UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum* L.

Por

Q.B.P. MONICA GUADALUPE LOZANO CONTRERAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA

SEPTIEMBRE, 2007

Q.B.P. MONICA GUADALUPE LOZANO CONTRERAS

TD
Z5320
FCB
2007
.L625

1020160688

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum* L.

Por

Q.B.P. MONICA GUADALUPE LOZANO CONTRERAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA

SEPTIEMBRE, 2007

1045959

FONDO
TESIS

TD
Z5320
FCB
2007
.L625

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum* L.

Por

Q.B.P. MÓNICA GUADALUPE LOZANO CONTRERAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología

SEPTIEMBRE, 2007

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith **y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii*** Bellows & Perring **en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum*** L.

Comité de Tesis

Dr. Luis J. Galán Wong
Director de la tesis

Dra. Myriam Elías Santos
Secretario

Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal

Dr. Alejandro González Hernández
Vocal

Dr. Hugo A. Luna Olvera
Vocal

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith **y Evaluación de su efectividad biológica contra** *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring **en cultivo de Algodón** *Gossypium hirsutum* L.

Presenta

Q.B.P. Mónica Gpe Lozano Contreras

Este trabajo se realizo en Unidad de Bioprocesos de la Facultad de Ciencias Biológicas, y en las instalaciones del Campo Experimental de la Laguna (CELALA), del INIFAP localizada en el municipio de Matamoros, Coahuila, México.

Dr. Luis J. Galán Wong
Director interno

Dr. Urbano Nava Camberos
Director externo

SEPTIEMBRE, 2007

Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum* L.

Presenta

Q.B.P. Mónica Guadalupe Lozano Contreras

Dr. Luis J. Galán Wong
Director de la tesis

Dra. Myriam Elías Santos
Co-Directora

SEPTIEMBRE, 2007

"Son la Perseverancia y la Paciencia, herramientas infalibles que nos llevan hacia una aproximación al conocimiento".

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis dos grandes amores, mi esposo y mi hija.

A mi esposo David por su amor, paciencia, esfuerzo y cooperación durante estos años, que me brindaron la fortaleza necesaria para lograr esta meta.

A mi hija Itzel por su amor y paciencia, y por todo ese tiempo que le pertenecía y que utilice en la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Myriam Elías Santos, por haberme dado la oportunidad de caminar este sendero a su lado, brindándome su confianza y lo más importante su amistad, así como los conocimientos brindados a lo largo de mi trabajo de tesis.

Mi eterno agradecimiento al Dr. Urbano Nava Camberos, por su guía y apoyo incondicional en la realización de mi trabajo, así como sus consejos que me darán la oportunidad de llegar hacer un excelente investigador.

A la Dra. Catalina Rivas Morales, por su auxilio cada vez que tuve problemas con mi trabajo, por sus consejos brindados para mi formación doctoral, así como la revisión de este manuscrito y sobre todo por tener confianza en mi.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, gracias por la oportunidad que me brindo para realizar este Doctorado, sobre todo por haberme encaminado a la Biotecnología a través de su cátedra años atrás cuando era una estudiante de licenciatura.

Al Dr. Alejandro González Hernández, por haberme presentado a las personas correctas, y sobre todo por haber sido mi maestro, por sus consejos, y por formar parte de este trabajo muchas gracias.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera, por su apoyo a lo largo de mi Doctorado, su asesoria y su participación en este proyecto, gracias.

Al Ing. Luis Palacios, por su valiosa ayuda, sus consejos y su hospitalidad.

Agradezco mucho al personal del Campo Experimental La Laguna, por su valiosa ayuda en esta investigación, gracias por su amistad, por haberme regalado su tiempo y sobre todo por haberme dado siempre un caluroso recibimiento.

CONTENIDO

Sección **Página**

1. INTRODUCCIÓN 1

2. HIPÓTESIS 2

3. OBJETIVO GENERAL 3
3.1 Objetivos Específicos 3

4. REVISIÓN DE LITERATURA 3

4.1 Hongos Entomopatógenos 4
4.1.1 Generalidades 4
4.1.2 Efectividad de Hongos Entomopatógenos 4
4.1.3 Formas de Utilización y Manejo de Hongos Entomopatógenos .. 6
4.1.4 Potencialidad de Uso de Hongos Entomopatógenos 6
4.1.5 Producción Masiva de Hongos Entomopatógenos en México 8
4.2. *Paecilomyces* spp 9
4.2.1 Importancia y Potencial de uso 9
4.2.2 Características de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith 9
4.2.3 Espectro de Acción / Plagas Afectadas 11
4.2.4 Ciclo de Infección del hongo 11
4.2.5 Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* 13
4.2.6 Comportamiento de los Cultivos Miceliales en Biorreactores ... 14
4.2.7 Relación de la agitación y la viscosidad en cultivos miceliales ... 18
4.2.8 Morfología miceliar en medios cultivo líquidos 18
4.3 *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring) 21
4.3.1 Ubicación Taxonómica 21
4.3.2 Morfología y Ciclo Biológico 21
4.3.3 Daños 24
4.3.4 Distribución e Importancia Económica 26
4.3.5 Principales Plantas Hospedantes de MBHP en la Comarca 27
4.3.6 Manejo Integrado 27

