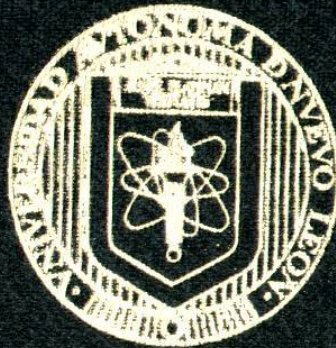


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



**"PRODUCCION DE ESPORAS DE *Paecilomyces*
fumosoroseus EN DIFERENTES MEDIOS
DE CULTIVO LIQUIDOS"**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

POR:

Q.B.P. ISELA QUINTERO ZAPATA

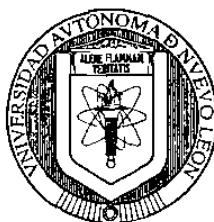
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., JUNIO DE 1998

IM
SB975
Q5
C.1



1080087107

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



**"PRODUCCION DE ESPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS"**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

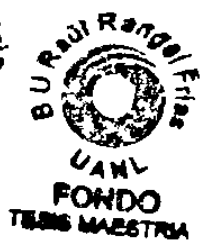
POR

Q.B.P. ISELA QUINTERO ZAPATA

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Junio de 1998

TM
53975
Q5



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



"PRODUCCION DE ESPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS"

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

Q.B.P. ISELA QUINTERO ZAPATA

Dr. Luis J. Galán Wong
Asesor interno

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

M.C. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

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

**"PRODUCCION DE ESPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS"**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

POR

Q.B.P. ISELA QUINTERO ZAPATA

Dr. Luis J. Galán Wong
Asesor interno

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

M.C. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal

Dr. Mark Jackson
Asesor Externo

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Junio de 1998

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCION	1
Hipótesis	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
ANTECEDENTES	3
Control biológico	3
Definición	3
Importancia	3
Hongos entomopatógenos	3
Importancia	3
Características morfológicas y de crecimiento	4
Mecanismos de acción	4
Procesos de producción	5
Productos comerciales	5
Compañías líderes en el mercado	6
Perspectivas	7
Características generales de <i>P. fumosoroseus</i>	7

Distribución	7
Morfología	7
Modo de acción	7
Rango de hospederos	8
Producción de blastosporas y desarrollo de medios de cultivo	8
Importancia del insecto blanco <i>B. tabaci</i>	10

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención y mantenimiento de las cepas	12
2. Medios de cultivo	12
3. Experimentos realizados a nivel de laboratorio	12
3.1. Preparación del inóculo	12
3.2. Producción de blastosporas	12
3.2.1. Determinación de cuenta de blastosporas	13
3.2.2. Peso seco	13
4. Recuperación de las blastosporas	13
4.1. Viabilidad	14
5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos	14
6. Ensayos de toxicidad, contra la mosca blanca (<i>B. argentifolii</i>)	15
6.1. Dosis	15
6.1.1. Primer bioensayo	15
6.1.2. Segundo bioensayo	15
6.1.3. Tercer bioensayo	15
6.1.4. Cuarto bioensayo	16
6.2. Evaluación	16
6.2.1. Bloques de agar	16
6.2.2. Viabilidad	16
6.2.3. Marcaje	16
6.2.4. Mortalidad	16

6.2.5 Análisis de resultados	16
------------------------------	----

RESULTADOS Y CONCLUSION	17
--------------------------------	----

CONCLUSIONES	21
---------------------	----

RECOMENDACIONES	22
------------------------	----

LITERATURA CITADA	23
--------------------------	----

FIGURAS Y TABLAS	27
-------------------------	----

DEDICATORIA

Para todos mis familiares con mucho cariño.

y

Para el amor de mi vida; Juan José Franco.

.

AGRADECIMIENTOS

Al **Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo**, por todo el apoyo y facilidades otorgadas en la realización de este trabajo de investigación.

Al **USDA-ARS de Peoria, Illinois** por habernos capacitado en el trabajo experimental de producción de esporas y por todas las facilidades otorgadas.

Al **USDA-ARS de Weslaco, Texas** por habernos capacitado en la realización de bioensayos de toxicidad y por todas las facilidades otorgadas.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por haberme otorgado la beca crédito.

Al **Dr. Luis J. Galán Wong**, por todo el apoyo y asesoría en este trabajo de investigación, así como las facilidades otorgadas para mis estudios.

Al **Dr. Mark Jackson**, por la capacitación recibida en su Institución, sugerencias para este trabajo y facilidades prestadas.

Al **Dr. Tadeo Poprawski**, por la capacitación en el desarrollo de los bioensayos y facilidades prestadas.

A la **Dra. Katiushka Arévalo Niño**, por el apoyo y sugerencias para este trabajo de investigación.

Al **M.C. Hugo A. Luna Olvera y Dra. Lilia H. Morales Ramos**, por su colaboración como miembros del comité de examen.

Al **M.C. Roberto Mercado y M.C. Ernesto Sánchez**, por su colaboración en la realización de los análisis estadísticos.

Al **Dr. Juan Manuel Alcocer**, por las sugerencias para este trabajo y por su amistad.

Al **Ing. Myriam Elias** y **Q.B.P. Beatriz Gómez**, por su apoyo y amistad.

Al la **Sra. Cristina Franco**, por su colaboración en la culminación del presente trabajo.

Al **M.C. Irma Martínez** y **Dr. Alberto Morales**, por las sugerencias en este trabajo de investigación y por su amistad.

Al **M.C. Alejandro Peña**, por el apoyo fotográfico.

Agradezco a **Jessica, Elena y Karina**, por su apoyo e interés dentro de este laboratorio.
Y en general a todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Diagrama del proceso típico de producción de hongos entomopatógenos.	33
2	Comparación de los componentes de los medios de cultivo para la cuenta de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> .	46
3	Comparación de los componentes de los medios de cultivo para peso seco de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> .	47
4	Comparación entre los componentes de los medios de cultivo para la viabilidad de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> .	48
5	Comparación de ensayos de <i>P. fumosoroseus</i> contra <i>B. argentifolii</i> en base a LD ₅₀ .	51

LISTA DE TABLAS

Tabla No.		Página
1	Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial.	27
2	Hongos en desarrollo biotecnológico como micoinsecticida.	28
3	Insectos susceptibles de control con hongos entomopatógenos.	29
4	Productos comerciales basados en hongos.	30
5	Ingredientes del medio de cultivo para la producción de insecticidas microbianos.	31
6	Contenido de los diferentes medios de cultivo para la producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> .	32
7 y 8	Cuentas de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	34
9	Comparación en la cuenta de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	36
10 y 11	Peso seco de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	37
12	Comparación del peso seco de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	39
13 y 14	Viabilidad de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	40
15	Comparación de la viabilidad de esporas de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios de cultivo.	42
16	ANOVA de los parámetros en dos experimentos diferentes.	43
17	ANOVA de los componentes de los medios de cultivo.	44

18	ANOVA de los medios de cultivo diseñados.	45
19	Número de esporas y viabilidad de muestras de <i>P. fumosoroseus</i> producidas por el USDA-Peoria.	49
20	Evaluación de las esporas de <i>P. fumosoroseus</i> contra <i>B. argentifolii</i> .	50

ABREVIATURAS

PDA	Agar papa dextrosa
ANOVA	Análisis de varianza
<i>B. bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>B. argentifolii</i>	<i>Bemisia argentifolii</i>
<i>B. tabaci</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
USDA-ARS	Departamento de Agricultura de Estados Unidos. (United State Departament of Agriculture - Agriculture Research Service)
LD ₅₀	Dosis letal media
NS	Diferencia no significativa
esp/g	Esporas por gramo
esp/ml	Esporas por mililitro
g	Gramo
g/l	Gramos por litro
<i>M. anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
mg/ml	Miligramos por mililitro
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mm ²	Milimetro cuadrado
<i>P. farinosus</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
% de germinación	Por ciento de germinación
P. de error	Probabilidad de error
F. calc.	Prueba de F calculada
rpm	Revoluciones por minuto
SAGAR	Secretaría de Agricultura y Ganadería Regional
LT ₅₀	Tiempo letal medio
w/v	Peso por volumen
v/v	Volumen por volumen

RESUMEN

La mosca blanca (*B. argentifolii*) es una plaga de distribución mundial, ya que ataca alrededor de 500 especies de plantas cultivadas, esto se debe a su alta tasa reproductora y a la resistencia que ha desarrollado sobre los insecticidas. Contra esta plaga agrícola se ha reportado *P. fumosoroseus* y al igual que otros hongos entomopatógenos sus esporas son aplicadas (forma infectiva) como si fuera un insecticida de contacto, y penetran en el insecto huésped a través de la cutícula, cavidad bucal o espiráculos. Mientras que la producción de este hongo se basa en técnicas de fermentación difásica, por lo cual pretendemos producir conidias en medios líquidos, ya que la producción de blastosporas y conidias provoca una disminución en la viabilidad y la actividad de las formulaciones. Por lo cual en el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo: evaluar diversas fuentes de carbono y de nitrógeno en diferentes medios de cultivo líquidos para la producción de *P. fumosoroseus*. Para lo cual se utilizó una cepa de *P. fumosoroseus* clave Pf-612 preservada en glicerol al 10% a -80°C . Para la producción de las blastosporas se utilizaron 12 diferentes medios de cultivo líquidos diseñados con 2 fuentes de carbono: melaza y glucosa comercial; y 2 fuentes de nitrógeno: harina de soya y solulys^R en tres concentraciones (6, 8 y 10%). Los experimentos fueron realizados a nivel de matraz: para la producción de blastosporas se agregó 10% v/v de inóculo (1×10^5 esp/ml) a cada uno de los medios diseñados y al control (medio utilizado por Jackson, *et al.*, 1997); se mantuvieron en agitación rotatoria por 72 h a 300 rpm y 28°C . Durante el proceso se determinó: cuenta de esporas/ml (hemacitometro) y peso seco en g/l (diferencia de peso). Al final del proceso los cultivos fueron secados con tierra de diatomeas (5% w/v) y posteriormente se midió la viabilidad (porcentaje de germinación). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza para los diferentes medios de cultivo y parámetros; y una prueba de tukey. Con los resultados obtenidos se concluye lo siguiente: Para las cuentas de esporas el medio elaborado con glucosa comercial + solulys^R al 10% (1.85×10^9 esp/ml) presentó la mayor concentración ($\alpha = 0.01$). El medio de cultivo que contiene glucosa comercial y solulys^R 6% presentaron la mayor producción de peso seco (48.0 g/l) con un $\alpha = 0.01$. Para la viabilidad de las esporas después del secado, se incrementó significativamente ($\alpha = 0.01$) el porcentaje de germinación cuando los medios contenían glucosa comercial y harina de soya 8% (95%).

INTRODUCCION

La erradicación y control de insectos de importancia agrícola se puede llevar a cabo mediante agentes químicos y biológicos. Como es bien conocido, los métodos químicos causan profundas perturbaciones ambientales y afectan por consecuencia la vida del hombre. Mientras que el control biológico se basa en el uso de microorganismos o sus productos para el mismo propósito. Esta última estrategia ha resultado de gran interés en los últimos años para los países desarrollados, donde la agricultura intensiva y el uso indiscriminado y masivo de los insecticidas químicos ha impactado severamente el frágil balance de los sistemas ecológicos. Hoy en día existen en el mercado mundial insecticidas biológicos a base de hongos, bacterias y virus. No obstante de las aproximadamente 700 especies de hongos que han mostrado actividad contra diferentes insectos, muy pocos son utilizados comercialmente como agentes de control. La necesidad de desarrollar alternativas a los pesticidas convencionales, se hace cada vez mas aparente, especialmente en el combate contra la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), una de las plagas de amplia distribución en el mundo y de suma importancia por atacar más de 500 especies de plantas cultivadas, su alta tasa reproductora y desarrollo de resistencia a los insecticidas. Los hongos reportados contra esta plaga son *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* los cuales se están desarrollando como agentes microbianos y únicamente el primero es causante de epizootias.

