

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



**UTILIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS LIQUIDOS PARA LA
OBTENCIÓN DE BLASTOESPORAS Y CONIDIAS DE
Beauveria bassiana (BALS.)VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA:
HYPHOMECETES) RESISTENTES A CONDICIONES AMBIENTALES.**

TESIS
QUE PRESENTA LA

BIOL. MABELLE JULIE CHONG RODRÍGUEZ

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

TM

SB975

.C4

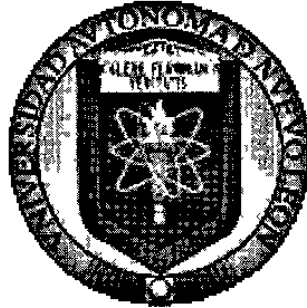
2003

c.1



1080124372

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



**UTILIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS LIQUIDOS PARA LA
OBTENCIÓN DE BLASTOESPORAS Y CONIDIAS DE
Beauveria bassiana (BALS.) VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA:
HYPHOMECETES) RESISTENTES A CONDICIONES AMBIENTALES.**

**TESIS
QUE PRESENTA LA**

BIOL. MABELLE JULIE CHONG RODRÍGUEZ

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

TM
SB975
.C4
2003



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

**UTILIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS LIQUIDOS PARA LA
OBTENCIÓN DE BLASTOESPORAS Y CONIDIAS DE
Beauveria bassiana (BALS.)VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA:
HYPHOMECETES) RESISTENTES A CONDICIONES AMBIENTALES.**

TESIS

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

BIOL. MABELLE JULIE CHONG RODRÍGUEZ

APROBADA

COMISION DE TESIS



**DR. LUIS J. GALAN WONG
DIRECTOR
PRESIDENTE**



**DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO
SECRETARIA**



**DR. MARK JACKSON
ASESOR EXTERNO
VOCAL**



**DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
VOCAL**

ESTA TESIS CORRESPONDE A LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON UNA BECA OTORGADA POR EL GOBIERNO DE MÉXICO A TRAVÉS DEL INSTITUTO MEXICANO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL (IMEXCI) DE LA SECRETARIA DE RELACIONES EXTERIORES.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y DEL SUELO “ DR. H. T. DULMAGE”, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UANL., EN COLABORACIÓN CON EL CENTRO NACIONAL PARA LA UTILIZACIÓN EN AGRICULTURA, ARS/USDA/NCAUR, PEORIA, ILLIONOIS, EUA., BAJO LA DIRECCIÓN INTERNA DEL DR. LUIS J. GALAN WONG (FCB/UANL) Y DIRECCIÓN EXTERNA DEL DR. MARK JACKSON (ARS/USDA/NCAUR).

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Página de título.....	i
Realización del trabajo.....	ii
Lugar de Trabajo.....	iii
Indice de contenido.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Importancia.....	5
Hipótesis.....	6
Objetivos.....	7
Antecedentes.....	8
Bioinsecticidas.....	8
Hongos entomopatógenos.....	10
<i>Beauveria bassiana</i>	12
Hospederos.....	14

<i>Plutella xylostella</i>	17
Factores de afectan la estabilidad.....	20
Cultivo.....	24
Producción de mico insectidas.....	27
Materiales y Métodos.....	32
Stock.....	32
Inóculo.....	32
Medios de cultivo.....	33
Precultivo.....	34
Cultivo.....	34
Separación y soporte.....	35
Secado.....	35
Viabilidad	36
Almacenamiento.....	37
Bioensayos contra <i>Plutella xylostella</i>	37
Diseño Expperimental.....	38
Resultados.....	39
Discusión.....	52
Conclusiones.....	63
Recomendaciones.....	64
Literatura citada.....	65

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los ángeles que Dios me dio en esta vida:

Mi madre: a quien debo lo que tengo y lo que soy. Gracias Mamá porque a través de la distancia haz sabido darme ánimos para seguir adelante, y tu apoyo incondicional. Tú haz sido mi mayor inspiración.

Mario Eduardo: gracias por tu amor y sobretodo por la paciencia en todo este tiempo. Por todas esas noches de desvelos en que no me dejaste sola para poder sacar todos mis experimentos. Porque los sueños comienzan a tener alas cuando comenzamos a creer en ellos.

A la memoria de mis amigos: Ivo Sáenz, Latanya Jones, Tanisha Branch, Herminia Chifundo: Por la valiosa oportunidad de haberlos conocido, y de contar con su amistad. Siempre los recordaré.

AGRADECIMIENTOS

- **A Dios:** por estar presente en cada momento de mi vida, dándome fuerzas aún en los momentos más difíciles: en mis tristezas, nostalgias y triunfos. Por la valiosa oportunidad de ver en cada problema una experiencia nueva de la cuál aprender.
- **Al Dr. Luis Galán Wong:** Por la valiosa oportunidad de formar parte de su laboratorio, y la constante comunicación y disposición que mantuvimos antes de mi llegada y durante mi estancia en México. Por su apoyo incondicional en mi formación académica y profesional, finalmente por la asesoría en la realización de este trabajo.
- **Al Dr. Mark Jackson:** Por su valiosa asesoría y disponibilidad durante la realización este trabajo, en base a su vasta experiencia. A la vez por su hospitalidad durante la estancia realizada en su laboratorio en Peoria, Illinois (ARS/NCAUR/USDA).
- **A la Dra. Katiushka Arévalo Niño y la Dra. Lilia H. Morales** por la asesoría durante la realización de este trabajo, por todos los consejos, hospitalidad y orientación durante todo este tiempo.

- **Al Dr. Carlos F. Sandoval:** por toda la asesoría, orientación, valiosos consejos, correcciones y sugerencias para las mejoras de este trabajo.
- **A la Lic. Angel Camacho** del IMEXCI de la SRE, por todo su apoyo y orientación con los trámites legales.
- **A la Lic. Laura Narbaez** de la SRE delegación Monterrey por su orientación con los trámites legales.
- **Al Lic. Rogelio González** del Departamento de Intercambio Académico de la UANL, por su apoyo para la extensión de mi beca.
- **A la Lic. Emma Melchor** del Departamento de Becas de Postgrado de la UANL por su hospitalidad y orientación en los trámites de mi beca
- **A la Lic. Eli Zamora** del Departamento de Becas de Postgrado de la UANL por su hospitalidad y orientación en los trámites de mi beca.
- **A la Lic. Rosario Cortés** de la Secretaría Académica de la UANL por su hospitalidad y orientación con trámites realizados.

- A las Sras. **Hilda Chapa, Alejandra Ramírez, Cristina de Franco** y la Srita. **Liliana Romo** por su disponibilidad en los trámites y firmas de documentos.
- A **Angela Payne** por el excelente entrenamiento que obtuvimos bajo su dirección durante nuestra estancia en Peoria, Illinois (ARS/NCAUR/USDA).
- A la **Embajada de Panamá** en D.F. en especial al Excelentísimo Sr. **Embajador Sr. Dionisio Guillén**, por trámites legales realizados para la extensión de mi beca.
- A el Cónsul de Panamá en Monterrey **Dr. Ricaurte Crespo**, por toda la asesoría durante mi estancia.
- A la **Dra. María Guadalupe Maldonado** por todo la ayuda y orientación a través de mi carrera.
- A la Srita. **Artemisa Perea** por su apoyo y orientación con la cría de *Plutella xylostella*.
- A **mi familia**: Porque a través de sus e-mails y cartas, nunca deje de sentirlos cerca. Los Amo.

- **A la Familia Sánchez Benitez en especial a la Sra. Juanita por su hospitalidad**
- **A mis amigos Panameños: Ludgardi Pájaro, Yahaira Alleyne, Valerio Iglesias, Mario Chifundo, Alizka Dobras, Oris de Gracia, Peerless Martínez, Aura Watson, Digna Caicedo, Samuel Valdés, Luis Alberto Saézn, Luis Enrique Ortíz, Andrew Rose, y la Lic. Maria Guadalupe Collado por la valiosa amistad que hemos mantenido en todo este tiempo y por acordarse de mi aún en la distancia, ese ha sido uno de mis mayores motores para seguir adelante.**
- **Al Dr. Puga de La Universidad de Panamá: Por todos los consejos y disposición a través del tiempo.**
- **A la Dra. Noris Salazar Allen de la Universidad de Panamá: Por sus muy sabios consejos y sugerencias.**
- **A mis amigos Mexicanos: Marisela García, Xótcitl Dorado, Pedro Puente, Viviana Mata, Adrián Rosas, Blanca González, , Alicia Guevara, Susana Dimas, Tomás Rangel, Hugo Gallardo, Gabriel Dobras y Familia, Jóvenes de Revolución por María: América**

Uribe, Amabely Torrijos, Roberto Berlanga Ana Saucedo, Luis Oviedo y Mario Esparza por su amistad incondicional y por hacerme sentir como en casa.

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Carbono
C°	grados centígrados
C:N	proporción carbono: nitrógeno
cm	centímetro
esporas/mL	esporas por mililitro
esporas/g	esporas por gramo
et. al.	y colaboradores
Fig.	Figura
g	gramos
h	horas
H	humedad
H ₂ O	Agua destilada estéril
N	nitrógeno
No.	número
ml	mililitros
mm	milímetros
μl	microlitros
PDA	agar papa dextrosa
RPM	revoluciones por minuto
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	luz ultravioleta

$\alpha:0.05$	Error de 0.05
%	Porcentaje 00/100
1er	Primer
2do	Segundo
3er	Tercer
4to	Cuarto
5to	Quinto
6to	Sexto

LISTA DE TABLAS

Tabla No.1	Principales elementos presentes en los microorganismos (porcentaje de composición).	25
Tabla No.2	Productos comerciales de <i>B. bassiana</i> elaborados a nivel Mundial.	30
Tabla No.3	Productos de <i>B. bassiana</i> elaborados en Colombia	31
Tabla No. 4	Porcentaje de Tolerancia a la desecación del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en los medios de cultivo con diferentes fuentes de C y N.	46
Tabla No.5	Almacenamiento a 4°C durante 6 meses del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en tierra de diatomeas desarrollo en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.	47
Tabla No.6	Almacenamiento a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 meses del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en tierra de diatomeas desarrollo en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.	47
Tabla No.7	Almacenamiento a 4°C durante 6 meses del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en caolín desarrollo en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.	48
Tabla No.8	Almacenamiento a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 meses del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en caolín desarrollo en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.	48
Tabla No.9	Porcentaje acumulativo de micosis de larvas de 3er estadio de <i>Plutella xylostella</i> tratadas con formulaciones de <i>B. bassiana</i> GHA en tierra de diatomeas.	50

LISTA DE TABLAS

Tabla No.9	Porcentaje acumulativo de micosis de larvas de 3er estadio de <i>Plutella xylostella</i> tratadas con formulaciones de <i>B. bassiana</i> GHA en tierra de diatomeas.	50
Tabla No.10	Porcentaje acumulativo de micosis de larvas de 3er estadio de <i>Plutella xylostella</i> tratadas con formulaciones de <i>B. bassiana</i> GHA en caolín	51
Tabla No.11	Porcentaje acumulativo de micosis de larvas de 3er estadio de <i>Plutella xylostella</i> tratadas con filtrados de <i>B. bassiana</i> GHA de los diferentes medios de cultivo.	51

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Ciclo de infección de hongos entomopatógenos.	12
Fig. 2	Colonia de <i>B. bassiana</i> en PDA.	14
Fig. 3	<i>Anthonomus grandis</i>	16
Fig. 4	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	16
Fig. 5	<i>Bemisia argentifolii</i>	16
Fig. 6	<i>Bemisia tabaci</i>	16
Fig. 7	Larva de 3er estadio de <i>Plutella xylostella</i>	20
Fig. 8	Producción de ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA, en medios de cultivos líquidos con diferentes fuentes de C y N.	39
Fig. 9	Ingrediente activo del medio M1.	40
Fig. 10	Ingrediente activo del medio T1.	40
Fig. 11	Ingrediente activo del medio T2.	40
Fig. 12	Ingrediente activo del medio T3.	40
Fig. 13	Germinación a las 10 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.	41
Fig. 14	Germinación a las 10 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.	41
Fig. 15	Germinación a las 12 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.	42
Fig. 16	Germinación a las 12 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.	41
Fig. 17	Germinación a las 14 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.	41
Fig. 18	Germinación a las 14 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.	41

LISTA DE FIGURAS

Fig. 19	Germinación a las 10 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de caolín.	43
Fig. 20	Germinación a las 10 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de caolín.	43
Fig. 21	Germinación a las 12 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de caolín.	44
Fig. 22	Germinación a las 12 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de caolín.	44
Fig. 23	Germinación a las 14 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte húmedo de caolín.	44
Fig. 24	Germinación a las 14 h del ingrediente activo de <i>B. bassiana</i> GHA en soporte seco de caolín.	44
Fig. 25	Microciclo observado en los medios durante la germinación.	45
Fig. 26	Larva de 3er estadio de <i>P.xylostella</i> , control -.	49
Fig. 27	Larva de 3er estadio de <i>P.xylostella</i> , control +.	49
Fig. 28	Micosis inicial en larvas de 3er estadio de <i>P.xylostella</i> .	50
Fig. 29	Micosis total en larvas de 3er estadio de <i>P.xylostella</i> .	50

RESUMEN

B. bassiana es un hongo entomopatógeno, que crece saprofiticamente en el suelo y puede atacar un rango amplio de insectos. Nuevos métodos de producción de biopesticidas son requeridos por ser más baratos y rápidos. Ha sido reportado que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden dar estabilidad a las esporas durante el secado. Cultivos de 100 ml de *B. bassiana* GHA fueron crecidos en cuatro medios líquidos diferentes: M1 (glucosa, casamino ácidos), T1 (glucosa, casamino ácidos), T2 (glucosa, líquido remojo de maíz) y T3 (glucosa, peptona) en matraces bafleados de 250 ml, a 300 RPM y 25 °C, en dos fases de tres días. Utilizamos como soportes tierra de diatomeas y caolín, y las esporas se secaron a 26 ± 1 °C. La viabilidad de las esporas fue determinada mediante estudios después de 10, 12, 14 horas de incubación. Los formulados con esporas de *B. bassiana* fueron almacenados a 4 °C y 26 °C por 6 meses, las pruebas de estabilidad durante almacenamiento fueron evaluadas con bioensayos con larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella*. El medio con mejor producción fue T2 (7.2×10^9 (esporas/ml). El medio T2 produjo esporas con el porcentaje más alto de tolerancia a la desecación en tierra de diatomeas (90%) y en caolin (96%) y presento la mejor estabilidad durante el almacenaje a 4 °C y 26 °C después de 6 meses. Las esporas producidas en el medio T2 poseen también la virulencia más alta con larvas de 3er estadio de *P. xylostella* con 90% de micosis para formulados en tierra de diatomeas, 100% de mortalidad para formulados en caolín y 100% de mortalidad para filtrados de esporas.