5. MATERIALES Y MÉTODOS 31

5.1 Conservación y Obtención del material biológico 32
5.1.1 Origen de la cepa 32
5.1.2 Medios de Cultivo 32
5.1.3 Preparación del pre-inoculo 32
5.1.4 Preparación de los medios de cultivo 33
5.1.5 Condiciones de Propagación 33
5.1.6 Fermentador utilizado 33

5.1.7 Inoculación del Fermentador 33
5.1.8 Producción de blastosporas en el Fermentador 34
5.1.9 Cuantificación de blastosporas 34
5.1.10 Determinación de Peso seco 34
5.1.11 Determinación de Azúcares 35
5.1.12 Recuperación de las blastosporas 35
5.1.13. Determinación del porciento de germinación 35
5.1.14 Determinación del k_La 36
5.1.15 Formulación de los productos obtenidos 36
5.1.16 Análisis Estadísticos 36
5.1.17 Diseño Experimental 37

5.2 Evaluación de efectividad en campo 38
5.2.1 Ubicación del Experimento 38
5.2.2 Manejo Agronómico del Cultivo 38
5.2.3 Tratamientos 38
5.2.4 Diseño Experimental 39
5.2.5 Variables Evaluadas 40
5.2.6 Análisis Estadístico 40

6. RESULTADOS 41

6.1. Producción de *P. fumosoroseus* 41
6.1.1 Producción de blastosporas a nivel de fermentador 41
6.1.2 Cinética de crecimiento en base a Peso Seco 42
6.1.3 Cinética de crecimiento en base a Consumo de Azúcares 44
6.1.4 Coeficiente de Transferencia de Oxígeno (k_La) 45
6.1.5 Viabilidad de las blastosporas 46
6.1.6 Ventajas y Desventajas de la Fermentación en cultivo Líquido 49
6.2. Efectividad biológica de *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii* 52

7. DISCUSIÓN 59
7.2. Discusión sobre la efectividad biológica 67

8. CONCLUSIONES 72
9. RECOMENDACIONES PARA UNA FUTURA INVESTIGACIÓN 73
10. LITERATURA CITADA 74

11. APÉNDICE 90

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1. Características microscópicas y macroscópicas de *Paecilomyces* spp. 10

2. Ninfa de *Bemisia argentifolii* infectada por *P. fumosoroseus* 11

3. Producción de hongos entomopatógenos en cultivo sólido y cultivo líquido .. 13

4. Huevecillo de *B. argentifolii* 22

5. Etapas ninfales de *B. argentifolii* 23

6. Ultima etapa ninfal de *B. argentifolii* 23

7. Adulto de *B. argentifolii* 24

8. Enemigos naturales de la mosquita blanca 29

9. Insecticida químico Endosulfan 29

10. Trampa amarilla para monitoreo de la plaga 30

11. Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* a escala fermentador en dos medios de cultivo líquido 41

12. Cinética de crecimiento de *P. fumosoroseus* cepa 612 a nivel de fermentador en ambos medios de cultivo líquido. La gráfica muestra concentración de biomasa 43

13. Cinética de crecimiento de *P. fumosoroseus* cepa 612 a nivel de fermentador en ambos medios de cultivo líquido. La gráfica muestra el consumo de azúcares 44

14. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en dos medios líquidos almacenados a 4 °C y formulados con tierra de diatomeas 47

15. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en dos medios líquidos sin formular, almacenados a 4 °C 48

LISTA DE TABLAS

Tabla **Página**

I. Diferencias que ocurren de forma natural en los hongos según varios autores. 5

II. Productos comerciales de hongos entomopatógenos 7

III. Enfermedades y virus de plantas transmitidos por *Bemisia* spp 26

IV. Diseño experimental para la determinación de los siguientes parámetros: cuenta de blastosporas, peso seco y consumo de azúcares 37

V. Diseño experimental para la determinación de los siguientes parámetros: viabilidad con soporte y viabilidad sin formular 37

VI. Diseño experimental de los tratamientos para el bioensayo a nivel de campo. 39

VII. Parámetros determinados en la producción de *P. fumosoroseus* cepa 612 en ambos medios a nivel fermentador después de 72 horas 42

VIII. Valores de k_La obtenido s a 520 r.p.m y 1 vvm en ambos medios de cultivo 45

IX. Costos de los productos 51

X. Porcentaje de ninfas infectadas de *B. argentifolii* sobre cultivo de algodón, al segundo día después de la aplicación de los tratamientos ... 53