En la actualidad, la producción masiva de *P. fumosoroseus* generalmente se basa en técnicas de fermentación difásica; que combina las ventajas tanto del medio sólido y líquido, y permite crecer al hongo hasta el final de la fase log para una producción máxima de biomasa micelial en fermentadores y posteriormente ser transferido a sustratos nutritivos o inertes para la producción de conidias aéreas en la fórmula de inóculo natural. Para el desarrollo de un medio de cultivo se debe tener en cuenta la accesibilidad de los componentes, así como el aspecto económico, ya que esto repercute en la comercialización del producto, llegando a ser un factor limitante en su aceptación y uso. Un medio de cultivo debe contener básicamente una fuente de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas y factores ambientales controlados en el proceso de desarrollo de los hongos como son la temperatura, el pH y la aireación. En la actualidad se busca producir conidias en medios líquidos, ya que estos hongos producen blastosporas y conidias, lo que disminuye la viabilidad y actividad en las formulaciones.

Debido a la problemática actual con el desarrollo de formulaciones de *P. fumosoroseus*, en términos de estabilidad en almacenaje, viabilidad y tolerancia a la desecación de sus blastosporas, en este trabajo se trató de incrementar su capacidad de sobrevivencia, al utilizar como estrategia diferentes medios de cultivo líquido a base de diversas fuentes de carbono y

nitrógeno, diseñados a partir de fuentes de bajo costo comercialmente accesibles. Por lo tanto nos planteamos la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPOTESIS

Suponemos que los medios de cultivo formulados pueden mejorar la eficiencia de la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en sistemas líquidos, en relación a su concentración, peso seco, así como mayor sobrevivencia de los extractos obtenidos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un medio de cultivo líquido para mejorar substancialmente la productividad de esporas de *P. fumosoroseus* a nivel de laboratorio.

Objetivos específicos

1. Diseñar diversos medios de cultivo líquidos a base de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, así como determinar la concentración de blastosporas y el peso seco al finalizar el proceso de producción.
2. Realizar pruebas de viabilidad para observar la sobrevivencia de los extractos recuperados mediante secado por aire.
3. Seleccionar el medio de cultivo cuya composición permita mejorar los parámetros mencionados anteriormente (cuenta de esporas, peso seco y viabilidad).

ANTEDECENTES

Control biológico.

Definición. El concepto de control biológico ha sido definido por algunos investigadores. Paul De Bach (1964) nos dice que es la acción de mantener a otra población de organismos a una densidad más baja en promedio, ya sea por parásitos, predadores o patógenos. En 1971, Falcón incluye el uso de microorganismos como agentes de control que suceden naturalmente, agentes introducidos y aplicación de microorganismos y/o sus productos como insecticidas microbianos. Finalmente, en 1987 el término se define nuevamente como el uso de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o sus productos para reducir los efectos de organismos plaga (Gabriel and Cook, 1990).

Importancia. Desde hace más 1700 años el control biológico de insectos de importancia agrícola se realiza en el lejano Oriente, mientras que en Europa y Estados Unidos de Norteamérica se practica 100 años atrás (Frost and Sullivan, 1990). Los bioinsecticidas en particular ocupan el 5% del mercado total de insecticidas químicos, el cual se estima es de 7,800 millones de dólares. En 1993 las ventas de productos biotecnológicos para uso agrícola en Estados Unidos ascendieron a 108 millones de dólares, de estos los bioinsecticidas representaron un 94% (Tilton, 1993; Lorence, 1996).

El empleo de microorganismos como insecticidas biológicos (bacterias, hongos y virus) ha tomado tal relevancia que en la actualidad, en diferentes países ya se emplean productos comerciales elaborados a base de estos. Se conocen más de 100,000 especies de microorganismos con potencial microbiano hacia poblaciones de insectos plaga en diferentes sectores: agrícola, forestal, de ornamentales y de salud. Dentro de estas especies se encuentran diferentes tipos de microorganismos (tabla 1), que incluyen 750 de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y aproximadamente 100 de bacterias (Ignoffo e Hink, 1971; Rodríguez *et al.*, 1991).

Hongos entomopatógenos.

Importancia. Los hongos parásitos de insectos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son un factor que puede limitar la población de una especie de insectos. La epizootia es atribuida a la humedad ambiental y a una excesiva población de insectos. (Castillo, 1987). Dentro de los hongos entomopatógenos (750), hasta el momento se han registrado para uso comercial los siguientes géneros: *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Entomocela*,

Verticillium y *Hirsutella*, siendo el primero el más estudiado. Los factores que han impulsado su desarrollo son la seguridad que ofrecen al hombre, el aumento desmedido de la contaminación de los suelos, agua o medio ambiente en general y la importancia que ha adquirido el concepto de "manejo integrado de plagas" (Valenzuela, 1987). Los hongos en diferentes etapas de desarrollo biotecnológico, se muestran en la tabla 2. Los hongos entomopatógenos atacan un amplio rango de insecto comparado con otros microorganismos; así podemos encontrar desde mosquitos (díptera), áfidos (homoptera), chinches (hemiptera), etc. (tabla 3) (Valenzuela, 1987; Deacon, 1984; Feng *et al.*, 1994).

Características morfológicas y de crecimiento. Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados dentro de la subdivisión Deuteromycotina (es decir hongos imperfectos que raramente producen estado sexual). Los géneros que se encuentran en este grupo se distinguen por estructuras llamadas conidióforos, las cuales producen las esporas, además de que diferencian las especies de hongos tomando en cuenta el tamaño y la forma. Los hongos no son tan exigentes, respecto a requerimientos nutricionales ya que pueden crecer con facilidad en medios comunes, tales como agar papa dextrosa, agar extracto de malta o agar saboraud dextrosa. En cultivos líquidos producen blastosporas (células semejantes a levaduras), mientras que en cultivos sólidos crecen como hifas elongadas. Su temperatura de crecimiento óptima se encuentra entre 20 a 25°C, pero no se desarrollan si es de 37°C. La humedad es un factor que favorece la producción de esporas asexuales en un cultivo (Deacon, 1984).

Mecanismo de acción. Ha sido estudiado con mayor detalle en *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Este proceso de manera general consta de las siguientes etapas:

1). Adherencia de la espora fungal a la cutícula del insecto. Este proceso de adherencia de las esporas de los deuteromycetos a la cutícula del hospedero no es específico

2). Germinación de la espora y diferenciación. Para que la germinación de la espora sea exitosa depende en gran medida de la accesibilidad que estas tengan a los nutrientes que se encuentren en ese ambiente.

3). Penetración en la cutícula del insecto huésped por el tubo germinal. La invasión de la cutícula está precedida por la formación de una estructura llamada "apresorio". Para facilitar su penetración el hongo produce algunas enzimas que degradan la capa externa de la cutícula (epicutícula). Para degradar las capas siguientes el hongo produce diversas proteasas; la más activa de ellas es una proteína básica de 28.6 KDa llamada PR-1. La acción de PR-1 sobre las proteínas que componen las capas internas de la cutícula libera pequeños fragmentos

(péptidos) de aproximadamente 5 aminoácidos de longitud. Para que éstos aminoácidos puedan ser utilizados como nutrientes por el hongo se necesita la acción de otro tipo de proteasas, principalmente aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Lorence, 1996).

4). Desarrollo del hongo en el hemocele y los tejidos. Una vez que los hongos han alcanzado la hemolinfa de los insectos éstos producen enzimas del tipo glicosidasa. Estas enzimas les permiten capturar nutrientes que son propicios de ese ambiente. Se propone que los hongos también producen otro tipo de proteínas que pueden actuar como toxinas y que ayudan a estos organismos para infectar a su hospedero (Charnley, 1994; Lorence, 1996; Valenzuela, 1987).

Procesos de producción. A partir de la segunda mitad de los años 80, la tecnología más usada para la producción de hongos entomopatógenos a escala industrial es la fermentación en el estado sólido. Cabe hacer notar que en este tipo de proceso el control de las variables que determinan la calidad del producto como el pH, la temperatura y la aireación es muy complejo debido a que los fenómenos de transferencia de nutrientes y de calor son mucho mas complicados que los que se presentan en los procesos de fermentación en cultivo sumergido (Lorence, 1996; Garza, *et al.*, 1994).

En la figura 1 se muestran las etapas principales del proceso típico de producción de las esporas provenientes de hongos entomopatógenos que recomienda la SAGAR de México. Los sustratos mas empleados para el crecimiento masivo de este tipo de organismos son los granos agrícolas o residuos de ellos; de éstos el arroz es el mas usado ya que conserva las propiedades de viabilidad (porcentaje de germinación) y patogenicidad (actividad tóxica) de los hongos. La producción generalmente se lleva a cabo en bolsas de plástico o "matrices". Para eliminar los riesgos de contaminación, generalmente se agregan antibióticos al sustrato; los antibióticos mas utilizados son la tetraciclina y el cloranfenicol. Es necesario también esterilizar el material lo que comunmente se hace con vapor. Para inocular cada bolsa lo mas común es usar las esporas que se cosechan del crecimiento del hongo en cuestión en un tubo de agar. El cuarto de incubación debe tener un fotoperiodo de 14 horas y una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El tiempo requerido para obtener la máxima producción de esporas varia para cada especie pero en general es de 15 a 20 días. La cosecha se lleva a cabo agregando tierra de diatomeas a las bolsas de cultivo con la finalidad de que las esporas se adhieran a dicho material. Las esporas se conservan en refrigeración donde permanecen viables hasta por 15 días (Garza, *et al.*, 1994).

Productos comerciales. Recientemente la compañía Mycotech ha desarrollado y patentado un proceso basado en fermentación sólida para producir la cepa GHA del hongo *B.*

bassiana a gran escala con la finalidad de producir "Mycotrol-WP" como agente para combatir a la mosca blanca. En la tabla 4 se describen los productos comerciales para el control biológico de plagas basados en hongos entomopatógenos. Se pueden diferenciar de acuerdo a su actividad en tres tipos de productos.

a). Insecticida: son todos aquellos que contienen como ingrediente activo de la formulación, cepas de las especies de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*.

b). Nematicida: *Arthrobotrys irregularis*.

c). Herbicida: *Colletotrichum gloesporioides*, *Phytophthora palmivora*, *Alternaria cassiae* y *Endothia parasitica*.

Compañías líderes en el mercado. En Estados Unidos las compañías líderes son EcoScience y Fermona; ambas comercializan productos basados en *B. bassiana* para el control de una plaga, la mosca blanca (*B. tabaci*). Recientemente entró a este mercado un nuevo competidor, Troy Bio-Sciences, el cual ofrece un producto para el control de insectos plaga de plantas ornamentales basados en este mismo agente "Naturalis-O". Esta misma empresa está desarrollando un nuevo producto para el control de arácnidos que es una plaga de ornamentales "Naturalis-L".

En Europa la compañía francesa Calliope es líder en la comercialización de productos tipo *B. bassiana*, los cuales están dirigidos fundamentalmente al control de plagas del maíz.

En México la compañía Agrobiológicos del noroeste, S. A. de C. V. (Agrobionsa, Culiacán, Sinaloa) está comercializando tres productos cuyo ingrediente activo son hongos. Estos productos son: "Bea-Sin" con *B. bassiana* para el control del picudo del algodón (*Anthonomus grandis thurberiae*), el picudo del chile y la mosca blanca; "Meta-Sin" formulado con *M. anisopliae* para el control de los picudos del algodón y chile, la mosca pinta (*Aeneolamia postica*) y el barrenador de la caña (*Diatrea saccharalis*) y "Pae-Sin" que contiene *P. fumosoroseus* para el control de huevecillos, ninfas y adultos de la mosca blanca.

Brasil, China y Cuba son países donde este tipo de agentes son muy usados para el control de plagas y la producción es local, en China 400,000 hectáreas de maíz son tratadas con *B. bassiana* para el control del barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*). En Brasil 600,000 hectáreas sembradas con caña de azúcar se tratan con *M. anisopliae* para el control de la *Mahanarva posticata*.

Otros países de América Latina donde se producen y usan comercialmente los hongos entomopatógenos son Colombia, Costa Rica y Venezuela (Jones, 1994; Lorence, 1996).

Perspectivas. Se considera que el futuro comercial de los hongos como agente de control biológico es muy promisorio ya que solo se conoce la actividad de muy pocas especies. Una gran cantidad está disponible para la investigación y desarrollo de nuevos productos a través de importantes colecciones que se localizan en los siguientes lugares: ATCC, el NRRL del Departamento de Agricultura (USDA) y la Universidad de Gainesville en Estados Unidos, la Academia de Ciencias de la República Checa, el Instituto Nacional de Investigación Agronómica (Institute Nationale def Recherche Agronomique o INRA) de Francia y el Centralbureau voor Schimmelcultures en Baarn, Alemania (Lorence, 1996; Riba *et al.*, 1994).