ABSTRACT

B. bassiana is an entomopathogenic fungus, that grows on soil saprophytically in soil and attacks a wide range of insects. New methods for production of biopesticides is required that are less expensive and faster. It has been reported that source of carbon and nitrogen can provide stability to spores during storage. One hundred ml cultures of *B. bassiana* strain GHA were grown four different liquid media: M1 (glucose, casaminoacids), T1 (glucose, casaminoacids), T2 (glucose, corn steep liquor), and T3 (glucose, peptone) in 250 ml baffles flask, at 300 RPM and 25°C, in two stages of three days. We used diatomeaceas earth and kaolin clay (Surround ®) as support, and dried the spores at 26 ± 1 °C. Spore viability was assessed by studies after 10, 12, and 14 hours incubation. Formulates of *B. bassiana* spores were stored for 6 months at 4 °C and 26 °C, and storage stability was evaluated with bioassays against three instar larvae of *Plutella xylostella*. The best production media was T2 (7.2×10^9 spores/ml). The T2 medium produced spores with the higher dessication tolerance percent in diatomeaceas earth (90%) and in Surround ® (96%) and had the best storage stability in diatomeaceas earth at 4 °C and 26 °C after 6 months. *B. bassiana* spores produced in the T2 medium also had the best virulence against 3rd instar larvae of *P. xylostella* with 90% mycosis for diatomeaceas earth formulates, 100% mortality for surround formulates and 100% mortality for spores filtrates.

INTRODUCCION

Son muchas las pérdidas económicas debido a un gran número de insectos plagas que dañan miles de cosechas, anualmente. Para los años 50's el control de las plagas se realizaba con químicos por su rápida acción y su efectividad. Sin embargo sus beneficios eran solo enfocados en la eliminación rápida de la plaga en las cosechas sin considerar el ambiente, la salud humana, y la economía. Lo que ha causado daños irreparables al paso de los años.

En los últimos años ha sido de gran importancia para la comunidad científica, buscar formas de preservar el ambiente y evitar el desbalance ecológico al introducir sustancias nocivas. Por este motivo se exploró desde hace algunas décadas la incorporación de microorganismos como bacterias, hongos, nemátodos y virus como bioinsecticidas (Valenzuela, 1987).

Muchos de estos tienen especificidad por su hospedero, lo que hace que algunos no presenten actividad alguna contra ciertos insectos plagas. De ahí la importancia en la búsqueda de nuevos microorganismos y nuevos métodos de producción de bioinsecticidas para contrarrestar plagas que muestran resistencia a ciertos bioinsecticidas.

Además de los beneficios que traería para los pequeños agricultores el uso de bioinsecticidas en cuanto a salud, estos son de aplicación sencilla, y menos costosos. Sin mencionar los beneficios en el ambiente, ya que se están utilizando microorganismos endémicos que normalmente se encuentran como saprofitos del suelo.

En Europa y Asia, la incorporación de bioinsecticidas en manejo integrado de plagas ha tomado un rol muy importante, sería de mucha importancia poder lograr la incorporación de estos en los países sub desarrollados específicamente en los trópicos por la enorme biodiversidad de microorganismos, aún no descubiertos que pueden estar en peligro de extinción con la utilización de químicos altamente nocivos.

IMPORTANCIA

Los daños que causan al ambiente y al hombre los pesticidas químicos, han dado lugar a la utilización de pesticidas más seguros como los bioinsecticidas. La inestabilidad de los bioinsecticidas, así como la actual resistencia de algunos insectos plagas a los pesticidas basándose en microorganismos como el caso de *Plutella xylostella* con resistencia a *Bacillus thuringiensis*, hace de interés la búsqueda de nuevos microorganismos para el control de este tipo de plagas, y para otros insectos blancos para los cuáles los insecticidas actuales no tienen actividad.

La mayoría de los bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos, son fácilmente inactivados bajo las condiciones ambientales como temperatura y exposición a rayos UV. Es de gran interés el poder desarrollar un mico insecticida más económico y sobre todo más estable ante condiciones ambientales y que el mismo pueda tener actividad contra blancos específicos.

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento la producción de los mico insecticidas ha sido en sustrato sólido y su único producto son conidias aéreas, este método es muy complejo, costoso, y lento. El poder utilizar el cultivo líquido como un método de producción más rápido para la producción de blastoesporas y conidias sumergidas es de mucho interés, ya que las blastoesporas pueden germinar en menos tiempo y se ha descrito que son más infectivas que las conidias.

Se ha determinado que ingredientes como fuentes de C y N utilizados en la producción, y la forma de secado del ingrediente activo (esporas) van a influir mucho en el comportamiento del mismo ante condiciones ambientales.

La originalidad de este trabajo radica en el poder producir ingrediente activo en cultivo sumergido con diferentes fuentes de C y N para la producción de reserva endógena, y realizar un secado menos agresivo. Y determinar si el manejo de estas condiciones permite que las esporas sean tolerantes ante las condiciones ambientales y también puedan tener actividad contra blancos específicos.

HIPÓTESIS

Es posible producir esporas de *B. bassiana* en diferentes fuentes de C y N, resistentes a condiciones ambientales con actividad contra lepidópteros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Probar diferentes medios de cultivos líquidos utilizando diferentes fuentes de C y N para la producción de blastoesporas y conidias de *B. bassiana*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Diseño de 3 medios de cultivo variando la fuente de N para producir esporas de *B. bassiana* y compararlos con el medio de Jackson en cuanto rendimiento y estabilidad de las esporas.
- Probar 2 soportes de filtración (tierra de diatomeas y caolín) y determinar la viabilidad de las esporas.
- Probar 2 temperaturas de almacenamiento de los formulados y determinar como influyen en la estabilidad del mismo.
- Determinar la proporción de conidias y blastoesporas obtenidas en los diferentes medios de cultivo diseñados.

ANTECEDENTES

Bioinsecticidas

La primera observación sobre enfermedades en insectos data desde 1527, reportada por Marcus Hieronymus Vid, y así se han reportado un sin número de parasitosis en insectos. Los insecticidas químicos han sido utilizados para el control de insectos en granos desde al menos 35 años, para protegerlos durante su almacenamiento. Recientemente ha emergido el desconcierto por el uso de insecticidas químicos debido a los costos, a los daños que ocasionan en el ambiente, y efectos adversos en el hombre entre ellos la esterilidad y cáncer.

Se han registrado también la resistencia de algunos insectos como *Rhyzopertha dominica* a clorpirofos-metil, *Sitophilus oryzae*, y *Tribolium castaneum* a la resmetrina y bioresmetrina; así como también la resistencia a los insecticidas biológicos con *Bacillus thuringiensis* (Rice et al, 1999).

Una alternativa para evitar el uso de insecticidas sintéticos para el control de insectos, es el empleo reciente de microorganismos como: *Bacillus thuringiensis* el cuál recientemente ha mostrado el problema de resistencia por algunos insectos como *Plutella xylostella*, y uso de los hongos entomopatógenos: *Beauveria brongniartii* (Aregger, 1991) *Beauveria bassiana* (Jeffs et. al., 1997; Poprawski et. al., 1999; Wraight

et. al., 1999), *Paecilomyces fumosoroseus* (Jackson et. al., 1997, Smith, 1993) *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* (Landa et. al., 1994).

El uso del control microbial en el combate de plagas inséctiles se enfoca principalmente en evitar la contaminación ambiental, eliminar del uso de productos químicos para la disminución de tóxicos y la resistencia en las plagas, finalmente proteger a la fauna insectil benéfica (Valenzuela, 1987).

Los microorganismos que han sido introducidos en los ambientes en los últimos 15 años han sido muy exitosos, por ser una forma de biocontrol segura para los humanos y estable para el ambiente (Bidochka, 2001), Hasta el momento en la elaboración de bioinsecticidas se ha destacado el uso de *Bacillus thuringiensis*, Baculovirus, hongos entomopatógenos como: *Paecilomyces fumosoroseous*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

Desafortunadamente el 2% del mercado global de pesticidas, corresponde a los bioinsecticidas, y el mayor porcentaje corresponde a los bioinsecticidas químicos (Bidochka, 2001).

Según Feng et. al. (1994) se han considerado mucho factores para la producción de un buen bioinsecticida entre ellos:

- La cepa debe ser capaz de producirse en grandes cantidades.

- Crecimiento rápido
- Virulenta.
- Se debe buscar un medio de óptimo de crecimiento que no sea costoso.
- Los productos deben ser aplicados a plagas con distintos aspectos biológicos.
- los productos formulados deben resistir el almacenamiento a temperatura ambiente.
- No deben perder su viabilidad e infectividad.

Hongos entomopatógenos

Se ha estimado que existen 1.5 millones especies de hongos en el mundo de los cuales solo el 5% ha sido descrito (Hawksworth, 1991) , y solo 1000 comprenden hongos entomopatógenos (Humber & Tigano, 2002). De los 700 hongos entomopatógenos reportados solamente 12 han sido seleccionados para el proceso de desarrollo contra insectos dañinos: Curculidae, Aphidae, Delphacidae, Cicadéllidae, Cercópidae, Aleyrodidae, Coccoidea, Thysanóptera, Coleóptera, Lepidóptera (Valenzuela, 1987).

Entre los hongos entomopatógenos que se han utilizados en las últimas décadas están: *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Beauveria bassiana*, *Metarizhium anisopliae*, *Verticillum lecanii*, *Entomophaga maimaiga*. El mecanismo de acción de los hongos

entomopatógenos comprende 10 etapas importantes: fijación de la unidad infectiva (esporas) a la cutículas del insecto, germinación de la unidad infectiva, penetración en el huésped, desarrollo del hongo en el hemocele (blastoesporas), producción de toxinas (Esto no ocurre en todos los hongos entomopatógenos), defunción del huésped, desarrollo extensivo en los órganos del huésped (hifas), penetración de hifas en la cutícula, avance hacia el exterior del insecto, producción de unidades infectivas, y dispersión de las unidades infectivas Ver Fig. 1 (Feng, 1994).

Lo que hace muy seguro el uso de hongos entomopatógenos es su unión directa con la fisiología y ecología del hospedero. El rango fisiológico del hospedero puede ser definido bajo condiciones de laboratorio las cuáles favorece al entomopatógeno. Los hongos con un rango estrecho de hospederos son muy seguros para su uso en campo (Roy & Pell, 2002).

La formulación de un mico insecticida tiene en mente dos objetivos: La fácil penetración al blanco dentro de sus hábitats, la permanencia y persistencia en el medio ambiente después de la aplicación (Feng, 1994).

La conidia va a germinar únicamente si hay alta humedad en el ambiente. La infección de algunos entomopatógenos como *B. bassiana* va a depender de la actividad enzimática para la degradación de proteínas, lípidos, y quitina.

micelio blanco, pulverulento y es de crecimiento rápido (Ver Fig. 2). Su

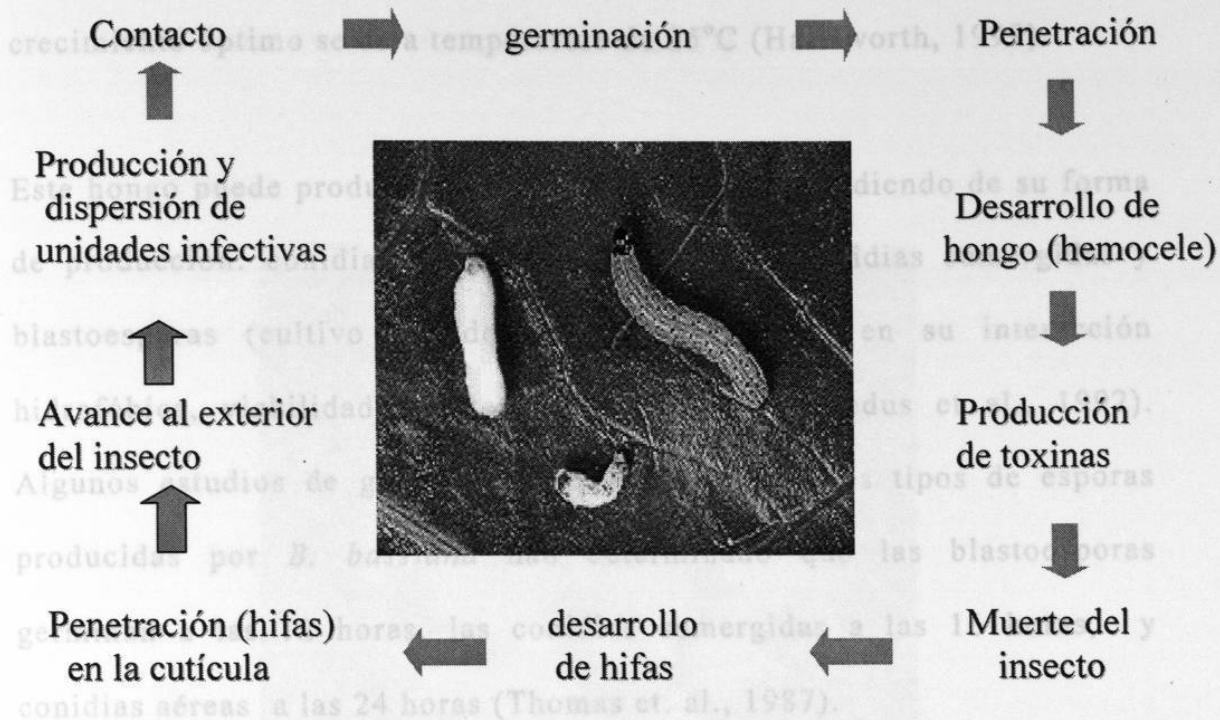


Fig. 1 Ciclo de infección de hongos entomopatógenos.

B. bassiana requiere condiciones estériles para su crecimiento, pues crece lentamente en cultivos contaminados por bacterias u hongos, y los

Beauveria bassiana den desarrollarse rápidamente sobrepasando el crecimiento de *B. bassiana* (Samsináková, 1966).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin es un hongo Deuteromycete que se encuentra dentro del grupo de los Moniléaceos, ha sido descrito como saprofito del suelo (Bidochka, 1998), endófito de plantas de maíz y en insectos en zonas templadas, tropicales (Peng, 1994). Se cree que esto es *Carpinus caroliniana* (Maccheroni, 2002) y también como patógeno de el anamorfio del ascomycete *Cordyceps* (Humber & Tigano, 2002).

insectos.

Produce algunas enzimas como chitinazas (Leger et. al., 1993) y Microscópicamente el arreglo de las esporas de *B. bassiana* se denomina proteinazas (Ortiz and Rice, 2000; Kim et. al., 1999) las cuales le simpodolosporas o esporas en zig-zag. Macroscópicamente presenta un facilitan el proceso de penetración en el hospedero posee un amplio

micelio blanco, pulvulento y es de crecimiento rápido (Ver Fig. 2). Su crecimiento óptimo se da a temperatura de 25°C (Hallsworth, 1999).

Este hongo puede producir tres tipos de esporas dependiendo de su forma de producción: conidias aéreas (cultivo sólido), conidias sumergidas y blastoesporas (cultivo líquido), las cuales varían en su interacción hidrofóbica, viabilidad, virulencia y tamaño (Hegedus et al., 1992). Algunos estudios de germinación entre los diferentes tipos de esporas producidas por *B. bassiana* han determinado que las blastoesporas germinan a las 12 horas, las conidias sumergidas a las 16 horas, y conidias aéreas a las 24 horas (Thomas et. al., 1987).

