



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**



**SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS Y ADULTOS DE LA CONCHUELA DEL
FRIJOL, *Epilachna varivestis* (MULSANT.) (COLEOPTERA:
COCCINELLIDAE), A AISLADOS NATIVOS DE *Beauveria bassiana*
(BALSAMO) VUILLEMIN (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE)**

TESIS QUE PRESENTA:

JAIME ANTONIO OCAMPO HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO

CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA.

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO DE 2010.

AGRADECIMIENTOS

Al cuerpo académico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales por compartir sus conocimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

A la Fundación Guanajuato Produce (Proyecto 491/08), Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato y la Unidad de Innovación Tecnológica del Sistema Producto Frijol Guanajuato por el financiamiento y facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

Se agradece también el apoyo por parte de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a través del proyecto 6.7.

A la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo por la oportunidad brindada, paciencia, consejo, confianza y acertada dirección del presente trabajo de investigación; pero sobre todo por su valiosa amistad.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra por sus oportunas y acertadas aportaciones realizadas a la presente investigación y por la revisión del escrito.

Al M. C. Fernando Tamayo Mejía por su valiosa aportación técnica y de conocimientos para la correcta realización de esta investigación además de la revisión del escrito y principalmente gracias Fer por tu amistad, confianza, respaldo incondicional que me has brindado desde siempre como mi hermano que siempre has sido.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por su confianza y sencillez que lo caracterizan y por las oportunas aportaciones realizadas a la presente investigación además de su apoyo estadístico y revisión del escrito.

Al Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa por sus conocimientos compartidos durante esta etapa de mi formación académica y por sus aportaciones al presente trabajo de investigación además de sus valiosas observaciones al escrito de la misma.

Al M. C. Javier Valle Mora por su apoyo estadístico en la presente investigación.

Al Dr. Samuel Pineda Guillermo por su amistad, confianza, apoyo y conocimientos compartidos durante esta etapa de mi formación académica.

A la Q. F. B. Violeta Elizalde Blancas e Hilda Barrón Esquivel por su apoyo incondicional en la realización de los bioensayos en el laboratorio, por sus aportaciones valiosas y por esa gran amistad que desde siempre nos ha unido.

A ese gran equipo formado por Jorge Ramírez, Brenda Valtierra, Juan Carlos Casillas y Alejandra Valtierra porque con su apoyo técnico se logró esta meta de mi vida profesional.

A todo el personal del Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos de CESAVER por su amistad, apoyo y facilidades otorgadas durante los bioensayos realizados en esta investigación.

A la Ing. Lupita Guerrero Chávez por su invaluable amistad, apoyo, sencillez y consejos en los buenos y malos momentos de la vida.

A la Biol. Lizeth R. Cruz Cota por su compañerismo y amistad durante esta etapa de estudiantes de maestría.

A Patricia Liliana Cerritos Barriga por siempre mostrar una gran actitud, disposición y apoyo en los trámites administrativos del postgrado pero sobre todo por su amistad y confianza.

A la familia Ramírez Hernández quienes me han considerado como un integrante tan especial como todos y cada uno de ustedes que la conforman, por ese gran cariño que tienen hacia mí y mi familia y especialmente por el apoyo brindado desde siempre.

Al Ing. Víctor Manuel Téllez Guzmán por su amistad y apoyo incondicional en la presente investigación.

A todos aquellos que por descuido omití nombrar pero que han aportado ese granito de arena que hoy hace diferencia en mi vida profesional.

Sinceramente...

Jaime Antonio Ocampo Hernández

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme en todo momento, permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios y por cuidar de mi familia en las horas de ausencia. Gracias señor porque quiero seguir recorriendo el mundo agradeciendo todo cuanto me has dado.

A mis padres Armando y Gloria por su incansable apoyo y confianza y quienes me han enseñado que en la vida nunca se deja de aprender y que con entusiasmo y dedicación podemos lograr grandes satisfacciones. Papá, mamá, nombres tan sencillos de pronunciar pero que siempre enaltecen de orgullo mi hablar porque tuve la fortuna de ser su hijo.

A mi esposa María del Rosario por su paciencia, comprensión y apoyo, pero sobre todo por su gran amor y demás atributos, que a mí me faltan, y hacen de ella una mujer excepcional. Gracias por compartir tu vida conmigo y tu pasión por mantener siempre unida a nuestra familia.

A mis hijos Izel Ximena y David Azael por ser mi mayor inspiración para seguirme preparando espiritual, personal y profesionalmente y por la grandes picardías y alegría que día a día comparten conmigo sin importar las circunstancias.

A mis hermanos Jorge Armando, Edgar y Héctor y hermanas Areli y Alma Cristina por su gran cariño que los caracteriza en todo momento.

A mi sobrinos Sergio Noel, José Karel, Betito, Ángel, Sebastián, Emir Nahim y Daniel por los momentos de alegría e inolvidables que nos han dado.

A la memoria de mi tío Antonio por enseñarme a vivir la vida siempre de una manera positiva, sencilla y feliz aún en los momentos difíciles.

A la memoria de mis abuelitas Micaela y Cristina quienes me enseñaron que no existen personas malas en la vida sino con malos momentos pero que siempre tienen algo nuevo que enseñarnos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. ANTECEDENTES	5
4.1. La conchuela del frijol, <i>E. varivestis</i>	5
4.1.1. Importancia económica	5
4.1.2. Biología y hábitos	6
4.2. Métodos de control de <i>E. varivestis</i>	7
4.2.1. Control químico	7
4.2.2. Control biológico	7
4.3. Características generales de los hongos entomopatógenos	9
4.3.1. Características generales de <i>B. bassiana</i>	12
4.3.2. Modo de acción de <i>B. bassiana</i>	12
4.3.3. Uso de <i>B. bassiana</i> para el control de plagas	15
V. HIPÓTESIS	17
VI. OBJETIVOS	18
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1. Lugar de trabajo	19
7.2. Cría de <i>E. varivestis</i>	19
7.3. Origen de los aislamientos de <i>B. bassiana</i>	19
7.4. Producción de inóculo	20

7.5.	Porcentaje de germinación de conidios	21
7.6.	Bioensayos	21
7.6.1.	Experimento 1	21
7.6.2.	Experimento 2	22
7.6.3.	Experimento 3	22
7.7.	Análisis estadísticos	22
VIII.	RESULTADOS	24
8.1.	Experimento 1	24
8.2.	Experimento 2	26
8.3.	Experimento 3	26
IX.	DISCUSIÓN	29
X.	CONCLUSIONES	34
XI.	LITERATURA	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Insecticidas químicos registrados para el control de <i>E. varivestis</i> en México (CICOPLAFEST 2009).	8
Cuadro 2. Origen de los aislamientos de <i>B. bassiana</i> considerados en el estudio.	20
Cuadro 3. Comparación de razón de riesgo entre aislados de <i>B. bassiana</i> aplicados <i>in vivo</i> sobre adultos de <i>E. varivestis</i> .	25
Cuadro 4. Análisis Probit para dos aislamientos nativos de <i>B. bassiana</i> contra larvas de tercer estadio y adultos <i>E. varivestis</i> .	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso infectivo de <i>B. bassiana</i> sobre la termita <i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen).	14
Figura 2. Supervivencia de los adultos de <i>E. varivestis</i> a la aplicación de 1×10^8 conidios/mL de cuatro aislamientos nativos y uno comercial de <i>B. bassiana</i> en condiciones de laboratorio.	24
Figura 3. Supervivencia de adultos y larvas de tercer estadio de <i>E. varivestis</i> a la aplicación <i>in vivo</i> de diferentes concentraciones conidiales de aislamientos nativos de <i>B. bassiana</i> a 10 dpi.	27
Figura 4. Tiempo Medio para Morir calculado para dos aislamientos nativos de <i>B. bassiana</i> aplicados sobre dos estados de desarrollo de <i>E. varivestis</i> .	27
Figura 5. Tiempo Medio para Morir calculado para larvas de tercer estadio y adultos de <i>E. varivestis</i> expuestos a dos aislamientos nativos de <i>B. bassiana</i> .	28