Características generales de *P. fumosoroseus*

Distribución. *P. fumosoroseus*, (Deuteromicotina: Hyphomycetes) es un hongo potencialmente útil para el biocontrol de plagas de importancia económica en la Agricultura, tal como la mosca blanca (*B. tabaci*). Por otra parte *P. fumosoroseus* es una especie ampliamente distribuída geográficamente que puede infectar diferentes órdenes de insectos en todas las etapas de su desarrollo, además de que frecuentemente es aislada de muestras de suelo (Samson, 1974; Tigano-Milani *et al.*, 1963). Recientemente, en diferentes partes del mundo como Estados Unidos y subcontinente de la India, *P. fumosoroseus* ha estado atacando a *B. tabaci* y esto a provocado verdaderas epizootias (Lacey, *et al.*, 1993).

Morfología. *P. fumosoroseus* se identifica por la formación de hifas hialinas, amarillentas, septadas y la mayoría de paredes suaves. Las estructuras conidiógenas en su mayoría consisten de ramales de conidioforos verticales o irregulares, (sinetosas o mononematosas) presentando en la parte terminal cada una de las ramas acumulos de células de conidiógenas. Este tipos de células son fialídicas y consisten de una parte basal cilíndrica o hinchada, que rápidamente termina en un cuello largo muy distintivo (Samson, 1974).

Modo de acción. *P. fumosoroseus* causa la mortalidad entre 24 y 48 horas a todos los estadios de la mosca blanca. Se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido que la conidia ataca el dorso del insecto, los tubos germinativos penetran y en 24 horas las hifas se forman en el hemocele. Finalmente el micelio emerge del cuerpo en 48 horas y esporula a las 72 horas (Osborne, *et al.*, 1990).

Rango de hospederos. *P. fumosoroseus* se ha descrito como un patógeno natural investigado para el control biológico de 41 especies de plagas de 8 ordenes de insectos. Dentro de los usos que se le han dado a este hongo para control están las siguientes: mariposa del fruto del durazno (*Carposina sasakii* Matsumura), termitas, escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), mariposa gypsy (*Lymantria dispar* L y *Galleria mellonella* L) (Samson, 1974).

Producción de blastosporas y desarrollo de medios de cultivo.

Para el desarrollo de un medio de cultivo se debe tener en cuenta su sencillez, así como el aspecto económico, ya que esto repercute en la comercialización del producto, llegando a ser un factor limitante en su aceptación y uso. La selección de ingredientes que constituirán el medio de cultivo dependerá del proceso de fermentación. Un medio de cultivo debe contener básicamente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y factores controlados en el proceso de desarrollo de los hongos como son la temperatura, pH y aireación. También se deben de tomar en cuenta dos aspectos esenciales: las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo no necesariamente serán las mismas que para la esporulación y el equilibrio óptimo de las condiciones físicas de desarrollo y componentes del medio están propensas al cambio. Los componentes esenciales de un medio de cultivo se describen en la tabla 5 (Valenzuela, 1987).

Tenemos que en 1966, Samsinakova, determinó el crecimiento y la producción de blastosporas de *B. bassiana*, en cultivos sumergidos con la siguiente composición: 2.5 % de glucosa, 2.5 % de almidón, 2.0 % de líquido de remojo de maíz, 0.5 % de Na Cl y 0.2 % de CaCO₃, a un pH de 4.5. El rendimiento obtenido al medir la producción de materia seca fue de 68.7 mg/ml y la concentración de esporas de 6.43×10^8 /ml después de las 72 h (Samsinakova, 1966).

Agudelo en 1983, menciona que la producción de cuerpos hifales con *Paecilomyces farinosus* en cultivos líquidos agitados son infectivos y tópicos a larvas de *Spodoptera exigua*, incrementándose más a pH de 5.5. *P. farinosus* infectó, eliminó y produjo micelio en la superficie de larvas de 1^{er} instar de *S. exigua* en combinaciones de humedad (70 %) y temperatura (15°C) relativas. El número de cuerpos hifales depositados en la superficie de las hojas de los cultivos tratados, causó una mortalidad del 70 % al 90 % de las larvas ensayadas (Agudelo and Falcon, 1983).

En el mismo año, Campbell, trabajó con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, cultivados en matraces con medios sintéticos líquidos, conteniendo una de las 22 fuentes de carbohidratos individuales, a respuesta de crecimiento y esporulación determinada. Encontró que *B. bassiana* crece mejor en D-melzitose, mientras que la esporulación es mejor en sacarosa, trealosa y glucosa. Respecto a *M. anisopliae* en la manosa crece mejor y esporula mejor con el inositol y el glicerol. También se observó que *B. bassiana* tiene un crecimiento mínimo en rammosa, y para ambos hongos una mínima esporulación con sorbosa (Campbell *et al.*, 1983).

Con respecto a la producción de *P. fumosoroseus* en medios complejos de cultivo sumergido, tenemos que Inch *et al.*, 1986 demostraron que el contenido de glicógeno fue más alto en las blastosporas producidas en cultivos limitados por nitrógeno que las limitadas por carbono, y sugieren que el contenido de glicógeno puede influenciar en la longevidad de las esporas almacenadas (Inch *et al.*, 1986).

Humphreys, 1990 trabaja con *P. farinosus* y *B. bassiana*, en medios limitados por glucosa y amonio, en cultivos batch y feed batch. En el crecimiento de cultivo batch en medios complejos o mínimos, ambos hongos produjeron blastosporas en la fase exponencial y desaceleración de crecimiento, mientras que *B. bassiana* solamente formó esporas durante la fase estacionaria. Respecto al cultivo "feed batch" limitado por glucosa y amonio (medio complejo y mínimo para glucosa, y mínimo para amonio), la concentración de blastosporas para *P. farinosus* fue inversamente relacionada con la tasa de dilución. Sin embargo, comparado con el crecimiento en cultivo "batch" en medios complejos, solamente en el cultivo "feed batch" limitado por glucosa (medio mínimo) de *P. farinosus* hubo una alta producción de blastosporas, mientras que un crecimiento desbalanceado ocurrió en cultivo batch limitado por amonio de ambos hongos (Humphreys *et al.*, 1990).

Por otra parte en 1991, Lane *et al.*, realizaron experimentos en cultivos sumergidos de *B. bassiana* utilizando el medio de Vogel modificado, ya que las condiciones de crecimiento pueden ser manipuladas para incrementar la longevidad de las blastosporas. Ellos demostraron que las blastosporas cosechadas de la fase estacionaria de cultivos limitados de nitrógeno contenían más reservas endógenas (carbohidratos, incluyendo glicógeno y lípidos) que los limitados por fuente de carbono y el tipo de blastosporas formadas conservaba su viabilidad (capacidad de formar tubo germinativo en medio de agar) durante su almacenaje a 25°C (Lane *et al.*, 1991).

En el mismo año Lane *et al.*, determinaron la Concentración Letal Media (LC₅₀) y el Tiempo Letal Medio (LT₅₀) contra adultos de *Nephotettix virescens* con las conidias y blastosporas de *B. bassiana* producidas en cultivos limitados de carbono y de nitrógeno. En

este experimento encontraron que no había diferencia significativa entre las LC_{50} de las blastosporas producidas en ambos medios de cultivo, mientras que con las conidias fueron menos virulentos. Por otra parte los valores de la LT_{50} de las conidias y las blastosporas de los cultivos limitados por nitrógeno, fueron significativamente más bajos que los valores producidos en cultivos limitados por carbono. Durante el almacenaje a 25° hubo un incremento en las LT_{50} de las conidias y blastosporas, relacionándolo con la viabilidad de las esporas (Lane *et al.*, 1991).

Jackson *et al.*, 1997, trabajaron distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y relaciones de carbono:nitrógeno, para producir blastosporas de *P. fumosoroseus* tolerantes a la desecación. Todos los medios probados soportaron la esporulación en cultivos sumergidos, incrementaron la concentración de blastosporas (5.8×10^8 esporas/ml) cuando se produjeron en medios conteniendo 80 g de glucosa y 13.2 g de casaminoácidos, y un alto porcentaje (79%) de las blastosporas que sobreviven al secado por aire. El medio que contenía 20 g de glucosa y concentraciones de casaminoácidos de 13.2 a 40 g, presentó un incremento en la producción de blastosporas tolerantes a desecación. Las blastosporas de *P. fumosoroseus* secadas por aire tienen una LD_{50} de 60 y 113 blastosporas/mm³ para *B. argentifolli* en dos bioensayos separados con relaciones (LD_{50} *B. bassiana* y LD_{50} *P. fumosoroseus*) de 3.9 y 3.8 respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que altas concentraciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* se pueden producir rápidamente en cultivos líquidos, mantener su viabilidad después del secado e infectar y matar a la mosquita blanca.

Recientemente García, G. *et al.*, cultivaron conidias y esporas de *B. bassiana* provenientes de un aislamiento de la colección de cepas de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico en medio líquido con la siguiente composición $(NH_4)_2 SO_4$ g/l como fuente de nitrógeno, melaza como fuente de carbono 12 ml/l y $(KH_2 PO_4)$ 2.5 g/l como fuente de potasio. Con este medio de cultivo utilizado ellos lograron obtener 2.476 g de biomasa/l de medio y 2.256×10^7 esporas/ml (García, G. *et al.*, 1997).

Importancia del insecto blanco *B. tabaci*

De los insectos plaga que actualmente causan mayores pérdidas a la agricultura, principalmente a los cultivos básicos y de hortalizas en nuestro país se encuentran diferentes especies de las comúnmente llamadas "moscas blancas" y las más perjudiciales son *B. tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. *B. tabaci* es una plaga polífaga de distribución amplia adaptada

a climas tropicales y templados del mundo. Es muy importante ya que ataca más de 500 especies de cultivos agrícolas importantes, principalmente hortalizas, oleaginosas, ornamentales y frutales, esto debido a su alta tasa reproductora y al desarrollo que a presentado a los insecticidas. Son importantes porque transmiten enfermedades virales (principalmente geminivirus), tales como: masaico dorado del frijol, chino del tomate, virus dorado de la papa, enchinamiento de la calabaza, enchinamiento de la sandía, virus de la hoja enrollada del algodón, virus atigrado del chile, virus dorado del chile y virus dorado de la lechuga.

Los daños ocasionados por *B. tabaci* se presentan al succionar la savia del floema de las plantas, provocando la muerte cuando las densidades poblacionales son muy altas. *Aschersonia aleyrodis*, *Verticillium lecanii* y *P. fumosoroseus* son hongos reportados contra la mosca blanca bajo condiciones de invernadero. Mientras que comercialmente *P. fumosoroseus* y *B. bassiana* se están desarrollando para el control de *B. argentifolii* (Landa et al., 1994; Osborne and Landa, 1992; Smith, 1993).

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención y mantenimiento de las cepas.

La cepa utilizada fue proporcionada por la Colección de cepas de *P. fumosoroseus* del USDA-ARS, Peoria, Illinois, con clave Pfr-612. Para su conservación se utilizaron viales criogénicos (Corning[®]) con 1.0 ml de glicerol al 10 % v/v y almacenadas en congelación a -80°C hasta ser utilizados (Jackson, *et al.*, 1997).

2. Medios de cultivo.

Se probaron 12 diferentes medios de cultivo elaborados a base de melaza y glucosa comercial como fuente de carbono; solulys[®] y harina de soya como fuente de nitrógeno además sales inorgánicas (tabla 6). Mientras que el medio reportado por Jackson, *et al.*, 1997 fue utilizado como control y su contenido es glucosa como fuente de carbono y casaminoácidos como fuente de nitrógeno.

3. Experimentos realizados a nivel de laboratorio. Los experimentos fueron realizados en dos ocasiones bajo las mismas condiciones para ver la reproducibilidad de ellos y determinar problemas en el transcurso del experimento, ya que en este Departamento es la primera vez que se trabaja con *P. fumosoroseus*.

