</i> , a una dilución de 1×10^7 conidias/ml.....	43
Tabla 7 Porcientos de emergencia de adultos, a 14 días de inoculados con suspensiones de esporas de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i> sobre larvas de tres días de <i>M. domestica</i>	44
Tabla 8 Porcientos de mortalidad a las 72 h en larvas de 3 días de <i>M. domestica</i> utilizando cepas HD.....	46
Tabla 9 Cepas de <i>Bacillus</i> aisladas.....	46
Tabla 10 Características de los aislamientos.....	48
Tabla 11 Por ciento de mortalidad a las 72 h en larvas de 3 días de <i>M. domestica</i> utilizando las cepas con esporas y cristales.....	48

Lista de figuras

	Páginas
Figura 1 Estructuras morfológicas del hongo <i>Metarhizium sp.</i>	14
Figura 2 Estructuras morfológicas del hongo <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	20
Figura 3 Ciclo de infección de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.)Vuill.....	22
Figura 4 Jaula para la cría de insectos.....	29
Figura 5 Dieta y bebedero para insectos adultos.....	30
Figura 6 Recipiente empleado para la cría de larvas.....	33
Figura 7 Cepas bacterianas aisladas y recipientes utilizados en los bioensayos.....	40
Figura 8 Secuencia de eventos en la infección de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de tres días de <i>Musca domestica</i>	44

RESUMEN

Las infestaciones por miembros del Orden Díptera, tanto en los animales domésticos como en el ser humano, son de gran importancia debido a las pérdidas económicas que conlleva, al provocar la disminución del rendimiento de productos y subproductos de origen animal. Un ejemplo de lo anterior es las pérdidas de alrededor de 730 millones de dólares que anualmente causa a la industria ganadera en los Estados Unidos.

Por otro lado es un transmisor comprobado de más de 30 virus, 175 bacterias, 8 especies de espiroquetas, 3 rickettsias, 19 hongos, más de 30 protozoarios y numerosos helmintos. Debido a esto se ha tratado de controlar la infestación por este insecto. Recientemente se ha probado el empleo del control biológico como alternativa.

A nivel nacional, existen pocos trabajos sobre alternativas de control biológico contra la mosca doméstica utilizando microorganismos, lo cual ha creado una necesidad por desarrollar trabajos de investigación en esta área. Los candidatos a ser estudiados son principalmente bacterias del género *Bacillus*, así como hongos entomopatógenos, ya que por su potencial y características de producción, constituyen una buena alternativa para el control de tales insectos, además de permitir la posibilidad de desarrollar una tecnología adecuada a nivel de campo, y que ésta pueda ser aplicada en las distintas explotaciones pecuarias existentes en nuestro país.

El presente trabajo tubo como objeto el evaluar la virulencia de 11 cepas de *Metarhizium anisopliae* y 10 de *Beauveria bassiana*, sobre larvas de tres días de *Musca domestica* en condiciones de laboratorio.

Se encontró en un primer experimento, que todas las cepas evaluadas de *M. anisopliae* y de *B. bassiana* mostraron actividad. Sin embargo las cepas de *M. anisopliae* fueron mejores que las de *B. bassiana* puesto que la cepa *Metarhizium* con menor actividad presento un 57 % de mortalidad en comparación con la mejor cepa de *Beauveria* que presento un 76 % de mortalidad en ambos casos utilizando una dilución de esporas de 1×10^7

Luego de seleccionar las tres cepas con mayor porcentaje de mortalidad de ambos géneros, se realizo un segundo bioensayo para determinar la LD₅₀ y el porcentaje de emergencia de insectos adultos luego de la exposición a diferentes suspensiones acuosas de esporas. Los resultados mostraron que las LD₅₀ para las cepas de *Metarhizium* fueron, para Mr 17 de $1 \times 10^{4.5}$, Mr 10 de $1 \times 10^{4.7}$, Mr 2 de $1 \times 10^{4.3}$ y para las cepas de *Beauveria* fueron en el caso de Bb 12 de $1 \times 10^{7.3}$, Bb 3 de $1 \times 10^{7.9}$ y Bb 2 de $1 \times 10^{6.4}$ con esto se concluye que a nivel de laboratorio, el hongo *Metarhizium anisopliae* tiene potencial como agente de control biológico para la *M. domestica* sin embargo es necesaria su evaluación a nivel de campo.

I. INTRODUCCION

Las infestaciones por miembros del Orden Díptera, tanto en los animales domésticos como en el ser humano, son de gran importancia debido a las pérdidas económicas que conlleva, al provocar la disminución del rendimiento de productos y subproductos de origen animal (Geden *et al.*, 1990; Bull y Pryor, 1991). La forma en que los dípteros impactan en la producción pecuaria es muy diversa. Algunos lo hacen de manera directa al alimentarse de los tejidos y/o secreciones del animal, realizando incluso parte de su ciclo biológico en el hospedero, lo cual provoca un daño franco en el animal (Leaning y Guerrero, 1987; Knapp *et al.*, 1992; Quiroz, 1990; Urquhart, 1987; Foreyt, 1990; Vera y Domínguez, 1985). Un ejemplo de lo anterior es el caso de *Haematobia irritans*, la cual causa pérdidas de alrededor de 730 millones de dólares anualmente a la industria ganadera en los Estados Unidos (Knapp *et al.*, 1992). Otros lo hacen de manera indirecta provocando “stress” en los animales, como es el caso de *Hypoderma bovis*, que en el estado adulto no se alimenta del animal y sólo utiliza el pelo de éstos como lugar de ovipostura. Posteriormente, al buscar posarse sobre él, le causa pánico, provocando que éste deje de comer (Urquhart, 1987). Lo anterior ha motivado un interés creciente por desarrollar alternativas de control eficaces, y que su impacto ecológico sea nulo (Lacey y Undeen, 1986, Porter *et al.*, 1993). Para hacer frente a este problema, se han desarrollado diferentes estrategias de control, dentro de las más comunes está el empleo de insecticidas químicos (Mc Govran y Piquett 1945; Langford *et al.*, 1954; Brindley y Selim, 1984; Forgash *et al.*, 1962); sin embargo, se ha visto la posibilidad por parte de los insectos, de

desarrollar resistencia a los mismos. (Harris *et al.*, 1982; Pimentel y Burgess 1985). Hablando en el caso específico de la mosca doméstica esta desarrolló resistencia hacia el DDT a partir de 1949 (Saito *et al.*, 1991).

Hablando más específicamente de esta última, y dada su capacidad cosmopolita, la mosca doméstica es un transmisor comprobado de la disentería (*Shigella* spp.), fiebre tifoidea y paratifoidea (*Eberthella typhosa*, *Salmonella paratyphi* y *S. schotemulleri*) y cólera (*Vibrio comma*). Por otro lado, hay fuertes evidencias de que este insecto está involucrado en la transmisión de la erupción cutánea causada por la espiroqueta *Treponema pertenue*, poliomielitis (virus de la polio), tuberculosis (*Micobacterium tuberculosis*), amibiasis (*Entamoeba coli*, *E. histolytica*) y giardiasis (*Giardia lamblia*); así como de varios helmintos (*Taenia* spp, *Ascaris* spp) (Cooler *et al.*, 1993). De hecho, se ha reportado que son más de 30 virus, 175 bacterias, 8 especies de espiroquetas, 3 rickettsias, 19 hongos, más de 30 protozoarios y numerosos helmintos los que están asociados a la transmisión mecánica por estos insectos (Vera y Domínguez, 1985). Es por esto la importancia que se ha dado a tratar de controlar la infestación por este tipo de insecto. Como se mencionó antes, se ha comprobando la resistencia de este insecto a químicos como el DDT, problema aunado a las características contaminantes para el medio ambiente que poseen la mayoría de estos compuestos. Por tal motivo, recientemente se ha probado el empleo del control biológico como alternativa.

Con respecto a esto último, existe diversas posibilidades, que van desde el empleo de microorganismos entomopatógenos (bacterias, hongos y virus); hasta organismos

depredadores naturales, tales como artrópodos parásitos (Atkins, 1978; Petersen y Meyer, 1983; Lacey y Undeen, 1986; Meyer *et al.*, 1990; Merchant *et al.*, 1985; Rojas, 1990; Scott *et al.*, 1991); y depredadores vertebrados, tales como patos y gallos, que en combinación con adecuadas medidas higiénicas reducen notablemente la población de mosca doméstica (Glofcheskie y Surgeoner., 1990; Rodríguez y Riehl, 1962). También se ha reportado el uso de extractos de plantas tales como *Azadirachta indica*, el cual contiene un compuesto análogo a la ecdisona, la cual produce alteraciones de la metamorfosis del insecto (Miller y Chamberlain, 1989; Rao y Nagasampagi, 1995). De los microorganismos entomopatógenos, los miembros del género *Bacillus*, específicamente *B. thuringiensis*, puede producir toxinas (β -exotoxina y δ -endotoxina) durante su desarrollo y/o esporulación, las cuales tienen actividad tóxica a insectos, principalmente dípteros y lepidópteros (Baumann *et al.*, 1991). Por otro lado, con respecto a los hongos entomopatógenos, los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Entomophthora* son los que se han mencionado tener actividad tóxica a este tipo de insectos (Barson *et al.*, 1994; Geden *et al.*, 1995).

A nivel nacional, existen pocos trabajos sobre alternativas de control biológico contra la mosca doméstica, utilizando microorganismos, lo cual ha creado una necesidad por desarrollar trabajos de investigación en esta área, los candidatos ha ser estudiados son principalmente bacterias del género *Bacillus* por un lado, así como hongos entomopatógenos, ya que por su potencial y sus características de producción, constituyen una buena alternativa para el control de tales insectos, además de permitir la posibilidad de

II. HIPOTESIS

- 1.-Es posible encontrar cepas autóctonas y alóctonas del género *Bacillus*, *Beauveria* y *Metarhizium* con actividad tóxica a estadios larvarios de *M. domestica*.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un bioensayo el cual permita medir la toxicidad de microorganismos entomopatógenos a *M. domestica* y buscar una forma que se ajuste a las necesidades de control biológico en campo.

Objetivos Particulares

- 1.- Desarrollar una dieta artificial, básica confiable y económica, para el cultivo de larvas de *M.domestica* a nivel de laboratorio, la cual permita medir el porcentaje de eclosión, pupación y emergencia de adultos.
- 2.- Aislar, identificar y/o seleccionar cepas autóctonas y alóctonas de hongos y bacterias en base a su capacidad bioinsecticida (LD_{50} y LD_{90}) a *M. domestica*.
- 3.- Estudiar la factibilidad económica de la producción y empleo de microorganismos para el control de *M.domestica*.

IV. ANTECEDENTES

1. Clasificación taxonómica de *M. doméstica*

La taxonomía de este insecto es la siguiente:

Reino..... Animal
Phylum..... Artropoda
Clase..... Insecta
Subclase..... Pterygota
Orden..... Díptera
Suborden..... Cyclorrapha
Familia..... Muscidae
Genero..... *Musca*
Especie..... *doméstica* (Salazar, 1981).

1.1 Ciclo evolutivo

La mosca doméstica pone de 100 a 150 huevos en una postura, la que realiza varias veces para llegar a un total de alrededor de 600 huevos. Las heces frescas de caballos constituyen el medio predilecto, pero puede hacerlo en heces de otros animales y del hombre o en otro tipo de materia orgánica, principalmente de origen vegetal. Los huevos son color crema, de 1 mm de largo, de forma alargada. La larva eclosiona en un periodo de 12 a 24 horas después de 3 a 7 días alcanza un tamaño de 10 a 12 mm. El cuerpo de la larva es puntiagudo anteriormente y ancho posteriormente. La distancia entre las dos placas estigmáticas posteriores es menor que el ancho de la placa y cada una presenta tres hendiduras. En el extremo anterior del cuerpo tiene un par de ganchos conectados con el aparato cefalofaríngeo. Durante el desarrollo larvario, suceden tres mudas y la pupa conserva la última; ésta es rígida y de color café. Permanece en el suelo y el desarrollo o metamorfosis tarda de 3 a 26 días, dando lugar a nuevos individuos. Después ocurre la

fecundación y se inicia un nuevo ciclo al comenzar la postura. El ciclo puede desarrollarse en 12 días en condiciones favorables. Las moscas no hibernan, pero los huevos, las larvas y las pupas pueden sobrevivir al frío del invierno (Quiroz ,1984; Vera y Domínguez., 1985). El número de larvas que se pueden criar en las excretas es muy alta; Herms encontró un promedio de 685 por libra de estiércol de caballo.

1.2 Transmisión de patógenos

Como sucede con otras moscas, el adulto de la mosca doméstica emerge de la pupa y se abre camino a través del medio en donde se desarrolló como larva; por lo anterior, el insecto se impregna fácilmente de restos de excremento y/o basura, condición que lo hace un peligroso portador de patógenos. Para dar una idea al respecto, ciertos investigadores han reportado que solo un espécimen es capaz de llevar en las patas, alas, cuerpo y partes bucales de 2 hasta 6 millones de bacterias.

El adulto es un organismo muy móvil que vuela y se para en basura, excrementos y alimentos, para reposar, ovipositar o alimentarse. Como solo puede ingerir líquidos, vomita ciertas sustancias con el propósito de licuar y absorber su propio alimento.

1.3 Moscas eusinantrópicas

En esta clasificación se agrupan aquellas moscas que habitan cerca de asentamientos humanos o lugares donde las personas se congregan como tiendas, restaurantes u otros lugares donde la materia fecal humana o animal se encuentre

disponible (Harwood y James, 1979; Vera y Domínguez, 1985). Esta clasificación a su vez se divide en moscas endofílicas y exofílicas de acuerdo a su relación con el ser humano.

1.4 Moscas endofílicas.

Este grupo de moscas dependen de desechos humanos y animales y la mosca doméstica constituye el mejor ejemplo. Tanto la mosca doméstica como la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* se asocian al ser humano, por lo que desde principios de siglo se empezó a desarrollar alternativas de control biológico, primordialmente introduciendo diferentes enemigos naturales en áreas donde estos insectos constituían un problema serio (Legner, 1995).