I. RESUMEN GENERAL

Los hongos entomopatógenos son activos contra un amplio rango de hospederos y tienen un alto potencial como agentes de control biológico. En el presente estudio, se evaluó la actividad de cuatro aislamientos nativos (Bb37, Bb38, Bb40 y Bb45) del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) y el producto comercial Mycotrol[®] (cepa GHA) sobre adultos de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), una de las plagas de mayor importancia económica del cultivo del frijol en México. Los aislamientos nativos se obtuvieron de diferentes especies de insectos colectados en cultivos de maíz en el estado de Guanajuato. Los insectos se expusieron mediante inmersión a una sola concentración de cada aislamiento (1×10^8 conidios viables/mL) incluyendo a la cepa GHA. La mortalidad se evaluó cada 24 h durante 10 d posteriores a la inoculación (dpi). Tres de los cuatro aislamientos (Bb37, Bb38 y Bb40) redujeron significativamente la sobrevivencia (rango de 25 al 41 %) de los adultos de *E. varivestis* comparado con la cepa comercial GHA (77 %) y el testigo (71 %) a los 10 dpi. En un segundo experimento, se realizaron bioensayos para determinar la Concentración Letal Media (CL_{50}) y el Tiempo Medio para Morir (TMM) de dos de los aislamientos más activos (Bb37 y Bb40) en larvas de tercer estadio y adultos de *E. varivestis*. Para el primer caso, se utilizó un rango de cinco concentraciones para cada aislamiento (1×10^5 a 1×10^9 conidios viables/mL). El TMM se determinó con los datos de mortalidad obtenidos con la concentración más alta utilizada. Los resultados mostraron que los valores de la CL_{50} y el TMM no difirieron significativamente en ninguno de los estados de desarrollo de *E. varivestis*. También se realizaron bioensayos independientes con los aislamientos Bb37 y Bb40, a una concentración de 1×10^9 conidios viables/mL, para comparar el TMM entre larvas de tercer estadio y adultos de *E. varivestis*. En este caso, los valores del TMM fueron significativamente menores para las larvas (87 y 100 h) comparados con los adultos (130 y 134 h, para Bb37 y Bb40 respectivamente). Se concluye que los aislamientos nativos de *B. bassiana* representan una importante alternativa para el control de *E. varivestis*. Sin embargo, se necesitan realizar estudios detallados que demuestren su efectividad en condiciones de campo.

II. SUMMARY

Entomopathogenic fungi are active against a broad host range and have been used as biological control agent. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) has been tested for the control of Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), one of the most important pest for bean production in Mexico. In this study, we compared the insecticidal activity of four *B. bassiana* native isolates (Bb37, Bb38, Bb40, and Bb45) against the commercial product Mycotrol® (strain GHA) on *E. varivestis* adults. Isolates were obtained from different species of insects collected in maize in Guanajuato state. Adults were exposed by an immersion method at a single concentration of each isolate (1×10^8 conidia/mL) including the GHA strain. Mortality during 10 d after inoculation (dai) at 24-h intervals, was evaluated. Isolates Bb37, Bb38, and Bb40 significantly reduced adult survival (range from 25 to 41%) compared with the commercial strain GHA (77%) and control (71%) at 10 dai. In a second experiment, bioassays were conducted to determine Lethal Concentration (LC_{50}) and Mean Time to Death (MTD) of the most active isolates (Bb37 and Bb40) in third instar and adults. We used a range of five concentrations for each isolate (1×10^5 - 1×10^9 conidia/mL). The MTD values were determined from mortality data obtained with the highest concentration used. The results showed that the LC_{50} and MTD did not differ significantly in any of the developmental stages of *E. varivestis* tested. An independent experiment, to compare the MTD values between third instar and *E. varivestis* adults, was conducted by using Bb37 and Bb40 at 1×10^9 conidia/mL dose. Results showed that MTD were significantly reduced against larvae (87 and 100 h) compared with adults (130 and 134 h, by Bb37 and Bb40, respectively). We concluded that native isolates of *B. bassiana* represent an important alternative for the control of *E. varivestis*. However, to demonstrate its effectiveness under field conditions, detailed studies are needed.

III. INTRODUCCIÓN

El frijol es un cultivo estratégico dentro del desarrollo rural en México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada y número de productores dedicados a su cultivo (Acosta *et al.* 2000). Guanajuato se encuentra dentro de los primeros seis estados productores de frijol; en 2008 se estableció una superficie de 96, 304 ha durante los ciclos de temporal (junio – octubre) y de riego (febrero – junio). Debido a ello, se logró obtener una producción de 53,420 ton de grano y un rendimiento medio de 0.68 ton/ha (SIAP 2009). Entre los tipos de frijol más utilizados se encuentran los frijoles negros, flor de junio y flor de mayo, además de algunos criollos de consumo local como rosa de castilla, entre otros.

La conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), es la plaga de mayor importancia del cultivo del frijol en México (Guerrero *et al.* 1979). Los estados más afectados son Durango, Zacatecas, Chihuahua y Guanajuato, en donde el insecto se puede alimentar de *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray, *P. angularis* (Willd.) W. Wight, *P. atropurpureus* (Moc. & Sessé ex DC.) Urban y *Vigna sinensis* L., entre otras especies (Behle *et al.* 2006; Peña *et al.* 2006). Para el control de la conchuela en frijol, los agricultores habitualmente realizan varias aplicaciones de insecticidas sintéticos, principalmente organofosforados (Behle *et al.* 2006). Desafortunadamente, el mal empleo de este recurso ha ocasionado varios problemas, tales como la contaminación ambiental y daños a la salud pública. Además, existe la posibilidad de que el insecto desarrolle resistencia a los insecticidas sintéticos. Debido a lo anterior, es importante que se lleven a cabo estrategias más adecuadas de control, bajo un contexto de manejo integrado de plagas (MIP) (Lacey *et al.* 2001).

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar a una gran diversidad de insectos, éstos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas y representan una alternativa importante para el control de plagas (Reinert *et al.* 1999; Faria y Wraight 2001). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) es un hongo que infecta a más de 700 especies de insectos (Barbercheck y Kaya 1990), dentro de los cuales se incluyen especies del orden Coleoptera (Feng *et al.* 1994, Bruck y Lewis 2001, Wraight y Ramos 2001). Actualmente, en el estado de Guanajuato se realizan aplicaciones de *B.*

bassiana para el control de diferentes plagas agrícolas como la mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, el chapulín, *Melanoplus differentialis* Thomas, el pulgón saltador, *Bactericera cockerelli* Sulc y la gallina ciega, *Phyllophaga* spp. (Anónimo 2008); sin embargo, no se ha realizado una investigación específica sobre el potencial de *B. bassiana* para el control de *E. varivestis*. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad de larvas y adultos de *E. varivestis* a *B. bassiana* en condiciones de laboratorio.

IV. ANTECEDENTES

4. 1. La conchuela del frijol, *E. varivestis*

4. 1. 1. Importancia económica

Epilachna varivestis es una especie originaria de la región tropical de América Central (Sureste de México y Guatemala) (Biddle *et al.* 1992) y una de las plagas más importantes del frijol y la soya. En el norte de América, dicha especie está establecida en los estados del este (Idaho, Washintong, Colorado y California), centro-oeste (Dakota del Norte, Nebraska, Michigan y Minnesota) y sur (Texas) de los Estados Unidos (Barrigossi *et al.* 2001a, Economic Research Service USDA 2010). En México, los estados más afectados son Durango, Zacatecas, Chihuahua, San Luis Potosí y Guanajuato (Behle *et al.* 2006).

Las larvas y los adultos de *E. varivestis* se alimentan de las hojas del frijol durante todo el ciclo fenológico del cultivo. Durante la etapa vegetativa, puede causar una disminución importante en el rendimiento cuando la defoliación es superior a 80% (Schaafsma y Ablett 1994). Asimismo, el rendimiento resulta afectado cuando los niveles de defoliación son superiores al 20% en las etapas de floración y llenado de vaina (Fan *et al.* 1993). En general, las variaciones en la densidad de población del insecto y su impacto en el rendimiento del cultivo del frijol pueden ser causadas por diversos factores, tales como el área geográfica, el clima, la densidad de siembra, la variedad del cultivo, la etapa de desarrollo del cultivo y las prácticas del control de plagas (Nolting y Edwards 1989, Barrigossi *et al.* 2003). En algunas áreas de México, el mayor daño económico ocurre entre los meses de julio a septiembre, lo cual coincide con el desarrollo vegetativo, floración y llenado de vaina del cultivo (McPherson *et al.* 1996, Pinto *et al.* 2002, Barrigossi *et al.* 2003). En dicho periodo, se pueden observar los picos máximos poblacionales de los estados más voraces del insecto: las larvas de tercero y cuarto estadio y los adultos (Guerrero *et al.* 1979, Barrigossi *et al.* 2001b, Pinto *et al.* 2002).