B. bassiana requiere condiciones estériles para su crecimiento, pues crece lentamente en cultivos contaminados por bacterias u hongos, y los contaminantes pueden desarrollarse rápidamente sobrepasando el crecimiento de *B. bassiana* (Samsináková, 1966).

Se ha reportado que *B. bassiana* posee la habilidad de controlar los insectos en zonas templadas, tropicales (Feng, 1994). Se cree que este es el anamorfo del ascomycete *Cordyceps* (Humber & Tigano, 2002).

Produce algunas enzimas como chitinasas (Leger et. al., 1993) y proteinazas (Urtz and Rice, 2000; Kim et. al., 1999) las cuáles le facilitan el proceso de penetración en el hospedero posee un amplio

rango de hospederos y potencial como agente de biocontrol (Hegedus et. al., 1992; Maurer et. al., 1997; Knudsen, 1999).

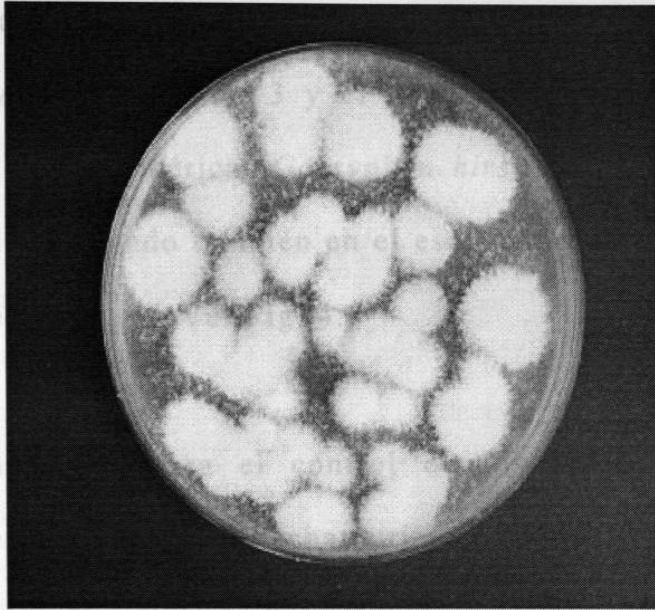


Fig.2 Colonia de *B. bassiana* en PDA.

Hospederos

Muchos hongos poseen una extrema especificidad por su hospedero, y no pueden infectar insectos que no son blancos, aunque se favorezca la infección. Estudios de susceptibilidad han sido llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio, sin embargo al realizar las pruebas en campo los valores pueden fluctuar un poco debido a la humedad y el estrés en las poblaciones de insectos. (Roy & Pell, 2002). Alrededor de 200 especies de insectos, dentro de 9 ordenes han sido relacionados como

hospederos de *B. bassiana*. Se ha podido aislar este hongo de casi todos los cadáveres de insectos (Maurer et al., 1997), y se ha reportado que parasita insectos plagas en el sector agrícola.

Posee la capacidad de controlar una de las principales plagas del algodón *Anthonomus grandis* Ver Fig. 3 y el parásito del algodón de Estados Unidos, Centro y Sur América *Gossypium hirsutum* (Wright, 1992) . *B. bassiana* ha sido reportado también en el escarabajo colorado de la papa, *Leptinotarsa decemlineata* Ver Fig. 4.

Este hongo se utiliza para el control de los insectos de la hierba *Melanoplus sanguinipes* (Khachatourians, 1993) y *Schistocerca americana* (Sieglaff, 1997); Parasitando insectos plagas del arroz *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Oryza sativa* (Urtz & Rice, 1997) y a *Plutella xylostella* la mosquita dorso de diamante (Vandenberg, 1998).

Parásita también a la mosquita blanca de jardín *Bemisia argentifolii* Ver Fig. 5 y a la mosquita blanca de hortalizas *Bemisia tabaci* Ver Fig. 6 (Landa, 1994). *B. bassiana* es un hongo de amplio espectro que no sólo parasita plagas agrícolas, recientemente se ha observado que parasita a insectos que pueden atacar las maderas de las casas, y parásitos de animales como *Alphitobius diaperinus* (Castrillo & Brooks, 1998).

HOSPEDEROS DE *B. bassiana*



Fig. 3 *Anthonomus grandis*



Fig. 4 *Leptinotarsa decemlineata*



Fig. 5 *Bemisia argentifolii*



Fig. 6 *Bemisia tabaci*

También puede servir para el control de vectores como *Rhodnius prolixus* vector del mal de Chagas en zonas tropicales (Luz & Farguez, 1999) y recientemente en el control de *Triatoma infestans* (Luz et. al., 1999). Estos hongos juegan un papel significativo en la regulación de la población de los insectos en la naturaleza y pueden potencialmente ser explotados con fines comerciales en el control biológico (Bidochka &

Kamp,2002).

La seguridad de muchos agentes de control se encuentra directamente relacionada con el rango fisiológico y ecológico de su hospedero. El rango fisiológico del hospedero puede ser determinado bajo condiciones de laboratorio y en muchos casos puede representar un escenario erróneo porque se favorece el crecimiento del hongo, muchos hongos que poseen un rango estrecho de hospederos bajo condiciones de laboratorio son seguros en condiciones de campo. El rango ecológico del hospedero representa los hospederos que actualmente son infectados en el campo y como es influenciado por el ambiente, y el comportamiento de los hospederos potenciales (Roy & Pell, 2002).

Es muy importante considerar el rango fisiológico y ecológico del hospedero para observar interacciones potenciales entre enemigos naturales. El potencial de infección directa de los blancos o presas por hongos es solo una interacción, sin embargo el papel de los blancos en la transmisión y dispersión de hongos también es muy importante para su manipulación.

***Plutella xylostella* (L).**

Plutella xylostella ha sido considerada como la plaga más importante de la cosechas de *Brassica* alrededor del mundo (Yeo et. al., 2001) . Es una plaga importante en las tierras bajas de los trópicos y sub trópicos. En

zonas templadas la mosquita dorso de diamante no pude sobrevivir en invierno.

El ciclo de vida comprende los huevecillos, 5 estadios larvales, pupa y adulto (Andrew, 1984):

- Huevecillos: Son pequeños de menos de 1mm de diámetro, de color amarillo. Suelen ser depositados en las hojas cerca de las venas y pueden estar en forma individual y en grupos.
- La larvas pueden llegar hasta 8-12 mm de largo cuando están en el último estadio larval, su color puede variar en coloración de café claro en los primeros dos estadios a verde oscuro en los últimos. Se encuentran normalmente en el envés de las hojas y entre las venas. Al sentirse en peligro se alejan rápidamente arrojando un hilo de seda.
- La pupa puede medir de 10-12 mm, posee un color verde oscuro adentro y se encuentra envuelta en una red blanca de seda. Se puede encontrar en la hojas o en la parte baja de la planta. La red de seda se encuentra adherida a la superficie de la hoja lo que la hace difícil de remover.
- El adulto o polilla: puede medir de 8-10mm, su color puede ir de gris a café. Se caracteriza por márgenes triangulares en el borde de las alas. El

adulto posee una estructura con forma de 3 diamante en la parte posterior media. Muchos adultos prefieren estar sobre las hojas. Los adultos son muy activos y visibles, vuelan alrededor de las planta en busca de un lugar donde depositar los huevos, los machos son atraídos por feromonas producidas por las hembra.

Es una plaga frecuente en repollo, brócoli, coliflor, mostaza y crucíferas. Su ciclo de vida puede completarse de 1-2 semanas, dependiendo de la temperatura. En los trópicos, su ciclo de vida es corto en las tierras bajas, es una plaga muy importante de estación seca.

Las larvas se alimentan de las hojas del repollo, preferiblemente de la parte inferior y formando agujeros en las hojas. Pueden crecer en hojas jóvenes evitando su desarrollo.

Este insecto es especialmente problemático porque poblaciones alrededor del mundo han desarrollado resistencia a muchos insecticidas comerciales, incluyendo algunos reguladores de crecimiento y toxinas en al menos dos subespecies de *Bacillus thuringiensis* producidos como insecticidas (Shelton & Wilsey, 1998).

Muchos hongos son aislados de *P. xylostella* pero solo algunos han sido estudiados, recientemente se han descrito epizootias naturales en la población de *P. xylostella* asiática. Los hongos *Zoophthora radicans* (Yeo

et. al.,2001), *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Ibrahim & Low, 1993) mostraron una eficacia potencial contra *P. xylostella*.

que pueden infectar y con la rapidez con que se desarrolla la enfermedad



Fig. 7 Larva de 3er estadio de *Plutella xylostella*.

Otro factor que influye de manera notable es la exposición a la luz solar

la cuál afecta a la sobre vivencia debido a una rápida desactivación de las

conidias, disminuyendo la efectividad de las mismas bajo condiciones de

campo. (Inglis et al., 1997 ; Roberts et. al., 2002). Se ha reportado que

Existen numerosos factores que pueden afectar la estabilidad de los

hongos entomopatógenos entre ellos tenemos los factores abióticos como

la temperatura, rayos UV, humedad y textura del suelo, agroquímicos;

factores bióticos como: plantas, microorganismos y artrópodos del suelo

La Humedad y textura del suelo son dos factores que se encuentran muy

(Keller, 1989; Noma, 2000). La temperatura es uno de los factores más

relacionados y poseen gran importancia debido a la viabilidad y

relevantes en el proceso de esporulación y sobre vivencia de hongos

entomopatógenos. Para muchos hongos la temperatura óptima oscila

La lluvia juega un papel muy importante en el movimiento vertical de los

entre los 20-25°C, con un máximo de 35°C y un mínimo de 5-10°C. Estas diferencias de temperaturas se relacionan con el número de hospederos que pueden infectar y con la rapidez con que se desarrolla la enfermedad (Keller, 1989)

Estudios realizados por Luz y colaboradores en 1999, para determinar el efecto de la temperatura sobre la esporulación de *B. bassiana* demostraron que la temperatura óptima para su esporulación es de 25°C, a temperaturas de 28-30°C la esporulación declina y a 35°C la esporulación se inhibe totalmente. La temperatura puede afectar también la estabilidad y la sobre vivencia de las conidias de hongos (Keller, 1989) y el porcentaje de germinación (Morley-Davies, 1995).

Otro factor que influye de manera notable es la exposición a la luz solar la cuál afecta a la sobre vivencia debido a una rápida desactivación de las conidias, disminuyendo la efectividad de las mismas bajo condiciones de campo. (Inglis et al., 1997 ; Roberts et. al., 2002). Se ha reportado que los rayos UV producen un mayor efecto en la viabilidad de las conidias que la temperatura. (Morley-Davies, 1995).

La Humedad y textura del suelo son dos factores que se encuentran muy relacionados y poseen gran importancia debido: a la viabilidad y actividad; y la migración o movimiento de entomopatógenos e insectos. La lluvia juega un papel muy importante en el movimiento vertical de los

hongos entomopatógenos, ya que la alta humedad favorece la viabilidad (Keller, 1989), también la excesiva precipitación puede afectar la eficacia del patógeno, debido al lavado de las UFC cuando no se da una buena adhesión de la conidia a la cutícula del substrato (Inglis et. al., 2000) .

Algunos estudios han revelado que el movimiento de las conidias de algunos hongos entre ellos *B. bassiana*, difiere y depende del tipo de suelo. Inglis y colaboradores (1998) reportaron que la eficacia de *B. bassiana* en tres clases de suelos variaba notablemente sobre el efecto en la ovo posición de *Melanoplus sanguinipes*, encontrando mayor susceptibilidad y eficacia en los suelos arcillosos, debido a que estos retienen el mayor porcentaje de humedad, lo cuál favorece la germinación de las esporas, y la preferencia de ciertos insectos a ovopositar en suelos húmedos.

En muchos bioensayos se ha reportado que los porcentajes más altos de mortalidad se dan cuando la humedad relativa oscila entre los 75-100% (Inglis et al., 1997; De la Rosa et al., 2000; Fargues & Luz, 2000) .

El uso de pesticidas químicos, herbicidas y fungicidas muchas veces puede tener un efecto inhibitor en algunos hongos entomopatógenos, en algunos estudios realizados *in vitro* se observo la capacidad de algunos

insecticidas de inhibir el crecimiento de algunos hongos de los géneros *Beauveria* y *Melolontha* (Keller, 1989).

Algunos hongos entomopatógenos se pueden inhibir al encontrarse en presencia de otros hongos y bacterias, como es el caso de *Penicillium urticae* que puede inhibir a *Beauveria bassiana*. También se puede encontrar el efecto contrario de antibiosis contra algunos hongos del suelo como *Phytophthora* sp. y *Pullularia* sp y el protozoario *Pythium*. Una gran variedad de microorganismos se pueden encontrar de manera natural en la cutícula de los insectos lo que puede afectar el proceso de germinación de las conidias. Muchos artrópodos juegan un papel muy importante en el proceso de distribución de los hongos entomopatógenos en el suelo, sin infectarse sirviendo solo como acarreadores (Keller, 1989).

Finalmente algunas plantas pueden producir algunos exudados que pueden inhibir el crecimiento de algunos hongos. López y Olivares (1997) reportaron que la especie *Quercus ilex* produce fenoles que pueden inhibir el crecimiento de los hongos nematófagos y entomopatógenos: *Verticillium suchlaporium*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Hirsutella rhossiliensis*, en más del doble de su crecimiento normal. Todos estos factores son de primordial consideración en el procesos de desestabilización de nuestros formulados.

Cultivo

Dos factores nutricionales esenciales para la actividad microbiana son: las fuentes de energía para el proceso metabólico y para síntesis de materia celular y los productos. Entre los principales elementos requeridos como factores nutricionales tenemos : C, H, O, N, P, S, K que son combinados de varias maneras para formar el material celular, Ver Tabla 1. Los medios de cultivo son diseñados para proveer el crecimiento activo del microorganismos (Zabriskie et. al., 1999).

Los nutrientes de una fermentación pueden ser clasificados como fuentes de carbono, nitrógeno, componentes inorgánicos, y vitaminas de acuerdo con su función principal en el medio de cultivo.

Se han explorado muchísimas fuentes de C para la producción de hongos entomopatógenos con el propósito de encontrar una adecuada formulación que permita la alta producción y la estabilidad del formulado. El objetivo de formular un medio es el de proveer ingredientes ricos en algunos nutrientes y deficientes en otros, que permitan un balance apropiado.

Para la producción de hongos entomopatógenos se han utilizado numerosas fuentes de C: como glucosa (Bidochka et. al., 1987; Thomas et. al., 1987; Humphreys et. al., 1989), maltosa (Rombach, 1989) sacarosa (Rombach et. al., 1988; Samsináková, 1966), almidón de maíz (Pereira y Roberts, 1991), quitina (Hegedus et. al., 1990) trehalosa, sorbitol, manitol (Bidochka et. al.,

1990). El carbono representa el 50% de la biomasa producida en las fermentaciones por tal motivo es el nutriente de mayor concentración en un medio de cultivo, sin embargo no todos los carbohidratos pueden ser utilizados como fuente de C en todos los microorganismos es decir que los requerimientos nutricionales de los microorganismos varían. Mientras algunos como *Saccharomyces cerevisiae* puede crecer solo en hexosas y disacáridos, otros como *Candida utilis* crece en algunas pentosas, hexosas y disacáridos (Zabriskie et. al., 1999).