3.1. Preparación del inóculo. La cepa Pfr-612 se activó en placas de agar papa dextrosa (PDA) a partir de los viales y se incubaron durante 15 a 21 días a temperatura ambiente. Después de la incubación se adicionaron de 5 a 10 ml de agua destilada estéril sobre la placa para remover las conidias y de esa suspensión se pasaron de 1 a 5 ml a un frasco de dilución conteniendo agua destilada estéril y a partir de este se contaron las conidias en la cámara Neubauer en uno de los cuadrantes hasta obtener por lo menos 50 conidias (5×10^5 conidias/ml) (Jackson *et al.*, 1997).

3.2. Producción de blastosporas. Del inóculo preparado con 5×10^5 conidias/ml se tomaron 10 % V/V y se depositaron a un matraz Erlenmeyer bafleado de 250 ml de capacidad, con 50 ml del medio de cultivo diseñado. Se mantuvieron en agitación rotatoria

(New Brunswick Scientific) a 300 rpm. a una temperatura de 28°C durante 72 horas. Cada tratamiento se hizo con tres repeticiones más un control (medio reportado por Jackson *et al.*, 1997). Al terminar el proceso (72 h) se determinó la concentración de blastosporas y la cantidad de peso seco.

3.2.1. Determinación de cuenta de blastosporas.

Se tomaron 1.0 ml de los medios de cultivo inoculados y adicionaron a 9.0 ml de agua destilada estéril contenida en un tubo de ensaye (dilución 1:10); posteriormente se efectuaron diluciones de 1:100 y 1:1000. De la última dilución se depositó una gota al hemocitometro neubauer y se procedió a contar las blastosporas en los cuatro cuadrantes de la cámara. Los resultados obtenidos para las cuentas se expresaron en esporas/ ml.

3.2.2. Peso seco.

Al final del proceso se tomaron 1.0 ml de cada medio de cultivo inoculado. El peso seco se determinó al hacer la filtración con una bomba de vacío a los cultivos a través de membranas con filtros de microfibra de vidrio (24 mm de diámetro) y se adicionó 1.0 ml de agua destilada. El filtrado recuperado se dejó a 100°C durante 24 horas, para posteriormente medir el peso. El peso seco se expresó en g/ml, y se utilizó el cálculo siguiente:

Peso de la muestra = Peso muestra filtrada - Peso papel filtro

$$\text{gramos/ml} = \frac{\text{Peso de la muestra}}{\text{ml de muestra (medio de cultivo)}}$$

4. Recuperación de las blastosporas. Se realizó mediante secado por aire la extracción de las blastosporas, de acuerdo a lo siguiente: los cultivos obtenidos con Pfr-612 en los diferentes medios diseñados se pasaron 2 veces a través de una malla, para eliminar el micelio. Después, del sobrenadante se tomaron 50 ml y se le adicionaron 2.5 g de tierra de diatomeas, posteriormente se realizaron filtraciones a través de una bomba de vacío utilizando papel filtro whatman No.1. El extracto recuperado se pasó a una caja petri y se dejó secar durante toda la noche. Al extracto obtenido se le determinó el porcentaje de germinación (viabilidad).

4.1. Viabilidad. Se realizó de acuerdo a la germinación de las esporas, a partir del extracto recuperado se tomó una pequeña muestra y se adicionó a 50 ml de caldo de extracto de papa. Este cultivo se mantuvo en agitación rotatoria (New Brunswick Scientific) durante 6 horas a 300 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron frescos directos de los cultivos y se procedió a contar 100 esporas, (tanto germinadas como no germinadas), y así determinar la proporción de esporas viables. El criterio para tomar en cuenta una espora germinada es cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. La viabilidad de las blastosporas se expresa en porciento de germinación.

5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos. Al finalizar todos los experimentos se realizó lo siguiente:

5.1. Un análisis de varianza de los parámetros (concentración de esporas, peso seco y viabilidad) con tres repeticiones:

- De las dos repeticiones.

Medir la reproducibilidad de los datos en dos diferentes experimentos.

- De los componentes de los medios de cultivo.

Tomando en cuenta solamente la fuente de carbono + fuente de nitrógeno.

- De los medios de cultivo diseñados.

Determinar el mejor medio de cultivo en base a fuente de carbono (glucosa comercial o melaza al 20%) y de nitrógeno (solulys^R o harina de soya al 6, 8 ó 10%).

5.2. Prueba de tukey:

- Para seleccionar el mejor componente de los medios de cultivo.

- Para determinar la mejor combinación de la fuente de carbono y de nitrógeno en base a la producción de esporas, peso seco y porciento de germinación.

6. Ensayos de toxicidad, contra la mosca blanca (*B. argentifolii*). Se realizaron 4 ensayos de toxicidad en el USDA-ARS, Weslaco, Texas en diferente tiempo, a tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) obtenidas por diferente forma de separación en el USDA-ARS, Peoria, Illinois: esporas frescas, es decir en el medio de producción; esporas liofilizadas en lactosa 10% más suero bovino 1% y las secadas por aire, con tierra de diatomeas al 5% (w/v), como acarreador. Se usaron conidias en solución tween 80 al 0.01% (v/v) como estandar, con el procedimiento que se describe a continuación:

6.1. Dosis. Se prepararon dosis para cada una de las preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612). Se usaron conidias en solución tween 80 al 0.01% (v/v) como estandar y dos controles (uno con solución tween 80 al 0.01% tween y otro de tierra de diatomeas con el medio de producción filtrado). Se usaron 4 repeticiones por dosis por preparación contra ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en hojas de melón. Se asperjó 1ml de cada tratamiento, utilizando una Potter Spray Tower.

6.1.1. Primer ensayo. Se prepararon 3 dosis: 1000 (alta), 200 (media) y 40 (baja) esporas/mm² para cada una de las tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) mencionadas anteriormente, el estandar y dos controles (uno con solución tween 80 al 0.01% y otro de tierra de diatomeas con el medio de producción filtrado). Para este experimento se usaron 4 repeticiones por dosis por preparación contra ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en hojas de melón. Se asperjó 1ml de cada tratamiento, utilizando una Potter Spray Tower. Se evaluaron como se describe en el punto 6.2.

6.1.2. Segundo ensayo. Se prepararon 5 dosis: 1000 (alta), 500 (media alta), 250 (media), 125 (media baja) y 62 (baja) esporas/mm², para cada una de las tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) y el estandar. Para este experimento se usaron 3 repeticiones por dosis por preparación contra ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en hojas de melón. Se asperjó 1ml de cada tratamiento, utilizando una Potter Spray Tower. Se evaluaron como se describe en el punto 6.2.

6.1.3. Tercer ensayo. Se prepararon 3 dosis: 1000 (alta), 200 (media) y 40 (baja) esporas/mm², para cada una de las tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) y el estandar. Para este experimento se usaron 4 repeticiones por dosis por preparación contra ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en hojas de melón. Se asperjó 1ml de cada tratamiento, utilizando una Potter Spray Tower. Se evaluaron como se describe en el punto 6.2.

6.1.4. Cuarto ensayo. Se prepararon 6 dosis: 1000 (alta), 750 (media alta), 500 (media), 250 (media baja), 125 (baja) y 25 (baja baja) esporas/mm², para cada una de las tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) y el estandar. Para este experimento se usaron 2 repeticiones por dosis por preparación contra ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en hojas de melón. Se asperjó 1ml de cada tratamiento, utilizando una Potter Spray Tower. Se evaluaron como se describe en el punto 6.2.

6.2. Evaluación

6.2.1. Bloques de agar: Se colocaron dos bloques de agar agar de 1.3 mm x 1.3 mm en cada lado de la vena media de la hoja por repetición al momento de asperjar, excluyendo al control. El uso de estos bloques fue para evaluar el número de esporas/mm².

6.2.2. Viabilidad: Se asperjaron placas de agar dextrosa saboraud de la dosis de 200 esporas/mm² por tratamiento. Después de incubar las conidias a 25°C durante 16 h y las blastosporas a 6 h, se contaron 100 esporas para determinar la viabilidad de las esporas, siguiendo el mismo criterio de tomar en cuenta una espora germinada cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. La viabilidad de las blastosporas se expresa en porciento de germinación.

6.2.3. Marcaje. Después de 24 h de incubación a 25°C y 100% de humedad, se marcaron aproximadamente 40 ninfas de 3^{er} instar de *B. argentifolii* en cada hoja, un día después de aspersión.

6.2.4. Mortalidad. Al cuarto día de la aspersión checar la mortalidad de las ninfas que fueron marcadas en cada hoja. Repetir las lecturas cada 24 h hasta llegar al día ocho después de la aspersión.

6.2.5. Análisis de los resultados. Bajo un análisis probit determinar la LD₅₀ para cada tratamiento y determinar el porciento de mortalidad para cada dosis por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Producción de esporas.

Se diseñaron 12 diferentes medios de cultivo elaborados a base de melaza y glucosa comercial como fuente de carbono; solulys^R y harina de soya como fuente de nitrógeno además sales inorgánicas (tabla 6). Mientras que el medio reportado por Jackson, *et al.*, 1997 fue utilizado como control. En la tabla 7 podemos observar el primer experimento realizado para la determinación de la concentración de esporas/ml de *P. fumosoroseus* en los diferentes medios de cultivo diseñados y vemos que los medios que contienen glucosa comercial como fuente de carbono y solulys^R como fuente de nitrógeno presentan las mas altas concentraciones en promedio (1.60×10^9 esp/ml), sin embargo los que presentan las cuentas más bajas (6.60×10^8 esp/ml) son los que contienen la melaza como fuente de carbono, esto es debido a que la glucosa comercial contiene una mayor proporción de carbohidratos (90%), mientras que la melaza contiene solo un 50%. Por otra parte vemos que los resultados fueron buenos al compararlos con el control (Jackson, *et al.*, 1997) por tal motivo los experimentos se realizaron por segunda ocasión. Y vemos que los resultados fueron similares como se observa en las tablas 8 y 9.

2. Peso seco.

Con respecto al peso seco reportado en gramos/litro podemos observar el primer experimento realizado en la tabla 10, con *P. fumosoroseus* en los diferentes medios de cultivo diseñados y vemos resultados similares al parámetro anterior con los medios que contienen glucosa comercial como fuente de carbono y solulys^R como fuente de nitrógeno, en los cuales se presenta la mayor cantidad en peso seco (38.1 g/l), sin embargo los que presentan los pesos mas bajos (18.1 g/l) son los que contienen la melaza como fuente de carbono. Por otra parte observamos que los resultados fueron buenos al compararlos con el control (Jackson, *et al.*, 1997) por tal motivo los experimentos se realizaron por segunda ocasión. Y tenemos que los resultados fueron similares como se observa en las tablas 11 y 12. También podemos mencionar que durante la estancia en el USDA - Peoria se realizaron experimentos con diferentes fuentes de nitrógeno y los resultados obtenidos fueron similares al del solulys^R (28.2 g/l).

3. Viabilidad.

Para tomar en cuenta una espora germinada se debe considerar cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. La viabilidad de las blastosporas se expresa en porciento de germinación. Con respecto a este parámetro reportado podemos observar el primer experimento en la tabla 3 y vemos que el medio elaborado con glucosa comercial como fuente de carbono y harina de soya como fuente de nitrógeno presentan mayor viabilidad (95 % de germinación) mientras que los menos viables fueron los que contienen melaza y solulys^R (82% de germinación). Al compararlos con el control (Jackson, *et al.*, 1997) observamos que los resultados fueron buenos (93% de germinación) por tal motivo los experimentos se realizaron por segunda ocasión. Y tenemos que los resultados fueron similares como se observa en las tablas 14 y 15. En un trabajo reportado por Jackson, *et al.*, 1997, el obtuvo un 79 % de germinación para *P. fumosoroseus* al probar diferentes concentraciones de fuente de carbono y de nitrógeno.