4.1.2. Biología y hábitos

La conchuela del frijol puede presentar una o dos generaciones por año en las zonas productoras de frijol del centro de México (Pinto *et al.* 2002). En algunas zonas de Estados Unidos, se han observado hasta tres generaciones al año en el cultivo de la soya (Stevens *et al.* 1975). Los adultos hibernan en los campos de cultivo aledaños a las zonas de producción de frijol y en zonas montañosas (Sánchez-Arroyo 2007). La temperatura y la lluvia juegan un papel determinante en la ruptura o término de la etapa invernante. Bernhardt y Shepard (1978) y Sánchez-Arroyo (2007) señalaron que con el inicio de las lluvias los adultos invernantes se establecen en las nuevas plantaciones de frijol y otros cultivos hospederos. Después del periodo invernante, los adultos se alimentan durante un lapso de 8 a 13 días para posteriormente iniciar su periodo reproductivo y la oviposición. Las hembras colocan de 500 a 600 huevecillos sobre el envés de las hojas, los cuales son puestos en grupos de 15 a 60 y cuya eclosión ocurre en un período de 5 a 15 días (Guerrero *et al.* 1979, Sánchez-Arroyo 2007).

La etapa larvaria presenta cuatro estadios y tiene una duración de dos a cinco semanas. Barrigossi *et al.* (2001a) observaron que las larvas recién emergidas se alimentan sobre la misma hoja en la que se ubica el grupo de huevecillos de donde emergieron. Al igual que los adultos, las larvas se alimentan en el envés de las hojas de frijol y usualmente es el lugar dónde se lleva a cabo la pupación, misma que tiene una duración promedio de una a dos semanas (Barrigossi *et al.* 2001a, Pinto *et al.* 2002).

Aunque algunos estudios han señalado que la distribución espacial del insecto en campo no presenta un patrón determinado, se ha observado una mayor oviposición en las áreas agrícolas más cercanas a los sitios de hibernación (Barrigossi *et al.* 2001b). Shirai y Yara (2001) observaron que la oviposición puede inhibirse cuando en promedio la temperatura de 27.5 °C se prolonga por un periodo de cinco días. Además, existe una alta tasa de mortalidad de los huevecillos y los primeros dos estadios larvales debida principalmente a la deshidratación provocada por el factor temperatura (Barrigossi *et al.* 2001a). Otros de los factores que influyen en la mortalidad del insecto están relacionados a la capacidad de alimentación y movimiento del mismo. Al respecto, se ha observado que la mortalidad larvaria

disminuye en el tercer y cuarto estadio debido a su alta movilidad, lo cual les permite colocarse en las zonas más frescas de la planta (Barrigossi *et al.* 2001a).

4.2. Métodos de control de *E. varivestis*

4.2.1 Control químico

En las últimas siete décadas, el control de insectos plaga se ha basado mayoritariamente en el uso de insecticidas sintéticos (Karam *et al.* 2004). Sin embargo, la tendencia actual en investigación de plaguicidas químicos está orientada al uso de nuevos ingredientes activos que posean una mayor especificidad y respeto por la fauna benéfica o especies no blanco (Dhaliwal *et al.* 2004). Desafortunadamente, en México estos nuevos productos no se utilizan en cultivos básicos como el frijol, debido a que éstos se utilizan para el control de plagas en cultivos más redituables como es el caso de las hortalizas. Los insecticidas más utilizados para el control de la conchuela del frijol son el carbaril, paratión metílico y malatión, aunque se cuenta con 13 compuestos químicos autorizados para el mismo fin y que en su mayoría pertenecen al grupo de los organofosforados (Cuadro 1) (Kogan y Tumipseed 1987, Pinto *et al.* 2004, Ibarra *et al.* 2006). A la fecha, no se han reportado casos de resistencia de *E. varivestis* a los anteriores insecticidas, aunque no debe descartarse la posibilidad de la adquisición de dicho fenómeno, puesto que se han registrado casos de resistencia a varios insecticidas en otras especies de coleóptero plaga (Arthropod Pesticides Resistance Database 2010).

4.2.2. Control biológico

El término control biológico se refiere al uso y manipulación de los enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos) para reducir las densidades poblacionales de las plagas a niveles que no superen el umbral económico y donde existe una interdependencia

entre las poblaciones del enemigo natural y las del fitófago (Van Driesche y Bellows 1996, Badii *et al.* 2000).

Cuadro 1. Insecticidas químicos registrados para el control de *E. varivestis* en México (CICOPLAFEST 2009). <http://mexicolegislation.com/CIC0PLAFEST.htm>

Modo de acción	Ingrediente activo	Grupo Químico
Sistémico	Acefate	Organofosforado
	Azinfós metílico	Organofosforado
	Carbarilo	Carbamato
	Deltametrina	Piretroide
	Endosulfán	Organoclorado
	Ethion	Organofosforado
	Fenvalerato	Piretroide
	Malation	Organofosforado
	Metidation	Organofosforado
	Metomilo	Carbamato
Contacto e ingestión	Naled	Organofosforado
	Paration Metilico	Organofosforado
	Triclorfon	Organofosforado

La utilización de los hongos entomopatógenos para el control de varias especies de coleópteros plaga se ha realizado de manera exitosa. A nivel mundial, destaca el control de la catarinita de la papa, *Leptinotarsa decemlineata* Say, gallina ciega, *Melolontha melolontha* L., broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari, diabrotica *Diabrotica* spp, picudo de la fresa, *Anthonomus signatus* Say y *Otiorhynchus ovatus* L., plagas de productos almacenados *Oryzaephilus surinamensis* L., *Tribolium castaneum* Herbst. y de importancia forestal *Agrilus*

planipennis Fairmaire, entre otras (Bruck y Lewis 2001, Keller *et al.* 2003, Throne y Lord 2004, Akbar *et al.* 2005, Klinger *et al.* 2006, Liu y Bauer 2006, Lord 2007, Sabbahi *et al.* 2008). Cabe señalar que también se han reportado efectos de los hongos entomopatógenos sobre algunas especies de insectos benéficos como las catarinitas *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville, *Harmonia axyridis* Pallas, *Coccinella septempunctata* L, *Adalia bipunctata* L, *Serangium parcesetosum* Sicard, *Olla v-nigrum* Mulsant, *Coleomegilla maculata* De Geer y *Cycloneda munda* Say (James y Lighthart 1994, James *et al.* 1998, Poprawski *et al.* 1998, Roy *et al.* 2008, Cottrell y Shapiro-Ilan 2008).

En México, se han evaluado diversos organismos benéficos para el control de la conchuela del frijol, entre los que destacan el parasitoide *Pediobius foveolatus* Crawford (Hymenoptera: Eulophidae) (García y Carrillo 2006), la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Tamez-Guerra *et al.* 1999) y los hongos entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *B. bassiana*, mismos que han mostrado resultados prometedores sobre el control del insecto (García *et al.* 1999, Behle *et al.* 2006). Los hongos mitospóricos como *B. bassiana* son activos contra un amplio rango de hospederos y tienen un alto potencial como agentes de control biológico (Lacey *et al.* 2001). Por las anteriores características, cada vez existe mayor interés por el empleo de productos biológicos contemplados como una alternativa dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP) en diferentes cultivos y principalmente en sistemas de cultivos conocidos como “agricultura orgánica” (Tamez-Guerra *et al.* 2001).

4.3. Características generales de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos poseen una serie de atributos que sirven como fundamento para su selección y utilización en el control biológico. Estos atributos son: 1) alta especificidad; 2) alta virulencia, reconocida como la capacidad de producir enfermedad en términos de grado y velocidad de invasión en el insecto; 3) eficiencia en la transmisión, característica importante cuando se requiere que el patógeno se establezca y colonice el hábitat del insecto hospedero; 4) diseminación, característica que le permite al patógeno distribuirse en el hábitat del insecto

hospedero; 5) inocuidad en el ambiente donde se aplican y 6) persistencia en el ambiente a través de su sobrevivencia en el cuerpo de los insectos infectados o bien mediante estructuras de resistencia (esporas) que desarrollen epizootias en la población del insecto hospedero (Lacey y Shapiro-Ilan 2003, Alatorre 2007).