2. Alternativas de control para moscas endofílicas.

2.1 Plantas entomopatógenas.

La utilización de plantas como alternativa de control también se ha documentado. Es bien conocido el hecho de que Charles Darwin destinó gran parte de su tiempo al estudio de plantas que utilizan a los insectos como suplemento nutritivo. Dichas observaciones concluyeron con la publicación en el año de 1875 del libro “plantas insectívoras”.

Actualmente se conocen 500 especies de plantas fotosintéticas que utilizan compuestos orgánicos a partir de los insectos que atrapan, entre los cuales se encuentran diferentes géneros con distintos mecanismos de captura. (Evans, 1984). Existen otras

plantas que se utilizan como control biológico y su mecanismo difiere del anterior, puesto que se utilizan extractos químicos, que actúan como inhibidores de la alimentación del insecto, alternando los reguladores del desarrollo, en forma de antiovipositantes. El principal ingrediente activo de este tipo de plantas es un compuesto químico cuya estructura es similar a la ecdisona (Miller y Chamberlain, 1989).

2.2 Depredadores vertebrados.

Por otro lado, el planteamiento de control biológico selectivo utilizando aves domésticas como gallináceas, fue hecho por Rodríguez y Riehl (1962). En base a esto, recientemente se publicó un artículo en el cual se utilizaron patos Moscovy (*Cairina moschata*), como método de control de moscas domésticas, los cuales mostraron un aceptable mecanismo de control biológico en establos lecheros (Glofcheskie y Surgeoner, 1990).

2.3 Insectos predadores.

Dentro de los insectos predadores más utilizados en el control biológico de este tipo de insectos, se encuentran miembros del Orden *Coleoptera*. Sin embargo, el grupo mas numeroso lo constituyen individuos del Orden *Himenoptera*, los cuales reducen notablemente la densidad de estos dípteros, puesto que atacan etapas tardías del ciclo biológico, produciendo mas del 90% de mortalidad en estadios tardíos, como el de pupa. (Petersen *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990; Rutz y Axtell, 1980; Geden *et*

al., 1992; Merchant *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1991; Legner, 1995).

2.4 Hongos entomopatógenos.

Otras especies alternativas de control, utilizados de forma limitada, la constituyen hongos que afectan a larvas y a moscas adultas. Un ejemplo de este grupo de hongos lo constituye *Entomophthora*. (Legner, 1995). Por otra parte, Vuillemin sugiere que *Beauveria bassiana* puede ser compatible con las condiciones de producción de sistemas agrícolas y animales, esto lo convierte en un buen candidato para el control biológico de moscas domésticas (Geden *et al.*, 1995), al igual que *Metarhizium anisopliae*, también patógeno a este insecto (Barson *et al.*, 1994).

2.5 Bacterias entomopatógenas.

A pesar de que son muy escasos los reportes relacionados con bacterias con actividad tóxica a *M. domestica*, se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* con alta toxicidad atribuida a la β -exotoxina. Más recientemente se aisló una cepa con actividad larvicida, mostrando acción tóxica causada por la δ -endotoxina. (Hodgman *et al.*, 1993).

2.6 Agentes vírales.

Por su parte, las partículas vírales forman parte de otro grupo de agentes biológicos de control. Hasta el año de 1993, sólo se había reportado un virus tóxico a moscas domésticas, un Reovirus ARN icosaédrico, el cual se replica en el citoplasma de los hemocitos del hospedero (Moussa, 1978). También se ha reportado un baculovirus y,

dentro de este grupo de organismos, Cooler et al en 1993, reportaron una partícula viral, envuelta de forma oval, con doble cadena de ADN, asociado con síntomas de “Hiperplasia de las Glándulas Salivales (HGS)”. El efecto de este virus es una reducción importante del desarrollo ovárico, aspermia y oligospermia, lo cual redundo en un efecto negativo sobre los aspectos reproductivos del hospedero (Cooler *et al.*, 1993).

3. Hongos entomopatógenos

En términos generales, los hongos son eucariotes con nutrición heterotrófica obligada, ya que no presentan clorofila. Sus células, en una etapa de su ciclo biológico, se encuentran dentro de paredes celulares, además de producir algún tipo de esporas. Algunos autores los consideran como divisiones dentro del reino vegetal y la mayoría los ubican en el reino “Mycota” (Ville, 1977). La mayor parte de hongos entomopatógenos se localizan en la división Eumycota, que se caracteriza por no formar plasmodio y presentar fase asimilativa típicamente filamentosa (Ainsworth, 1973).

Existe una gran diversidad de hongos presentes en las clases *Oomycetes*, *Zygomycetes*, *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* y *Deuteromycetes* (MacCoy, 1990; Keller, 1991; Zimmermann, 1993). Los patógenos de la clase Deuteromycotina (*Beauveria*, *Metarhizium* y *Verticillium*), tienen gran cantidad de hospederos y en condiciones apropiadas causan grandes epizootias sobre poblaciones de plagas (Ferron, 1978). Con frecuencia se aíslan a partir de distintos insectos por ejemplo en el caso de *Metarhizium anisopliae*, su lista de hospederos incluye más de 200 especies de insectos, siendo la

mayoría de estos Coléopteros, de las familias Curculinidae, Elateridae y Scarabaeidae, mientras que las infecciones en Dípteros e Himenopteros son más escasas (Zimmermann, 1993). Estos microorganismos caracterizan por no formar células móviles y ser de estado imperfecto, existiendo órdenes que son motivos de investigación en la actualidad (Ferron., 1985).

El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas, se practica en los países como Brasil, Inglaterra, Francia, China y USA (MacCoy, 1990; Maniania, 1991; Zimmermann, 1993).

3.1 Ventajas y desventajas en el uso de hongos entomopatógenos

Ventajas:

- a) El inóculo no afecta a los demás seres vivos, son específicos para su hospederos, y no afecta a insectos benéficos.
- b) Son compatibles y se pueden aplicar junto con ciertos productos químicos.
- c) El insecto no desarrolla resistencia al hongo.
- d) Es de fácil reproducción a bajo costo.
- e) Su aplicación se realiza con los mismos equipos de los insecticidas.

Desventajas:

- a) El hongo debe ser viable e infeccioso.
- b) Su aplicación se debe de realizar cuando la plaga sea más susceptible a la enfermedad.

c) Lo específico de lo patógeno, ocasiona que en lugares que se interrelacionan varias especies de plagas no se controle satisfactoriamente un complejo entomológico (Hall, 1979; Mac Coy, 1990).

Actualmente ya se tiene formulaciones comerciales a base de hongos en varios países (Reinecke *et al.*, 1990 ; MacCoy, 1990 ; Goettel *et al.*, 1990 ; Rhodes, 1993 ; Riba y Silvy., 1993). Dentro de ellos, seis formulaciones a base del hongo *M. anisopliae*, tales como Biomex, Biocontrol, Combio, Metabiol, Metapol y Metaquino, en Brasil (MacCoy, 1990; Goettel *et al.*, 1990); Biotrol, en USA (MacCoy, 1990); BIO 1020, en Alemania (Reinecke *et al.*, 1990). Lo anterior, permite considerar la potencialidad de utilizar *M. anisopliae* dentro de programa de control biológico.

3.2 El hongo entomopatógeno *Metarhizium*.

El hongo *Metarhizium* es un Deuteromycete, que produce conidios en masa, en conidióforos libres. Los conidios son cilíndricos y miden de 5 a 8 micras de ancho y 10-14 de longitud. Hasta la fecha se tienen 6 especies bien definidas que son: *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *M. album*, *M. cylindrospora*, *M. guizhouense* y *M. pingshaense* (Rombach *et al.*, 1987; Zimmermann, 1993). Una descripción del mismo se presenta en la (Figura 1.)

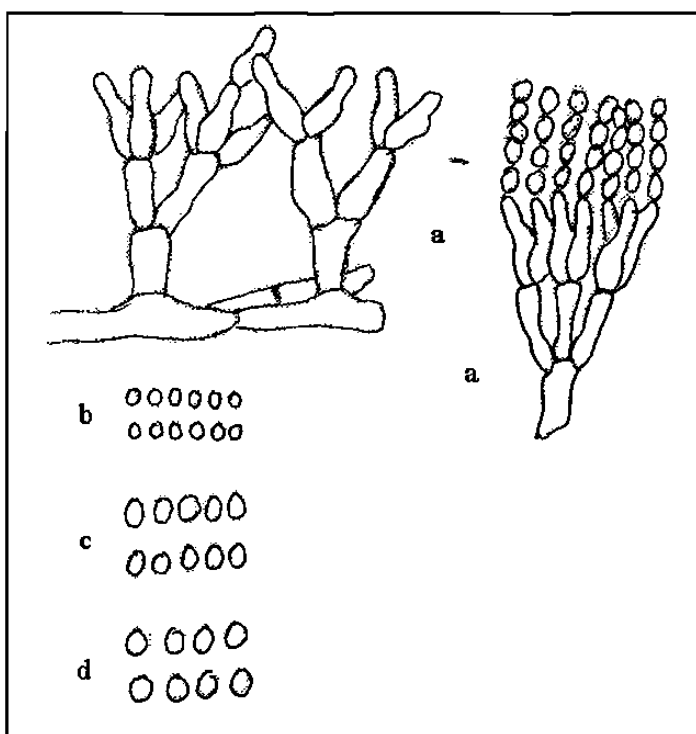


Figura 1. Estructuras morfológicas del hongo *Metarhizium* sp. a) conidióforos de *M. anisopliae*, b) conidias de *M. anisopliae* var. *anisopliae* o *minor*, c) conidias de *M. anisopliae* var. *major*, d) conidias de *M. flavoviride*.

3.3 Insectos hospederos de *M. anisopliae*

Este hongo parásita a 204 especies de insectos, dentro de los órdenes Orthópera (11 sp.), Dermáptera (1 sp.), Hemíptera (21 sp.), Lepidóptera (27 sp.), Díptera (4 sp.), Himenóptera (6 sp.) y Coleóptera (134 sp.) (Zimmermann, 1992; Zimmermann, 1993).

3.4 Mecanismo de infección

La infección del hongo sobre el insecto se inicia al adherirse el conidio, germinar y penetrar el tubo germinativo en la cutícula. La penetración de la hifa, a través de la epicutícula, se realiza por un doble proceso, uno enzimático y otro mecánico, actuando ambos en forma simultánea (El Sayed *et al.*, 1989; Fachino de Barros y Monteiro de

Barros., 1991).

La epicutícula está constituida por muchas capas. Cada una de ellas tiene características propias; la exterior es muy frágil, pero presenta resistencia a la degradación enzimática y evita el paso de enzimas degradadoras de la cutícula; está formada por lipoproteínas polimerizadas, estabilizadas mediante quinonas. Esta composición la hace dura, pero los hongos poseen enzimas degradadoras, que les permiten modificar la unidad estructural del hospedero. Además, el proceso selectivo o enzimático del hospedero, permiten degradar y asimilar los materiales del hospedero, utilizando su complejo enzimático quimoelastasa, quitinasas y lipasas (Roberts, 1981; Locke, 1984; Hajek y Leger., 1994).

Cuando el hongo logra romper la epicutícula, se favorece a las estructuras penetrantes del hongo y entonces pueden extenderse e incrementar aun más la acción de las enzimas degradantes (Chanley y St.Leger., 1991; Goettel *et al.*, 1989; Locke, 1984).

También la procutícula actúa como una barrera física, que impide el desarrollo de una infección fúngica, por su impermeabilidad a secreciones de los patógenos y su resistencias mecánica a la penetración; su grado de resistencia depende del espesor y el grado de endurecimiento (queratinización) (Locke, 1984; Hassan y Charnley., 1989). Los insectos con segmentos del cuerpo altamente queratinizados son invadidos vía membrana intersegmentales (Hassan y Charnley., 1989; Magalhaes *et al.*, 1990; Magalhaes *et al.*, 1991; Leucona *et al.*, 1991).

La melenización de la cutícula es inducida por el daño físico o por glucanos β -1,3,

en la pared celular fúngica (Soderhall, 1982; Murrin y Nolan, 1987; Butt *et al.*, 1988). La melanización ocurre con frecuencia demasiado tarde, como para detener el crecimiento rápido del patógeno (St. Lager, 1991).

3.5 Producción de metabolitos.

Los hongos patógenos poseen enzimas que permiten degradar y asimilar los materiales del hospedero, mientras suspenden los mecanismos de resistencia del hospedero (Bidochka y Khachatourians., 1992). Los metabolitos fúngicos ayudan al patógeno a modificar la integridad estructural del hospedero, a inhibir el proceso selectivo o a enzimas del hospedero y a interferir con el sistema regular del hospedero. El daño asociado con los síntomas de la enfermedad, pueden ser producidos por las enzimas y por sus metabolitos de bajo peso molecular (toxinas). Las enzimas son las que determinan la virulencia, porque permiten al patógeno coexistir con los procesos metabólicos cambiantes, asociados con los estados de enfermedades del hospedero (Hajek y St.Lager., 1994).

Una vez que el hongo alcanza el homocelo del insecto, este puede morir por la combinación de daños mecánicos, causados por crecimiento fúngico o por el agotamiento de nutrientes y toxicosis. Pero también puede morir mediante la síntesis y acción de sus toxinas (Guillespie y Claydon., 1989).

3.6 Toxinas producidas por los hongos entomopatógenos.

En *M. anisopliae* se han reportado dos familias de toxinas que reciben el nombre de

destruxinas (A, B y E) y citocalacinas (Roberts., 1981; Samuels *et al.*, 1988 a, b) .