XI. Porcentaje de ninfas infectadas de *B. argentifolii* sobre cultivo de algodón, al cuarto día después de la aplicación de los tratamientos ... 55

XII. Porcentaje de ninfas infectadas de *B. argentifolii* sobre cultivo de algodón, al sexto día después de la aplicación de los tratamientos 57

APÉNDICE

Apéndice **Página**

A. Velocidad de toma de oxígeno y concentración de oxígeno disuelto en condiciones de limitación de O_2 91

B. Curva de fluidez para representar la viscosidad dinámica y aparente 92

C. Cálculos del k_La de la fermentación 93

D. Integración de la ecuación de transferencia de oxígeno disuelto 94

E. Pasos para evaluar el k_La por el método de desgasificación 95

F. Determinación del k_La 96

G. Secuencia de cálculo de la correlación para estimar k_La 97

H. Método de mínimos cuadrados 98

I. Análisis de Varianza Factorial obtenidos en la producción de las blastosporas de P. fumosoroseus a nivel fermentador con ambos tratamientos 100

J. Análisis de Varianza Factorial obtenidos del peso seco de las blastosporas a nivel fermentador con ambos tratamientos 101

K. Análisis de Varianza Factorial obtenidos del consumo de azúcares de *P. fumosoroseus* a nivel fermentador con ambos tratamientos 102

L. Análisis de varianza factorial de los resultados de sobrevivencia de las blastosporas formuladas con tierra de diatomeas con ambos tratamientos 103

M. Análisis de varianza factorial de los resultados de sobrevivencia de las blastosporas formuladas sin tierra de diatomeas con ambos tratamientos 104

N. Valores de las diferentes dosis empleadas 105

O. Comparación de medias de los tratamientos con *P. fumosoroseus* 612 aplicados contra *B. argentifolii* en cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) al segundo día después de la aplicación .. 106

P. Comparación de medias de los tratamientos con *P. fumosoroseus* 612 aplicados contra *B. argentifolii* en cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) al cuarto día después de la aplicación ... 107

Q. Comparación de medias de los tratamientos con *P. fumosoroseus* 612 aplicados contra *B. argentifolii* en cultivo de algodón (Gossypium hirsutum L.) al sexto día después de la aplicación ... 108

NOMENCLATURA

ANOVA	Análisis de varianza
ARS	Agricultural research service
AS	Alta diferencia significativa
B. bassiana	*Beauveria bassiana*
B. argentifolii	*Bemisia argentifolii*
B. tabaci	*Bemisia tabaci*
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
Cf	Caldo fermentativo
C. Rivas	Catalina Rivas (medio de cultivo)
Cols.	Colaboradores
cm	Centímetros
Cg*	Concentración del oxígeno disuelto
CL	Concentración del oxígeno disuelto en el seno del líquido
°C	Grados centígrados
d	Días
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
Dt	Diámetro del tanque
esp/mL	Esporas por mililitro
et al	Y los demás
F. Calc.	Prueba de F. calculada
$FeSO_4$	Sulfato de ferroso
g	gramos
g/L	gramos por litro
ha	Hectárea
h	horas
h	Altura (metros)
h^{-1}	Horas a la menos uno
H_2O	agua

HR	Humedad relativa
kg	kilogramos
KH_2PO_4	fosfato ácido de potasio
k_La	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxigeno (h^{-1})
km	kilómetro
DL_{50}	Dosis letal
L	Litro
μa	Viscosidad aparente
MBHP	Mosquita blanca de la hoja plateada
m.d.d	Millones de dólares
mg/mL	miligramos por mililitro
$MgSO_4$	sulfato de magnesio
mL	mililitro
m^2	Metro cuadrado
mm^2	Milímetro cuadrado
η	viscosidad
NS	Diferencia no significativa
No	Número
O_2D	Oxígeno Disuelto
O_2	Oxígeno
PDA	Agar papa dextrosa
P. de error	Probabilidad de error
Pg/V	Potencia gaseada por volumen
P. farinosus	*Paecilomyces farinosus*
P. fumosoroseus	*Paecilomyces fumosoroseus*
pH	potencial de hidrógeno
P/V	Potencia por unidad de volumen
$\sqrt{P}$	proporción
r.p.m	revoluciones por minuto
Solución Co	solución de cobalto
Solución Mg	solución de magnesio
Solución Zn	solución de zinc

sp	Especie
spp	Especies
τ	Esfuerzo cortante
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	United States Department of Agriculture
U.V.	Luz ultravioleta
Vg	velocidad para un campo gravitacional (cm/seg)
Vs	Velocidad superficial del gas
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
v/v	Volumen por volumen
®	Registrado
%	Por ciento