De manera general, los hongos entomopatógenos pueden invadir al insecto hospedero a través de la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales y/o espiráculos, sitios en donde se promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas cuando existe alta humedad. Se reconocen cinco etapas de desarrollo del hongo sobre el insecto: 1) adhesión del inóculo a la cutícula del insecto hospedero, 2) formación del tubo germinativo, 3) penetración de la cutícula del hospedero, 4) crecimiento del patógeno dentro del hospedero y 5) reproducción o producción de conidióforos y conidios sobre el cadáver del insecto hospedero (Nayaranan 2004, Alatorre 2007). Una vez que se ha logrado el anterior proceso, existen diversos factores bióticos y abióticos que influyen sobre la manifestación epizootica de los entomopatógenos sobre sus hospederos.

Los factores bióticos incluyen aquellos que son inherentes al insecto hospedero o inherentes al hongo entomopatógeno. Nayaranan (2004) señala que los factores inherentes al insecto hospedero pueden clasificarse en dos grupos: 1) mecanismos de defensa no específicos, los cuales incluyen aspectos morfológicos como la presencia de barreras estructurales (cutícula) y barreras pasivas (membrana peritrófica) y 2) mecanismos de defensa específicos, los cuales incluyen reacciones celulares o inmunológicas como la fagocitosis; la nodulación (agregación de la hemolinfa); la encapsulación, especialmente contra bacterias, hongos, protozoarios y nematodos y las reacciones humorales que involucra la activación de proteínas con efecto antibacterial y antifúngico.

Algunos estudios en coccinélidos han demostrado la presencia de sustancias químicas de origen endógeno (alcaloides) que son producidas por el insecto como un mecanismo de defensa del ataque de los depredadores (Camarano *et al.* 2009). Attygalle *et al.* (1993 y 1994) señalan la presencia de los alcaloides epilachnina, epilachnadianina, neoepilachnina, homoepilachnina y 9-propyl-10-azacyclododecan-12-olide secretados por *E. varivestis* con

efecto disuasivo para hormigas, otros depredadores y parasitoides. Ningún estudio en coccinélidos ha comprobado el efecto de los alcaloides secretados por este grupo de coleópteros sobre entomopatógenos como mecanismo de defensa; sin embargo, se sugiere que la especie *H. axydiris* podría tener alguna acción defensiva por estos compuestos en la hemolinfa (Roy *et al.* 2008).

Los factores bióticos inherentes al hongo entomopatógeno incluyen la acción de enzimas producidas durante la penetración del hongo en la cutícula del insecto, tales como la 1-4-bquitobiosidasasproteasas (subtilisina Pr1 A y B), serín proteasa (Pr2), cisteína proteasa (Pr4), la carboxipeptidasa (MeCPA), metaloendoproteasa, dipeptidilpeptidasa, lipasas, esterazas y quitinasas (poli N-acetil-b-D- glucosaminidasa). También se incluyen la acción de metabolitos tóxicos que alteran el transporte de cationes a través de la membrana celular, por ejemplo la beauvericina producida por *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* (Zimmermann) Gams & Zarey y *B. bassiana*, y el basianolide producido por este último hongo y por *P. fumosoroseus* (Hajek y Leger 1994 y 2001, Alatorre 2007, Fan *et al.* 2007). La oosporeina es otro metabolito tóxico producido por *B. bassiana* que presenta actividad microbiana que favorece el desarrollo del entomopatógeno. Dichas toxinas provocan alteraciones en diversos organelos, paralizan las células o causan un mal funcionamiento del intestino medio, tubos de malpigio, tejido muscular y hemocitos (Alatorre 2007).

Dentro de los factores abióticos se pueden mencionar a los rayos ultravioleta que minimizan la persistencia del patógeno en el ambiente, la temperatura que afecta directamente el proceso de desarrollo de la enfermedad, la humedad relativa como factor esencial para la germinación de las esporas de la mayoría de los hongos, el viento y la lluvia que actúan como agentes importantes en la diseminación y el pH del medio de desarrollo (Hallsworth y Magan 1996, Shipp *et al.* 2003, Amarasekare y Edelson 2004, Ying y Feng 2004, Pucheta *et al.* 2006, Thompsom *et al.* 2006, Alatorre 2007).

4.3.1. Características generales de *B. bassiana*

B. bassiana pertenece al grupo de los Hypocreales, éstos incluyen organismos que se caracterizan por sus formas miceliales que llevan esporas asexuales (conidia) provenientes de células conidiógenas especializadas, libres o en estroma miceliar (conidióforos, sinemas, esporodoquios, acérvulos). Las colonias de *B. bassiana* se caracterizan porque alcanzan de 0.6-2.3 cm de diámetro en ocho días a 20 °C y son de apariencia polvosa. El crecimiento micelial es de color blanco, pero puede tornarse amarillo o rosado. Los conidios se encuentran dispuestos en zig-zag, son hialinos, globosos y generalmente miden de 2 a 3 µm de diámetro (Tanada y Kaya 1993). Específicamente, *B. bassiana* es el agente causal de la muscardina blanca, la cual es infectiva a un amplio rango de insectos pertenecientes a diversos órdenes. Los diferentes aislados de este entomopatógeno presentan diferencias en su virulencia sobre el insecto huésped (Bing y Lewis 1991), así como en sus características fisiológicas (Sosa *et al.* 1994).

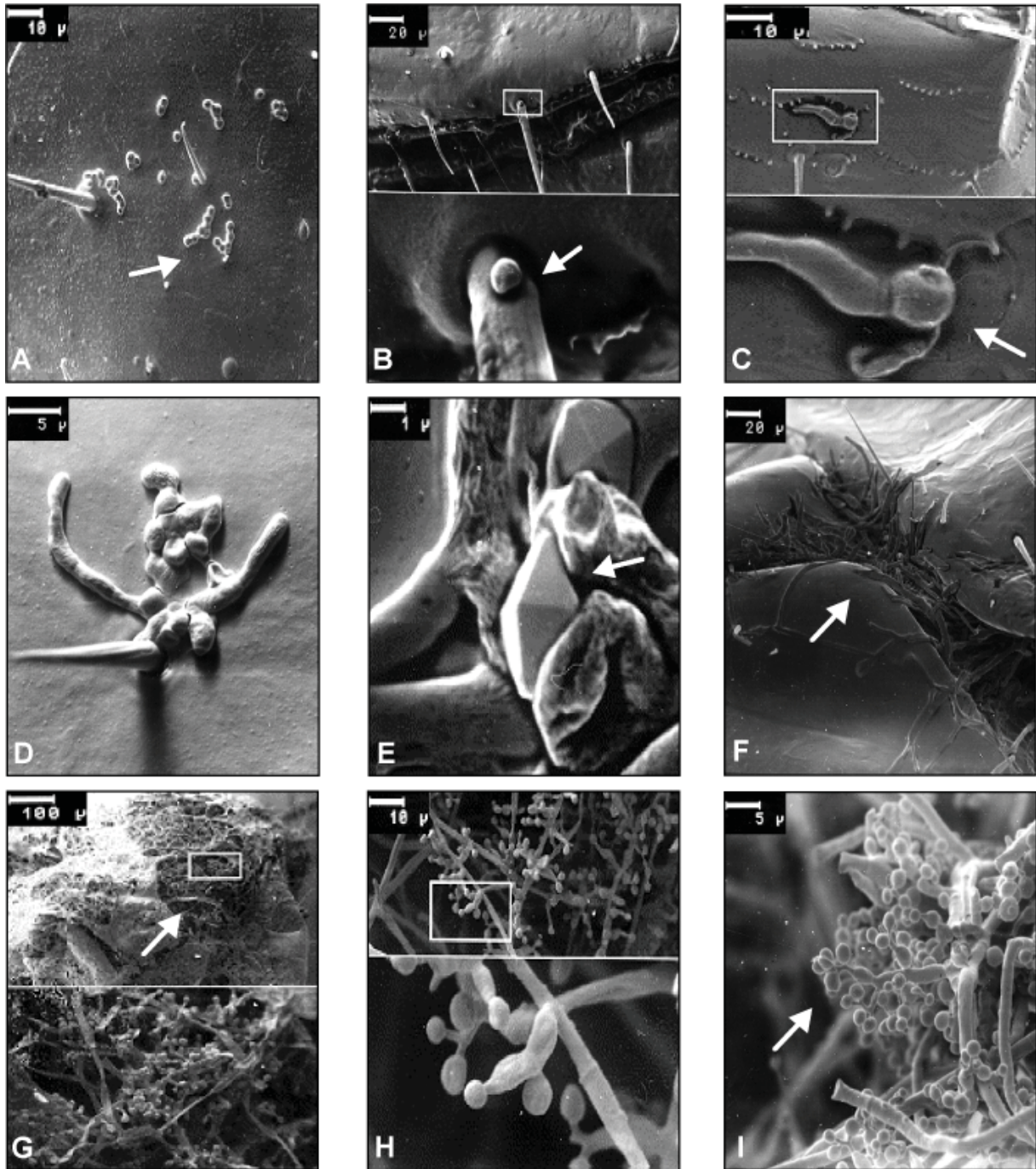
B. bassiana es el hongo entomopatógeno más ampliamente distribuido en el mundo, se ha encontrado infectando insectos tanto en regiones de clima templado como tropical. Su presencia natural se ha observado en diversos tipos de hábitats: suelos alpinos, suelos cultivados, áreas forestales, arena del desierto y sabana (Wagner y Lewis 2000, Zimmermann *et al.* 2007). Este hongo también ha sido aislado de una amplia variedad de insectos de diferentes órdenes como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, y Embioptera (Vestergaard *et al.* 2003).