Tabla 1 Principales elementos presentes en los microorganismos porcentaje de composición (Zabriskie et. al., 1999).		
Elemento	Función Fisiológica	Peso seco %
Hidrógeno	Constituyente de compuesto orgánicos y agua	8
Oxígeno	Constituyente de compuesto orgánicos y agua	20
Carbono	Constituyente de compuesto orgánicos	50
Nitrógeno	Constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas	14
Azufre	Constituyente de proteínas y algunas enzimas.	1
Fósforo	Constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas.	3
Magnesio	Co factor de numerosas reacciones enzimáticas (ATP)	0.5
Manganeso	Co factor de algunas enzimas	0.1
Calcio	Co factor de enzimas (proteasas)	0.5
Hierro	Constituyentes de citocromos, y co factor de algunas Enzimas	0.2
Cobalto	Constituyente de la vitamina B ₁₂	0.03
Cobre	Constituyente de algunas enzimas	0.03
Zinc	Constituyente de algunas enzimas	0.03
Molibdeno	Constituyente de algunas enzimas	0.03

Después del carbono y el oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en el material celular, y la sustancia más completa en la fermentación después de la fuente de C. Las fuentes N son utilizadas metabólicamente para la síntesis anabólica de material celular que contiene nitrógeno como amino ácidos, purinas, pirimidinas, proteínas, DNA y RNA (Zabriskie et. al., 1999).

Se pueden utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno como: KNO_3 (Thomas et. al., 1986), NaNO_3 (Bidochka et. al., 1990) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Humphreys et. al., 1989). Fuentes orgánicas como peptona (Samsináková, 1966; Barnes et. al., 1975; Hegedus et. al., 1990; Humphreys et. al., 1989; Khachatourians et. al., 1987), levadura (Samsináková, 1966; Hegedus et. al., 1990; Humphreys et. al., 1989; Rombach et. al., 1988; Bidochka, et. al., 1987), Líquido remojo de maíz (Blácheré et. al., 1973) y casamino ácidos (Jackson et. al., 1997).

La falta de una adecuada formulación de muchos microorganismos para el control de insectos es una falla muy grande de muchos insecticidas microbianos (Pereyra & Roberts, 1991). Hasta hace unos años el deseo del poder formular blastoesporas de hongos entomopatógenos resistentes a la desecación fue una meta muy atractiva para muchos investigadores por el deseo de poder formular blastoesporas que son mucho más infectivas, que puedan germinar en la aplicación y producir conidias disminuyendo el tiempo perdido para la producción de conidias. No fue hasta 1997 que

Jackson y colaboradores, lograron producir en medio líquido blastoesporas resistentes a la desecación de *Paecilomyces fumosoroseus*. Se siguen utilizando y buscando nuevas formulaciones que les permitan obtener ingrediente activo más estable ante condiciones ambientales.

Producción de mico insecticidas

El interés de los hongos para el posible control biológico de plagas se ha incrementado desde los 60's. Por lo que es de interés buscar nuevos métodos de producción a gran escala, que no sean costosos debido a las grandes cantidades necesarias para la aplicación en campo, y la dificultad de mantener el proceso estéril.

Las técnicas más comunes para la producción en masa de hongos entomopatógenos son: el cultivo de superficie y el cultivo en dos fases, en el cuál el hongo primero crece en condiciones sumergidas y luego esporula en un medio sólido o semisólido. Estos métodos de cultivo pueden producir conidias aéreas, deseables por su virulencia y resistencia ante condiciones ambientales adversas (Hegedus et. al., 1990). El cultivo de superficie sin embargo es muy intenso, laborioso y costoso. En cultivos semi-sólidos es muy difícil el control de factores relevantes como el pH.

El método favorito para la producción a gran escala es el cultivo líquido en una sola fase, en el cuál se pueden producir esporas en un corto tiempo. La

ventaja de esta técnica es el control de la esterilidad y que los procesos de escalamiento son relativamente fáciles (Thomas et. al., 1987).

Sin embargo en cultivo sumergido muchos hongos imperfectos no producen conidia, produciendo micelio y blastoesporas en abundancia. Otro factor muy importante en la producción de mico insectidas es la formulación, mientras muchos hongos entomopatógenos han sido formulados a base de conidias. Algunos estudios han logrado obtener formulaciones de micelio seco, por ser rápido, fácil, y porque este puede permanecer viable (Peyra & Roberts, 1989). Los formulados de micelio seco son empleados en campo con resultados exitosos (Rombach et al., 1988).

Las Formulaciones en aceite han recibido considerable atención en años reciente debido a que se incrementa la eficacia en los volúmenes bajos de aplicación, y también en condiciones bajas de humedad (Grodén et. al., 2002).

Muchas compañías que producen hongos entomopatógenos en sustrato sólido utilizan arroz como sustrato. Muchas formulaciones del mercado son polvos humectables, las cuales se logran al mezclar el hongo y algún adyuvante. Existen aproximadamente 6 compañías de producción de hongos entomopatógenos en Brazil en la producción de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, y *S. insectorum* (Leite et. al., 2002).

Se han desarrollado un sin número de formas de cultivo para el desarrollo de hongos, específicamente *B. bassiana* ha sido desarrollado en cultivo sólido (Bidochka & Kamp, 2002) y cultivo líquido o sumergido (Samsináková, 1966, Aoki & Yanase, 1970; Barnes et. al., 1975, Thomas et. al., 1987; Bidochka et. al., 1987; Rombach et. al., 1988; Humpreys et. al., 1990; Bidochka et. al., 1990; Lane & Rice, 1991).

La fermentación líquida de *B. bassiana*, bajo algunas condiciones nutricionales y dependiendo de la cepa, puede producir conidias sumergidas (Thomas et. al., 1987), y en algunos estudios se reportada la producción de blastoesporas (Samsináková, 1966, Bidochka et. al., 1987). En cultivo sólido se ha observado la formación de conidias áreas las cuales son más resistentes a condiciones ambientales y menos virulentas.

Anteriormente se ha desarrollado a *B. bassiana* en medios líquidos con el propósito de realizar estudios morfológicos, solo Goral (1971) en la ex Unión Soviética desarrollo conidias sumergidas de este hongo en cultivo líquido con fines comerciales, además de su eficaz producción en corto tiempo son más resistentes ante condiciones ambientales.

B. bassiana se ha producido comercialmente por países como la ex Unión Soviética, Estados Unidos, México, Checoslovaquia, Colombia, Francia Suiza y Venezuela (Butt et. al., 2001) Ver Tabla 2. A raíz de la actividad

de *B. bassiana* contra la broca del café en Colombia, se crearon numerosas empresas en la producción masiva de este hongo para el control de dicha plaga, Ver Tabla 3.

Tabla 2 Productos comerciales de <i>B. bassiana</i> a nivel mundial (Butt et. al., 2001)		
Producto	País	Mano de obra
Boverin	Unión Soviética	Former
AGO BIOCONTROL BASSINA 50	Colombia	Agro Biocontrol
Mycotrol WP	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
Mycotrol GH	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
Mycotrol ES	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
BotaniGard ES	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation Rincon-Vitava Insectaries Inc.
BotaniGard 22WP	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
Corn Gard ES	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
Corn Gard G	Estados Unidos, México	Mycotech Corporation
Naturalis TNO	Estados Unidos	Troy Biosciences
Ostrinil	Francia	Natural Plant Protection
Beauveria Sheweizer	Suiza	Eric Schweizer Seeds Ltd.
Proecol	Venezuela	Probiagro
Boverol	Checoslovaquia	
Boverosil	Checoslovaquia	

Tabla 3 Productos comerciales de *B. bassiana* elaborados en Colombia (Flores, 2002)

Producto	Esporas/g	Manufactura
Cebiopest	1.2×10^{10}	Fundación Centro de Biotecnología
Matabroca	7.9×10^8	Fundación Centro de Biotecnología
Brocaril	6.1×10^9	Laverlam
Brocaril	4.3×10^{10}	Laverlam
Bassianil	1.0×10^9	Biocontrol
Conidia	8.2×10^9	Agrevo
Conidia	5.2×10^{10}	Agrevo
Cepa Cenicafé	3.0×10^9	Cenicafé
Cenicafé pilot plant	5.0×10^{10} a 1.0×10^{11}	Cenicafé
Carrie + kerosene	2.0×10^{11}	Cenicafé
Matabroca	2.5×10^{10}	Vecol
Micosplag	1.0×10^8	Orius
Agobiocontrol	1.4×10^8	Onatec
Biogarden Bassiana AC	2×10^{10}	Biogarden Control Biológico
Sporen 21	2×10^9	Bioenlace 21 S.A.
Biogarden <i>B. bassiana</i>	2×10^{10}	Biogarden

MATERIALES Y MÉTODOS

Stock

Se activó la cepa GHA de *Beauveria bassiana*, a partir de un formulado realizándose diluciones seriadas hasta 10^8 e inoculándose esta última dilución por estría en 4 direcciones en placas petri de PDA para obtener colonias aisladas. Con un aza de punta estéril al calor se tomaron varias porciones de una colonia, se estrió en varias placas petri, y se incubó a temperatura ambiente por dos semanas. Posteriormente con un escarpelo estéril se procedió a cortar las placas previamente inoculadas, en cuadritos de 1mm de diámetro. Se colocaron 5 cuadritos en crío viales con 1ml de glicerol al 10%. Se realizo un stock de 100 crío viales y se coloco en un congelador a -80°C , para su posterior uso.

Inóculo

Se tomo un crío vial para cada ensayo, se coloco a temperatura ambiente y con ayuda de un aza microbiológica se homogenizo la cepa. Con ayuda de una micro pipeta se tomo $100\ \mu\text{l}$, y se inóculo en el centro de placas de PDA para su distribución con un esparcidor de vidrio estéril. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente por dos semanas. Las conidias fueron resuspendidas adicionándose 10 ml de agua destilada estéril en las placas, desprendiendo las conidias del

micelio con un aza microbiológica. Se tomo 1ml de solución de conidias para realizar diluciones en serie hasta 10^4 ml.

El conteo de esporas se realizo en una cámara de Neubauer se contaron 16 cuadrantes, el total obtenido se dividió entre cuatro y se multiplico por 10^4 que es el factor de dilución de la cámara, se realizó con ayuda de un microscopio de contraste de fase a 40x, Se utilizó la formula $V1C1/V2C2$ para ajustar la concentración a 1×10^7 esporas/ml en agua destilada estéril, esta concentración se utilizo como inóculo para la fase de precultivo.

Medios de cultivos

Se utilizaron cuatro medios de cultivos con diferentes concentraciones de C y N:

1. M1 descrito por Jackson et al (1997).
2. T1 (glucosa , casamino ácidos).
3. T2 (glucosa , líquido remojo de maíz).
4. T3 (glucosa, peptona).

Los medios T tienen como medio basal el descrito por Thomas et. al. (1987) modificado, en cuanto a la concentración de los metales Zn (1.4g/l), Co (3.3g/l), y Mn (1.56g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/L, sin $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Los medios de cultivo se realizarán en réplicas de 4,

en dos fases: precultivo y cultivo, en matraces de 250ml. Estos fueron esterilizados previamente a 121°C por 15 minutos.

Precultivo

La fase de precultivo se inoculó con 10 ml de 1×10^7 esporas/ml, en 90 ml de cada medio de cultivo, en estos medios las fuentes de Carbono y Nitrógeno fueron las siguientes: M1 (glucosa, casamino ácidos), T1 (glucosa, casamino ácidos), T2 (glucosa, líquido remojo de maíz), y T3 (glucosa, peptona). Se colocaron en un agitador a 25°C, 300RPM por 3 días. Se realizó el conteo de esporas al 3er día, en una cámara de Neubauer, y un microscopio de contraste de fase a 40x.

Al 3er día se ajustó la concentración de esporas de cada medio de manera individual en 50 ml de agua destilada estéril a 1×10^8 esporas/ml, para la fase de cultivo.

Cultivo

Se inocularon 10 ml de la concentración de 1×10^8 esporas/ml en medios nuevos: M1 (glucosa, casamino ácidos), T1 (glucosa, casamino ácidos), T2 (sacarosa, líquido remojo de maíz), y T3 (glucosa, peptona). Los matraces fueron agitados a 25°C, 300 RPM por 3 días. Se realizó el conteo de esporas al tercer día, los valores fueron promediado y considerados como la producción de cada medio.

Separación y soporte

Las cuatro réplicas de cada matraz fueron filtradas a través de una tela de manta doble al vacío para separar las esporas del micelio. Se realizó un conteo de esporas de cada filtrado. Se colocó 1 ml del filtrado de cada medio con 1 gota de glutaraldehído al 0.1% con la finalidad de detener la germinación de las esporas para fotografiar la muestra.

Se procedió a incluir el filtrado de cada medio en dos soportes de manera individual. Los soportes fueron: tierra de diatomeas, y caolín ajustando la concentración a 2×10^{10} esporas/g con la fórmula $\text{esporas/mL} \times \text{mL} / 2.2 \times 10^{10} \text{ g}$, adicionándose el valor obtenido en soporte. Se adicionaron los respectivos soportes por muestra hasta obtener una mezcla homogénea, Se realizó la filtración de la mezcla en un embudo de porcelana de bushner 11cm de diámetro al cuál se le pondrá papel Whatman No. 1 de 11 cm de diámetro. Se utilizara una bomba al vacío conectada a un kitasato Pyrex de 1000 ml. Se vertió sobre el filtro la solución del hasta hacer una capa delgada, esto es con el propósito de proteger y retener el mayor número de esporas.

Secado

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas, colocándose en bolsas plásticas zip-loc almacenadas a 4°C y 26°C para los ensayos posteriores de almacenamiento. Se realizaron

pruebas de viabilidad en placas de PDA de cada formulado después del secado, colocando 0.01 g del formulado en 10 ml de agua destilada estéril. Se hicieron diluciones en serie hasta 10^8 y se inoculó 100 μ l de las cuatro últimas diluciones

Se determinó el porcentaje de humedad de la muestra colocando una pequeña muestra de los formulados, a temperatura de 80°C por 24 horas, se realizaron mediciones de la muestra antes y después del secado hasta obtener un peso constante. Se determinó el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad. : } \frac{\text{Peso húmedo muestra}}{\text{Peso constante muestra}} \times 100$$

Viabilidad

Para los ensayos de germinación se colocó 1.5 ml de cada filtrado en 50 ml de caldo Sabouraud en matraces bafleados de 250ml, se agitó a 300 RPM a 25°C, esto se realizó con tres réplicas se realizaron mediciones a las 10, 12 y 14 horas. Se realizaron pruebas de germinación con los formulados antes y después del secado, se colocó 200 mg de los formulados en 50 ml de caldo Sabouraud bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Los ensayos de germinación se realizan para determinar la viabilidad de las esporas obtenidas.