4. Análisis estadístico. Para la realización del Análisis de varianza los valores de esporas /ml se transformaron a números logaritmos y el porciento de germinación a arco seno, esto con la finalidad de normalizar las variables. Los datos transformados y los de peso seco se sometieron a programa estadístico SPSS.

a. ANOVA de los parámetros, concentración de esporas/ml, peso seco y viabilidad para medir la reproducibilidad de los datos en dos diferentes experimentos. Podemos observar en la tabla 16 que no existe diferencia significativa para la concentración de esporas/ml y para el peso seco, mientras que para el % de germinación existe una alta diferencia significativa con $\alpha = 0.01$. Esto indica que no hubo problemas con respecto a la metodología para reproducir los resultados de esporas y peso seco; sin embargo cuando se repitió el experimento, la capacidad de germinación de las esporas fue alterada.

b. ANOVA de los componente de los medios de cultivo. Observamos en la tabla 17 que existe una alta diferencia significativa con $\alpha = 0.01$ para la cuenta de esporas/ml, para el peso seco y para la segunda repetición del % de germinación. Mientras que para la primera repetición del % de germinación no hay diferencia significativa. Esto significa que existe una

diferencia entre los medios de cultivo. Respecto a la comparación de medias utilizando una prueba de tukey se encontró que las cuentas de esporas (figura 2) presentan mayor concentración en los medios que contienen glucosa comercial + solulys^R. También se encontraron resultados similares para el peso seco (figura 3) en el medio con la composición mencionada anteriormente. Sin embargo para el porcentaje de germinación los resultados (figura 4) fueron mejores en los medios que contienen glucosa comercial y harina de soya.

_____c. ANOVA de los medios de cultivo diseñados. Para determinar la mejor combinación de la fuente de carbono y de nitrógeno (diferentes concentraciones) en base a la producción de esporas, peso seco y porcentaje de germinación. Podemos observar en la tabla 18 que existe una diferencia altamente significativa para la concentración de esporas/ml, para el peso seco y para el % de germinación con $\alpha = 0.01$. Esto significa que los 12 medios de cultivo diseñados son diferentes.

5. Aplicación de la técnica de ensayos de toxicidad.

Se realizaron 4 ensayos de toxicidad contra la mosca blanca (*B. argentifolii*) en el USDA-ARS, Weslaco, Texas; a nivel de laboratorio a tres preparaciones de blastosporas de *P. fumosoroseus* (tabla 18) obtenidas por diferentes formas de separación en el USDA-ARS, Peoria, Illinois: esporas frescas es decir en el medio de producción; esporas liofilizadas en lactosa 10% más suero bovino y las secadas por aire, con tierra de diatomeas al 5% (w/v) como acarreador. Se usaron conidias de *P. fumosoroseus* en solución tween 80 al 0.01% (v/v) como estandar, producto formulado por Mycotech con una concentración de 7.4×10^{10} esp/g y una viabilidad del 97%.

Con respecto a la LD₅₀, observamos en la gráfica 5 que en general en el tercer y cuarto bioensayo hubo un comportamiento muy similar con todos los tratamientos probados. Sin embargo en el cuarto bioensayo las condiciones fueron 6 dosis con 2 repeticiones, esto abarca un mayor rango de dosis, pero pocas repeticiones; se sugiere incrementar el número de repeticiones para disminuir la variabilidad y posteriormente evaluar la toxicidad con otros tratamientos en otros bioensayos bajo esas condiciones. También observamos que las blastosporas obtenidas mediante secado por aire presentan una mayor toxicidad (11 esp/mm²), a pesar de que los bioensayos fueron efectuados bajo diferentes condiciones (dosis y repeticiones) y en diferentes fechas (marzo, mayo, junio y octubre). Aunque cabe hacer mención que la preparación de las diluciones influye sobre la aspersion bajo la Potter Spray Tower.

Podemos observar en la tabla 20 que las blastosporas frescas mantienen un mayor porcentaje de mortalidad en el tercero y cuarto bioensayo, los cuales se efectuaron en los meses de junio y octubre, respectivamente. Sin embargo las esporas que fueron tratadas con tierra de diatomeas en segundo lugar. Por otra parte observamos que en el primero y segundo bioensayo el estandar causó mayor mortalidad que en el resto de los tratamientos; esto puede atribuirse a que fueron los primeros ensayos y se desconocía la técnica.

CONCLUSIONES

I. De los componentes de los medios de cultivo.

1. En general los medios de cultivo que incluían glucosa comercial y soluly^R presentaron el mayor número de esporas/ml de *P. fumosoroseus*.

2. Para el peso seco los medios elaborados son glucosa comercial y soluly^R presentaron las mayores cantidades en gramos por litro.

3. Mientras que para la sobrevivencia los medios elaborados a base de glucosa comercial y harina de soya mostraron un mayor porcentaje de germinación.

II. De los medios de cultivo diseñados.

1. Para las cuentas de esporas el medio que contiene glucosa comercial y soluly^R al 10% fue el mejor ($\alpha = 0.01$).

2. El medio de cultivo que contiene glucosca comercial y soluly^R 6% presentaron la mayor producción de peso seco ($\alpha = 0.01$).

3. El porciento de germinación de esporas se incrementó significativamente ($\alpha = 0.01$) cuando los medios contenían glucosa comercial y harina de soya 8%.

III. De la técnica de bioensayos.

1. Las esporas secadas por aire presentaron el mayor número de esporas/ml.

2. Sin embargo la recuperación de esporas con tierra de diatomeas dificulta el conteo de estas.

3. Respecto al tipo de tratamiento los que mantuvieron mejor toxicidad en base a LD₅₀ fueron los obtenidos mediante secado por aire con tierra de diatomeas.

RECOMENDACIONES

1. Efectuar bioensayos de actividad tóxica a los mejores extractos obtenidos con *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii*.
2. Realizar una producción de esporas con el medio elaborado a base de glucosa comercial y solulys^R, para probar los extractos con los insectos que se encuentran en la cría de nuestro laboratorio (*Spodoptera exigua*, *S. frugiperda* y *Trichoplusia ni*)
3. Determinar pruebas de viabilidad nuevamente a los extractos recuperados, para determinar su sobrevivencia a diferentes intervalos y condiciones de almacenamiento.
4. Aislar cepas nativas de *P. fumosoroseus* y determinarles la concentración de esporas, peso seco y viabilidad, así como toxicidad.
5. Realizar experimentos con glucosa comercial 20% y solulys^R, disminuyendo las concentraciones de la fuente de nitrógeno a 5, 4, 3 y 2%.
6. Realizar otros experimentos con la mejor concentración que se obtenga del punto anterior variando la concentración de la fuente de carbono.

LITERATURA CITADA

- Agudelo, F. and L. Falcon.** 1983 Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* **42:** 124-132
- Campbell, R. K.; Barnes, G. L.; Cartwright, B. O. and Eikenbary.** 1983 Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. *Journal of Invertebrate Pathology.* **41:** 117-121
- Castillo, T. J.** 1987. *Micología General.* Editorial Limusa. Dirección General de Institutos Tecnológicos. pp:40-41
- Charnley, A. K.** 1994. Host invasion by insect pathogenic fungi. "VI International Colloquium on invertebrate pathology an microbial control and II International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, Agost 28 - September 2. pp:31-37
- Deacon, J. W.** 1984. *Aspect of Microbiology 7: microbial control of plant pests and diseases.* Van Nostrand Reinhold. UKO Co. Ltd. pp:31-42
- Falcón, L. A.** 1971. Use of bacteria for microbial control. En: *Microbial control of insects and mites,* Burges H. D. y N. W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N. Y
- Feng, M. G.; Poprawski, T. J. and G. G. Khachatourians.** 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology.* **4:**3-34
- Frost and Sullivan.** 1990. *Biopesticides: A technology impact report,* Frost & Sullivan Inc. New York, N. Y. pp:1-341
- Gabriel, C. J. and C. R. Cook.** 1990. Biological control the need for a new scientific framework. *Bio/Science.* **40:**204-207.
- García, G. C.; Hernández, V. V.; Segovia, V. e H. Medrano.** 1997. Producción de conidia - esporas de *Beauveria bassiana* en medios líquido y su evaluación en larvas de

Epilachna varivestis. XX Congreso Nacional de Control Biológico, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp:37- 38

- Garza, E.; Berlanga, A. y V. M. Hernández.** 1994. Guía técnica. Producción de hongos entomopatógenos. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Tecoman, Colima, México
- Humphreys, A. M.; Matewale, P.; Cunliffe, B. and A. P. J. Trinci.** 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. *Mycological Research*. **94**:1046 - 1050
- Inch, J. M. M.; Humphreys, A. M.; Trinci, A. P. and A. T. Gillespie.** 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans. Br. Mycol. Soc.* **87**:215-222
- Ignoffo, C. M. and W. F. Hink.** 1971. Propagation of arthropod pathogens in living systems in: *Microbial control of insects and mites*. Burges, H. D., N. W. Hussey (eds.) Academic Press. New York, N. Y.
- Jackson, M. A.; McGuire, M. R.; Lacey, L. A. and S. P. Wraight.** 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*. **95**: 1 - 7
- Jones, K. A.** 1994. Registration and use of microbial insecticides in developing countries. "VI International Colloquium on invertebrate pathology an microbial control. Montpellier, France, Agost 28 - September 2. pp:82-88
- Lacey, L. A.; Kirk, A. A. and R. D. Henneseey.** 1993. Foreing exploration for natural enemies of *Bemisia tabaci* and implementation in integrated control programs in United States. A.N.P.P. Third International Conference on Pests in Agriculture, Montpellier, France. pp:351 - 360
- Landa, Z. L.; Osborne, F.; López and J. Eyal.** 1994 A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control*. **4**:341-350
- Lane, B. S; Trinci, A. P. J. and A. T. Gillespie.** 1991 Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon and nitrogen-limited batch cultures. *Mycological Research*. **95**: 821 - 828

- Lane, B. S; Trinci, A. P. J. and A. T. Gillespie.** 1991 Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycological Research*. **95**: 829 - 833
- Lorence, Q. A.** 1996. Los biopesticidas en el marco de la agricultura sustentable. Cuadernos de vigilancia tecnológica, Cambiotec. UNAM. México. pp:39-43
- Osborne, L. S.; Storey, G. K.; McCoy, C. W. and J. F. Walter, J. F.** 1990. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Proceedings of the 5 International Colloquium on the Invertebrate Pathology and the Microbial Control*. Adelaide Australia. 20 - 24 August, 1990. pp:386
- Osborne, L. S. and Z. Landa.** 1992 Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*. **75**:456 - 471
- Riba, G.; Couteaudier, Y.; Maurer, P. y C. Neuvéglise.** 1994. Molecular methods offer a new challenge for fungal bioinsecticides. "VI International Colloquium on invertebrate pathology an microbial control". Montpellier, France, Agost 28 - September 2. pp: 375-379
- Rodríguez, M. M.; Martínez, M. de la T. y E. U. Niembro.** 1991. *Bacillus thuringiensis*: características biológicas y perspectivas de producción. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* **33**:279-292.
- Samson, R. A.** 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. In "Studies in Mycology". Vol 6 Baarn. The Netherlands.
- Samsinakova, A.** 1966. Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *Journal of Invertebrate Pathology*. **8**: 395-400
- Smith, P.** 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News an Information*. **14**: 71-78
- Soper, R. S. and M. g. Ward.** 1981. Production, formulation and application of fungi for insect. In "Biological Control in Crop production, BARC Symposium No.5 (G. C. Papavizas Ed.) Allandheld, Asmun, Monteclair, New Jersey. pp:161-180

- Tigano-Milani, M. S.; Faria, M. R.; Martins, I. and R. E. Leucona.** 1963 Ocorrência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Soroke *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brasil. An. Soc. Entomol. Brasil. 22:391-393
- Tilton, H.** 1993. Biopesticides have 5% market share of 7.8 billion dollars chemical insecticides market. Chemical Marketing Reporter, Mayo 17, p:SR11
- Valenzuela, L. E.** 1987. Microorganismos entomopatógenos: su aprovechamiento en el control de insectos plaga. (1^{era}. ed.) Edición Silva Castillejo. México. pp:15-26.

FIGURAS

Y

TABLAS

Tabla 1. Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial.