4.3.2. Modo de acción de *B. bassiana*

Al igual de otros patógenos, *B. bassiana* presenta varias etapas desde la inoculación hasta la muerte del hospedero (Figura 1), pero como se señaló anteriormente existen diversos factores que influyen el éxito de la infección de los entomopatógenos sobre sus hospederos. La adhesión de las esporas de *B. bassiana* al hospedero depende de la superficie celular de la

cutícula y las características y cualidades adhesivas del propágalo, las cuales son producidas por conidios aéreos, blastosporas y conidios sumergidos (Holder y Keyhani 2005). La germinación también está influenciada por ciertos lípidos, ácidos grasos de cadena corta, aldehídos, esterres grasos, cetonas y alcoholes con actividad antimicrobiana. Sin embargo, la cutícula también puede estar cubierta con sustancias que son importantes para el inicio del proceso infectivo como aminoácidos libres o péptidos que podrían desencadenar la germinación de la espora. De manera general, la germinación de la espora inicia a las 10 h y está casi terminada a las 20 h a 20-25 °C (Zimmermann 2007).

La penetración de *B. bassiana* en las capas de la cutícula, desencadena una serie de respuestas por el hospedero, por ejemplo la producción de fenoloxidasas, hemocitos y melanización. Se conoce que durante el proceso de infección, especies del género *Beauveria* producen enzimas proteolíticas y toxinas (Zimmermann 2007). Cuando la penetración de *B. bassiana* es exitosa, el hongo produce propágalos que se distribuyen y le permiten invadir otras partes del cuerpo de su hospedero y la producción de toxinas. Finalmente, se presenta la muerte del insecto y se considera el final de patogénesis. El período de incubación del entomopatógeno dentro insecto depende del hospedero, la edad del hospedero, temperatura y la virulencia del aislamiento. Después de la muerte de insecto y, bajo ciertas condiciones de humedad, el hongo comienza su fase saprofítica y emerge del cuerpo de insecto para producir conidios sobre la superficie exterior del cadáver. Bajo condiciones de poca humedad, el hongo puede sobrevivir en etapa hifal e incluso conidial dentro del cadáver (Zimmermann 2007).



- Scanning electron microscope micrographs of the development of *B. bassiana* on *H. tenuis*. A) Conidia adhered to the tegument (1000X, 0 h after inoculation); B) Conidium adhered to the basis of a seta (2000X, 24 h); C) Germinating conidium, with halo formation in the cuticle (4000X, 72 h); D) Penetration of a germ-tube into the cuticle (3000X, 72 h); E) Details of the bipiramidal crystals, possibly of oxalate (2000X, 96 h); F) Extrusion of the mycelium at intersegmental region (500X, 96 h); G) Conidiophore formation and conidiogenesis on the termite head, with degradation of the cuticle (800X, 120 h); H and I) Details of the conidiogenesis process (4000X and 2000X, 120 h, respectively).

Figura 1. Proceso infectivo de *B. bassiana* sobre la termita *Heterotermes tenuis* (Hagen). (Tomada de Moino *et al.* 2002).

4.3.3. Uso de *B. bassiana* para el control de plagas

Los enemigos naturales de insectos pueden ser empleados bajo tres amplias estrategias, control biológico clásico, aumento y conservación. Existen diversos ejemplos que muestran el desarrollo de estas estrategias (Alatorre 2007, Jackson *et. al.* 2010). *Beauveria bassiana* es un hongo que tiene un alto potencial como agente de control biológico en forma inundativa, ya que es relativamente fácil de producir masivamente y formular para aplicarse con equipo tradicional (Pimentel 2005). En México, *B. bassiana* se ha liberado para el control de la broca del café, *H. hampei*; mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius en el algodón; lepidópteros defoliadores como *Malacosoma* spp. en sauce llorón (*Salix* spp.), *Trichoplusia ni* Hübner, *Plutella xylostella* L., *Copitarsia consueta* Walter, *Pieris rapae* L y trips *Thrips tabaci* Lindeman en hortalizas (Alatorre 2007). Bajo condiciones de laboratorio, se han realizado algunas investigaciones enfocadas al control de *E. varivestis* mediante *B. bassiana*, en donde se han observado diferencias en susceptibilidad relacionadas con el origen geográfico y los hospederos (España 2000).

La producción de *B. bassiana* y otros hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *P. fumosoroseus* y *L. lecanii* se ha venido realizando en los estados de Colima, Guanajuato, Sinaloa y Oaxaca para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas. Estos hongos son producidos tanto en compañías independientes (Agrobionsa) como estatales (CNRCB-DGSV, CESAVER) (Tamez-Guerra *et al.* 2001). *B. bassiana* puede constituir una eficaz estrategia de manejo de insectos plaga, aunque casi siempre tiene que ser utilizado en combinación con otras estrategias para lograr un control sostenido de las plagas (De la Rosa *et al.* 2000). Por ejemplo, Wraight y Ramos (2005) observaron una mortalidad del 25% en campo en larvas de la catarinita de la papa, *L. decemlineata*, por efecto de *B. bassiana* (cepa GHA), dicha mortalidad logró incrementarse hasta 35% cuando el hongo se aplicó en forma conjunta con la bacteria *B. thuringiensis*. Feng *et al.* (2004) reportan que la mortalidad de una población de campo de la mosca blanca de los invernaderos, *T. vaporariorum*, varió entre el 23 a 43% cuando se aplicó *B. bassiana* solo y de 60 a 67.6 % cuando se utilizó en combinación con dosis bajas de Imidacloprid, estos niveles fueron mayores que los observados con el Imidacloprid solo. En un estudio realizado con la

broca del café, *H. hampeii*, se observó que diferentes aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* provocaron niveles máximos de control del 40.6 y 22.1% respectivamente, a los 30 y 40 días posteriores de su aplicación en campos de café (De la Rosa *et al.* 2000). Estos autores sugieren que para mantener e incrementar estos niveles de control es necesaria la implementación de otras prácticas de control como la colecta, eliminación de frutos infestados por la plaga y la liberación de parasitoides.

V. HIPÓTESIS

H_0 : La susceptibilidad de *E. varivestis* hacia el hongo entomopatógeno *B. bassiana* depende del origen geográfico y fuente del inóculo y la edad del hospedero.

H_a : La susceptibilidad de *E. varivestis* hacia el hongo entomopatógeno *B. bassiana* no depende del origen geográfico y fuente del inóculo y la edad del hospedero.

VI. OBJETIVOS

General

Evaluar la susceptibilidad de *E. varivestis* hacia aislamientos nativos de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio.

Específicos

1. Evaluar la virulencia de cuatro aislamientos nativos y uno comercial de *B. bassiana* sobre adultos de *E. varivestis*.
2. Determinar las concentraciones letales medias (CL₅₀) y el tiempo medio para morir (TMM) en larvas de tercer estadio y adultos de *E. varivesti* expuestos a dos aislamientos nativos de *B. bassiana*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Lugar de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el Centro de Reproducción de Organismos Benéficos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), ubicado en las instalaciones del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato en Irapuato, Guanajuato.

7.2. Cría de *E. varivestis*

Se estableció en condiciones de laboratorio a partir de insectos colectados en cultivos de frijol en los municipios de Ocampo y San Felipe, Guanajuato, durante el ciclo de temporal primavera-verano de 2008. Los adultos se colocaron en grupos de 100 individuos en jaulas de madera (50 x 50 cm) cubiertas con tela tul diamante. Los insectos se alimentaron con plantas de frijol (20-30 cm de altura) de la variedad Flor de Junio Marcela, las cuales se cultivaron en condiciones de invernadero en bandejas de plástico de 34 x 28 x 14 cm provistas del sustrato Sunshine mix # 5 (Sun Gro Horticulture Inc.). La cría del insecto se mantuvo bajo las siguientes condiciones ambientales: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60 al 80% de HR y un fotoperiodo de 12:12 h (luz-oscuridad).