Almacenamiento

Como se menciono anteriormente los formulados fueron almacenados a 4°C y 26°C, se tomo 0.01 g de cada formulado en 10ml de agua destilada estéril obteniendo una dilución de 10^{-3} , a partir de esta se realizaron diluciones hasta 10^{-8} . Para la prueba de viabilidad en placas de PDA se inocularon 100 μ l en cada placa por triplicado y esparciéndose con una esparcidor de vidrio estéril. Estas pruebas fueron realizadas mensualmente, las diluciones fueron disminuyendo a medida que paso el tiempo. Se procedió ha realizar la dilución donde se observaron UFC en la placa de 30-300 colonias del mes anterior y dos diluciones anteriores a esta.

Bioensayos contra *Plutella xylostella*

Los bioensayos fueron realizados con larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella*. Las larvas fueron alimentadas con hojas de brócoli y mantenidas en una cámara bioclimática baja condiciones controladas de luz hasta tener el estadio adecuado. Se utilizaron 10 larvas por tratamiento, las cuales fueron sumergidas en una solución 1×10^8 esporas/ml de cada medio del cultivo después del filtrado.

En el caso de las formulaciones se realizo una dilución y conteo en placas PDA, esto con el propósito de saber cuantas esporas de las inoculadas eran viables en el formulado.

La inmersión de larvas fue por 30 segundos, se procedió a tomar las larvas en un pincel y a colocarla sobre una hoja de brócoli pequeña encima de placas de 5.5 cm de diámetro con agar agua al 1.5%, esto con el propósito de mantener la humedad de la hoja. Se realizó el conteo de larvas muertas diariamente colocando las mismas sobre Papel Whatman No. 1 húmedo en una placa de petri de 9.5 cm, con la finalidad de provocar la esporulación del hongo.

Las larvas micosadas con *B. bassiana* presentaron inicialmente un color amarillo-naranja o rosa, durante la esporulación la larva presente el color blanco característico del micelio.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis de los datos se realizará una ANOVA simple, se utilizará un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS

Producción

Los datos de producción del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en los diferentes medios fueron para: M1 2.2×10^9 esporas/ml, T1 6.0×10^8 esporas/ml, T2 7.2×10^9 esporas/ml, T3 1.6×10^9 esporas/ml. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas ($\alpha: 0.05$) de T2 con respecto a M1, T1 y T3 entre estos tres últimos no se encontraron diferencias significativas (Ver Fig. 8).

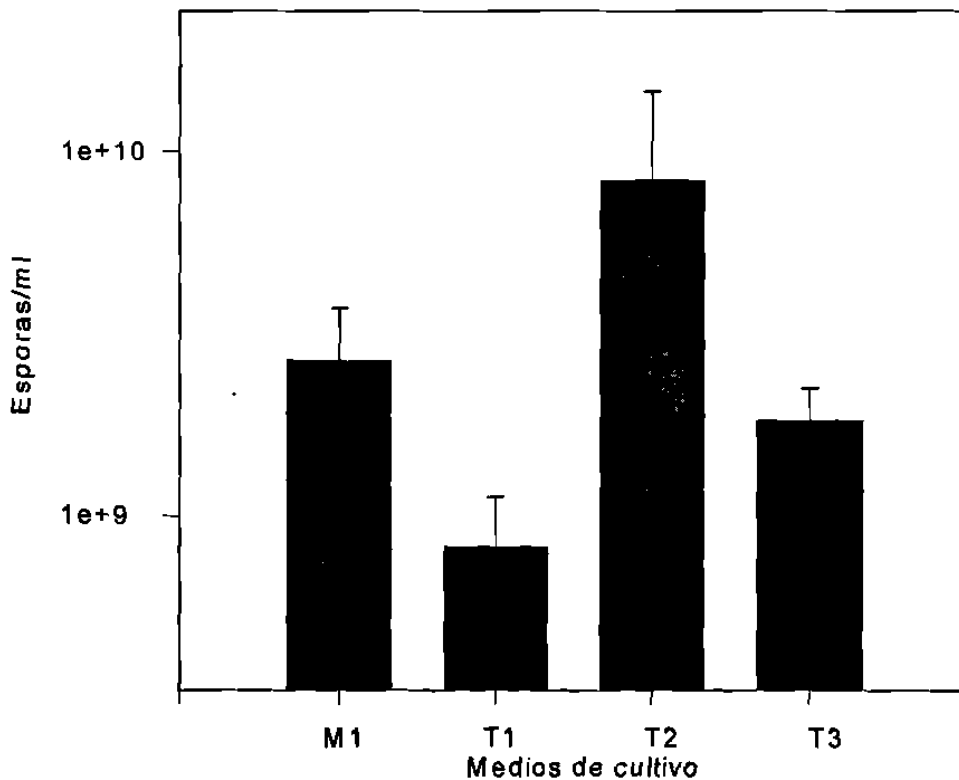


Fig. 8 Producción de ingrediente activo de *Beauveria bassiana* GHA, en medios líquidos con diferentes fuentes de C y N.

En cuanto al ingrediente activo de *B. bassiana* desarrollado de los medios se observaron blastoesporas en los medios M1, T1 y T3 (Ver Fig. 9,10,12) y conidias sumergidas en el medio T2 (Ver Fig. 11).

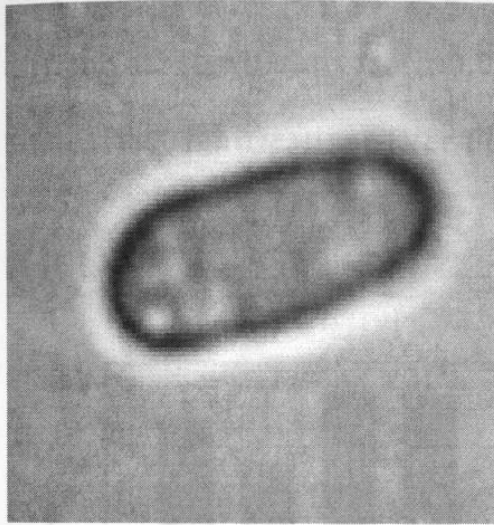


Fig. 9 Ingrediente activo del medio M1

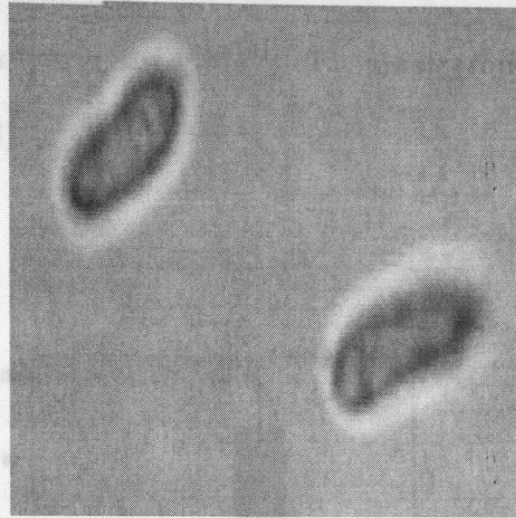


Fig. 10 Ingrediente activo del medio T1

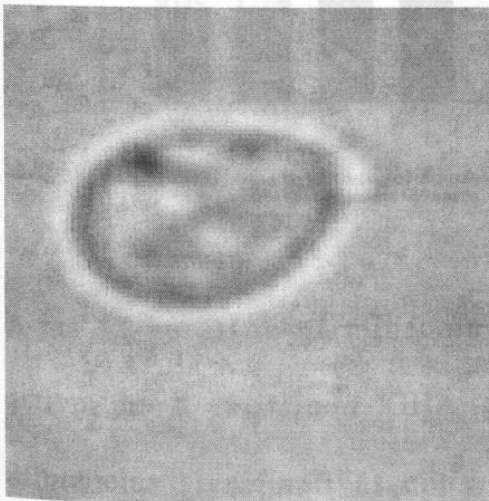


Fig. 11 Ingrediente activo del medio T2

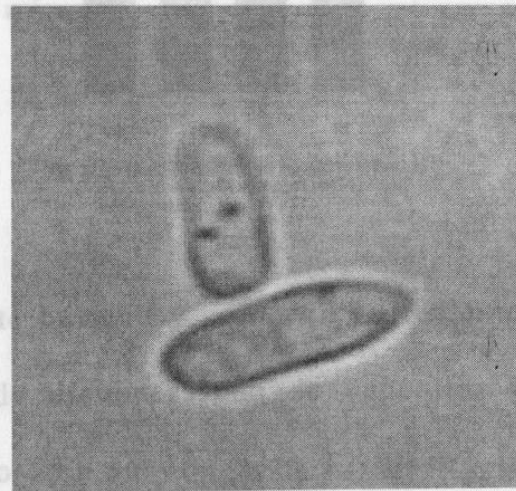


Fig. 12 Ingrediente activo del medio T3

comparar la germinación en soporte húmedo y seco entre los medios (Ver Fig. 15 y 16).

Germinación

Al realizarse la pruebas de germinación a las 10 h, del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo y seco en tierra de diatomeas, T2 y T3 presentaron la más alta germinación. En soporte húmedo T1 mostró diferencias significativas ($\alpha:0.05$) y en soporte seco M1 y T1 mostraron diferencias significativas (Ver Fig. 13 y 14).

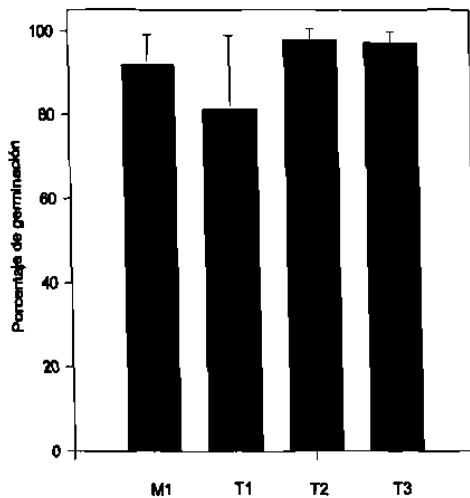


Fig. 13 Germinación a las 10 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.

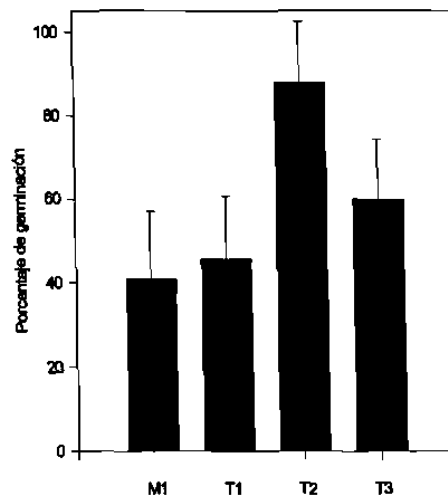


Fig. 14 Germinación a las 10 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.

A las 12 horas de germinación en soporte húmedo y seco con ingrediente activo de *B. bassiana* GHA e tierra de diatomeas, no se encontraron diferencias significativas entre los medios. En soporte seco T2 mostró la germinación más alta, solo M1 mostró diferencias significativas ($\alpha:0.05$) al comparar la germinación en soporte húmedo y seco entre los medios (Ver Fig. 15 y 16).

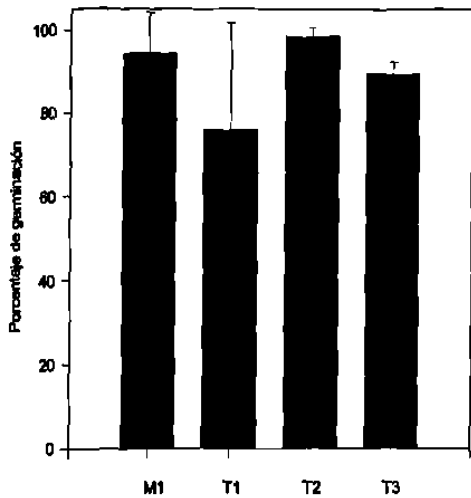


Fig. 15 Germinación a las 12 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.

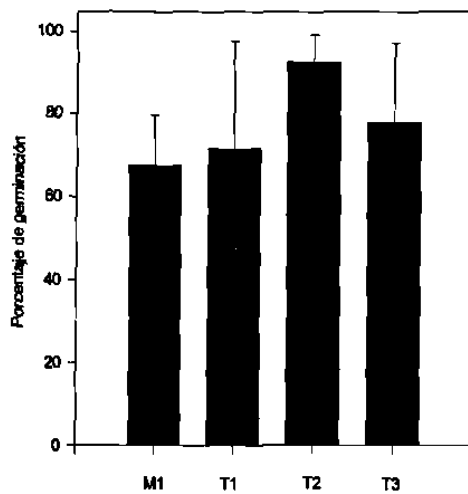


Fig. 16 Germinación a las 12 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.

A las 14 horas de germinación en soporte húmedo y seco de tierra de diatomeas no se observaron diferencias significativas ($\alpha:0.05$), al comparar entre los medios el soporte húmedo y seco no se observaron diferencias. (Ver Fig. 17 y 18).

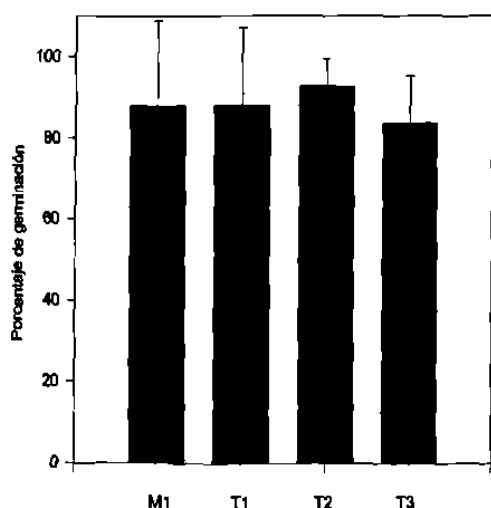


Fig. 17 Germinación a las 14 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de tierra de diatomeas.

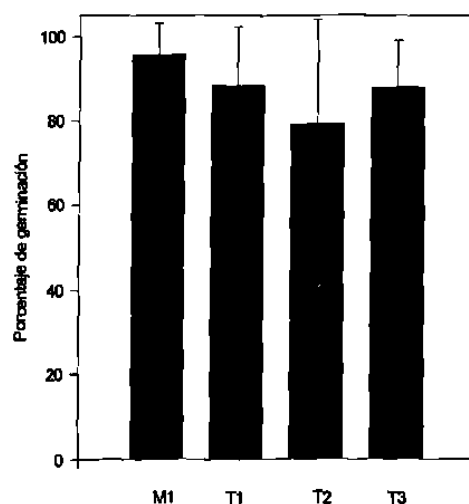


Fig. 18 Germinación a las 14 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de tierra de diatomeas.

En cuanto a las pruebas de germinación en caolín a las 10 h en soporte húmedo solo T3 mostró diferencias significativas ($\alpha: 0.05$), en soporte seco no hubo diferencias entre los medios. Al comparar en los medios soporte húmedo con soporte seco T1 mostró diferencias (Ver Fig. 19 y 20).