RESUMEN

En tiempos recientes se ha visto que existen varias ventajas en usar cultivos líquidos para la producción de blastosporas. Estos incluyen principalmente los procesos de escalamiento que son relativamente fáciles, así como el control de parámetros tales como temperatura, aireación y pH. En este trabajo evaluamos la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* Brown & Smith, usando un medio de cultivo líquido barato a nivel fermentador de 14 L (con un volumen de trabajo de 5 L), comparándolo con un medio usado comúnmente para la producción y viabilidad de las blastosporas, así como el control biológico de estas contra *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. Los dos medios usados contuvieron la misma concentración de glucosa, pero se diferenciaron en la fuente de Nitrógeno (medio M. Jackson que contiene casaaminoácidos y el medio C. Rivas contiene peptona de colágeno y extracto de levadura). Inicialmente con un inoculo de $1x10^6$ blastosporas/mL, el medio C. Rivas produce 2.4 $x10^{10}$ blastosporas/mL después de 72 h en agitación de 520 r.p.m y 1 vvm, mientras que el medio M. Jackson con la misma agitación obtiene 2.7 $x10^8$ blastosporas/mL. Al tiempo que se estableció un coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) de 115.38 h^{-1} para ambos medios. A partir de ello se observó que los microorganismos en el medio M. Jackson crecieron más lentamente durante fase log y alcanzaron la fase exponencial hasta después de 36 h de fermentación. En tanto que la viabilidad de las blastosporas se mantuvo más alta (65%) en el medio M. Jackson que las obtenidas en el medio C. Rivas (59%), durante un tiempo de 150 días, almacenadas a 4 °C y formuladas con un soporte (tierra de diatomeas). Por otra parte a nivel de campo los bioensayos de control sobre *B. argentifolii* fueron más efectivos con las formulaciones de los medios de cultivo obtenidos en el fermentador (C. Rivas y M. Jackson), por lo que las blastosporas de *P. fumosoroseus* mostraron al final del muestreo una mortalidad del 65%, con respecto a Specifik® (testigo biológico) y Endosulfan (testigo químico) que son productos comerciales, los cuales lograron un 40% de mortalidad. En general las formulaciones con blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas en el medio C. Rivas fueron 100% más efectivas y con mayor poder residual sobre los cultivos de algodón que las obtenidas en el medio M. Jackson. Concluyendo que el medio que contiene peptona de colágeno y extracto de levadura es una alternativa para la producción de las blastosporas de *P. fumosoroseus,* proporcionando costos más bajos, una producción más alta y un tiempo más corto de la propagación para el control de *B. argentifolii.*

Palabras clave: Blastosporas, Bioensayos, Diferentes fuentes de nitrógeno, Producción, *P. fumosoroseus.*

ABSTRACT

There are many advantages to using liquid cultures for the production of blastospores. These include mainly the processes of scaling which are relatively easy, as well as the control of parameters such as temperature, aeration and pH. In this work, we evaluated the production of *P. fumosoroseus* Brown & Smith blastospores using a low-cost liquid culture medium in a fermenter of 14 L (with a volume of work of 5 L), in comparison to a medium commonly used for this purpose, with regard to yield and viability of blastospores, as well as the biological control of these against *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. The two media contained the same concentration of glucose but differed in N source (M. Jackson containing casamino acids and C. Rivas provided with collagen peptone and yeast extract). Starting with an inoculum of $1x10^6$ blastospores/mL, C. Rivas medium produced $2.4x10^{10}$ blastospores/mL after incubation for 72 h at 520 r.p.m agitation and 1 vvm aeration, while only 2.7 $x10^8$/mL were produced with M. Jackson. A coefficient of transference settled down of I oxygenate k_La of 115.38 h^{-1} for both mediums. The viability of the blastospores stayed more discharge (65%) in the average M. Jackson that obtained in the average C. Rivas (59%), during a time of 150 days, stored to 4°C and with the support (Earth of diatomeas). At field level the bioassays of control on *B. argentifolii* is more effective with the obtained formulations of studied mediums of culture (C. Rivas and M. Jackson), since the blastospores of *P. fumosoroseus* showed at the end of the sampling a mortality of 65%, with respect to the other treatments, Specifik® (biological witness) and Endosulfan (chemical witness) commercial products which profit a 40% of mortality. The formulations with blastospores of *P. fumosoroseus* obtained in the average C. Rivas greater were more effective 100% and with being able residual on the cotton cultures, that obtained in the average M. Jackson. The medium that contain peptone of collagen and yeast extract are an alternative for the production of the blastosporas of *P. fumosoroseus*, providing lower costs, one more a higher production and a shorter time of the propagation, for the control of *B. argentifolii*.

Key words: Nitrogen Blastospores, Bioassays, Different sources, Production, *P. fumosoroseus*.