7.3. Origen de los aislamientos de *B. bassiana*

Se utilizaron cuatro aislamientos de *B. bassiana* provenientes de diferentes especies de insectos colectados en cultivo de maíz en el estado de Guanajuato, los cuales forman parte de la colección de hongos entomopatógenos del CESAVEG (Cuadro 2). Además, se evaluó la cepa GHA de *B. bassiana* proveniente del producto comercial Mycotrol® ES.

Cuadro 2. Origen de los aislamientos de *B. bassiana* considerados en el estudio.

Aislamiento	Hospedero	Origen geográfico
Bb37	<i>Melanoplus differentialis</i> (Thomas) (Orthoptera: Acrididae)	Apaseo el Alto, Gto.
Bb38	<i>Phyllophaga</i> sp. (Coleoptera: Scarabaeidae)	Jerécuaro, Gto.
Bb40	<i>Phyllophaga</i> sp. (Coleoptera: Scarabaeidae)	Huanímaro, Gto.
Bb41	Mycotrol (cepa GHA)	--
Bb45	Gusano de alambre ¹ (Coleoptera: Elateridae)	Irapuato, Gto.

¹Especie no determinada.

7.4. Producción del inóculo

Los aislamientos de *B. bassiana* procedieron de stocks conservados en sílica gel a 4 °C. Los aislamientos se cultivaron en cajas Petri que contenían el medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), mismas que se colocaron a 25 ± 2 °C durante 15 d. Posteriormente, se produjeron cultivos monospóricos para cada uno de los aislamientos mediante algunas modificaciones de la técnica de Ho y Ko (1997). A las cajas que contenían las siembras reactivadas se les agregaron 200 µL de agua destilada, la cual se mezcló con el hongo y se extrajo una alícuota que se depositó dentro de un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada. La suspensión de conidios se vertió en cajas Petri con ADS, éstas se mantuvieron en reposo durante 10 min a temperatura ambiente; se eliminó el exceso de agua y nuevamente se dejaron reposar por 24 h. Las cajas con el hongo se observaron en el estereoscopio y, con la ayuda de una jeringa de insulina, se tomaron cinco conidios germinados para colocarlos por separado en cajas Petri con ADS, éstos fueron incubados a 25 ± 2 °C hasta su esporulación. Todo el procedimiento anterior se llevó a cabo en condiciones estériles.

7.5. Porcentaje de germinación de los conidios

Para validar la germinación de los conidios procedentes de los cultivos monospóricos, antes de cada experimento, se tomó una muestra de éstos con la ayuda de un asa bacteriológica y se depositó en un vial que contenía 10 mL de agua destilada estéril con Inex A[®] al 0.01%, dicha solución se agitó por 5 min. Con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la suspensión de conidios y se dispersó una gota de la suspensión sobre dos trozos de ADS. Los conidios se incubaron a 25 ± 2 °C y la germinación se evaluó a las 17 h posteriores a la incubación. La cuantificación de los conidios se realizó en un microscopio óptico a 40X, en donde se consideraron conidios viables aquellos que presentaron un tubo germinativo de una longitud mayor a la mitad del tamaño de los mismos. Para el cálculo del porcentaje de germinación, se utilizó la siguiente fórmula: % germinación de conidios = $(V/T) \times 100$, donde V = total de conidios viables y T = total de conidios en la muestra (viables y no viables). Las soluciones fúngicas se ajustaron a un 100% de viabilidad y la concentración se determinó con un hemacitómetro mediante observación en un microscopio óptico a 40X (Rombach 1989).

7.6. Bioensayos

7.6.1. Experimento 1. En el presente y los subsecuentes experimentos, los bioensayos se realizaron mediante el método de inoculación por inmersión (Posada y Vega 2005). Para este caso, los adultos (~ 5 d de edad) se expusieron a una sola concentración de cada aislamiento (1×10^8 conidios viables/mL) incluyendo a la cepa comercial GHA. Para ello, diferentes grupos de 10 insectos se colocaron en vasos desechables de 150 mL, los cuales se desinfectaron y se acondicionaron a manera de red con un fondo de tela tul. El vaso se sumergió en la suspensión de conidios durante 10 s. Para evitar que los insectos flotaran, se colocó sobre éstos otro vaso de plástico de la misma capacidad antes mencionada. Posteriormente, los individuos se colocaron para su secado sobre toallas estériles de papel por un periodo de 30 min. Cabe señalar que antes de la inoculación, los insectos se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio a 0.1 % durante 10 s y se enjuagaron dos veces. Las concentraciones se prepararon en agua destilada estéril más el surfactante Inex-A[®] a 0.01 % vol:vol. Los insectos

testigo se trataron únicamente con agua más el surfactante. La inoculación se realizó en la campana de flujo laminar.

Después de la aplicación de los tratamientos, los insectos de cada grupo se colocaron individualmente en tubos de plástico estériles de 15 ml (Axxigen®) tapados con algodón, el cual se humedeció diariamente con agua destilada estéril. Los adultos se alimentaron diariamente con hojas frescas de frijol previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio a 0.01 %. Los insectos tratados se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2 °C en ausencia de luz durante 10 d. El registro de la mortalidad se realizó cada 24 h. Por cada aislamiento, se realizaron siete repeticiones en diferentes días con 10 insectos para cada una. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado.

7.6.2. Experimento 2. Se realizaron bioensayos para determinar la CL_{50} de dos de los aislamientos que provocaron mayor mortalidad activos (Bb37 y Bb40). La CL_{50} se calculó para los adultos (~5 días de edad) y las larvas de tercer estadio (~ 12 días de edad). Se aplicaron cinco concentraciones por cada aislamiento en un intervalo de 1×10^5 a 1×10^9 conidios viables/mL. Por cada aislamiento, se realizaron cuatro repeticiones en diferentes días con 30 insectos para cada una.

7.6.3. Experimento 3. Se realizaron bioensayos para determinar el TMM en larvas de tercer estadio y adultos de *E. varivestis* tratados con cada aislamiento. Estos ensayos se realizaron con el mismo número de repeticiones descritos para los ensayos del experimento 2, pero en éste caso sólo se aplicó una concentración para cada aislamiento (1×10^9 conidios viables/mL), concentración con la cual se esperó obtener ~ 90 % de mortalidad.

7.7. Análisis estadísticos

Los resultados de los bioensayos iniciales se analizaron mediante un modelo de regresión proporcional de Cox, el cual se realizó en el programa R v2.10.0 (Windows XP). Con dicho modelo se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la sobrevivencia a través del tiempo de

los adultos de *E. varivestis*. Las diferencias estadísticas se realizaron comparando las razones de riesgos entre los tratamientos, determinándose un intervalo del 95 %. Para validar el modelo se verificó el cumplimiento del supuesto de paralelismo. Para comparar el efecto entre tratamientos, se realizó el ajuste de Bonferroni, considerándose significativos los tratamientos que presentaron una $P < 0.02$.

Los resultados de los bioensayos de la segunda etapa se analizaron mediante un análisis Probit de modelos paralelos. Antes de comparar la actividad entre aislamientos, se observó si los datos de cada repetición se podían combinar en un solo grupo de resultados. El análisis consistió en aplicar tres tipos de modelos. Primero, el ajuste de todos los datos a una sola línea Probit; segundo, la diferencia entre las ordenadas al origen de los datos de cada repetición y tercero la diferencia entre pendientes de cada grupo de datos. El mejor modelo se seleccionó en cada caso con base a pruebas parciales de F. Las concentraciones que causaron el 50% de mortalidad se estimaron a partir del mejor modelo, los límites de confianza se calcularon de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller 1944). Una vez evaluada la similitud entre repeticiones, se comparó la respuesta entre aislamientos mediante el mismo tipo de análisis descrito anteriormente. Todos los análisis se realizaron mediante el programa GenStat Ver. 8.2 (Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station 2005).