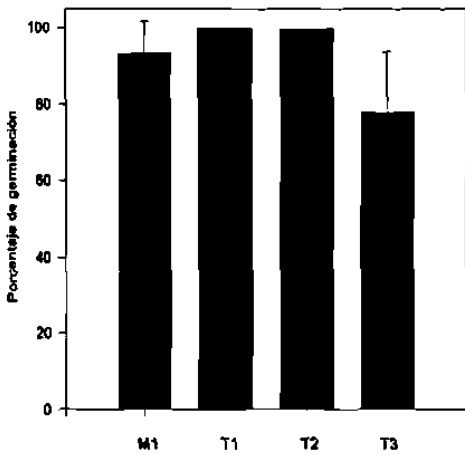


Fig. 19 Germinación a las 10 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de caolín

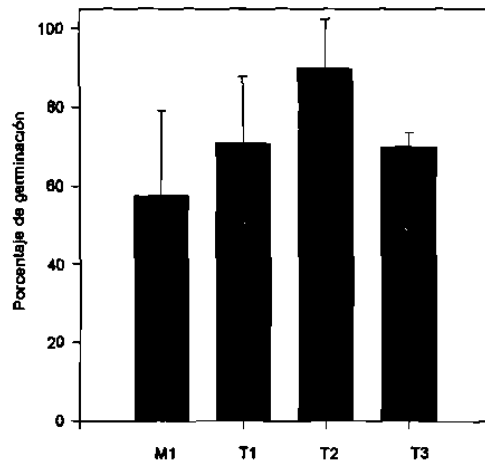


Fig. 20 Germinación a las 10 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de caolín.

A las 12 horas de germinación del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de caolín, T3 mostró diferencias significativas ($\alpha: 0.05$) con los demás medios. En soporte seco no se observaron diferencias. Al comparar soporte húmedo y seco entre los medios no se observaron diferencias (Ver Fig. 21 y 22).

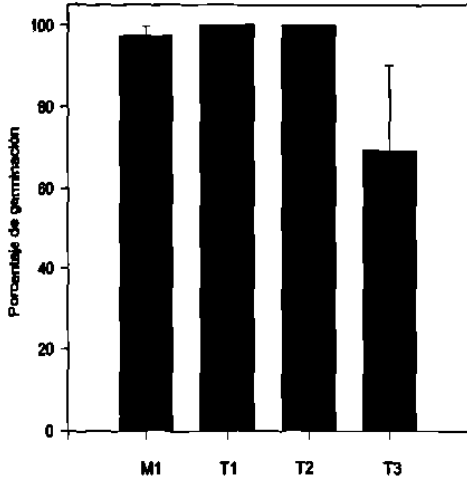


Fig. 21 Germinación a las 12 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de caolín.

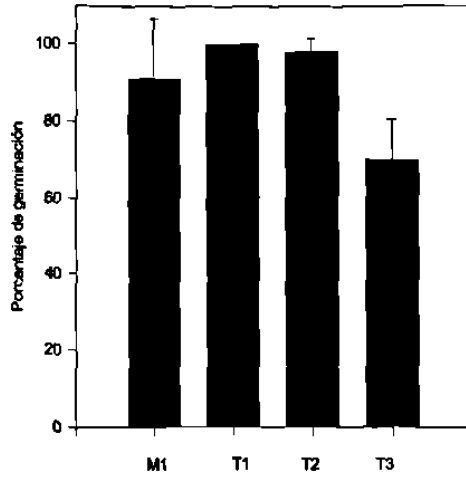


Fig. 22 Germinación a las 12 horas del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de caolín.

A las 14 horas de germinación en soporte húmedo y seco de caolín no se observaron diferencias significativas ($\alpha:0.05$), al comparar entre los medios el soporte húmedo y seco no se observaron diferencias. (Ver Fig. 23 y 24).

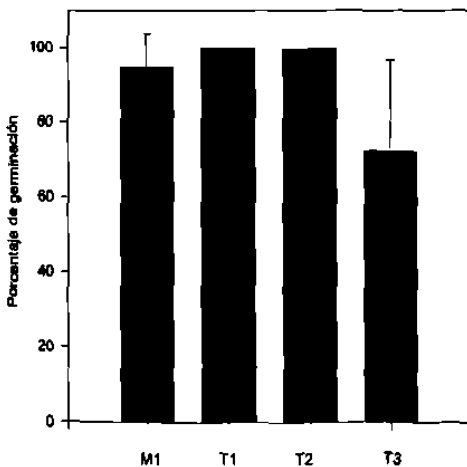


Fig. 23 Germinación a las 14 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte húmedo de caolín.

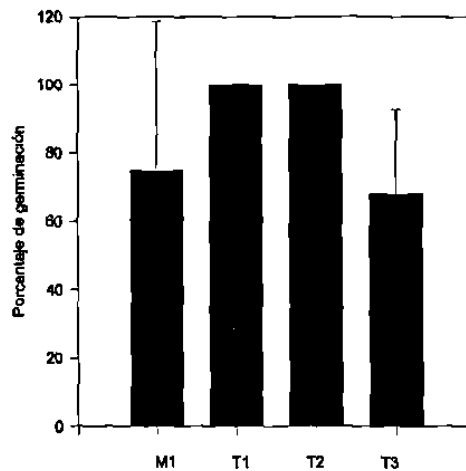


Fig. 24 Germinación a las 14 h del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en soporte seco de caolín.

Al realizar las pruebas de germinación se observó la formación de una conidia sumergida a partir de una blastoespora mejor conocido como microciclo, este fenómeno puede variar de una cepa a otra, todavía no se conoce el porque del mismo.

Medios de cultivo	Tierra de diatomeas	Caolín
M1	75 %	79 %
T1	84 %	99 %

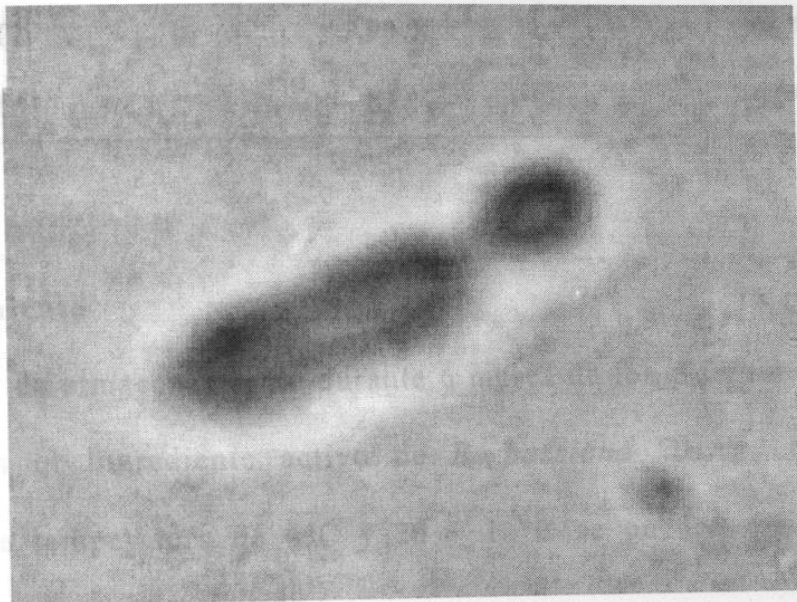


Fig. 25 Microciclo observado en los medios durante la germinación.

T2 presentó en tierra de diatomeas mayor cantidad de UPE a ambas temperaturas de almacenaje, se logró observar estabilidad a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante los primeros 3 meses, lo que nos sugiere que este medio a diferencia de los otros es más estable ante dichas condiciones de almacenamiento. Las diferencias significativas ($\alpha:0.05$) se pueden observar con los datos de germinación se sacaron los valores de tolerancia a la desecación de las esporas después del secado, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha:0.05$) entre los medios y ni entre los soportes, el medio T2 presentó mejor tolerancia a la desecación en los dos soportes (Ver Tabla No. 4).

Tabla No. 4 Porcentaje de Tolerancia a la desecación del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en los medios de cultivo con diferentes fuentes de C y N.

Medios de cultivo	Tierra de diatomeas	Caolín
M1	75 %	79 %
T1	84 %	90 %
T2	90 %	96 %
T3	83 %	94 %

Almacenamiento

Los valores de almacenamiento durante 6 meses de los diferentes medios de cultivo con el ingrediente activo de *B. bassiana* GHA, en tierra de diatomeas a temperatura de 4°C y 26 ± 1 °C se pueden observar en las Tablas No. 5 y No. 6.

T2 presento en tierra de diatomeas mayor cantidad de UFC a ambas temperaturas de almacenaje, se logro observar estabilidad a temperatura de 26 ± 1 °C durante los primeros 3 meses, lo que nos sugiere que este medio a diferencia de los otros es más estable ante dichas condiciones de almacenamiento. Las diferencias significativas ($\alpha:0.05$) se pueden observar en las Tablas mediante letras (A, B, C).

Tabla No. 5 Almacenamiento a 4 °C durante 6 meses del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en tierra de diatomeas desarrollado en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.

	Mes					
	1er	2do	3er	4to	5to	6to
M1	5.1 x 10 ^{7A}	5.0 x 10 ^{7A}	4.5 x 10 ^{7A}	5.0 x 10 ^{7A}	3.5 x 10 ^{7A}	3.5 x 10 ^{7A}
T2	2.3 x 10 ^{8B}	1.4 x 10 ^{8B}	9.9 x 10 ^{7A}	7.0 x 10 ^{7A}	7.9 x 10 ^{7B}	8.5 x 10 ^{7B}
T3	1.0 x 10 ^{7C}	1.0 x 10 ^{7A}	1.1 x 10 ^{7A}	8.5 x 10 ^{5A}	2.9 x 10 ^{5A}	3.0 x 10 ^{5C}

Nota: las unidades de almacenamiento se dan en esporas/g.

Tabla No. 6 Almacenamiento a 26 ± 1 °C durante 6 meses del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en tierra de diatomeas desarrollado en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.

	Mes				
	1er	2do	3er	4to	5to
M1	1.4 x 10 ^{7A}	1.9 x 10 ^{7A}	5.1 x 10 ^{5A}	5.8 x 10 ^{4A}	
T2	2.7 x 10 ^{6B}	2.2 x 10 ^{6A}	2.8 x 10 ^{7B}	7.1 x 10 ^{4A}	2.5 x 10 ^{4A}
T3	3.5 x 10 ^{4B}	3.5 x 10 ^{4A}	4.0 x 10 ^{3A}		

Nota: las unidades de almacenamiento se dan en esporas/g.

Los valores de almacenamiento durante 6 meses de los diferentes medios de cultivo con el ingrediente activo de *B. bassiana* GHA, caolín a temperatura de 4°C y 26 ± 1 °C se pueden observar en las Tablas No. 7 y No. 8. Se observo que a temperatura de 4°C, T2 y M1 se comportan casi igual, no

muestran diferencias significativas ($\alpha:0.05$) entre ellos, T3 mostró diferencias con M1. Las diferencias significativas se pueden observar en las Tablas mediante letras (A, B, C). M1 fue el mejor medio a ambas temperaturas de almacenamiento en caolín.

Tabla No. 7 Almacenamiento a 4 °C durante 6 meses del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en caolín desarrollado en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.

	Mes					
	1er mes	2do mes	3er mes	4to mes	5to mes	6to mes
M1	1.8 x 10 ^{8A}	8.2 x 10 ^{7A}	3.3 x 10 ^{7A}	6.7 x 10 ^{7A}	2.1 x 10 ^{7A}	5.7 x 10 ^{7A}
T2	3.1 x 10 ^{8B}	1.5 x 10 ^{8A}	4.5 x 10 ^{7A}	6.1 x 10 ^{7A}	6.0 x 10 ^{7B}	2.6x10 ^{7AB}
T3	3.5 x 10 ^{7A}	1.9 x 10 ^{7B}	1.9 x 10 ^{7B}	5.3 x 10 ^{6B}	1.9 x 10 ^{6A}	9.6 x 10 ^{6B}

Nota: las unidades de almacenamiento se dan en esporas/g.

Tabla No. 8 Almacenamiento a 26 ± 1 °C durante 6 meses del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en caolín desarrollado en medios de cultivo líquido con diferentes fuentes de C y N.

	Mes			
	1er mes	2do mes	3er mes	4to mes
M1	3.4 x 10 ^{7A}	3.6 x 10 ^{7A}	2.6 x 10 ^{6A}	5.6 x 10 ^{5A}
T2	1.5 x 10 ^{6B}	2.6 x 10 ^{5B}	2.1 x 10 ^{5B}	9.6 x 10 ^{3B}
T3	5.1 x 10 ^{5B}	1.8 x 10 ^{5B}	2.3 x 10 ^{5B}	

Nota: las unidades de almacenamiento se dan en esporas/g.

La mejor temperatura de almacenaje para los formulados fue 4°C, se pudo observar que los factores que influyen en la estabilidad del formulado son: formulación del medio de cultivo, temperatura de almacenaje, soporte.

Bioensayos contra *Plutella xylostella*

Los resultados de los bioensayos del ingrediente activo de *B. bassiana* GHA en los controles negativos no se reporto mortalidad, ni micosis (Ver Fig. 26), en los diferentes tratamientos filtrados y formulados almacenados a 4°C en tierra de diatomeas y en caolín contra larvas de 3er estadio de *P. xylostella* se observo inicialmente una coloración de naranja a rosada y la esporulación progresiva del hongo (Ver Fig. 27-29) .

BIOENSAYOS

Tabla No. 9 Porcentaje acumulado de larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella* tratadas con formulaciones de *B. bassiana* GHA en tierra de diatomeas

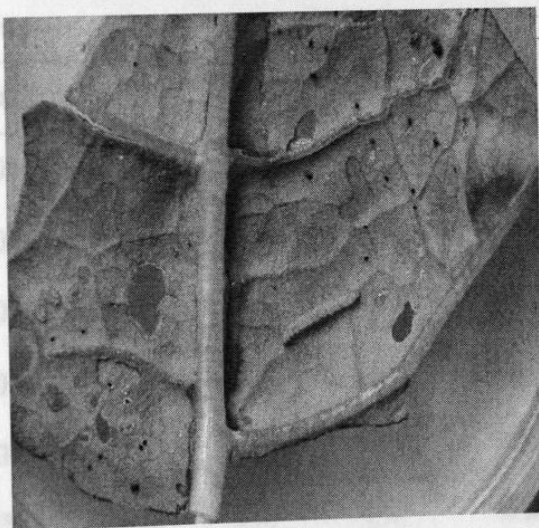
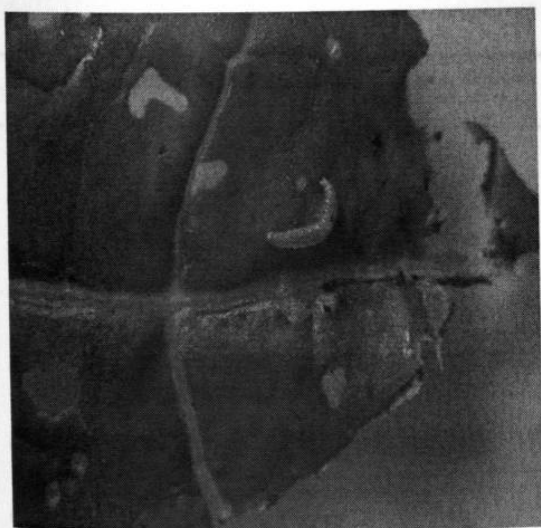


Fig.26 Larva de 3er estadio de *P. xylostella*, control -.