Grupo	Organismo	Producto	País		
Virus	Virus de la Poliedrosis Nuclear	Virin-Ensh, Virin-ABB, Virin-EKS, Virin-Diprion, Virin-HS, Virin-GYAP, Virin-LS, Virin-KHS, Virin-OS	URSS		
		Elcar, Gypcheck, TM-Buocontrol	EU		
		Manestrin, Hifantrin	Bulgaria		
		Monisarmio-Virua	Finlandia		
		Virox	Inglaterra		
		VPN 80, VPN 82	Guatemala		
		Virus de la Poliedrosis Citoplásmica	VPC	Japón	
Bacterias	<i>Bacillus popillae</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. thuringiensis</i>	Doom, Japademic, Milky Spore	EU		
		ABG-6185	EU		
		Agree	México		
		Dipel, Javelin, Biotrol, Foil, M-1, Bactimos, Teknar, Vectobac, Larvo-Bt, Thuricide	EU		
		Bactospeine	Bélgica		
		Bathurin, Moskitur	Checoslovaquia		
		BIP, Enterobacterin-3, Thuringin, Bitoksibacillín, Exotoksin, Gomelín, Insektín, Lepidocin, Bactokulicid, Dendrobacillín	URSS		
		Bacillan, Thuridan	Polonia		
		Thurindhghín, Turintoks	Rumania		
		Biobit	Dinamarca		
		Bactutal	Yugoslavia		
		Hongos	<i>Bauveria bassiana</i> <i>Hirsutella thompsoni</i> <i>Metharhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i>	Biotrol FBB, ABG-6178	EU
				Boverin	URSS
Boverol, Boverosil	Checoslovaquia				
Mycar	EU				
Biotrol-FMA	EU				
Mataquino	Brasil				
Metarrhizin	URSS				
Vertelpac, Mycotol	Inglaterra				
Nemátodos	<i>S. feltiae</i>	Verticillín	URSS		
		Verticón	Checoslovaquia		
		Seek, Spear, Neocide, Crop Patrol, Pest patrol	EU		

Adaptada de Rodríguez *et al.*, 1991.

Tabla 2. Hongos en desarrollo biotecnológico como micoinsecticida.

Patógeno	Insecto blanco	País	Estado de desarrollo*
<i>Aschersonia</i> spp.	Escamas y mosquita blanca	URSS	3
<i>Beauveria bassiana</i>	Barrenador europeo del maíz	URSS	5
		USA	2
		R. P. China	5
<i>Conidiobulus obscurus</i>	Afidos (pulgones)	Francia	3
		Gran Bretaña	2
		USA	2
<i>Culicinomyces clavosporus</i>	Mosquitos	Australia	2
<i>Entomophaga grylli</i>	Saltamontes	USA	1
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Acaro de los cítricos	USA	4
<i>Lagenidium giganteum</i>	Mosquitos	USA	2
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Salivazo	Brasil	5
	Mosquitos	USA	2
	Grillo del campo	Australia	1
	Escarabajo rinoceronte	Pacífico sur	2
<i>Nomuraea rileyi</i>	Gusano peludo	USA	2
<i>Verticillium lecanii</i>	Afidos en invernadero	Gran Bretaña	5
<i>Zoophthora radicans</i>	Gusano de la yema del abeto	USA	1

* 1. Evaluación de laboratorio. 2. Producción limitada para pruebas a pequeña escala. 3. Producción en planta piloto para pruebas a mayor escala. 4. Permiso para uso experimental. 5. Registro para su comercialización. Adaptada de Valenzuela, 1987. Avances reportados hasta 1982.

Tabla 3. Insectos susceptibles de control con hongos entomopatógenos.

Género de hongos	Estado infectivo	Insectos susceptibles
<i>Coelomomyces</i>	Zoosporas	Mosquitos
<i>Lagenidium</i>	Zoosporas	Mosquitos
<i>Leptolegnia</i>	Zoosporas	Mosquitos
<i>Conidiobulus</i>	Conidia	Afidos
<i>Entomophaga</i>	Conidia	Chapulines y gusanos
<i>Zoophthora</i>	Conidia	Afidos, gusanos y escarabajos
<i>Beauveria</i>	Conidia	Escarabajos, gusanos y pulgas saltonas
<i>Culicinomyces</i>	Conidia	Mosquitos
<i>Hirsutella</i>	Conidia	Acaros y saltamontes
<i>Metarrhizium</i>	Conidia	Pulgas saltonas, mosquitos, escarabajos y chinches apestosas
<i>Paecilomyces</i>	Conidia	Defoliadores y gusanos
<i>Tolypocladium</i>	Conidia	Mosquitos
<i>Verticillium</i>	Conidia	Afidos, mosquitas blancas, trips y escamas
<i>Nomuraea</i>	Conidia	Gusanos defoliadores
<i>Entomocela</i>	Conidia	

Adaptada de Valenzuela, L. E. 1987 y Donald, W.R.

Tabla 4. Productos comerciales basados en hongos.

HONGO	PRODUCTO	ORGANISMO BLANCO	CULTIVO	EMPRESA
INSECTICIDAS Y NEMATICIDAS				
<i>Beauveria bassiana</i>	Beasin	<i>Anthonomus grandis</i>	Varios	Agrobionsa (México)
	Betel	<i>Haplochelius marginalis</i>	Maíz	Calliope (Francia)
	Boverin	N.D.	Maíz	Glavmikrobioprum (Rusia)
	Mycotrol	Mosca blanca, áfidos y trips	Varios	Mycotech Corp. (E.U.A.)
	Naturalis-O	Diversos	Ornamentales	Troy Bio Sciences (E.U.A.)
	Ostrinil	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Maíz	Calliope (Francia)
	N.D.	Mosca blanca	Varios	Fermona (E.U.A.)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bio-Path	<i>Blattella germanica</i>	Granos almacenados	EcoScience Corp. (E.U.A.)
	Meta-Sin	<i>Aeneolamia postica</i>	Varios	Agrobionsa (México)
	Metaquino	<i>Mahanarva posticata</i>	Caña de azúcar	IAA-Codepac (Brasil)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Pae-Sin	Mosca blanca	Varios	Agrobionsa (México)
<i>Arthrobotrys irregularis</i>	S350	Nemátodos	Florales	Somyal (Francia)
HERBICIDAS				
<i>Alternaria cassiae</i>	Casst	<i>Cassia Obtusifolia</i>	Soya y algodón	Mycogen Corp. (E.U.A.)
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Collego	<i>Aeschynomene virginica</i>	Soya	Ecogen (E.U.A.)
<i>Endothia parasitica</i> hipovirulenta	E.P.Bioprox	<i>Endothia parasitica</i>	Castaña	INRA (Francia)
<i>Phytophthora palmivora</i>	Devine	<i>Morenia odorata</i>	Cítricos	Abbot Labs. (E.U.A.)

Tomada de Lorence, 1996.

Tabla 5. Ingredientes del medio de cultivo para la producción de insecticidas microbianos

Substancias inorgánicas	Fuentes de carbono	Fuentes de nitrógeno
H ₂ SO ₄	Glucosa	Harina de soya
Na OH	Jarabe de maíz	Alimento de soya
Na ₂ CO ₃	Almidón de maíz	Alimento de semilla de algodón
Ca CO ₃	Alimento de maíz	Maíz macerado
K ₂ HPO ₄	Dextrina	Glúten de maíz
NH ₄ OH	Sacarosa	Levadura de cerveza
(NH ₄) ₃ PO ₄	Lactosa	Levadura primaria
(NH ₄) ₂ SO ₄	Suero	Levadura hidrolizada
Mq SO ₄ . 7 H ₂ O	Aceite de soya	Peptona de soya
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	Aceite de manteca de cerdo	Lactalbumina
Zn SO ₄		
NH ₄ NO ₃		
Na NO ₃		

Adaptada de Valenzuela, 1987

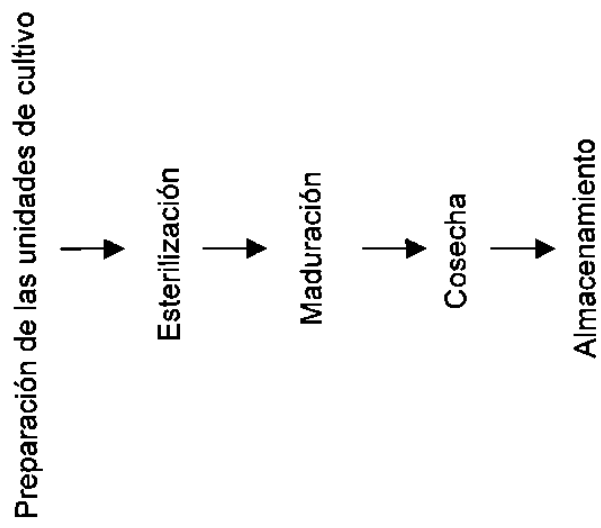
Tabla 6. Contenido de los diferentes medios de cultivo para la producción de blastosporas.

Componente	Medios de cultivo												C
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Medio basal*	25 ml												
Fuente de carbono (ml)													
Glucosa comercial 20%	20	20	20	-	-	-	20	20	20	-	-	-	-
Melaza 20%	-	-	-	20	20	20	-	-	-	20	20	20	-
Glucosa 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Fuente de nitrógeno (g)													
Solulys ^R 8%	1.5	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solulys ^R 10%	-	1.9	-	-	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Solulys ^R 6%	-	-	1.2	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-
Harina de soya 8%	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-	-
Harina de soya 10%	-	-	-	-	-	-	-	1.9	-	-	1.9	-	-
Harina de soya 6%	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	1.2	-
Casaminoácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3
Inóculo (5 x 10⁵ esp/ml)	5 ml												

C: control (medio reportado por Jackson, *et al.*, 1997) Esp/ml: Esporas por mililitro.

* KH₂PO₄ 4.0g; MgSO₄ . 7 H₂O 0.6 g; CaCl₂ . 2 H₂O 0.8 g; FeSO₄ . 7 H₂O 0.1 g; CoCl₂ 20 ml; Mn SO₄ 20 ml y ZnSO₄ . 7 H₂O 20 ml en 940 ml de H₂O dest.

Figura 1. Diagrama del proceso típico de producción de hongos entomopatógenos.



Fuente: Garza, *et al.*, 1994. Guía técnica. Producción de hongos entomopatógenos. Secretaría de Agricultura y Recursos hidráulicos. Tecomán, Colima, México.

Tabla 7. Cuenta de esporas de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyes ^R 8%	1.72 x 10 ⁹	1.95 x 10 ⁸
Gluc comercial + Solulyes ^R 10%	1.85 x 10 ⁹	3.01 x 10 ⁸
Gluc comercial + Solulyes ^R 6%	1.25 x 10 ⁹	1.88 x 10 ⁸
Control	1.08 x 10 ⁹	7.48 x 10 ⁸
Melaza + Solulyes ^R 8%	8.77 x 10 ⁸	2.28 x 10 ⁸
Melaza + Solulyes ^R 10%	3.17 x 10 ⁸	9.45 x 10 ⁷
Melaza + Solulyes ^R 6%	8.00 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁷
Control	1.03 x 10 ⁹	1.15 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 8%	6.73 x 10 ⁸	3.01 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 10%	1.13 x 10 ⁹	2.38 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 6%	9.13 x 10 ⁸	6.81 x 10 ⁷
Control	1.05 x 10 ⁹	1.25 x 10 ⁸
Melaza + Harina de soya 8%	4.33 x 10 ⁸	1.96 x 10 ⁸
Melaza + Harina de soya 10%	4.93 x 10 ⁸	7.51 x 10 ⁷
Melaza + Harina de soya 6%	6.43 x 10 ⁸	2.57 x 10 ⁸
Control	1.35 x 10 ⁹	1.17 x 10 ⁸

Los datos corresponden al 1er. Experimento. Las cuentas de esporas son por mililitro. Control: Medio utilizado por Jackson, M. et al., 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 8. Cuenta de esporas de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyz ^R 8%	1.73 x 10 ⁸	2.40 x 10 ⁸
Gluc comercial + Solulyz ^R 10%	1.65 x 10 ⁸	3.74 x 10 ⁸
Gluc comercial + Solulyz ^R 6%	1.47 x 10 ⁸	1.35 x 10 ⁸
Control	1.56 x 10 ⁸	3.16 x 10 ⁸
Melaza + Solulyz ^R 8%	5.53 x 10 ⁸	5.23 x 10 ⁸
Melaza + Solulyz ^R 10%	1.63 x 10 ⁷	1.17 x 10 ⁷
Melaza + Solulyz ^R 6%	1.03 x 10 ⁸	7.99 x 10 ⁸
Control	1.56 x 10 ⁸	3.16 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 8%	1.16 x 10 ⁸	1.16 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 10%	1.25 x 10 ⁸	1.10 x 10 ⁸
Gluc comercial + Harina de soya 6%	1.93 x 10 ⁸	3.25 x 10 ⁸
Control	1.61 x 10 ⁸	1.73 x 10 ⁸
Melaza + Harina de soya 8%	1.42 x 10 ⁸	2.38 x 10 ⁸
Melaza + Harina de soya 10%	1.69 x 10 ⁸	2.82 x 10 ⁸
Melaza + Harina de soya 6%	1.27 x 10 ⁸	2.69 x 10 ⁸
Control	1.61 x 10 ⁸	1.73 x 10 ⁸