El cálculo para el TMM se realizó en el programa GLIM (Generalized Linear Interactive Modeling, Numerical Algorithms Group 1993) con una distribución de sobrevivencia Weibull (Aitkin *et al.* 1989), donde se excluyeron a los individuos vivos (Farrar y Ridgway 1998), por lo tanto, el censor (w) fue invariablemente $w=1$. Este parámetro se calculó para las larvas de tercer estadio o los adultos de *E. varivestis* tratados con los dos aislamientos seleccionados (Bb37 y Bb40) (bioensayos de la segunda etapa del estudio). Así mismo, el TMM se calculó para ambos estados de desarrollo tratados con cada aislamiento. En ambos casos el cálculo se realizó con los datos de mortalidad obtenidos a una concentración de 1×10^9 conidios viables/mL.

VIII. RESULTADOS

8.1. Experimento 1. Tres de los cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana* (Bb37, Bb38 y Bb40) redujeron significativamente la sobrevivencia de los adultos de *E. varivestis* comparado con la cepa comercial GHA (77 %) y el testigo (71 %) (*likelihood ratio test* = 89.37, g.l. = 5, $p = P < 0.001$) (Figura 2), aunque los tres primeros no difirieron significativamente entre sí ($P > 0.06$ para todos los casos) (Cuadro 3). En contraste, la cepa GHA y el aislamiento nativo Bb45 no afectaron significativamente la sobrevivencia de los insectos comparado con el testigo ($P = 0.41$ y $P = 0.02$ respectivamente). Así mismo, Bb45 no difirió significativamente con respecto a Bb38 ($P = 0.03$).

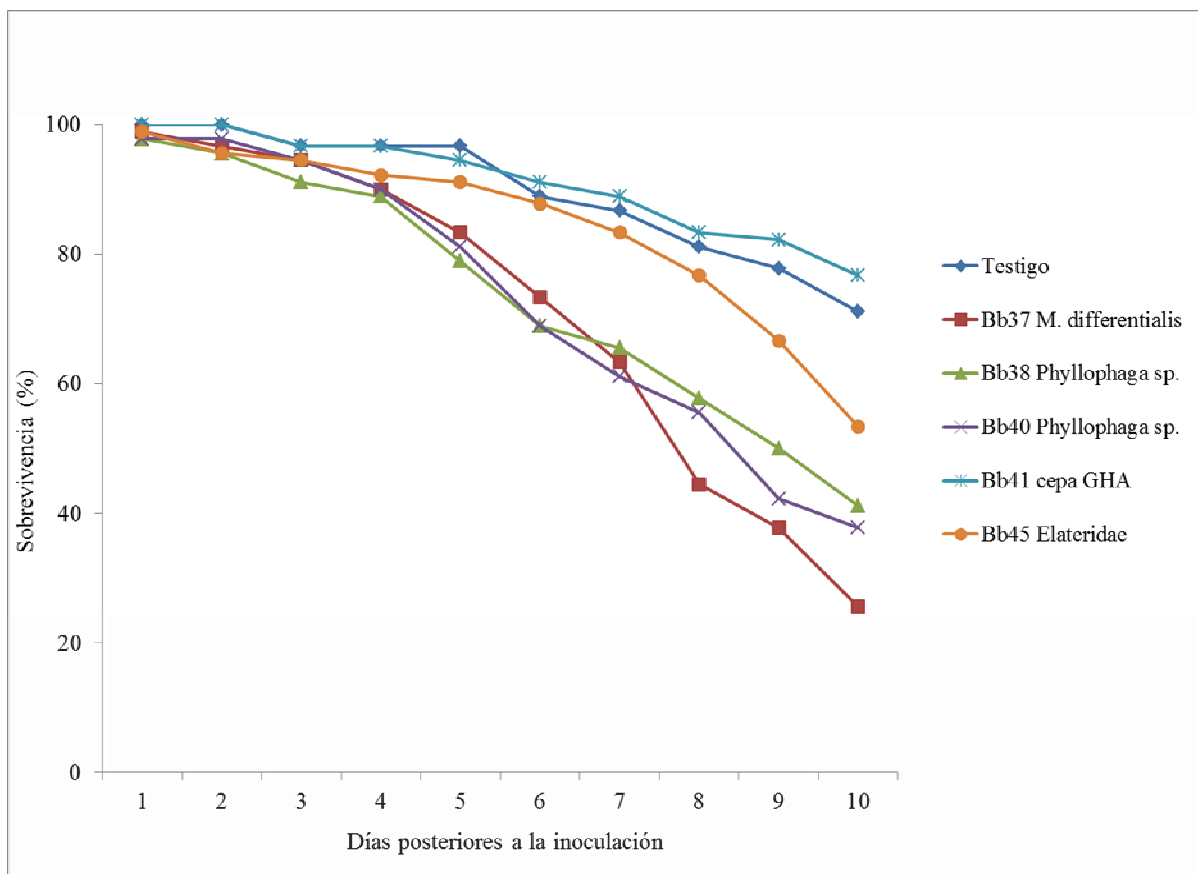


Figura 2. Sobrevivencia de los adultos de *E. varivestis* a la aplicación de 1×10^8 conidios/mL de cuatro aislamientos nativos y uno comercial de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio.

Los aislados Bb37, Bb38 y Bb40 mostraron una mayor actividad insecticida sobre los adultos de *E. varivestis* a partir del 5^{to} dpi respecto a los aislados Bb45, cepa GHA y el testigo. Cabe señalar que en todos los casos, la actividad de los insectos tratados con el hongo entomopatógeno disminuyó notablemente a partir del 3^{er} dpi, lo cual posiblemente se relacionó con el inicio del proceso infectivo del patógeno. Los aislados Bb37 y Bb40 se seleccionaron para realizar los ensayos de la segunda etapa experimental, debido a que ambos redujeron significativamente la sobrevivencia de los adultos de *E. varivestis* comparados con el testigo y la cepa comercial a partir del 5^{to} dpi. El aislado Bb38, aunque causó un nivel de reducción de sobrevivencia similar al Bb37 y Bb40, no se consideró para la siguiente etapa debido a que proviene del mismo hospedero que Bb40 (larvas de *Phyllophaga* sp.), posiblemente esto reflejó su comportamiento muy similar al aislado Bb40 (Figura 2).

Cuadro 3. Comparación de razón de riesgo entre aislados de *B. bassiana* aplicados *in vivo* sobre adultos de *E. varivestis*.

Coparación y Límites de Confianza para la Razón de Riesgo entre Tratamientos				
Tratamientos	Valor de Probabilidad	Significancia	Límites de Confianza (95% Confiabilidad)	
	Pr(> z)		Inferior	Superior
Bb37 vs Testigo	5.11E-09	***	2.46027	6.10390
Bb38 vs Testigo	2.44E-05	***	1.71890	4.39697
Bb40 vs Testigo	1.93E-08	***	2.33704	5.80498
Cepa GHA vs Testigo	4.08E-01	n.s.	0.44137	1.39412
Bb45 vs Testigo	2.20E-02	n.s.	1.08598	2.88902
Bb38 vs Bb37	6.22E-02	n.s.	0.49455	1.01765
Bb40 vs Bb37	7.70E-01	n.s.	0.67646	1.33547
Cepa GHA vs Bb37	1.93E-10	***	0.12379	0.33100
Bb45 vs Bb37	7.27E-05	***	0.31046	0.67294
Bb40 vs Bb38	1.13E-01	n.s.	0.93305	1.92379
Cepa GHA vs Bb38	1.18E-06	***	0.17206	0.47317
Bb45 vs Bb38	3.34E-02	n.s.	0.42971	0.96604
Cepa GHA vs Bb40	7.38E-10	***	0.13017	0.34843
Bb45 vs Bb40	2.14E-04	***	0.32638	0.70856
Bb45 vs Cepa GHA	2.31E-03	**	1.33709	3.81334

Significancia "*** = 0.001", "** = 0.01", "* = 0.05", "n.s. = no significativo".

8.2. Experimento 2. El análisis indicó que tanto en larvas como en adultos no se observaron diferencias significativas entre las repeticiones realizadas con Bb37 y Bb40 ($P > 0.001$, para todos los casos). Las diferencias entre las pendientes de cada grupo de datos indicaron que la virulencia de ambos aislamientos fue estadísticamente similar tanto para larvas como para adultos, lo anterior debido a que las ordenadas al origen ($F_{1,36} = 0.03$, $P = 0.865$ para adultos; $F_{1,36} = 0.22$, $P = 0.641$ para larvas) y las pendientes de las líneas de regresión ($F_{1,36} = 0.05$, $P = 0.824$ para adultos; $F_{1,36} = 0.56$, $P = 0.461$ para larvas) no difirieron significativamente (Cuadro 4). La sobrevivencia de los adultos y larvas de tercer estadio de *E. varivestis* fue menor a medida que se incrementó la dosis de inóculo aplicado (1×10^5 a 1×10^9 conidios viables/mL) con ambos aislados, con los cuales se obtuvo un rango de mortalidad de 17.5 a 87.5 % y de 30 a 88.3 % para adultos y larvas tratados con Bb37 y un rango de mortalidad de 30.8 a 98.3 % y 27.7 a 94.1 % para adultos y larvas tratados con Bb40, respectivamente (Figura 3). Al igual que los valores de las CL_{50} s, no se observaron diferencias significativas entre los valores del TMM calculados para las larvas de tercer estadio y los adultos tratados con Bb37 y Bb40 (Figura 4).