Fig.27 Larva de 3er estadio de *P. xylostella*, control +.

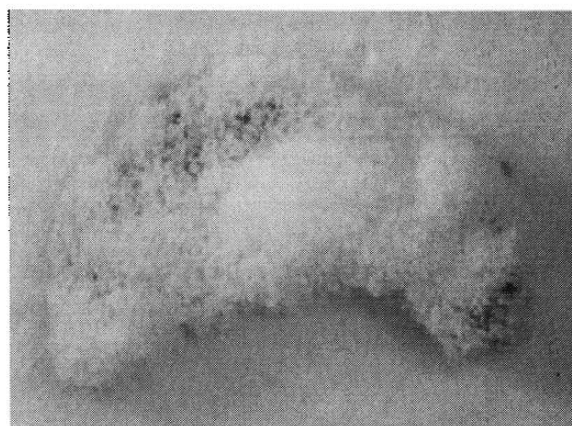
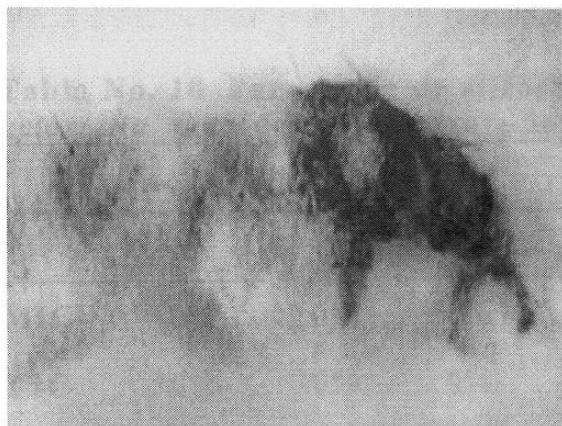


Fig. 28 Micosis inicial en larvas de 3er estadio de *P. xylostella*.

Fig. 29 Micosis total en larvas de 3er estadio *P. xylostella*

Los porcentaje de micosis acumulada se pueden observar en la Tablas No. 9-11. El medio T2 en ambos soportes y en el filtrado presento mayor micosis, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (α : 0.05).

Tabla No. 9 Porcentaje acumulativo de micosis de larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella* tratadas con formulaciones de *B. bassiana* GHA en tierra de diatomeas.

	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1TD	0%	0%	0%	20%	50%	70%	80%	80%
T1TD	0%	0%	0%	20%	50%	80%	80%	80%
T2TD	0%	0%	0%	30%	70%	90%	90%	90%
T3TD	0%	0%	0%	10%	40%	60%	80%	80%
C +	0%	0%	10%	70%	80%	90%	90%	90%
C -	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
C -	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

NOTA: Para el bionsayo se utilizaron 10 larvas para cada ensayo con al menos dos repeticiones; solamente se presentan las larvas muertas con crecimiento micelial externo, control + Conidias aéreas, control - agua destilada estéril con Tween 80, y agua destilada con Tween 80 y tierra de diatomeas

Tabla No. 10 Porcentaje de micosis en larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella* tratadas con formulaciones de *B. bassiana* GHA en caolín

	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
MIC	0%	0%	0%	0%	10%	30%	40%	70%
T1C	0%	0%	0%	20%	70%	90%	90%	90%
T2C	0%	0%	0%	20%	30%	70%	90%	100%
T3C	0%	0%	0%	10%	40%	40%	40%	40%
C +	0%	0%	10%	70%	80%	90%	90%	90%
C -	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

NOTA: Para el bionsayo se utilizaron 10 larvas para cada ensayo con una repetición; solamente se presentan las larvas muertas con crecimiento micelial externo, , control + Conidias aéreas, control - agua destilada estéril con Tween .

Tabla No. 11 Porcentaje de micosis en larvas de 3er estadio de *Plutella xylostella* tratadas con filtrados de *B. bassiana* GHA de los diferentes medios de cultivo

	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1F	0%	0%	90%	100%	100%	100%	100%	100%
T1F	0%	0%	90%	100%	100%	100%	100%	100%
T2F	0%	70%	90%	100%	100%	100%	100%	100%
C +	0%	0%	10%	70%	80%	90%	90%	90%
C -	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

NOTA: Para el bionsayo se utilizaron 10 larvas para cada ensayo con una repetición; solamente se presentan las larvas muertas con crecimiento micelial externo, , control + Conidias aéreas, control - agua destilada estéril con Tween .

DISCUSIÓN

Producción

En este estudio se encontró variabilidad en la producción y dos clases de esporas: blastoesporas y conidias sumergidas, estas diferencias están relacionadas con la fuente de Carbono (Thomas et. al., 1987). Un estudio muy relevante para nosotros es el realizado por Thomas y colaboradores (1987) en el que menciona que la producción de *B. bassiana* en cultivo líquido, con una proporción de C: N de 5:1, una agitación de 150 RPM a 27°C, e inóculo de 5.0×10^4 a 1.0×10^5 esporas/ml, obtuvo una producción final 5×10^8 esporas/ml

Sin embargo en la producción de otros hongos como: *Paecilomyces fumosoroseus* en proporción de C: N de 10:1, agitación de 300 RPM a 28 °C por 3 días, e inóculo de 1×10^6 la producción final fue 8.8×10^8 esporas/ml (Jackson et. al., 1997). En nuestro estudio los valores más altos fueron para el medio T2 con una proporción C: N de 2:1, con agitación de 300 RMP a 25°C por 3 y 6 días, e inóculo en precultivo de 1×10^7 esporas/ml y en cultivo de 1×10^8 esporas/ml, obtuvimos una producción en precultivo de 1.7×10^9 esporas/ml y en cultivo 7.18×10^9 esporas/ml. Los valores obtenidos son más altos que los mencionados anteriormente, también debemos considerar factores como la temperatura, la proporción C: N, y la aeración. En nuestro trabajo la temperatura y la

proporción C:N es menor que la utilizada en los estudios anteriores. Lo que nos sugiere que la proporción C:N juega un papel fundamental en la producción (Feng, 1994).

Se ha reportado que ha excesiva aireación de 300 RPM o revoluciones mayores se produce mucho micelio y poca esporulación, encontramos que en el medio T2 la producción de micelio es mínima en comparación a los otros medios de ahí la importancia de utilizar un medio que no sea demasiado rico en C pues se obtiene mucho crecimiento micelial, sin embargo al darse el agotamiento de nutrientes como el N se observa mayor esporulación (Thomas et. al., 1987).

En cuanto a la clase de esporas encontradas en los medios tenemos que los medios M1, T1 y T3 presentan mayor número de blastoesporas, y en T2 se observaron mayor cantidad de conidias sumergidas. El medio M1 antes desarrollado para la producción de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus* por Jackson (1997) nos dio resultados consistentes con *B. bassiana*.

El medio T1 que posee las mismas fuentes de C y N que M1, en proporciones menores también se obtuvieron blastoesporas. Se ha determinado que algunas fuentes de nitrógeno como la peptona, neopeptona, triptona y extracto de levadura no permiten la formación de conidias en cultivo sumergido (Thomas et. al. 1987), sin embargo la producción de

blastoesporas es abundante, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el medio T3 cuya fuente de N es peptona donde se observo mayor número de blastoesporas.

Estudios realizados en producción de *B. bassiana* utilizando peptona como fuente de N reportan la producción de blastoesporas lo que respalda los resultados obtenidos en nuestro estudio (Bidochka, et. al., 1987; Humphreys et. al., 1989).

Para T2 observamos mayor cantidad de conidias sumergidas, bajo algunas condiciones de cultivo se ha observado que las blastoesporas producidas en la fase estacionaria aproximadamente en el 4 a 5 día de producción, pueden dar lugar a conidias sumergidas sin pasar por el crecimiento micelial, este fenómeno es denominado microciclo (Thomas et. al., 1987). En este estudio se observo el fenómeno de microciclo en los medios M1, T1, y T3.

Aunque se utilizó la sacarosa como fuente de carbono ya que por reportan mencionan mayor producción de blastoesporas (Bláchere, 1973), en nuestro estudio obtuvimos la producción de conidias sumergidas, por lo que sugerimos que el nitrógeno en este caso líquido remojo de maíz tiene un papel determinante en la clase de espora producida. Estudios realizados con *H. thompsonii* en el cual utiliza sacarosa como fuente de C y líquido remojo de maíz como fuente de N en una proporción 3:1 demuestran que al

incrementar la proporción del Líquido remojo de maíz se obtiene la formación de conidias sumergidas (Rombach, 1988).

Datos corroborados en nuestro estudio con *B. bassiana* donde las fuentes de C y N fueron sacarosa y líquido remojo de maíz en una proporción 2:1, y se observó la mayor producción de conidias sumergidas.

Germinación

Pudimos observar la germinación de nuestros filtrados fue máxima en todos los medios a las 10 horas, lo reportado en la germinación de *B. bassiana* ha sido 12 horas para blastoesporas, 16 para conidias sumergidas y 24h para conidias aéreas (Thomas et. al., 1986), las germinaciones en cultivo fresco pueden variar para blastoesporas se han reportado 10 h, para conidias 20 h, la germinación en fuentes de N limitada puede ser más lenta que en fuente de C (Lane & Trinci, 1991).

Esto nos sugiere que nuestro ingrediente activo son blastoesporas, sin embargo para el medio T2 la morfología circular no concuerda con la morfología alargada reportada para blastoesporas (Bidochka, et. al., 1987).

Se han obtenido blastoesporas con las fuentes de C y N utilizadas para este medio sacarosa y líquido remojo de maíz respectivamente, sin embargo también se han reportado producción de conidias sumergidas en esta fuente de N. Lo que nos sugiere que tal vez se deban realizar más estudios sobre

el ingrediente activo del medio T2, para reconfirmar que realmente es una conidia sumergida debido a que posee patrones de germinación de una blastoespora.

Algunos estudios realizados para determinar el porcentaje de desecación de *Paecilomyces fumosoroseus* han reportado el 79% (Jackson et. al., 1997), 69% en LM1 y 21% en LM2 (Sandoval et. al., 2001), Nuestro trabajo reporta un porcentaje de tolerancia a la desecación para *B. bassiana* en tierra de diatomeas de 75% para M1, de 67% para T1, de 92% para T2 y de 78% para T3, lo que nos indica que nuestro valores son promedios o en algunos casos como el de T2 más altos que los reportados para otros hongos entomopatógenos.

Al realizar las pruebas de germinación después del secado en tierra de diatomeas y caolín, obtuvimos valores más altos de germinación en caolín en todos los medios a excepción de T3, lo que concuerda con datos reportados por Sandoval et. al. (2001), donde los valores más altos de germinación de blastoesporas de *P. fumosoroseus* se obtuvieron para las formulaciones en caolín. Para caolín nuestro porcentaje de tolerancia a la desecación fue para M1 de 78%, para T1 de 88%, para T2 de 97% y para T3 de 94%, Datos similares fueron reportados por Sandoval et. al. (2001) en la viabilidad después del secado en los medios LM1 y LM2 de 94.8% y 75.2% respectivamente, para *P. fumosoroseus* lo que nos indica que nuestro

nuestros en caolín caen dentro de los valores promedios reportados para otros hongos entomopatógenos.

Cuando se obtienen fuentes de N inapropiadas para la producción de esporas se obtienen valores muy bajos de tolerancia a la desecación como la peptona de colágena reportada en el medio LM2 (Sandoval et. al., 2001). Estudios anteriores han demostrado que la fuente de N puede influenciar la tolerancia a la desecación en cultivos líquidos (Jackson , 1999).

Almacenamiento

En este estudio obtuvimos mejor viabilidad a 4°C que a 26°C estudios anteriores reportan el mismo comportamiento en otros hongos entomopatógenos (Jackson et. al., 1997; Stathers et. al., 1993). Generalmente las esporas almacenadas en la oscuridad, seca y a baja temperatura pueden permanecer viables por largo tiempo (Aregger, 1992).

Observamos que el soporte y los medios de cultivo tenían cierta influencia en la estabilidad de nuestro formulado, nuestros resultados durante los meses de almacenamiento fueron variables de un mes a otro, sin embargo durante el último mes (6to) se encontraron diferencias significativas entre los medios a 4°C y 26°C. Se ha determinado que las condiciones de secado y la humedad relativa puede impactar en la estabilidad de los formulados almacenados de blastoesporas de *P. fumosoroseus*, de ahí el porque la

diferencia de la estabilidad de nuestro formulado debido a que la humedad relativa en condiciones de almacenaje es muy diferente a ambas temperaturas.

Debemos mencionar que la humedad de las muestras de este estudio fue menos de 1%, los valores de humedad óptimos van de 2-5%, lo que nos indica que si mejoramos nuestro secado para que sea más controlado nuestra viabilidad puede mejorar en condiciones de almacenaje. Con diferentes soportes el secado puede ser diferente reduciendo así la estabilidad del mismo durante el almacenaje (Sandoval et. al., 2001) en nuestro estudio obtuvimos mayor viabilidad en soporte de caolín a temperatura ambiente.

Estudios de germinación realizados con conidias almacenadas a diferentes temperaturas han reportado que la longevidad de las conidias disminuye cuando aumenta la temperatura de almacenamiento, la longevidad de las blastoesporas es dependiente de la temperatura, a una temperatura dada las blastoesporas pierden su habilidad de germinar en un medio con agar mucho más rápido que las conidias (Lane & Trinci, 1991).

La viabilidad de las conidias declina en diferente medida dependiendo del medio de almacenaje (Stathers et. al., 1993), Debemos considerar que el tipo de ingrediente activo conidias aéreas, conidias sumergidas, y blastoesporas poseen diferente estabilidad, siendo las blastoesporas las menos estables (Hegedus et. al., 1992).

Se ha estimado que las conidias necesitan permanecer viables al menos 7 semanas para ser utilizados como agente de control biológico (Clark et. al., 1968), sin embargo Couch & Ignoffo sugieren que el tiempo de vida de un biopesticida debe ser de 12-18 meses, o 3-6 meses si el patógeno es requerido para una aplicación en un tiempo específico (1981), Algunas conidias almacenadas durante 2-3 meses a temperatura refrigeradas son estables, sin embargo a temperatura ambiente tropical la viabilidad se puede reducir a días (Stathers et. al., 1993).

En nuestros resultados los formulados almacenados a temperatura refrigerada poseen viabilidad más alta, que los formulados a temperatura ambiente, sin embargo hemos obtenido que en los medios M1 y T2 los formulados a temperatura de 26 ± 1 °C pueden permanecer estables hasta el 4to mes, por lo que deben considerarse los datos reportados.

En cuanto a los medios utilizados los resultados pueden ser variables debido a que muchos hongos acumulan carbohidratos de reserva cuando crecen en un medio que contenga exceso de fuente de C, los principales carbohidratos de reserva reportado para *B. bassiana* son glicógeno, manitol, eritrol, arabitol, cuando el medio ha sido suplementado con glucosa. En ausencia de glucosa se ha detectado todos los compuestos mencionados menos el arabitol, la función de la carbohidratos de reserva es proveer al

organismos de una fuente de C disponible en condiciones de agotamiento de nutrientes. En muchos hongos bajo condiciones extremas la espora provee la fuente de C utilizable (Bidochka et. al., 1990).