De las destruxinas hasta la fecha se conocen 18 diferentes y son decipéptidos cíclicos, que afectan la estructura y funcionamiento normal de varios organelos, tales como: mitocondrias, retículo endoplásmico y membranas nucleares. De las citocalacinas se reportan tres diferentes, pero todas paralizan las células y causan una disfunción del nervio óptico central, tubo de Malpighio, hemocitos y tejido muscular. Las principales lesiones que se observan en los insectos afectados es la formación de núcleos picnóticos, degradación de mitocondrias de retículo endoplásmico rugoso y disfunción ribosomal (Roberts, 1981; Vey *et al.*, 1985; Samuel *et al.*, 1988 a, b., Vey y Quit., 1989; Cerenius *et al.*, 1990) .Vey et al. en 1987 encontraron que al incorporar destruxina E en el agua que contenía larvas del mosquito *Culex pipiens* (L.) y en el alimento de insectos adultos de *Drosophila melanogaster* (Meigen) y *Musca domestica* (L.), el compuesto fue letal para los insectos produciendo en estos un efecto citopatico, principalmente en el intestino medio, así como cambios a nivel de mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, sin embargo no se observaron lesiones a nivel neuromuscular. (Gillespie y Claydon, 1989).

3.7 Condiciones ambientales para la reproducción.

Se reporta que la germinación, el crecimiento, la esporulación y la virulencia son características de los hongos, que pueden ser afectadas por la temperatura, luz ultravioleta y la humedad (Zimmermann, 1982; Ferron, 1985; Carrutherrs *et al.*, 1988; Fargues *et al.*,

1988). La temperatura media óptima de *M. anisopliae* es de 25°C, para que se desarrolle, pero pierde su capacidad de matar a los 37°C (Daust y Roberts, 1983; García *et al.*, 1984; Majchrowicz y Poprawski, 1993; Reinecke *et al.*, 1990; Moorhouse *et al.*, 1994).

3.8 Patogenicidad, virulencia y agresividad

Patogenicidad, virulencia y agresividad son conceptos muy comunes dentro del lenguaje de hongos entomopatógenos. La patogenicidad de hongos entomopatógenos esta definida como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedades (Shaner *et al.*, 1992), la virulencia, como el grado de patogenicidad con que un organismo mata o causa daño a un insecto hospedero específico en condiciones controladas (Aizawa, 1971; Bigler, 1989; Alves, 1986) y la agresividad como la habilidad de un patógeno para invadir a su hospedero (Shaner *et al.*, 1992). A menudo, los conceptos de agresividad, patogenicidad y virulencia son empleados como sinónimos en patología de insectos y se utilizan para indicar el nivel de enfermedad provocado por microorganismos. Se ha demostrado que existe una gran variabilidad en virulencia entre especies de hongos y entre cepas de un mismo hongo (Fargues y Remaudiere., 1977; Riba y Kawakami, 1982; Mac Coy, 1990 ; Maniania, 1991; Lezama, 1993), ya que esta característica es gobernada por factores poligenéticos (Riba *et al.*, 1982) y condiciones ambientales (Roberts y Campbell, 1977; Ferron., 1981; Ferron, 1985; Fargues y Remaudiere, 1977).

Lo anterior, obliga a realizar estudios que permitan evaluar y seleccionar un aislado en la región donde se desea emplear como control biológico, con capacidad de matar un

insecto plaga determinado, con el fin de tener más probabilidades de éxito en campo (Zimmermann, 1986; Zimmermann, 1993; Maniania, 1991; MacCoy, 1990).

En lo que se refiere a dípteros, muchos asilados de *M. anisopliae* de diferentes regiones geográficas y una gran variedad de especies de insectos, han mostrado ser virulentas hacia larvas de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Roberts, 1977; Daust y Roberts, 1983).

También en adultos de la mosca del mediterráneo *C. capitata*, este mismo hongo presenta potencialidad de uso, con una dosis letal media (DL₅₀) estimada en 8×10^6 conidios por ml y un tiempo letal medio (TL₅₀) de 11.4 días (García *et al.*, 1984).

Por lo anterior, existe la posibilidad de que larvas de *M. domestica* sean también sensibles a infecciones de *M. anisopliae*.

3.9 El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Este hongo se estudió a partir de unas observaciones de Agustino Bassi en 1835, sobre la moscardina del gusano de seda *Bombyx mori*. Fue asilado por Balsamo y descrito por Vuillemin en 1911 (citado por Ferron, 1978). *B. bassiana* ha llegado al mercado con el nombre comercial de *Bauverie* y *Maturalis* “ L “, para utilizarse en el control de Lepidópteros, Pirálidos, Cercópodos, Aleiródidos, Homópteros y Curculiónidos (Ferron, 1985). Este hongo se caracteriza por tener una estructura somática septada de sus hifas, su multiplicación es por conidios libres; conocidos como conidiosporas o conidias; éstos se forman de los conidióforos que tienen forma de botella (fiálides), las conidias son

esféricas que miden hasta 4 micras de diámetro y presentan un color blancocremoso (Ferron., 1985).

Este hongo forma un micelio blanco con aspecto algodonoso, su esporulación es abundante de coloración crema y una textura en forma de talco, la formación de sus conidióforos en forma de zig-zig, insertados directamente en el micelio con conidias terminales (Lesne., 1975).(Fig. 2)

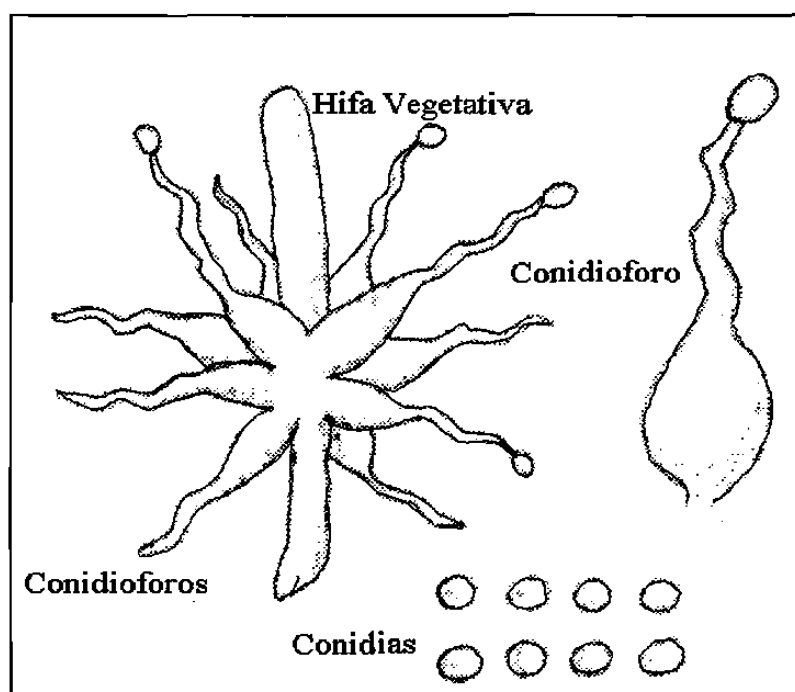


Fig. 2. Estructuras morfológicas del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

3.10 Hospederos.

Tienen una amplia gama de hospederos de más de 700 especies, entre ellas el gusano cogollero del maíz *Spodoptera. frugiperda*, conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Buls., barrenador del arroz *Sitophilus oriza* L. y el *Tribolium confosum* Duv. (Lesne, 1975). Adultos de mosca doméstica fueron susceptibles en un rango del 90 al 99% al aislado Hf88 de *B. bassiana*. Se menciona que *B. bassiana* tiene poder patógeno sobre

Diatraea saccharalis y presenta grandes posibilidades de uso como agente de control biológico contra barrenadores (Lecuona, 1986).

3.11 Mecanismos de infección

La infección de hongo entomopatógeno sobre sus hospederos, se realiza cuando el conidio se pone en contacto con el tegumento del insecto.

El conidio desarrolla un tubo germinativo o hifa de penetración, ésta atraviesa la cutícula del insecto en un doble proceso, mecánico y enzimático (Gillespie y Claydon., 1989). Una vez en el hemocele, el hongo prolifera como cuerpos hifales o como blastosporas (Ferron, 1985).

Cuando el insecto es invadido totalmente, muere en una etapa temprana de la infección, a causa de las toxinas liberadas por el hongo.

Estos crecen en todo el cuerpo del hospedero muerto, desarrollándose una fase saprofita y en condiciones favorables, las hifas salen del hospedero al través del tegumento, dando lugar al desarrollo de conidióforos en la superficie del insecto momificado, formando nuevos conidios permitiendo de esta forma, la propagación de la enfermedad (Bidochka y Kachatourians, 1992).

Bajo condiciones inapropiadas, el hongo produce clamidiosporas dentro del insecto muerto, y reinicia su crecimiento a partir de ellas, cuando las condiciones sean apropiadas para la dispersión (Deacon, 1988) (Fig. 3.)

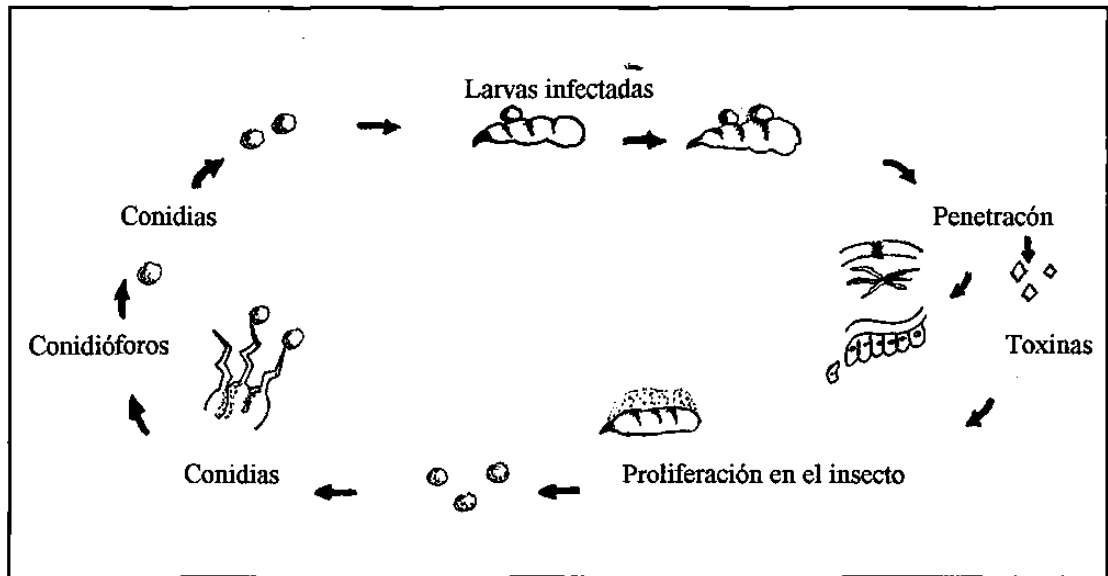


Fig. 3. Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. adaptado de (Prieto, 1996).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill posee la capacidad de producir enzimas con las cuales destruye la cutícula del insecto, tales como quitinasas, lipasa y amilasas, las cuales facilitan la penetración (St. Leger *et al.*, 1989; Aarnio y Agathos, 1989; Facchino de Barros y Monteiro de Barros., 1991; Bidochka y Kachatourians., 1992). Por parte del insecto, éste tiene una reacción no específica al ser atacado en su cutícula, mediante un proceso de melanización, provocando una actividad fenoxidásica (Retault y Vey., 1977). Si el hongo vence este mecanismo de defensa y logra llegar al hemocele, se divide en cuerpos hifales (blastosporas); pero se ve atacado por otra línea de defensa del hospedero del tipo hemocítico, encabezada por los granulocitos, quienes al encontrar los cuerpos hifales, los envuelven para formar pseudot tejido, al cual se le conoce como granuloma (Vey, 1971). Por su parte, el hongo desarrolla un mecanismo que frena la reacción hemocítica del insecto, produciendo sustancias tóxicas o micotoxinas, que ocasionan la muerte del hospedero antes de que haya sido totalmente colonizado por el hongo (Roberts,

1981). La toxina que produce *B. bassiana* y que afecta tanto a células como a fagocitos del hospedero, se llama Bauveriana. Esta es la que ocasiona la muerte del insecto antes de su total invasión (Deacon, 1988). Después de que *B. bassiana* causa la muerte del insecto, éste invade todos los tejidos, los insectos se momifican y cambian de color por una pigmentación antibacteriana que es secretada por el hongo, como la oosporina, bassianina o tellinas (Mac Innis, 1975).

3.12 Síntomas

Cuando la larva está infectada, paulatinamente va perdiendo capacidad de movimiento, por lo tanto no responden en forma normal a los estímulos externos y adquiere también un color rosado, el cual es característico de las infecciones por *B. bassiana*. También se torna blanda y flexible hasta que el hongo se desarrolla en su interior. Finalmente se pone rígido y se momifica. Si las condiciones de humedad y temperatura lo permiten, el hongo se manifiesta externamente por medio de conidios y en ocasiones mediante esporas en reposo, las cuales permanecen viables alrededor de 128 semanas a una temperatura de 4 °C y cerca de 7 semanas a temperaturas de 23 a 38 °C. Este hongo crece a una temperatura mínima de 10 °C y una máxima de 38 °C, mientras que las esporas soportan temperaturas de 98 °C por 5 horas en atmósfera seca y 40 °C durante 24 horas en atmósfera húmeda, pero se destruye cuando estas condiciones se prolongan por 72 horas o más (Lesne, 1975).

4. Bacterias entomopatógenas

Otra alternativa de control la constituyen, sin lugar a duda, las bacterias entomopatógenas, particularmente las del género *Bacillus*, específicamente *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* (Atkins, 1978; Porter *et al.*, 1993; Klier y Rapoport., 1987; Hodgman *et al.*, 1993).

4.1 La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*.

Varias especies del género *Bacillus* son patógenas para insectos, pero de todas, *B. thuringiensis* es la más ampliamente utilizada (Luthy y Ebersold., 1981). Recientemente se ha observado que una cepa, la HD-522 de *B. thuringiensis* sp. *israelensis* es activo contra larvas o pupas de la mosca del cuerno *Haematobia irritans* (Schmidtman *et al.*, 1993).