Los datos corresponden al 2do. Experimento. Las cuentas de esporas son por mililitro. Control: Medio utilizado por Jackson, M. *et al.*, 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 9. Comparación en la cuenta de esporas de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	1ra.	2da.
Gluc comercial + Solulyz ^R 8%	1.72 x 10 ⁸	1.73 x 10 ⁹
Gluc comercial + Solulyz ^R 10%	1.85 x 10 ⁸	1.65 x 10 ⁹
Gluc comercial + Solulyz ^R 6%	1.25 x 10 ⁸	1.47 x 10 ⁹
Control	1.08 x 10 ⁹	1.56 x 10 ⁹
Melaza + Solulyz ^R 8%	8.77 x 10 ⁸	5.53 x 10 ⁸
Melaza + Solulyz ^R 10%	3.17 x 10 ⁸	1.63 x 10 ⁷
Melaza + Solulyz ^R 6%	8.00 x 10 ⁸	1.03 x 10 ⁸
Control	1.03 x 10 ⁹	1.56 x 10 ⁹
Gluc comercial + Harina de soya 8%	6.73 x 10 ⁸	1.16 x 10 ⁹
Gluc comercial + Harina de soya 10%	1.13 x 10 ⁹	1.25 x 10 ⁹
Gluc comercial + Harina de soya 6%	9.13 x 10 ⁸	1.93 x 10 ⁹
Control	1.05 x 10 ⁹	1.61 x 10 ⁹
Melaza + Harina de soya 8%	4.33 x 10 ⁸	1.42 x 10 ⁹
Melaza + Harina de soya 10%	4.93 x 10 ⁸	1.69 x 10 ⁹
Melaza + Harina de soya 6%	6.43 x 10 ⁸	1.27 x 10 ⁹
Control	1.35 x 10 ⁹	1.61 x 10 ⁹

Las cuentas de esporas son por mililitro. Control: Medio utilizado por Jackson, M. *et al.*, 1997. 1ra y 2da: son las repeticiones. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones.

Tabla 10. Peso seco de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyz ^R 8%	33.8	11.5
Gluc comercial + Solulyz ^R 10%	32.6	10.1
Gluc comercial + Solulyz ^R 6%	48.0	9.27
Control	43.9	5.02
Melaza + Solulyz ^R 8%	16.8	0.00
Melaza + Solulyz ^R 10%	20.4	3.37
Melaza + Solulyz ^R 6%	17.1	0.00
Control	13.9	0.00
Gluc comercial + Harina de soya 8%	22.2	0.97
Gluc comercial + Harina de soya 10%	24.9	6.26
Gluc comercial + Harina de soya 6%	20.7	2.69
Control	15.6	2.40
Melaza + Harina de soya 8%	23.4	2.65
Melaza + Harina de soya 10%	29.6	3.13
Melaza + Harina de soya 6%	23.4	0.87
Control	15.9	2.85

Los datos corresponden al 1er. Experimento. Los valores del peso seco son en gramos/litro. Control: Medio utilizado por Jackson, M. et al., 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 11. Peso seco de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyls ^R 8%	35.4	4.9
Gluc comercial + Solulyls ^R 10%	31.3	4.16
Gluc comercial + Solulyls ^R 6%	27.6	3.25
Control	29.0	5.48
Melaza + Solulyls ^R 8%	17.9	2.23
Melaza + Solulyls ^R 10%	17.6	3.32
Melaza + Solulyls ^R 6%	23.6	5.63
Control	29.0	5.48
Gluc comercial + Harina de soya 8%	30.4	3.17
Gluc comercial + Harina de soya 10%	30.6	4.61
Gluc comercial + Harina de soya 6%	25.9	3.61
Control	18.7	0.85
Melaza + Harina de soya 8%	27.5	4.18
Melaza + Harina de soya 10%	37.9	4.97
Melaza + Harina de soya 6%	25.1	5.92
Control	18.7	0.85

Los datos corresponden al 2do. Experimento. Los valores del peso seco son en gramos/litro. Control: Medio utilizado por Jackson, M. et al., 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 12. Comparación en el Peso seco de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	1ra	2da
Gluc comercial + Solulyz ^R 8%	33.8	35.4
Gluc comercial + Solulyz ^R 10%	32.6	31.3
Gluc comercial + Solulyz ^R 6%	48.0	27.6
Control	43.9	29.0
Melaza + Solulyz ^R 8%	16.8	17.9
Melaza + Solulyz ^R 10%	20.4	17.6
Melaza + Solulyz ^R 6%	17.1	23.6
Control	13.9	29.0
Gluc comercial + Harina de soya 8%	22.2	30.4
Gluc comercial + Harina de soya 10%	24.9	30.6
Gluc comercial + Harina de soya 6%	20.7	25.9
Control	15.6	18.7
Melaza + Harina de soya 8%	23.4	27.5
Melaza + Harina de soya 10%	29.6	37.9
Melaza + Harina de soya 6%	23.4	25.1
Control	15.9	18.7

Los valores del peso seco son en gramos/litro y corresponden al promedio de tres repeticiones. 1ra y 2da: son las repeticiones. Control: Medio utilizado por Jackson, M. et al., 1997.

Tabla 13. Viabilidad de esporas de *P. fumosoroseus* producidas en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyes ^R 8%	nd	nd
Gluc comercial + Solulyes ^R 10%	nd	nd
Gluc comercial + Solulyes ^R 6%	nd	nd
Control	nd	nd
Melaza + Solulyes ^R 8%	84	7.02
Melaza + Solulyes ^R 10%	75	9.50
Melaza + Solulyes ^R 6%	88	8.96
Control	95	6.08
Gluc comercial + Harina de soya 8%	95	3.61
Gluc comercial + Harina de soya 10%	94	1.53
Gluc comercial + Harina de soya 6%	95	1.00
Control	89	1.15
Melaza + Harina de soya 8%	83	3.00
Melaza + Harina de soya 10%	94	3.51
Melaza + Harina de soya 6%	96	3.21
Control	95	3.21

Los datos corresponden al 1er. Experimento. Los valores expresan el porcentaje de germinación. Control: Medio utilizado por Jackson, M. *et al.*, 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 14. Viabilidad de esporas de *P. fumosoroseus* producidas en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Promedio	D.S.
Gluc comercial + Solulyes ^R 8%	92	3.06
Gluc comercial + Solulyes ^R 10%	99	1.00
Gluc comercial + Solulyes ^R 6%	92	2.08
Control	87	2.52
Melaza + Solulyes ^R 8%	72	1.04
Melaza + Solulyes ^R 10%	nd	nd
Melaza + Solulyes ^R 6%	49	3.06
Control	87	2.52
Gluc comercial + Harina de soya 8%	93	4.73
Gluc comercial + Harina de soya 10%	90	1.53
Gluc comercial + Harina de soya 6%	91	3.61
Control	92	2.65
Melaza + Harina de soya 8%	53	6.43
Melaza + Harina de soya 10%	48	2.52
Melaza + Harina de soya 6%	nd	nd
Control	92	2.65

Los datos corresponden al 2do. Experimento. Los valores expresan el porcentaje de germinación. Control: Medio utilizado por Jackson, M. *et al.*, 1997. Promedio, corresponde al de tres repeticiones. D.S: Desviación estándar.

Tabla 15. Comparación en la viabilidad de esporas de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	1ra.	2da.
Gluc comercial + Solulyes ^R 8%	nd	92
Gluc comercial + Solulyes ^R 10%	nd	99
Gluc comercial + Solulyes ^R 6%	nd	92
Control	nd	87
Melaza + Solulyes ^R 8%	84	72
Melaza + Solulyes ^R 10%	75	nd
Melaza + Solulyes ^R 6%	88	49
Control	95	87
Gluc comercial + Harina de soya 8%	95	93
Gluc comercial + Harina de soya 10%	94	90
Gluc comercial + Harina de soya 6%	95	91
Control	89	92
Melaza + Harina de soya 8%	83	53
Melaza + Harina de soya 10%	94	48
Melaza + Harina de soya 6%	96	nd
Control	95	92

Los valores expresan el porcentaje de germinación. Control: Medio utilizado por Jackson, M. et al., 1997. 1ra y 2da: son las repeticiones. Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones.

Tabla 16. ANOVA de los parámetros en dos experimentos diferentes.

Variable	F calc.	P. de error	Significancia
Esporas/ml	0.3731	0.5428	NS
Peso seco	0.6634	0.4174	NS
% de germinación	7.3598	0.0082	**

** Diferencia altamente significativa $\alpha = 0.01$

NS = Diferencia no significativa.

F. Calc.= prueba de F calculada. P. de error= probabilidad de error.

Tabla 17. ANOVA de los componentes de los medios de cultivo.

Variable	F calc.	P. de error	Significancia
Esporas/ml	5.2292	0.0036	**
	7.4924	0.0002	**
Peso seco	28.1319	0.0000	**
	3.8772	0.0152	**
% de germinación	2.9919	0.0640	NS
	13.5507	0.0000	**

** Diferencia altamente significativa $\alpha = 0.01$

NS = Diferencia no significativa.

F. Calc.= prueba de F calculada. P. de error= probabilidad de error.

Tabla 18. ANOVA de los medios de cultivo diseñados.

Variable	F calc.	P. de error	Significancia
Esporas/ml	6.63	0.0000	**
	19.10	0.0000	**
Peso seco	2.87	0.0073	**
	4.53	0.0002	**
% de germinación	3.54	0.0054	**
	56.03	0.0000	**

** Diferencia altamente significativa $\alpha = 0.01$
 F. Calc. = prueba de F calculada. P. de error = probabilidad de error.

Figura 2. Comparación de los componentes de los medios de cultivo para la cuenta de esporas de *P. fumosoroseus*.

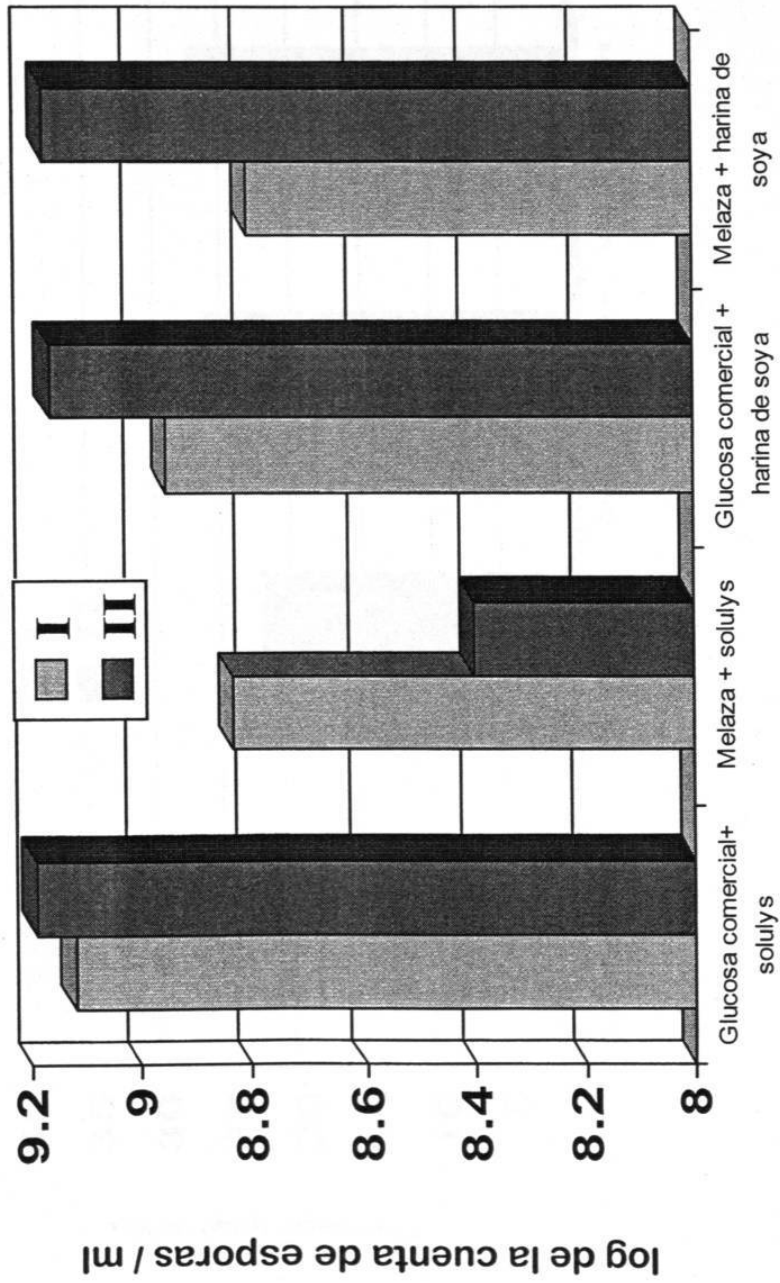


Figura 3. Comparación de los componentes de los medios de cultivo para peso seco de esporas de *P. fumosoroseus*.