Desde el punto de vista de la fuente de N el incremento en la reserva endógena en cultivos limitados de N pueden incrementar la sobre vivencia durante el almacenamiento (Lane & Trinci, 1991), sin embargo estudios realizados con blastoesporas han determinado que la fuente de N, juega un papel muy importante ante condiciones de almacenamiento. Datos que confirman en nuestros resultados los medios T2 y T3 cuya única variante fue la fuente de N, y se encontraron diferencias significativas a ambas temperaturas en tierra de diatomeas, sin embargo en caolín no se encontraron diferencias significativas entre T2 y T3, pero si entre estos y M1 cuya fuente de N es casamino ácidos. Lo que nos indica que la estabilidad de pende de muchos factores: Temperatura, humedad, secado, formulación y soporte. En tierra de diatomeas a temperatura de 4°C todos los medios presentaron diferencias el mejor medio fue T2 con 7.9×10^7 esporas/g, a 26°C el mejor medio fue T2 2.8×10^6 esporas/g , sin embargo en caolín a 4 °C los medios M1 y T2 fueron mejores no se encontraron diferencias significativas en los valores de 2.6×10^7 esporas/g y 5.7×10^7 esporas/g respectivamente, a 26°C el mejor medio fue M1 con 2.58 esporas/g.

Bionsayos contra *P. xylostella*

Se ha reportado que *B. bassiana* posee actividad contra larvas de *P. xylostella* (Vandenberg et. al., 1998) lo que hace atractivo el uso de este hongo como un producto comercial, los datos reportados aquí muestran que al realizar bioensayos con filtrados la mortalidad es más rápida esto es debido a que cuando se utilizan soportes la germinación se más lenta por lo cuál se retarda también la mortalidad.

Los valores obtenidos contrastan con lo anteriormente reportado donde a temperatura de 25°C y humedad relativa de 90 se da la mejor mortalidad, en nuestro estudio el medio T2 en tierra de diatomeas dio el porcentaje de micosis acumulada fue igual a la del control positivo (conidias aéreas) de un 90%, en el caso de T2 en caolín y del filtrado el porcentaje de micosis acumulada fue de 100%, en los controles negativos se observo 0% de micosis acumulada, no se encontraron diferencias significativas (α : 0.05) en los medios y en los soportes.

Los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Vandenberg y colaboradores (1998) en donde los tratamientos con *B. bassiana* producen mayor mortalidad que los controles negativos. Lo que a su vez descarta que el soporte pueda causar algún factor adverso en las larvas tratadas, y que la mortalidad se debe principalmente por el hongo, estos datos fueron

confirmados al determinar el porcentaje de micosis acumulada en las larvas tratadas.

Sin embargo los datos aquí obtenidos presentan una alternativa para la producción de ingrediente activo de *B. bassiana* donde el proceso además de ser más rápido, y económico es también efectivo debido a que la formulación utilizada mantiene su virulencia y en algunos casos es superior al control positivo

CONCLUSIONES

1. El mejor medio para la producción de esporas fue T2.
2. Tierra de diatomas *B. bassiana* crecida en medio T2 , antes y después del secado presento mayor germinación.
3. En caolín *B. bassiana* crecida en medio T2 , antes y después del secado presento mayor germinación.
4. *B. bassiana* crecida en medio T2 presento mejor estabilidad en UFC a 4 °C y a 26 ± 1 °C , a los 6 meses de almacenamiento.
5. *B. bassiana* crecida en medio T2 presento mejor estabilidad en UFC a 4 °C , y M1 a 26 ± 1 °C a los 6 meses de almacenamiento.
6. Nuestros resultados indican que si hay influencia del medio de cultivo en la producción, clase de esporas, germinación y estabilidad durante el almacenaje.
7. Si hay influencia de la temperatura y el soporte utilizado en la estabilidad del formulado almacenado.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el secado bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.
2. Continuar las pruebas de almacenamiento por al menos 1 año.
3. Producción de diferentes cepas de *B. bassiana* con los medios de cultivo probados.
4. Producción de otros hongos entomopatógenos en los medios estudiados para comparación.
5. Realización de bioensayos con diferentes insectos como mosquita blanca.
6. Realizar un SDS PAGE para determinar las toxinas producidas en los medios de cultivo.
7. Realizar pase de larvas micosadas a larvas sanas para incrementar la virulencia.
8. Aislamiento y producción de hongos entomopatógenos endémicos.

LITERATURA CITADA

Andrews K. L. 1984. El manejo Integrado de Plagas invertebradas en los cultivos Agronómicos, Hortícolas y frutales en la Escuela Agrícola panamericana. Zamorano Press.

Aoki, J., & K. Yanase. 1970. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi of muscardine: Influence of Amino Acid in the formations and multiplication of hyphal bodies of *Spicaria Fumoso-rosea* (Wize) Vassil. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Journal of Sericultural Science of Japan Vol 39: 4, 285-292.

Aregger, E. 1992. Conidia production of the fungus *Beauveria brogniartii* on barley and quality evaluation during storage at 2°C. J. Invertebr. Pathol. 59, 2-10.

Barnes, G. L., Boethel, D. J., Eikenbary, R. D., Criswill, J. T., and C. R. Centry. 1975. Growth and sporulation of *Metarrhizium anisopliae* and *B. bassiana* on media containing various peptone sources. J. Invertebr. Pathol. 25, 301-305.

Bidochka, M., Pfeifer, T., & G. Khachatourians. 1987. Development of the enthomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. Mycopathologia 99:77-83.

Bidochka, M., Low, N., and Khachatourians. 1990. Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol* 56: 3186-3190.

Bidochka, M., Karperski., J., and G. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76: 1198-1204.

Bidochka, M. 2001. Monitoring the fate of biocontrol fungi In : *Fungi as Biocontrol Agents*, T. M. Bull, C. Jackson and N. Magan (eds.) CABI Publishing. Wallington, UK. 193-218.

Bláchere, H., Calvez, J., Ferron, P., Corrieu, G., and P. Peringer. 1973. Etude de la formulation et de la conservation d'une préparation entomopathogène a base de blastospores de *Beauveria tenella*. *Ann. Zool.-Ecol.anim.* 5(I), 69-79.

Butt, T.M., Jackson, C., and N. Magan. 2001. Fungal biological control agents: Progress, problems and potencial In: *Fungi as Biocontrol Agents*, T.M. Bull, C. Jackson and N. Magan (eds.). CABI Publishing. Wallington, UK. 1-8.

Castrillo, L & W. Brooks. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the Darking beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. J. Invertebr. Pathol. (72):190-196.

Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., and J. E. Lindengren. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. J. Interber. Pathol. 11, 1-7.

Couch, T.L., and C. M. Ignoffo. 1981. Formulation of insect pathogens. In Microbial Control of Pests and Plant diseases 1970-1980. (H.D:Burges, Ed.) Academic Press, New York. 621-634.

De la Rosa, W., Alatorre, R., Barrera, J., and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93(5):1409-1414.

Feng, M, T., Poprawski, G., G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Biocontrol Science and Technology 4:3-34.

Flórez, F. J. Microbial control of the coffee berry borer in Colombia. In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (8:2002: *Foz do Iguacu*, PR). 285-291.

Goral, V. M. 1971. A method for preparation of conidia of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Ukrainian patent No. 301142. April 1971.

Groden, E., Drummond, F. A., and S. P. Wraight. Microbial control of Colorado potato beetle in potatoes in rain-fed potato agroecosystems in the Northeastern US, In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (8:2002: *Foz do Iguacu*, PR). 265-269.

Hawksworth, D. 1991. The Fungal dimension of diversity, magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95, 641-655.

Hallsworth, J. & N. Magan. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol* 74:261-266.

Hegedus, D., Bidochka, M., and G. Khachatourians. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium

containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 641-647.

Hegedus, D., Bidochka, M., Miranpuri, G., and G. Khachatourians. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spores types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 36: 785-789.

Humber, R. A. & M. S. Tigano. Global perspectives on the discovery, isolation, preservation and exploitation of entomopathogenic fungal germoplasm. In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (8:2002: *Foz do Iguacu*, PR). 196-200.

Humphreys, A. M., Matewale, P., Trinci, A., A. Gillespie. 1989. Effects of water activity on morphology, growth, and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed batch culture.

Humphreys, A. M., Matewale, P., Trinci, A., B. Cunliffe. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed batch culture. *Mycol. Res.* 94(8): 1046-1050.

Ibrahim, Y. B., and w. Low. 1993. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria*

bassiana and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*.
Int. J. Pest Manage 39:288-292.

Inglis, D., Johnson, D., and M. Goettel. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) Hyphomycetes: Sympudolospora of grasshopper under field conditions. Environ. Entomol. 26(2):400-409.

Inglis, D., Johnson, D., Kawchuk, L & M. Goettel. 1998. Effect of soil texture and soil sterilization on susceptibility of ovipositing grasshoppers to *Beauveria bassiana*. J Invertebr. Pathol 71:73-81.

Inglis, D., Ivie, T., Duke, G and M. Goettel. 2000. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and colorado potato beetle larvae. Biological Control 18:55-64.

Jackson, M., McGuire, M., Lacey, L and S. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res: 101(1): 35-41 (1997).

Jackson, M. A. 1999. Method for producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. U.S. Patent No. 5,968,808. Oct 19, 1999.

Jeffs, L. B., Feng, M. G., Falkowsky, J., E and G. Khatourians. 1997. Infection of the migratory grasshopper (Orthoptera: Acridae) by ingestion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. J. Econ. Entomol. 90(2,383-390).

Kachatourians, G & D. Hegedus. 1993. Construction of cloned DNA probes for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in grasshoppers. J. Invertebr. Pathol. 62:233-240.

Kamp & Bidochcka. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agar. Letters in Applied Microbiology 35, 74-77.

Keller, S., and G. Zimmermann. 1989. Mycopathogens of soil insects, pp.240-265. In: N. Wilding, P. Collins, and P. M. Hammond (eds.) Insects-Fungus interactions, 14th Symposium of the Royal Entomological Society of London in collaboration with the British Mycological Society. Academic Press. San Diego.

Knudsen G. R. and J. Schotzko. 1999. Spatial simulation of epizootics caused by *Beauveria bassiana* in Russian wheat aphid populations.

Landa, A., Osborne, L., Lopez, L., J. Eyal. 1994. A Biossay for Determinating Pathogeniciy of Entomogenous Fungi on Whiteflies. *Biological Control* 4 : 341-350.

Lane, B. S., Trinci, A. P. and A. T. Gillespie. 1991. Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested form carbon and nitrogen limited batch cultures. *Mycol. Research* 821-828.

Leite, L. G., Batista-Filho, A., Almeida, J. E., and S. B. Alves. Technical aspects of the industrial production of entomopathogenic fungi in Brazil In: *International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control* (8:2002:Foz do Iguacu, PR). 193.

López-Lorca, L & C. Olivares Bernabéu. 1997. Growth inhibition of nematophagous and entomopathogenic fungi by leaf litter and soil containing phenols. *Mycol. Res.* 101(6):6911-697.

Luz, C & J, Fargues. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 146:33-41.

Luz, C., Silva, I., Cordeiro, C and M, Tigano. 1999. Sporulation de *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum. *J. Invertebr. Pathol.* 73:223-225.

Luz, V. and J. Fargues. 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimens on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *J.Invertebr. Pathol* 75: 202-211

Noma, T.& K. Strinckler. 2000. Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera:Miridae) feeding and ovoposition. *Environ. Entomol.* 29 (2):392-401.

Macheroni, W. Endophytic fungi as agents for the biological control of insects In: *International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control* (8:2002:Foz do Iguacu, PR). 78-82.

Maurer, O., Couteaudier, P., Girard, P., Brigde, P., and G. Riba. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101(2):159-164.

Morley-Davies, J., Moore, D and C. Prior. 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol. Res.* 100:31-38.

Pereyra, R. & D. Roberts. 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, 39-46.

Pereyra, R. & D. Roberts. 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.* 84(6):1657-1661.

Poprawski, T. J., Parker, P. E. and J. H. Tsai. 1999. Laboratory and field evaluation of hyphomycetes insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera:aphididae). *Environ. Entomol.* 28(2): 315-321.

Rice, W. C. and R. R. Cogburn. 1999. Activity of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against three coleopteran pests of stored grain. *J. Econ. Entomol.* 92(39):691-694 .

Rombach, M. C., Aguda, R. M., D. W. Roberts. 1988. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) in different

liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. *Entomophaga* 33 (3) 315-324.

Rombach, M. C. 1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) sympudoloconidia in submerged culture. *Entomophaga* 34(1)45-52.

Roy, H. E. and R. Pell. Interactions between entomopathogenic fungi and predators In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (8:2002:Foz do Iguacu, PR). 28-30.

Samsináková, A. 1966. Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *J. of Invertebr. Pathol.* 8: 395-400.

Sandoval, C. F., Galán Wong, L. J., Arévalo-Niño, K., Luna-Olvera, H., Jackson, M. A., and T. J. Poprawski. 2001. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 423-428.

Shelton, A. M., Wilsey, W. T., Vandenberg, J. D., and M. Ramos. 1998. Assesment of *Beauveria bassiana* sprays for control of

diamondback moth (lepidoptera:plutellidae) on crucifers. J. Econ. Entomol. 91(3):624-630.

Stathers, T. E., Moore, D. and C. Prior. 1993. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. J. of Invertebr. Pathol. 62, 111-115.

Sieglaff, D., Pereira, R and J. Capinera. 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) to *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acridae).

Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. Biocontrol News and Information 14 (4): 71N-78N.

Thomas K. C., Khachatourians, G. G. and W. M. Ingledew. 1987: Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia in submerged culture. Can. J. Microbiol. 33:12-20.

Valenzuela, E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos su aprovechamiento en el control de insectos plagas. Universidad Autónoma de Chapingo.

Vandenberg, J., Ramos, M., and J. Altre. 1998. Dose-response and Age and temperature related susceptibility of the Diamond Moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). Environ.Entomol. 27(4): 1018-1021

Urtz, B & W. Rice. 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptruss oryzophilus*. Lett. Appl. Microbiol. 25:405-409.

Wraight, S., Carruthers, R., Jaronski, S., Bradley., Garza, C., and Galiani-Wraight S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203-217.

Wright, J. E. & L. D. Chandler. 1992. Development of a Biorational Mycoinsecticide : *Beauveria bassiana* conidial formulation and its application against Boll Weevil Populations (Coleoptera : Curculionidae). J. Econ. Entomol. 85 (4): 1130-1135.

Yeo, H., Pell, J., Walter, M., Boyd-Wilson, K., Snelling, C., and D. M. Suckling. 2001. Suceptibility of diamondback moth (*Plutella xylostella* (L.)) larvae to the entomopathogenic fungus, *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko. New Zealand Plant Protection 54:47-50.

Zabriskie, D. W., Armiger, W. B., Phillips, D. H., and P. A. Albano.
1999. Fifth edition. Trader's guide to fermentation media formulation.
Traders protein. Tennessee, USA.