B. thuringiensis es una bacteria esporulada gram positiva, aerobia, móvil por flagelos peritricos, que presenta una inclusión refractil, denominado cuerpo paraesporal o cristal, el cual confiere patogenicidad contra larvas de insectos plagas (Saldaña, 1989). El descubrimiento de esta bacteria, que en un principio se conoció como *B. soto*, se atribuye al japonés Ishiwata en 1901, quien lo aisló a partir de orugas enfermas del gusano de seda, *Bombix mori* (Dulmage y Aizawa., 1982). Sin embargo, su descripción fue incompleta. La primer descripción microbiológica válida la realizó el alemán Berlinier en 1911, quien aisló la bacteria de la palomilla de la flor del mediterráneo *Anagasta kuehniella* (Heimpel y Angus., 1963). En el año de 1915 reaisló la bacteria y propuso el nombre de *Bacillus thuringiensis* por haberla aislado de la provincia de Thuringen. A diferencia de su

contraparte japonesa, Berlinier probó que la patogenia de este bacilo era contra muchas especies de insectos, por lo que en Europa fue vista como una alternativa para el control de los insectos plaga. Las investigaciones con esta bacteria entraron en una etapa de rezago y no fue sino hasta 1927 que Mattes aplica el concepto del uso de *B. thuringiensis* como alternativa de control biológico. A partir de entonces el empleo de esta bacteria se ha convertido en una alternativa real de control de plagas para algunos insectos (Baumann *et al.*, 1991; Bowles *et al.*, 1990) y más recientemente, para protozoarios y nemátodos.

4.2 Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *B. thuringiensis* puede producir cuatro diferentes tipos de toxinas, las cuales son conocidas como μ -exotoxina, β exotoxina, χ -endotoxina y la δ -endotoxina. la μ -exotoxina es una proteína termolábil, activa contra insectos y ratones por lo que es llamada “factor ratón”; la β exotoxina, llamada “factor mosca”, que es usada como aditivo al alimento de aves ó ganado para el control de moscas, ya que, una vez excretada junto con las heces, inhibe el crecimiento de las larvas del insecto, debido a que la actividad se mantiene después de pasar por el tracto digestivo de los animales; la χ -endotoxina y la δ -endotoxina, siendo esta última la que a mostrado un amplio espectro de acción contra larvas de insectos lepidopteros, dípteros y coleópteros principalmente (Himeno, 1987., Hofte *et al.*, 1989). La δ -endotoxina es una protoxina en forma de cristal que se forma durante la fase de esporulación. Esta protoxina es desarrollada como inclusiones paraesporal (cerca de la espora) y es altamente tóxica al ser ingeridas por un insecto

susceptible, ya que esta protoxina pasa a toxina a un pH de 9.5-10, lo cual ocurre a nivel intestinal. A este nivel ocurre tanto parálisis como formación de poros. El insecto muere al no poder digerir el alimento y debido al daño intestinal (Porter *et al.*, 1993).

4.3 La bacteria entomopatógena *Bacillus sphaericus*

B. sphaericus es un bacilo del suelo, gram variable, teniendo como rasgo característico la espora terminal y su incapacidad de crecer en medios anaerobios. Mide 0.6 µm de ancho por 1.5-5 µm de largo y es móvil (Bravo *et al.*, 1992). Esta bacteria ha sido eficazmente usada para el control biológico de especies de mosquitos, los cuales son vectores de importantes enfermedades en humanos y animales (Bravo *et al.*, 1992). En general *B. sphaericus* es más activo contra *Culex* y *Anopheles* spp. y menos activo contra *Aedes* spp. El modo en que se emplea es adicionando esporas en medios acuáticos contaminados, donde se ha observado que persiste su habilidad tóxica (Bravo *et al.*, 1992).

4.4 Toxinas de *Bacillus sphaericus*.

Estudios sistemáticos de toxicidad de nuevos aislados han revelado que las cepas tóxicas son los serotipos H-5 y H-25. Su actividad más amplia fue contra larvas de *Culex pipiens* y *Anopheles stephensi* (Bravo *et al.*, 1992).

Diferentes especies de larvas de mosquitos varían ampliamente en la susceptibilidad del cristal tóxico de *B. sphaericus* debido a las diferencias en el número de sitios de unión

o receptores blanco de la proteína tóxica a el hemocelo gástrico y a la parte posterior del intestino medio (Bravo *et al.*, 1992).

MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo de investigación se realizó en tres etapas. Durante la primera de ellas se seleccionó de entre tres dietas, la más idónea para la producción de larvas de mosca.

La segunda y tercera etapas consistieron en la evaluación de cepas autóctonas y alóctonas de hongos y bacterias entomopatógenos, respectivamente, contra larvas de tres días de *M. domestica*.

5. Establecimiento de la colonia de *Musca domestica*.

Se estableció una colonia de aproximadamente 3,000 a 3,500 moscas, a partir de pupas donadas por el departamento de entomología agrícola del I.T.E.S.M Campus Monterrey y a partir de insectos adultos capturados en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Las pupas se colocaron en cajas plásticas con arena, a una temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con humedad relativa del 70%, hasta la emergencia de los adultos.

Los insectos capturados y los que nacieron en condiciones de laboratorio fueron instalados, en forma separada, en cajas rectangulares de 60 x 30 cm de largo y ancho respectivamente, las paredes de dichas cajas, fueron hechas de tela mosquitera de material plástico, con un extremo desarmable y el extremo anterior con una manga de manipulación. Ambas cajas, y se pusieron en cuartos a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 75% aproximadamente.(Fig. 4).



Fig. 4 Jaula para la cría de insectos.

5.1 Dietas para larvas y adultos

La dieta para adultos consistió de 250.0 g de azúcar granulada, 250.0 g de yema de huevo en polvo y 500.0 g de leche en polvo sin grasa. Los ingredientes se colocaron en recipientes de plástico de 250 ml, y se les proporcionó agua sin clorinar a *libitum* (Fig. 5). Para el caso de larvas, se probaron diferentes dietas, teniendo como base harina de alfalfa, salvado de trigo y harina de maíz. La preparación de la dieta consistió en hidratarla hasta obtener una pasta homogénea.



Fig. 5 Dieta y bebedero para insectos adultos.

5.2 Preparación de la dieta para larvas.

Las dietas se elaboraron moliendo los ingredientes mencionados y mezclándolos.

Una vez preparadas, las dietas se homogeneizaron humedeciéndolas y agitando con agua destilada. Estando ya mezcladas se vaciaron en los recipientes de plástico, dejando orificios para facilitar la ovipostura.

5.3 Selección de la dieta utilizada en el trabajo.

A partir de la colonia inicial de moscas, se colectaron 50 huevos para la evaluación de cada dieta en cajas de Petri, (50 huevos para la dieta “ A “, 50 huevos para la dieta “ B “, 50 huevos para la dieta “ C “ así como 50 huevos con la misma dieta la “D” utilizada en la colonia inicial. Para la colección de dichos huevos, se utilizaron palillos de madera y agujas de disección. Por medio de observaciones al microscopio estereoscópico y en base a su color y forma, se determinó la viabilidad de los mismos. La forma de evaluación de las

dietas consistió en colocar 10 huevos en contenedores de plástico, a los cuales se les adicionaron 20 g de la dieta correspondiente. Se utilizaron cinco repeticiones para cada dieta. Los contenedores se incubaron a 28 ± 2 °C y con una humedad relativa de 75 ± 5 %. A las 36 horas, se determinó el porcentaje de eclosión, contando el total de larvas y dividiéndolo entre el total de huevos, considerando como porcentaje óptimo un 95 %. Así mismo se pesaron las larvas para determinar el peso al 3er. estadio, siendo el óptimo de 13 a 15 mg.

Apartir de la colonia inicial, se colectaron 50 larvas de 3 días de edad para la evaluación de cada dieta, siguiendo la misma metodología de colecta e incubación descrita para los huevos. Cuatro días después, se determinó el porcentaje de pupación contando el total de pupas y dividiéndolo entre el total de larvas. (valor óptimo es de 80 %). Estas pupas se colocaron en nuevos contenedores secos y vacíos y cuatro días después se determinó el porcentaje de emergencia (valor óptimo de 95 %), el cual se determinó contando el total de adultos entre el total de pupas. Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron por duplicado. Las dietas utilizadas se muestran en la (Tabla 1).

Tabla 1 Componentes específicos de cada una de las dietas para larvas.

Ingredientes	DIETAS			
Ingredientes	A	B	C	D (control)
Harina Maíz	200 g.	200 g.	200 g.	200 g.
Harina Alfalfa	300 g.	300 g.	300 g.	300 g.
Salvado Trigo	400 g.	400 g.	300 g.	500 g.
Harina Sangre	100 g.	No	100 g.	No
Melaza	No	100 g.	100 g.	No

5.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos con dietas artificiales.

Se empleó el método de análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había diferencia significativa entre las 3 dietas en base a los siguientes parámetros: peso de la larva, peso de las pupas, longitud y diámetro de las larvas (para c/u de estas mediciones de los bioensayos 1 y 2). Además se realizaron comparaciones múltiples (prueba de Tukey) y análisis factorial de 2 x 2 para determinar la diferencia significativa de los ingredientes a probar en c/u de las dietas y para saber si existía una interacción entre los ingredientes de cada una de las dietas. Se realizaron pruebas de χ cuadrada en los 2 bioensayos para medir los parámetros de % de eclosión, % de pupación y % de emergencia, con parámetros cualitativos.

5.5 Mantenimiento de la Colonia

A partir del medio de ovipostura se inició la colección de huevos, a los cuales se les determinó viabilidad, en base a su color y forma. Posteriormente se colocaron en un recipiente plástico de mayor tamaño, al cual se adicionó dieta artificial, variando las cantidades dependiendo del número de huevos, aproximadamente 200 g por cada 100 huevos. El recipiente de plástico empleado para desarrollo larvario que se utilizó tenía la capacidad suficiente para agregarle hasta 1000 g de dieta para larvas, y se cuidó que su tapa permitiera la aireación e impidiera la salida de las larvas. Estos recipientes se colocaron en un cuarto a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Fig.6).



Fig. 6 Recipiente empleado para la cría de larvas.

Después de 24 hrs, a partir de la emergencia de las primeras larvas y como resultado de la alimentación de las mismas, se inició la fermentación de la dieta, para dar inicio a la pupación. Las pupas así obtenidas se transfirieron a recipientes de vidrio más pequeños, con capacidad de 150 ml. Se mantuvieron ahí por un espacio de cuatro días y se determinó el porcentaje de emergencia, considerando como óptimo un 95%. La dieta así seleccionada se utilizó como medio de ovipostura para la obtención de huevos para la cría de larvas.

6. Obtención de cepas de hongos entomopatógenos.

Las cepas de hongos a utilizar en el presente trabajo fueron donadas de la colección de cepas de hongos entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, siendo un total de 21 cepas, 10 de éstas corresponden al género *Metarhizium* y el resto al género *Beauveria*. Algunos de estos hongos se encuentran incluidos en la colección de hongos entomopatógenos del USDA y se identifican con el número de la colección del ARSEF. El origen de las cepas se muestra en la (Tabla 2a y 2b).

Tabla 2a. Origen de las cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Cepa	No. ARSEF	Hospedero de Origen	Lugar de Aislamiento	Fecha
Ma 1	3312	Mosca pinta	Brasil	1990
Ma 2	3290	<i>D.saccharalis</i>	Colima	1988
Ma 3	For.Comercial	<i>D.saccharalis</i>	USA	1987
Ma 4	3291	<i>D.saccharalis</i>	Colima	1987
Ma 5	3292	<i>D.saccharalis</i>	Colima	1987
Ma 6	3293	<i>S.frugiperda</i>	Colima	1988
Ma 7	3294	<i>S.frugiperda</i>	Colima	1989
Ma 8	3295	<i>A.gemmatalis</i>	Tamaulipas	1987
Ma 10	3306	<i>G.senilis</i>	Colima	1990
Ma11 (22)	No	Suelo	Manzanillo	1993
Ma 17 (28)	No	Frailecillo	Colima	1994

Tabla 2b. Origen de las cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa	No. ARSEF	Hospedero de Origen	Lugar de Aislamiento	Fecha
Bb 1	3285	<i>Atta sp.</i>	Monterrey	1987
Bb 2	3285	<i>S.littoralis</i>	Francia	1987
Bb 3	3309	<i>D.balteata</i>	Jalisco	1990
Bb 4	No	<i>Diabotica sp.</i>	Jalisco	1988
Bb 5	3287	<i>D.balteata</i>	Colima	1988
Bb 6	3288	<i>S.frugiperda</i>	Colima	1988
Bb 7	3289	<i>S.frugiperda</i>	Colima	1988
Bb 8	3310	<i>G.senilis</i>	Colima	1990
Bb 11	No	For.Comercial	USA	1992
Bb 12 (02)	(<600 msnm)	<i>H.hampei</i>	Oaxaca	1992

6.1 Propagación de los hongos

Ambas cepas de hongos fueron cultivadas en medios de agar dextrosa de Sabouraud, con la adición de 15 de extracto de levadura (Merck) (Latch, 1976., Moorhouse *et al.*, 1993 a y b) y con 0.005% del antibiótico cloramfenicol (Sneh., 1991). Se incubaron tres semanas bajo condiciones de laboratorio $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Riba *et al.*, 1986; Reinecke *et al.*, 1990; Popawski *et al.*, 1985)

incubar por tres días a 28 ± 2 °C a una humedad relativa del $75 \% \pm 5$ °C, para asegurar que la edad de las larvas fuera de tres días.

6.5 Bioensayos

Se realizaron una serie de experimentos previos e independientes para cubrir los objetivos planteados. En una primera etapa se utilizó un total de 21 cepas, 10 de éstas correspondientes al género *Metarhizium* y el resto al género *Beauveria*, las cuales fueron probadas en su actividad contra larvas de *M. domestica* de tres días de edad. Se emplearon 10 larvas con cinco repeticiones por cada tratamiento, además del testigo sin tratar. Este experimento se realizó tres veces en total y se obtuvo el promedio de ellos. Cada grupo de 10 larvas se inoculó por inmersión en la dilución de 1×10^7 conidias/ml, de cada una de las cepas a evaluar y se colocaron en un envase plástico (SOLO PT200 y PL2) al cual en el fondo se le colocó un trozo de papel filtro humedecido con agua estéril para mantener una humedad elevada. La mortalidad se determinó cada tercer día, hasta la emergencia de los insectos adultos.