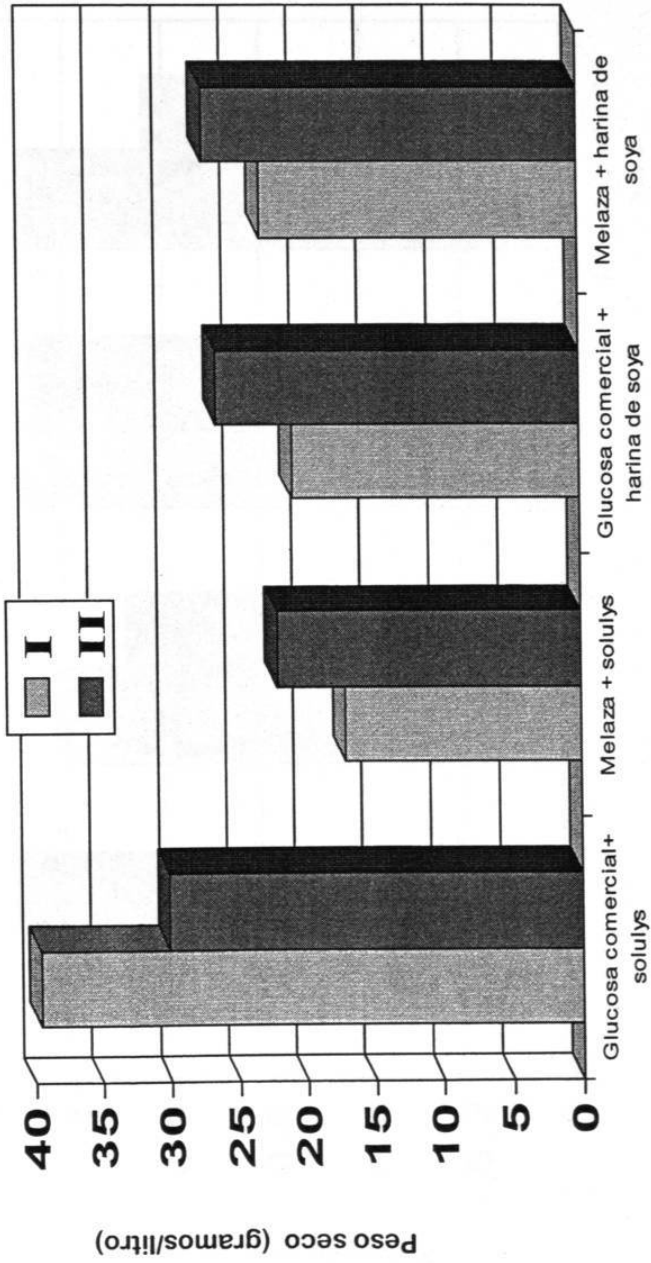


Figura 4. Comparación entre los componentes de los medios de cultivo para la viabilidad de esporas de *P. fumosoroseus*.

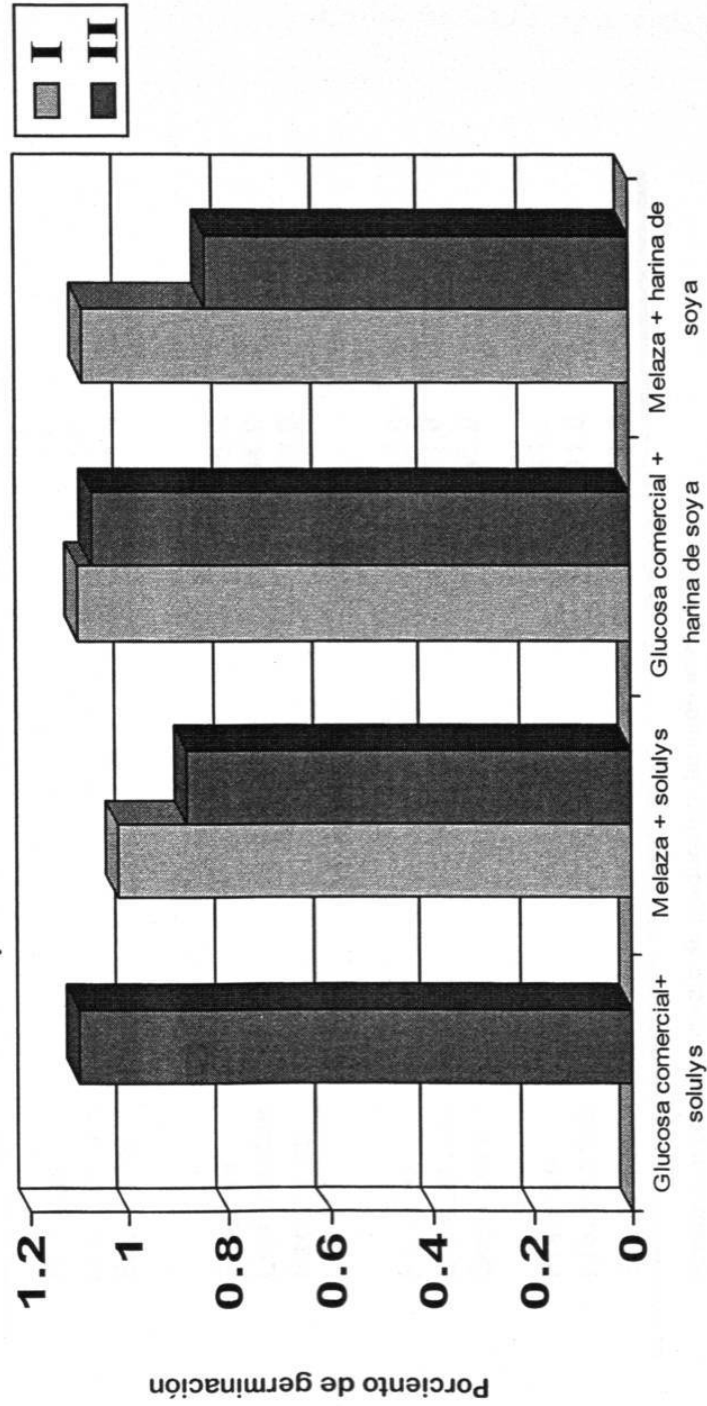


Tabla 19. Número de esporas y viabilidad de muestras de *P. fumosoroseus* producidas por el USDA-Peoria.

Tratamientos	Esp/ml (10 ⁸)	% Germinación
Frescas	13	95.0
Liofilizadas	13	91.0
Sec x aire	170	80.0
Frescas	9.2	95.0
Liofilizadas	9.2	94.0
Sec x aire	150	90.0
Frescas	13	93.0
Liofilizadas	9.2	91.0
Sec x aire	1.2	90.0
Frescas	93	96.0
Liofilizadas	9.2	91.0
Sec x aire	160	89.0

Frescas: esporas en medio de producción Jackson *et al.*, 1997.

Liofilizadas: esporas en lactosa 10% y suero bovino 1%.

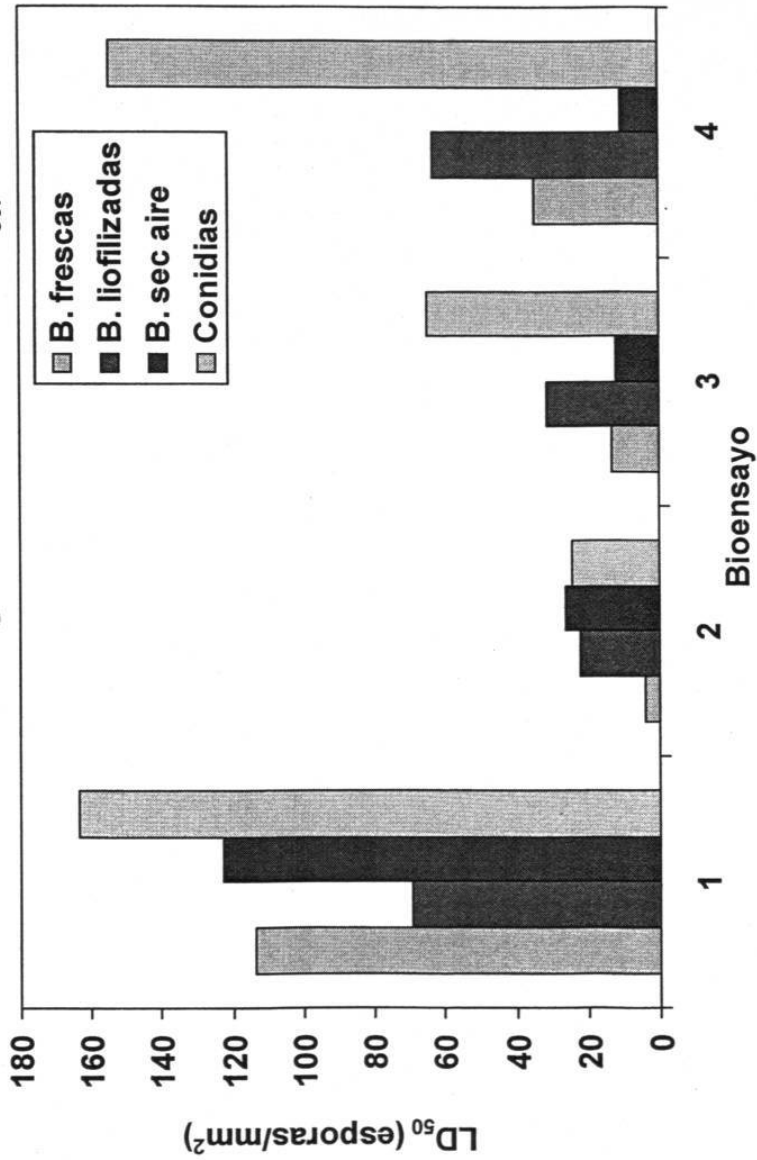
Sec. x aire: esporas con tierra de diatomeas 5% (w/v).

Tabla 20. Evaluación de esporas de *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii*.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad			
	I	II	III	IV
B frescas	81.8	63.0	99.0	95.0
B liofilizadas	78.1	88.0	94.0	84.0
B sec x aire	83.1	80.0	98.0	93.0
Conidias	91.3	98.0	88.0	90.0

B: Blastosporas. Dosis 1000 Esporas/mm². Bloensayos realizados: I. Marzo, II. Mayo, III. Junio y IV. Octubre de 1997. Frescas: esporas en medio de producción Jackson et al., 1997. Liofilizadas: esporas en lactosa 10% y suero bovino 1%. Sec. x aire: esporas con tierra de diatomeas 5% (w/v). Conidias: en solución tween 80 0.01%

Figura 5. Comparación de ensayos de *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii* en base a LD₅₀.



LD₅₀: Dosis Letal media . B: Blastosporas. Bioensayos realizados: 1. Marzo, 2. Mayo, 3. Junio y 4. Octubre de 1997. Frescas: esporas en medio de producción Jackson *et al.*, 1997. Liofilizadas: esporas en lactosa 10% y suero bovino 1%. Sec. x aire: esporas con tierra de diatomeas 5% (w/v). Conidias: en solución tween 80 0.01%