En un segundo experimento se determinó, la dosis letal media (LD_{50}) de aquellas cepas que en el primer bioensayo mostraron la mayor mortalidad. Esta se obtuvo preparando 50 ml de una suspensión acuosa a las concentraciones de 0, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidias por ml, para cada uno de los aislados seleccionados. De cada concentración, se inocularon tres grupos de 25 larvas, siguiendo la misma metodología del experimento inicial. La mortalidad total se registró diariamente por

catorce días hasta la emergencia de los insectos adultos.

6.6 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron examinados mediante un ANOVA y la prueba de separación de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad, utilizando el paquete estadístico de Statistix, 1996. Las dosis letales se analizaron con el paquete de Probit.

7. Obtención de cepas bacterianas.

Como aislados previos se tomaron 11 cepas de la colección del Dr. Howard T. Dulmage (HD) del género *Bacillus* del caparío del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo del Departamento de Microbiología e Inmunología la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L (Tabla 3). Para la obtención de los nuevos aislados se realizaron muestreos de suelos, larvas e insectos, enfermos ó muertos, durante un período de tres meses, en lugares donde abunda este tipo de insectos (basureros, desechos orgánicos, asentamientos ganaderos etc.). Los muestreos se realizaron en los municipios de Monterrey, Linares, Cadereyta, San Nicolas, Allende, General Bravo, China, Pesquería, Guadalupe Villa de Santiago y Apodaca Nuevo León, así como en La Piedad, Michoacán y Saltillo, Coahuila. (Tabla 9). En el caso de suelo, se colectaron muestras de 5 a 10 g.

En todos los casos, el material obtenido se colocó en bolsas plásticas nuevas y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

Tabla 3. Cepas HD utilizadas en el trabajo.

HD-2 <i>thuringiensis</i>	HD-4 <i>alesti</i>
HD-7 <i>dendolius</i>	HD-73 <i>kurstaki</i>
HD-109 <i>kurstaki</i>	HD-126 <i>aizawa</i>
HD-121 <i>tolworthi</i>	HD-324 <i>morrisoni</i>
HD-501 <i>morrisoni</i>	HD-550 <i>israelensis</i>
HD-567 <i>israelensis</i>	

7.1 Aislamiento de bacterias esporuladas (*Bacillus ssp.*).

Se suspendió un gramo de la muestra de suelo en 10 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó mezclando vigorosamente por un tiempo de 2 min. Posteriormente se calentó a 80° por 15 minutos a baño maría. En el caso de muestras de insectos, se tomó un gramo de muestra, la cual fué sumergida en alcohol al 90% por espacio de 10 minutos, y se enjuagaron con agua destilada estéril, en un volumen aproximado de 5 ml. Se maceró la muestra y se calentó a 80 °C durante 15 minutos a baño maría. Se tomó 0.1 ml de ese macerado, como inóculo, tanto de las muestras de suelo como del macerado de insectos, y estos fueron inoculados por estría en cajas Petri con agar nutritivo. Posteriormente se incubaron a 30 °C por 5 días (tiempo de esporulación).

7.2 Identificación de cepas

La identificación de cepas se realizó sólo en aquellos aislados que mostraron actividad contra larvas de *Musca domestica*. Primero se sembraron en placa para corroborar la presencia de cristal. Los aislados que mostraron esta característica fueron utilizados para los bioensayos.

7.3 Dieta para el bioensayo.

La dieta utilizada para el desarrollo de las larvas fué la misma que para los bioensayos, pero se adicionó agar-agar para darle solidez al mismo. Los sólidos de la dieta (1000 g) se disolvieron en 1500 ml de agua destilada, y se adicionó 2.5 g de levadura. El agar se adicionó a una proporción de 20 g por litro. La disolución de los ingredientes se consiguió al ir agregando el agua destilada caliente a 50 °C, y se mezcló y homogeneizó con la ayuda de una batidora eléctrica.

7.4 Bioensayos para medir actividad tóxica de aislados y cepas de colección de *B. thuringiensis* sobre larvas de tres días de *M.domestica*.

Con las cepas aisladas se procedió a cultivarlas en cajas Petri con agar nutritivo a 30 °C por 48 h. Después se removieron los cristales y las esporas, lavando las placas con 1.5 de agua destilada estéril. La fracción de esporas y cristales se utilizó para ser adicionada a las dietas de las larvas, utilizando 10 g. de dieta mas 1 ml de extracto crudo de esporas/cristales para la realización de los bioensayos.(Fig.7).

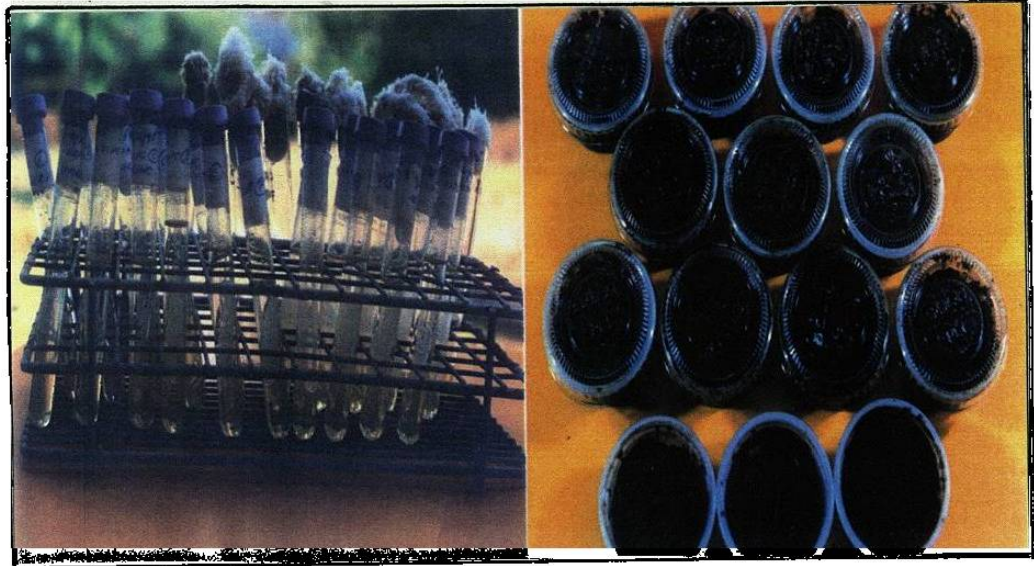


Fig. 7 Cepas bacterianas aisladas y recipientes utilizados en los bioensayos.

7.5 Selección preliminar de los aislados.

Se colocaron 25 larvas de tercer estadio y tres repeticiones por tratamiento así como un testigo. Se registró la mortalidad a las 24, 48 y 72 h. Las cepas que en esta selección preliminar mostraron mas del 50 % de mortalidad, fueron seleccionadas para ser utilizadas en la continuación del trabajo, mediante su escala a medios de fermentación y para la determinación de la LD_{50} y LD_{90} respectivamente.

VI. RESULTADOS

8. Evaluación de dietas para la cría de *M. domestica*

Los resultados de los dos experimentos donde se evalúan las tres dietas para la producción de larvas de *M. domestica* tomando como parámetros el porcentaje de eclosión, porcentaje de pupación y porcentaje de emergencia, después de ser evaluados mediante la prueba de χ cuadrada, mostraron que el mayor porcentaje de eclosión se obtuvo en la dieta "A" con un 77.7 %, con una diferencia significativa (D.S) entre las 4 dietas ($P < 0.05$); el mayor porcentaje de pupación se encontró en las dietas "A" y "D" ambas con un 100 % , aunque este valor no fue significativo, diferencia no significativa (DNS) ($P > 0.05$) en tanto que el mayor porcentaje de emergencia se dio en la dieta " C " con un 90.9 % donde se encontró una (D.S) ($P < 0.05$). En la (Tabla 4), se muestra un resumen global de los porcentajes de eclosión, pupación y emergencia.

Por otra parte al analizar los parámetros de pesos y medidas por el análisis de varianza (ANOVA) se encontró que el mayor peso de las pupas se obtuvo en las dietas "A" con 26.0 mg y "D" con 20.6 mg respectivamente, se encontró diferencia significativa (D.S) entre las cuatro dietas ($P < 0.01$) mientras que los mejores parámetros de medidas, las dietas " A " y " D " fueron las mejores tanto en longitud como en diámetro siendo estos valores para la dieta " A " de 11.73 x 1.75 mm y para la " D " 10.85 x 1.55 mm respectivamente, encontrándose diferencia significativa (D.S) entre las cuatro dietas ($P < 0.02$). En la (Tabla 5), se muestra un resumen global de los parámetros de pesos y medidas.

Tabla 4 Resumen global de los porcentos de eclosión, pupación emergencia.

DIETA	No.de larvas	No.de pupas	% de ^b pupación	No. de moscas	%de ^a emerg	No. de huevos	No. de larvas	%de ^a eclos.
"A"	56	56	100	46	82.1	90	70	77.77
"B"	27	23	85	19	82.6	80	19	23.75
"C"	45	44	97.7	40	90.9	100	75	75
"D"(contrl.)	49	49	100	41	83.6	100	76	76

^a D.S (P < 0.05)^b DNS (P > 0.05)**Tabla 5 Resumen global de los parámetros de pesos y medidas**

parametros	Dieta "A"	Dieta "B"	Dieta "C"	Dieta "D"
medidas promedio	11.73x1.75mm.	7.65x1.05mm.	8.48x1.05mm.	10.85x1.55mm.
pesos promedio	26.25 mg	9.48 mg	14.1 mg	24.2 mg

Medidas D.S (P < 0.02), pesos D.S (P < 0.01)

9. Actividad tóxica de hongos entomopatógenos.

Se encontró que todas las cepas probadas tanto, de *Beauveria* como las de *Metarhizium* mostraron actividad tóxica sobre larvas de tres días de mosca doméstica aunque dicha actividad, fue diferente en cada cepa. Por ejemplo; del género *Beauveria* nueve de las diez cepas probadas tuvieron mas del 50% de mortalidad a los 12 días de inoculadas por inmersión de una dilución de 1×10^7 conidias/ml (Tabla 6a). En el caso de las cepas de *Metarhizium*, se observó lo mismo en todas las cepas probadas (Tabla 6b).

9.1 Actividad tóxica de *Beauveria bassiana*.

Las diez cepas de *Beauveria bassiana* mostraron actividad tóxica a *M. domestica* (Tablas 6a).

Tabla 6a Porcentaje de mortalidad de larvas de tres días de *M. domestica* a 12 días de inoculados con *Beauveria bassiana*, a una dilución de 1×10^7 conidias/ml.

Cepa	Numero larvas tratadas	Mortalidad total a los 12 días	Porcentaje de Mortalidad *
Bb.2	150	114	76 a
Bb.12	150	100.5	67 a b
Bb.8	150	99.9	66.6 a b
Bb.3	150	94.9	63.3 a b
Bb.1	150	88.9	59.3 b c
Bb.11	150	82.9	55.3 b c
Bb.4	150	81	54.6 b c
Bb.6	150	81	54 b c
Bb.5	150	78.9	52.6 b c
Bb.7	150	72	48 c
Control	150	28	18.6 d

*Promedios seguidos con la misma letra son iguales estadísticamente ($P < 0.05$)

9.2 Actividad tóxica de *Metarhizium anisopliae*

Tabla 6b Porcentaje de mortalidad de larvas de tres días de *M. domestica* a 12 días de inoculados con *Metarhizium anisopliae*, a una dilución de 1×10^7 conidias/ml.

Cepa	Numero larvas tratadas	Mortalidad total a los 12 días	Porcentaje de Mortalidad *
Ma 17	150	135	90 a
Ma 2	150	133.5	89 a b
Ma 10	150	126	84 a b c
Ma 7	150	120	80 a b c d
Ma 5	150	118.5	79 b c d
Ma 1	150	111	74 c d e
Ma 3	150	109.5	73 d e f
Ma 6	150	108	72 d e f
Ma 8	150	102	68 e f
Ma 9	150	96	64 f g
Ma 4	150	85.5	57 g
Cont.	150	1.3	.9 h

*Promedios seguidos con la misma letra son iguales estadísticamente, ($P < 0.05$).

Un criterio para determinar la virulencia de los hongos entomopatógenos consistió en determinar la dosis letal media (LD_{50}), para lo cual se seleccionaron las tres cepas de cada género que presentaron la mas alta mortalidad sobre larvas de tres días de *Musca domestica*, las cuales que fueron Ma 17, Ma 10, Ma 2 así como Bb 12, Bb 3 y Bb 2

respectivamente. Cabe mencionar que aunque B. b 8 mostro un mejor porcentaje de mortalidad, fue similar estadísticamente a B. b 3; sin embargo, ésta última tenía una mejor producción de conidios. Por ello se decidió incluirla en las cepas seleccionadas.

Los resultados del análisis probitt mostraron que Mr 17 presentó una LD₅₀ de $1 \times 10^{4.5}$, Mr 10 de $1 \times 10^{4.7}$, Mr 2 de $1 \times 10^{4.3}$ y para el caso de Bb 12 presento una LD₅₀ de $1 \times 10^{7.3}$, Bb 3 de $1 \times 10^{7.9}$ y Bb 2 de $1 \times 10^{6.4}$.

Los porcentos de emergencia de adultos de *M. domestica*, 14 días después de la inoculación con suspensiones acuosas de conidias de los géneros *M. anisopliae* y de *B. bassiana* sobre larvas de tres días de dicho insecto, se muestran en la (Tabla 7).

Tabla 7 Porcientos de emergencia de adultos, a de 14 días de inoculados con suspensiones de esporas de *M. anisopliae* y de *B. bassiana*, sobre larvas de tres días de *M. domestica*.

Cepas	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	control
Mr17	1.3%	9.3%	22.6%	42.6%	48.0%	58.6%	88.3%
Mr10	12.0%	14.6%	36.0%	42.6%	68.0%	77.3%	94.6%
Mr2	0.0%	0.0%	28.0%	46.6%	54.6%	58.6%	93.3%
Bb12	33.3%	50.6%	66.6%	85.3%	89.3%	93.3%	86.6%
Bb3	42.6%	46.6%	58.6%	66.6%	72.0%	77.3%	89.3%
Bb2	22.6%	44.0%	56.0%	62.6%	81.3%	89.3%	90.6%

La Secuencia de eventos en la infección de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de tres días de *Musca domestica* se muestra en la (Fig. 8).

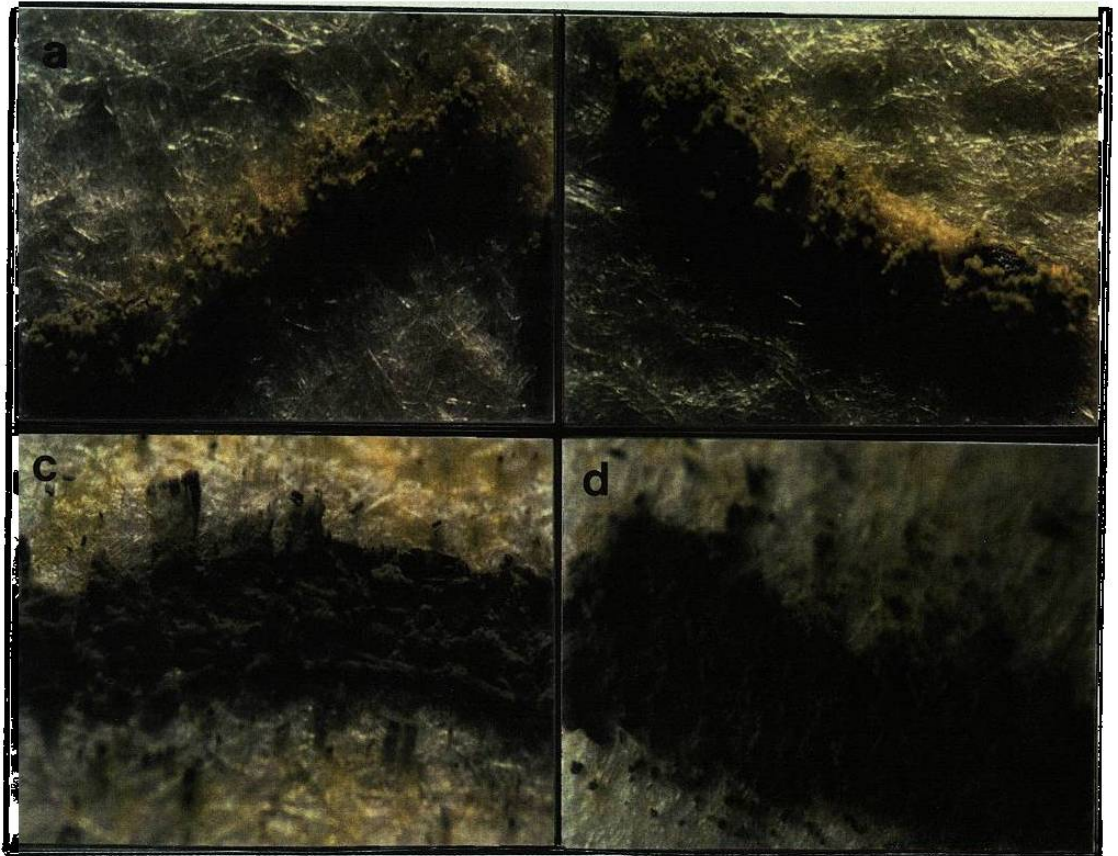


Fig.8 Secuencia de eventos en la infección de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de tres días de *Musca domestica*.

10 Evaluación de cepas de *B.thuringiensis*.

Se utilizaron las once cepas HD, (Tabla 3) así como los aislados de *Bacillus*, que mostraron esporas y cristales, 7 en total (Tabla 10). El resto de las cepas aisladas fueron descartadas del trabajo, puesto que no presentaron esporas y cristales (Tabla 9).

Los resultados de ANOVA para la evaluar el porcentaje de mortalidad a las 72 h. de larvas de tres días de *M. domestica* mostró diferencia no significativa (D.N.S) frente al control (Tabla 8).

Tabla 8 Porcientos de mortalidad a las 72h en larvas de 3 días de mosca doméstica utilizando cepas HD:-

Cepas	L.tratadas	Mort.24Hr.	Mort.48Hr	Mort.72Hr	%Mort.*
HD-2	75	0	0	1	1.3 a
HD-4	75	0	1	1	2.6 a
HD-7	75	0	0	0	0 a
HD-73	75	0	1	0	1.3 a
HD-109	75	0	1	2	3.9 a
HD-121	75	0	0	0	0 a
HD-126	75	0	0	1	1.3 a
HD-650	75	0	1	2	3.9 a
HD-567	75	0	2	3	6.6 a
HD-324	75	0	1	1	2.6 a
HD-501	75	0	1	2	3.9 a
Control	75	0	1	0	1.3 a

*Los promedios con la misma letra, son iguales estadísticamente, entre ellos (P>0.05). Ninguna de las cepas obtuvo mas de un cincuenta por ciento de mortalidad.

10.1 Aislamiento de cepas de *Bacillus*.

Del muestreo realizado durante un período de tres meses en diferentes explotaciones pecuarias, y de algunas zonas urbanas de distintos Municipios del estado de Nuevo León, de Saltillo Coahuila y tres más de la Piedad Michoacán, se aislaron las cepas que se muestran en la (Tabla 9).

Tabla 9 Cepas de *Bacillus* aisladas.

Clave de la muestra	Localidad	Tipo de muestra	No de cepas recuperadas	Clave de la cepas aisladas
MV01	Mty.Ç	Larvas	0	Ninguna
MV02	Mty Ç	Larvas	0	Ninguna
MV03	Linares *	Moscas	2	AV y BV
MV04	Linares *	Larvas	0	Ninguna
MV05	Cadereyta -	Moscas	1	CV
MV06	Cadereyta -	Larvas	2	DV y EV
MV07	S.Nicolas Ç	Larvas	0	Ninguna
MV08	S.Nicolas Ç	Larvas	0	Ninguna
MV09	Mty Ç	Larvas	0	Ninguna
MV10	Mty Ç	Suelo	1	FV
MV11	S.Nicolas Ç	Suelo	0	Ninguna
MV12	S.Nicolas Ç	Moscas	0	Ninguna

Tabla 9 (continuacion)Cepas de Bacillus aisladas.

MV13	S.Nicolas Ç	- Suelo	1	GV
MV14	Allende +	Moscas	1	HV
MV15	Allende +	Larvas	0	Ninguna
MV16	G.Bravo *	Larvas	0	Ninguna
MV17	G.Bravo *	Larvas	2	IV y JV
MV18	China *	Moscas	1	KV
MV19	China *	Suelo	0	Ninguna
MV20	G.Bravo *	Moscas	1	K'
MV21	Pesquería -	Moscas	0	Ninguna
MV22	Pesquería -	Larvas	0	Ninguna
MV23	La Piedad -	Larvas	1	LV
MV24	La Piedad -	Moscas	3	MV,NV y ÑV
MV25	La Piedad -	Suelo	0	Ninguna
MV26	Allende -	Larvas	0	Ninguna
MV27	Allende -	Moscas	0	Ninguna
MV28	Guadalupe *	Moscas	0	Ninguna
MV29	Guadalupe *	Larvas	0	Ninguna
MV30	S.Nicolas Ç	Suelo	0	Ninguna
MV31	Linares *	Suelo	1	OV
MV32	Linares *	Moscas	0	Ninguna
MV33	Linares *	Larvas	0	Ninguna
MV34	Saltillo *	Suelo	2	PV y QV
MV35	Apodaca *	Suelo	1	RV
MV36	Apodaca *	Moscas	0	Ninguna
MV37	Apodaca *	Larvas	1	SV
MV38	Santiago Ç	Suelo	1	TV
MV39	Santiago Ç	Larvas	0	Ninguna
MV40	Santiago Ç	Moscas	0	Ninguna
MV41	Mty Ç	Suelo	1	UV
MV42	Mty Ç	Larvas	0	Ninguna
MV43	S.Nicolas Ç	Suelo	0	Ninguna

*Explotaciones Bovinas; + Explotaciones Avícolas; - Explotaciones Porcinas; Ç Zona Urbana.

Las características de las cepas aisladas que fueron seleccionadas para los bioensayos se muestran en la (Tabla 10).

Tabla 10 Características de los aislamientos.

Clave de la muestra	Localidad	Tipo de Muestra	Clave de la Cepa	Espora	Cristal
MV03	Linares *	Larvas	BV	Si	Si
MV10	Mty. Ç	Suelo	FV	Si	Si
MV31	Linares *	Suelo	OV	Si	Si
MV13	S.nicolas Ç	Suelo	GV	Si	Si
MV17	G.bravo *	Larvas	IV	Si	Si
MV34	Saltillo *	Suelo	PV	Si	Si
MV34	Saltillo *	Suelo	QV	Si	SI

*Explotaciones Bovinas; + Explotaciones Avícolas; - Explotaciones Porcinas; Ç Zona Urbana

10.2 Actividad tóxica de las cepas de *Bacillus* aisladas.

Se eligieron siete cepas, que presentaron la característica de producir esporas y cristales. Los resultados se muestran en la (Tabla 10). El resto de las cepas fueron descartadas del trabajo. Al realizar el análisis de datos por medio de ANOVA los valores de porcentaje de mortalidad a las 72 h sobre larvas de tres días de *Musca domestica* mostró que, al igual que en el caso de las cepas HD, no se encontraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (Tabla 11).

Tabla 11 Porcientos de mortalidad a las 72h en larvas de 3 días de *Musca domestica* utilizando las cepas con esporas y cristales.

Cepas	L.tratadas	Mort.24Hr.	Mort.48Hr	Mort.72Hr	%Mort.*
BV	75	2	1	1	5.2 a
FV	75	0	1	1	2.6 a
OV	75	1	1	1	3.9 a
GV	75	0	2	3	6.5 a
IV	75	0	2	2	5.2 a
PV	75	0	0	1	1.3 a
QV	75	0	0	1	1.3 a
Control	75	0	2	1	3.9 a

*Los promedios con la misma letra, son iguales estadísticamente, entre ellos ($P > 0.05$). Ninguna de las cepas obtuvo más de un cincuenta por ciento de mortalidad.

VII. DISCUSION

Debido a que carecíamos de una colonia de *M. domestica*, que aportara la suficiente cantidad de larvas para lograr los objetivos por nosotros planteados fue que decidimos establecer dicha colonia. Es por esto que el presente trabajo se inició con la evaluación de distintas dietas artificiales para la cría de *M. domestica* ya que las dietas para el desarrollo de insectos en condiciones de laboratorio, constituyen un punto crucial en la realización de investigación con cualquier tipo de insecto (Watson *et al.*,1993; Hogsette.,1992).

Existen diferentes consideraciones para el desarrollo de dietas para la producción de larvas de mosca doméstica. Entre estas consideraciones esta, el costo y la factibilidad en su elaboración. Por ejemplo, la dieta producida por Chemical Specialities Manufacturers' Associations (CSMA), utilizada para la cría de larvas de *Musca domestica* tiene un costo aproximado de 8.38 pesos por Kg de dieta, mientras que la desarrollada por Hogsette en 1992 tiene un costo aproximado de 1.77 pesos por Kg de dieta (Hogsette, 1992). Por su parte, el costo de la dieta que mostro la mayor eficiencia en este trabajo tiene un costo de 1.65 pesos por Kg de dieta. En esta primera parte se consiguió tener una dieta con valor economico similar al reportado por Hogsette.

Otro de los aspectos importantes a considerar en el desarrollo de dietas es la cantidad y calidad de los insectos obtenidos con las mismas. Por ejemplo con respecto al parámetro de porciento de pupación se obtuvieron mejores resultados con nuestra dieta (100 %) que los reportados por Watson *et al* en 1993 con un (72 %) y los reportados por

Hogsette 1992 con un (89.7 %). Con respecto a los porcentos de emergencia de nuestra dieta (82.1 %), fueron mejores que los reportados por Watson *et al* en 1993 con un (63 %). Con respecto a el parámetro de porciento de eclosión Hogsette reporta un (99.0 %) para su dieta y un (95.5 %) para CSMA, mientras que la empleada en este trabajo mostró un (77.7 %) (Hogsette, 1992; Watson *et al.*, 1993).

Por otro lado, los resultados del presente trabajo mostraron que el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, presenta potencialidad y podría ser utilizado como una alternativa de control biológico de *M. domestica*.

Dentro de las ventajas potenciales de esta alternativa de control se destaca la sustitución parcial o total del uso de compuestos químicos para el control de este insecto y en consecuencia se daría una reducción en la posibilidad del desarrollo de resistencia por parte del mismo, además de evitar daño ecológico.

Barson y cols. en (1994) evaluaron seis especies de hongos entomopatógenos para el control de larvas de *Musca domestica* e incluyeron en su trabajo cepas de *M anisopliae* y *B. bassiana*, además de otros géneros. Ellos encontraron que al evaluar la reducción en la emergencia de adultos, todos los aislados redujeron significativamente la emergencia de adultos a una dilución de 1×10^8 en comparación con otras diluciones, así como con el grupo control. Dichos resultados concuerdan con los reportados en este trabajo.

Barson y cols (1994) también encontraron que *Metarhizium anisopliae* y *T. cylindrosporum* fueron los mas sobresalientes en cuanto a la reducción de la emergencia

de adultos, en las diluciones de 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 y 1×10^5 en comparación con las demás diluciones y los testigos. Con respecto a esto, los resultados encontrados en este trabajo mostraron que todas las cepas *M. anisopliae* fueron mejores en el parámetro (Reducción del porciento de emergencia) con respecto a *B. bassiana*. Por ejemplo, Mr17 en las diluciones de 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 evitó mas del 50% de la emergencia, en comparación con Bb2, que solo en las diluciones de 1×10^8 y 1×10^7 fue capaz de una reducción similar (Tabla 16)

Watson y cols. en 1995 evaluaron dos cepas de *B. bassiana* (P89 y L90), con respecto a su patogenicia sobre adultos y larvas de *M. domestica*. Para la evaluación, ellos utilizaron excremento fresco de bovino el cual era inoculado con distintas diluciones de esporas de 1×10^{10} , 1×10^9 y $1 \times 10^8/\text{cm}^3$. Encontrando una efectividad marginal sobre el desarrollo larvario, tanto del grupo testigo como del tratado con una dilución de 1×10^8 , mostrando una mortalidad mínima. En ambos casos los insectos alcanzaron el estado adulto. Aunque dichas observaciones no pueden ser comparadas con nuestros resultados puesto que el diseño experimental es distinto, dado que ellos utilizaron excremento tratado, y nosotros infectamos a los insectos por inmersión, los resultados concuerdan en el hecho de que *Beauveria* mostró menor actividad tóxica que *Metarhizium*, resultados que concuerdan con los reportados por Barson y cols. en 1994.

Durante los años pasados las propiedades insecticidas de *B. thuringiensis* han sido evaluadas extensivamente. A pesar de que distintos autores han reportado distintos grados de resistencia por parte de la *M. domestica*, en su mayoría esta resistencia posee índices

muy bajos, si se le compara con la resistencia hacia los insecticidas químicos (Wilson y Burns, 1968). *B.thuringiensis* posee actividad contra distintos grupos de insectos como los lepidópteros, dípteros y coleópteros (Chilcott y Wigley., 1993).

Hodgman *et al* en el año de 1993 aislaron una cepa de *B. thuringiensis* que mostró poseer actividad contra larvas de *Musca* doméstica, así como hacia otros dípteros y lepidópteros . La δ -endotoxina purificada de este aislado, mató al 50% de las larvas de *M. domestica*, a una concentración de 10.2 mg/ml. Además, no se detectó la producción de la β -exotoxina (Hodgman, 1993).

Por último cabe mencionar que Robacker et al. (1996) evaluaron 55 aislados de *B. thuringiensis* con respecto a su actividad contra larvas de Mosca Mexicana de la fruta *Anastrephala ludens* y la mas sobresaliente fue la cepa HD2 con un 4% de mortalidad, mientras que nosotros, con esta misma cepa pero contra larvas de *Musca domestica* encontramos un 1.3% de mortalidad, utilizando en ambos casos un extracto crudo de esporas/cristales. Otro de los aislados sobresalientes en el trabajo de Robacker y cols. y que también fue evaluado por nosotros fue el HD 567 en donde ellos encontraron un 31.5% de mortalidad mientras que nosotros encontramos un 6.6% de mortalidad. Sin embargo en el trabajo de Robacker et al. se utilizó un precipitado, es decir un purificado por el método lactosa/acetona, en cambio nosotros utilizamos un extracto crudo de esporas/cristales.

VIII. CONCLUSIONES.

Los resultados de este trabajo de investigación, mostraron que:

- a) Es posible producir dietas para el desarrollo de larvas de *Musca domestica* en calidad y cantidad adecuadas para la realización de trabajos experimentales con este insecto.
- b) Al evaluar diez cepas de *Beauveria* se encontró que nueve cepas de *Beauveria* provocaron mas del 50% de mortalidad en larvas *Musca domestica*.
- c) Al evaluar once cepas de *Metarhizium* se encontró que todas las cepas provocaron mas del 50% de mortalidad en larvas *Musca domestica*.
- d) Las cepas de *B. thuringiensis* de colección (cepas HD) y aislados en el laboratorio no mostrarón potencial para reducir las poblaciones de larvas de *Musca domestica*.

LITERATURA CITADA

- Aarnio T. H. and Agathos, S.N. 1989. Production of extracellular enzymes and cyclosporin by Tolypocladium inflatum and morphologically related fungi. *Bionotechnol. Letters*. 11: 759-764
- Ainsworth, G. C. 1973. Introduction and keys to higher taxa "The fungi an advanced treatise" (Ainsworth, G. C. Sparrow; F. K. and Sussman, A. S. Eds.), Academic Press, vol. 4, p. 621.
- Alves, S. B. 1986. Patología general En: Control microbiano de insectos. Manole (Ed.) Brasil, pp. 170 y 273-277.
- Aizawa, K. 1971. Strains improvement and conservation of virulence of pathogens. In: *Microbial Control of insects and mites*. Burges, H.D. and Hussey, N.W. (Eds.), Academic Press, London, New York, pp. 655-672.
- Atkins, M. D. 1978. Biological control-organism against organism. *Insects in Perspective* MacMillan Publishers. London. pp. 421-437.
- Barson, G., Renn, N. and A. F. Bywater. 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J. Invertebr. Pathol.* 6: 107-113.
- Baumann, P., M. A. Clark, L. Baumann and A. H. Broadwell. 1991. Bacillus sphaericus as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiol. Rev.* 55: 425-436.
- Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians 1992. Growth of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana on cuticular components from the migratory grasshopper, Melanoplus sanguinipes. *Entomol. Exp. Appl.* 59: 165-173.
- Bigler, F. 1989. Quality assessment and control on entomofagous insects used for biological control. *J. Appl. Entomol.* 108: 390-400.
- Bowles, D. E., M. V. Meisch, A. A. Weathersbee, J. W. Jones, P. Efirid and D. Bassi. 1990. Efficacy of Bacillus sphaericus formulations against Psorophora columbiae larvae in small rice plots. *J. of the Amer. Mosquito Cont. Assoc.* 6: 631-634.
- Bravo, A., Lorence A. y R. Quintero. 1992. Perspectivas en la utilización de Bacillus thuringiensis como bioinsecticida. *Rev. de la Soc.Mèx. de Biotec. y Bioing.* 2: 139-154.
- Brindley, W. A. and A. A. Selim. 1984. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environ. Entomol.* 13: 349-353.

- Bull, D. L. and N. W. Pryor. 1991. Interactions of carbaryl with susceptible and multiresistant house flies (Diptera: Muscidae). *J. Econo. Entomol.* 84: 1145-1153.
- Butt, T. M., Wraight, S. P., Galaini-Wraight, S. Humber, R. A. Roberts, D.W. and R. S. Soper, 1988. Humoral encapsulation of the fungus Erynia radicans (Entomophthorales) by the potato leafhopper Empoasca fabae (Homoptera: Cicadellidae) conidia. *J. Invert. Pathol.* 52: 49-56.
- Carruthers, R. I., Feng, Z., Ramos, M. E. and R. S. Soper, 1988. The effect of solar radiation on the survival of Entomophaga grylli (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, 52: 154-162.
- Cerenius, L., Thornquist, P.O., Vey, A., Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1990. The effect of the fungal toxin destruxine on isolated crayfish haemocytes. *J. Insect. Physiol.* 36:785-789.
- Charnley, A. K. and R. J. St. Leger, 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. Ed: G. T. Cole and H. C. Hoch. Plenum Press, New York, (Eds.). *The fungal spore and disease initiation in plant and animals.* New York, Plenum, pp. 267-286.
- Chilcott, C. N. and P. J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of Bacillus thuringiensis from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 244-247.
- Cooler, R. R., D. G. Boucias, J. H. Franck, J. E., Maruniak. A. García Cañedo and C. Pendland. 1993. Characterization and description of a virus causing salivary gland hyperplasia in the housefly, Musca domestica. *Med. Vet. Entomol.* 7: 275-282.
- Daust, R.A. and Roberts, D.W. 1983. Studies on the prolonged storage of Metarhizium anisopliae conidia: effect of temperature and virulence against mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 143-150.
- Deacon, J. W., 1988. *Introducción a la micología moderna.* 1a. ed. DE. LIMUSA. México. pp. 310-316.
- Dulmage H. T. and K. Aizawa 1982. Distribution of Bacillus thuringiensis in nature. In Microbial and Viral Pesticides. E. Kurstak, Marcel Dekker Ed, Inc. New York. pp. 209-237.
- El-Sayed, G. N., Coudron, T. A. and C. M. Ignoffo. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus Nomurea rileyi. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 389-403.
- Evans, H. E. *Insect Biology: Entomophagus plants: a Textbook of Entomology.* Addison-Wesley. Publishers. Menlo Park, California, 1984. pp. 248-398.

- Fachino de Barros, I. and Monteiro de Barros, N. 1991. Production extracellular of enzymes by Nomuraea rileyi (Farlow) Samson. Rev. Microbiol. Sao Paulo, 22: 17-20.
- Fargues, J. and G. Remaudiere. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungus. Mycopathologia. 62: 31-37.
- Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R. and Itier, B. 1988. Efecct du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycete entomopathogene Nomuraea rileyi, a la surface d'un couvert vegetal. Entomophaga, 33: 357-370.
- Fargues, J., Maniana, N.K., Delmas, J.C. and N. Smits. 1992. Influence de la temperature sur la croissance in vitro d' Hypohomycetes entomopathogenes. Agronomie 12: 557-564.
- Foreyt, W.J. 1990. Veterinary Parasitology: Flies, Reference manual, second Ed. Washintong State University press. pp. 90-93.
- Ferron, P. 1978. Lutte biologique contre les insectes revageurs des culture au moyen de champignons entomopathogenes, DTI L4-AGRO, pp. 491-497.
- Ferron, P. 1981. Pests control by the fungi Beauveria and Metarhizium In : Microbial control of pest and plant dissaes. Burgues, H.D. (Ed.) Academic Press, N.Y. pp. 465-482.
- Ferron, P. 1985. Fungal control In: "Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology". Vol. 12, Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (Eds.), Pergamon press, pp. 313-346.
- Forgash, J., B. J. Cook and R. C. Riley. 1962. Mechanisms of resistance in diazinon-selected multi-resistant Musca domestica. J. Econ. Entomol. 55: 544-551.
- García, A.S., Messias, C.L., de Souza, H. M.L. and A. E. Piedrabuena. 1984. Patogenicidad de Metarhizium anisopliae a Ceratitis capitata (Wied) (Diptera, Tephritidae). Revista Bras. Ent. 28: 421-424.
- Geden, C. J., D. C. Steinkraus, S. J. Long., D. A. Rutz and W. L. Shoop. 1990. Susceptibility of Insecticide- Susceptible and Wild House Flies (Diptera: Muscidae) to Abamectina on white washed and unpainted wood. J. Econ. Entomol. 85: 1935-1939.
- Geden, C. J., D. A. Rutz., J. G. Scott and S. J. Long. 1992. Susceptibility of House Flies (Diptera: Muscidae) and five pupal parasitoids (Hymenoptera: Pteromalidae) to abamentin and seven commercial Insecticides. J. Econ. Entomol. 85: 435-440.

- Geden, C. J., Rutz, D. A. and D. C. Steinkraus. 1995. Virulence of different isolates and formulations of Beauveria bassiana for house flies and the parasitoid Muscidifurax raptor. *Biological Control*. 5: 615-621.
- Glofcheskie, B. D. and G. A. Surgeoner. 1990. Moscovy ducks as an adjunct for the control of the house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ.Entomol.* 83: 788-791.
- Goettel, M. S., St. Lager, R. J. Rizzo, V. W., Staples, R. C. and D. W. Roberts. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae during penetration of cuticle host (*Manduca sexta*). *J. Gen.Microbial.* 135: 2233-2239.
- Goettel, M.S., Poprawski, T. J., Vandenberg, J. D., Li, Z. and D.W. Roberts. 1990. Safety to nontarget invertebrates of insecticides, CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 259
- Guillespie, A. T. and Cladon, N. 1989. The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.*, 27: 203-215.
- Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hall, M. I. 1979. El uso de microorganismos en el control biológico. "Control biológico de las Plagas de insectos y Malas Hierbas". Ed CECSA México. pp.716-717.
- Harris, C. R., Turnbull, S. A and J. W. Whistlecraft. 1982 Multiple resistance shown by field strains of house fly Musca domestica (Diptera: Muscidae), to organochlorine, organophosphorus, carbamate, and pyrethroid insecticides. *Canadian Entomol.* 14: 447-454.
- Harwood, R. F. and M. T. James. 1979. *Entomology in human and animal health*. MacMillan Publishing Co. New York. pp. 84-88.
- Hassan, A. E. and A. K. Charnley. 1989. Ultrastructural study of the penetration by Metarhizium anisopliae through Dimilin-affecte cuticule of Manduca sexta. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 117-124.
- Heimpel, A. M. and T. A. Angus 1963. Diseases caused by creating spore-forming bacteria. In: *Insect Pathology, and Advances Treatise* Steinhaus E.A. (Ed.), New York. pp. 21-73.
- Himeno, M. 1987. Mechanism of action of Delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis. *Toxin Rev.* 6: 45-71.

- Hodgman, T. C., Y. Zinim, S. Ming, T. Sawyer, C. M. Nicholls and D. J. Ellar. 1993. Characterization of a Bacillus thuringiensis strain which is toxic to the housefly Musca domestica. FEMS Microbiol. Let. 114: 17-22.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbol. Rev. 53: 242-255.
- Hogsette, J. A. 1992. New diets for production of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in the laboratory. J. Econ. Entomol. 85: 2291-2294.
- Ignoffo, C. M. and Y. Gard. 1970. Use of an agar-base diet and house fly larvae to assay β -exotoxina activity of Bacillus thuringiensis. J. Econom. Entomol. 63: 1987-1989.
- Keller, S. 1991. Les maladies fongiques des ravageurs et leur importance pratique. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 23: 299-310.
- Klier, A. and G. Rapoport. 1987. Bacillus larval toxin crystal protein. Microbiol. Sci. 4: 274-276.
- Knapp, F. W., J. E. Cilek and J. G. Burg. 1992. Horn fly insecticide resistance: suggested management practices. Compend. pp. 694-697.
- Lacey, L. A. and A. H. Undeen. 1986. Microbiology control of black flies and mosquitoes, Ann. Rev. Entomol. 31: 265-296.
- Langford, G. S., Johnson W. T. and W. C. Harding. 1954. Bait studies for fly control. J. Econ Entomol. 47: 438-441.
- Latch, G. C. M. 1976. Studies on the susceptibility of Oryctes rhinoceros to some entomogenous fungi. Entomophaga 21: 31-38.
- Leaning, W. H. D. and J. Guerrero. 1987. The economic impact of parasitism in cattle. Proc. of MSD AGVET Symposium. Montreal, Canada. pp. 9-24.
- Lecuona, R. E. 1986 Control microbiano de Diatraça saccharalis (Fabr. 1774) (Lep- Pyralidae) com Beauveria bassiana (Bals) Vuill. B. brongniartii (Sacc) Retch e virus da granulose e simulacao des efectos de sua aplicao (Tesis de Maestria) Piracicaba, Brasil. p.170.
- Lecuona, R., Riba, G., Cassier, P. and J. L. Clement. 1991. Alteration of the epicuticular hydrocarbons during infection with Beauveria bassiana or B. brongniartii. J. Invertebr. Pathol., 58: 18-18.

- Legner, E. F. 1995. Biological control of diptera of medical and veterinary importance. J. Vector Ecol. pp. 59-120.
- Lesne, J. 1975. Aperçu psychophysiologique sur la symptomatologie de l'infection érythrozoïque chez les insectes. INRA, septembre: 1: 2-16
- Lezama, G. R. 1993. Patogenicidad de hongos (Hyphomycetes) y del nematodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora Poinar, sobre Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Tesis (Doctor en Ciencias), F.C.B. A. U. de C. México, p.117.
- Locke, M. 1984. The structure of insect cuticle. New York: Rockefeller Foundation pp. 38-53.
- Luthy, P. and H. R. Ebersold. 1981. Entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis. Pharmather Pergamon Press, Great Britain. 13: 257-283
- Mac Coy, C. M. 1990. Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: New directions in Biological Control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases, Alan, R. (De.) Liss. Inc. pp 139-159.
- Mac Innis, T. Jr. 1975. Biochemical basis of pathogenesis of fungal diseases of vectors. In: "Biological Regulation of Vectors" (Biggs, J. D. Ed.). Dhen. Publ. pp. 95-110.
- Majchrowicz, I. and J. T. Poprawski. 1993. Effects in vitro of entomopathogenic fungi. biocontrol. Sci. and Tecnol. 3: 321-336.
- Maniania, N. K. 1991. Potential of some fungal pathogens for the control of pests in the tropics. Insect Sci. Appl. 12: 63-70.
- Magalhaes, B. P., Shields, E. J., Butt, T. M., Roberts, D. W. and R. A. Humbert. 1990. Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus Zoopthora radicans (Zygomycetes: Entomophthorales). J. Invertebr. Pathol. 55: 284-288.
- Magalhaes, B.P., St Leger, R.J. Humbert, R.A. Allee, L.L., Shields, E.J. and D.W. Roberts. 1991. Nuclear events during germination and appressorial formation of the Entomophthorales. J. Invertebr. Pathol. 57: 43-49.
- McGovran, E. R. and P. G. Piquett. 1945. Toxicity of benzene hexachloride to housefly larvae. J. of Econ. Entomol. 38: 719-720.
- Merchamt, M. E., R. V. Flanders and R. E. Williams. 1985. Sampling method comparisons for estimation of parasitism of Musca domestica (Diptera: Muscidae) pupae in accumulated poultry manure. J. Econ. Entomol. 78: 1299-1303.

- Meyer, J. A., B. A. Mullens, T. C. Cyr and C. Stokes. 1990. Commercial and naturally occurring fly parasitoids (Hymenoptera: Pteromalidae) as biological control agents of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on California dairies. *J. Econ. Entomol.* 83: 799-806.
- Miller, J. A. and W. F. Chamberlain. 1989. Azadirachtin as a larvicide against the horn fly, stable fly, and house fly (Diptera: Muscidae) *J. Econ. Entomol.* 82: 1375-1378.
- Moorhouse, E. R., Gillespie, A.T. and Charnley, A.K. 1993a. Laboratory selection of Metarhizium spp. isolates for control of vine weevil larvae (Otiorhynchus sulcatus). *J. Invertebr. Patol.* 62: 15-21.
- Moorhouse, E.R., Gillespie, A.T. and A. K. Charnley. 1993b. Selection of virulent and persistent Metarhizium anisopliae isolates to control black vine weevil (Otiorhynchus sulcatus) larvae on glasshouse begonia. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 67-52.
- Moorhouse, E. R., Gillespie, A.T. and Charnley, A.K. 1994. The influence of temperature on the susceptibility of vine weevil, Otiorhynchus sulcatus (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae), larvae to Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Ann. Appl. Biol.* 124: 185-193.
- Moussa, A.Y. 1978. A new virus disease in the house fly, Musca domestica (Diptera). *J. Invert. Pathology.* 31: 204-216.
- Murrin, F. and R. A. Nolan. 1987. Ultrastructure of the infection of spruce budworm larvae by the fungus Entomophaga aulicae. *Can. J. Bot.* 65: 1694-1706.
- Petersen, J. J. and J. A. Meyer. 1983. Host preference and seasonal distribution of pteromalid parasites (Hymenoptera: pteromalidae) of stable flies (Diptera: Muscidae) associated with confined livestock in eastern Nebraska. *Environ. Entomol.* 12: 567-571.
- Petersen, J. J., Meyer J. A., D. A. Stage and P. B. Morgan. 1983. Evaluation of sequential releases of Spalangia endius (Hymenoptera: Pteromalidae) for control of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) associated with confined livestock in eastern Nebraska. *J. Econ. Entomol.* 76: 283-286.
- Pimentel, D. and M. Burgess. 1985. Effects of single versus combinations of insecticides on the development of resistance. *Environ. Entomol.* 14: 582-589.
- Poprawski, T. J., Marchal, M. and Robert, P. H. 1985. Comparative susceptibility of Otiorhynchus sulcatus and Sitona lineatus (Coleoptera: Curculionide) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. *Environ. Entomol.* 14: 247-253.

- Porter, A.G., Davidson E. W. and J. Weiliu. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 57: 838-861.
- Prieto, J. J. Virulencia del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Sobre larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en laboratorio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima. Tecomán. Colima. 1996.
- Quiroz, R. H. 1990. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Infestaciones por moscas y mosquitos. Ed. Limusa. Méx. D.F. pp. 703-715.
- Rao, R. and B. A. Nagasampagi. 1995. Development of combined use of neem (*Azadirachta indica*) and water management for the control of culicine mosquitoes in rice fields. *Med. Vet. Entomol.* 9: 25-35.
- Reinecke, P., Andersch, W., Stenzel, K. and J. Hartwing. 1990. Bio 1020. A new microbial insecticide for use in horticultural crops In: Brighton crop protection conference Pests and diseases. pp 49 -54.
- Retault, C. and Vey, A, 1977. Production désterases ef de N-acetil-D- glucosaminidase dans le tegument du coleoptere *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopethogene *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga* 22 194-289.
- Rhodes, D. J. 1993. Formulation of biological control agents. In: Explotation of microorganisms. Jones, D.G. (Ed.), Chapman & Hall, London. pp. 411-439.
- Riba, G., Katagiri, K. and R. Kawakami. 1982. Preliminary studies on the susceptibility of the Silkworm *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to some entomegenous Hyphomicetes. *Appl. Entomol. Zool.*, 17: 238-343.
- Riba, G., Keita, A., Soares, G. G. Jr. and P. Ferron. 1986. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolyocladium cylindrosporum* as pathogen of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 469-473.
- Riba, G. and C. Silvy. 1993. La lutte biologique et les biopesticides. *Phytoma-la defese des vegetaux* 452: 21-32.
- Robacker, D. C., Martínez, J. A., García, J. A., Díaz, M. and C. Romero. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Biol. and Microbiol. Cont.* 1:105-110.

- Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Burges, H.D. (Ed.), Academic Press, London, New York. pp. 144-464.
- Roberts, D.W and A. S. Campell, 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Misc: Publ. Entomol. Soc. Am.* 10: 1-80.
- Rodríguez, J. L. and L. A. Riehl. 1962. Control of flies in manure of chickens and rabbits by cockerels in southern California university, citrus research center and agricultural experiment station, Riverside. *J. Econ. Entomol.* 55: 473-477.
- Rojas, M. 1990. Parasitismo de los rumiantes domésticos, terapia prevención y modelos de aprendizaje. De. MAIJOSA, Lima Perú. pp.355-361.
- Rombach, M.C., Rombach, G.M., Aguda, R.M. and D. W Roberts. 1987. Counting conidia of Metarhizium flavoviride, and Beauveria bassiana by light transmission measurements on conidial suspensions. *Philipp. Ent.* 7: 43-50.
- Rutz, D. A. and R. C. Axtell. 1980. House fly (Musca domestica) parasites (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with poultry manure in North Carolina. *Enviro. Entomol.* 9: 175-180.
- Saito, K., N. Motoyama and W. C. Dauterman. 1991. Studies on the resistance to various insecticides of a house fly strain (Diptera: Muscidae) selected with azamethiphos. *J. Econ. Entomol.* 84: 1635-1637.
- Salazar, S. A. 1981. Dinámica poblacional de larvas y adultos de mosca domestica (Diptera: Musidae) en granjas del municipio de Ramos Arizpe, Coah. Tesis de licenciatura. Division de Agronomía de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.
- Saldaña, J. M. y J.P. Ortega. 1989. Diseño de una técnica rápida y sencilla para determinar la presencia de Bacillus thuringiensis en muestras de suelo. *Publ. Biol., F.C.B., U.A.N.L., Méx.* 3: 15-24.
- Samuels, R. I., Charnley, A.K. and S. E. Reynolds. 1988a. The role of destruxins in the pathogenicity of tree strains of Metarhizium anisopliae for the tobacco hornworm Manduca sexta *Mycopathology.* 104: 51-58.
- Samuels, R. I., Charnley, A.K. and S. E. Reynolds. 1988b. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compound produced by the entomopathogenic fungus, Metarhizium anisopliae. *Comp. Biochem. Physiol.* 90: 403-412.

- Schmidtman, E.T., Watson, D.W. and P. A. W. Martin. 1993. Bacterial control of flies in Livestock operations. American Chemical Society. pp. 47-53.
- Scott, J. G., K. Dong, C. J. Geden and D. A. Rutz. 1990. Evaluation of the biochemical basis of insecticide selectivity between host and parasitoid species. *Eviron. Entomol.* 19:1722-1725.
- Scott, G., J. Geden, D. A. Rutz and N. Liu. 1991. Comparative toxicity of seven insecticides to immature stages of Musca domestica (Diptera: Muscidae) and two of its important biological control agents, Muscidifurax raptor and Spalangia cameroni (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Econ. Entomol.* 84:776-779.
- Shaner, G. Stromberg, E. L. Lacy., G. H., Barker, K. R. and T. P. Pirone. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 47-66.
- Sneh, B. 1991. Isolation of Metarhizium anisopliae from insect on an improved selective medium based on wheat germ. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 269-273.
- Soderhall, K. 1982. Fungal cell wall beta-1,3 glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 565-573.
- St. Leger, R. J. 1991. Integument as a barrier to microbial infections In: The physiology of insect epidermis A. Retnakaran, K. Binnington. (Eds) Australia, Csiro pp. 286-308.
- St. Leger R.J., Butt, T.M. Staples, R. C. and D. W. Roberts. 1989. Synthesis of proteins including a cuticle degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. *Exp. Mycol.*, 13: 253-262.
- Urquhart, G.M. 1987 *Veterinary Parasitology. Family Muscidae* (Ed.) Longman, Group. England, pp. 149-156.
- Vera, J. y B. Domínguez. 1985. Biología, hábitos y control de moscas de los establos lecheros. Memorias de la 1era. Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. Méx. D.F. pp. 49-58.
- Vey, A. 1971. Etude des reactions cellulaires anticryptogamiques chez Galleria mellonella La structure et ultrastructure des granulomes a Aspergillus niger V. Tiegh. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 3:17-30.
- Vey, A., Quiot, J.M., Vago, C. and J. Fargues. 1985. Effect immunodepresseur de toxines fongiques: inhibition de la reaction d'encapsulation multicellulaire par les destruxines. *C.R. Acad.Sci.(Paris)*, t.3:647-651.

- Vey, A. and J. M. Quit. 1989. Effect cytotoxique in vitro et chez l'insecte hôte des destruccines toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopatogene. Metarhizium anisopliae. Can J. Microbiol. 35: 1000-1008.
- Ville, A.C. 1977. Biología. Séptima edición, Editorial Interamericana. México. pp.297-304.
- Watson, D.W., Martin, P.A.W. and E.T. Schmidtman. 1993. Egg yolk and Bacteria growth medium for Musca domestica (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 30: 820-823.
- Wilson, B. H. and E. C. Burns. 1968. Introduction of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in laboratory Strain of House Flies. J. Econ. Entomol. 16: 1747-1748.
- Zimmermann, G. 1982. Effect of high temperatures and artificial sun light on the viability of conidia of Metarhizium anisopliae. J. Invertebr. Pathol. 40: 36-40
- Zimmermann, G. 1986. Insect pathogenic fungi as pest control agents. Fortschritte der Zoologie 32: 217-231.
- Zimmermann, G. 1992. "Use of the fungus, Beauveria brongniartii, for the control of pathogens in scarab in Scarab Pest Management" T.A. Jackson and T. R. Glare (Eds.) Intercept, Andover, United, Kingdom. pp. 199-208
- Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae and its potential as a biocontrol. Pestic Sci. 37: 375-379.