8.3. Experimento 3. Cuando ambos estados de desarrollo se trataron con cada aislamiento, los valores del TMM fueron significativamente menores para las larvas (87 y 100 h) comparados con los adultos (130 y 134 h, para Bb37 y Bb40 respectivamente) (Figura 5).

Cuadro 4. Análisis Probit para dos aislamientos nativos de *B. bassiana* contra larvas de tercer estadio y adultos *E. varivestis*.

Estado de desarrollo	Aislamiento	Concentración Letal CL_{50} (con/ml)	Límites de Confianza (L.C. a 95 %)
Larvas de tercer estadio	Bb37	2.32×10^6	$8.85 \times 10^5 - 5.61 \times 10^6$
	Bb40	3.13×10^6	$1.22 \times 10^6 - 7.54 \times 10^6$
Adultos	Bb37	1.16×10^7	$4.2 \times 10^6 - 3.25 \times 10^7$
	Bb40	1.02×10^7	$3.69 \times 10^6 - 2.85 \times 10^7$

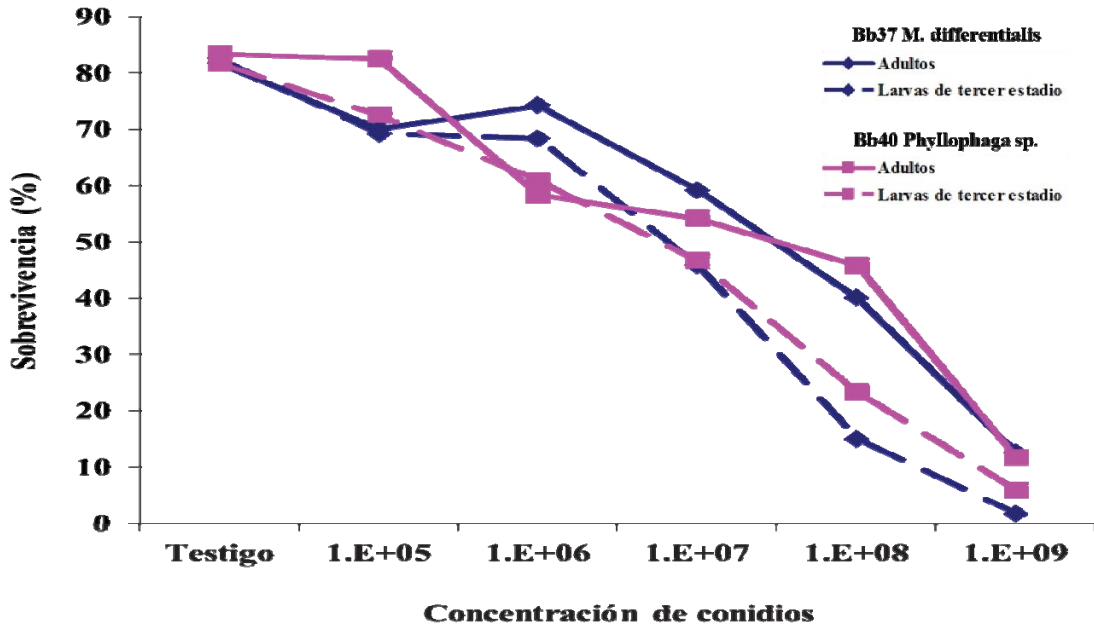


Figura 3. Supervivencia de adultos y larvas de tercer estadio de *E. varivestis* a la aplicación *in vivo* de diferentes concentraciones conidiales de aislamientos nativos de *B. bassiana* a 10 dpi.

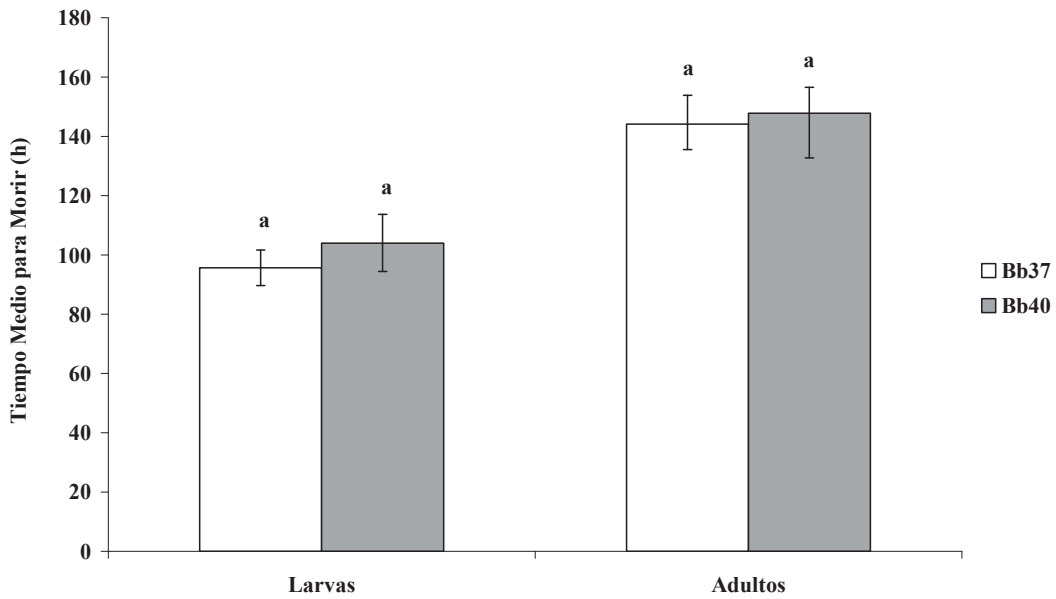


Figura 4. Tiempo Medio para Morir calculado para dos aislamientos nativos de *B. bassiana* aplicados sobre dos estados de desarrollo de *E. varivestis*. Columnas dentro de cada aislamiento con la misma letra no difieren significativamente (Análisis Weibull, $P < 0.05$). Las barras de error son intervalos a 95% de confianza.

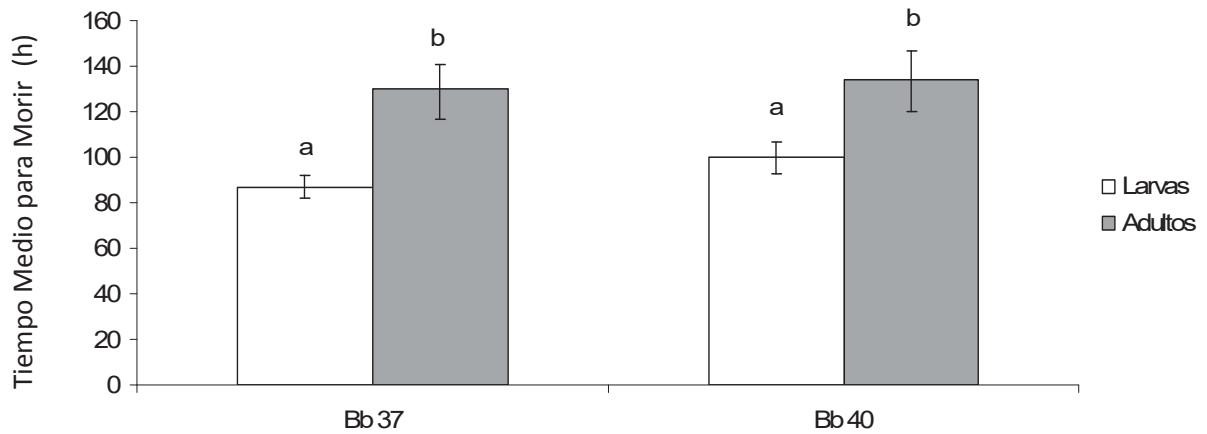


Figura 5. Tiempo Medio para Morir calculado para larvas de tercer estadio y adultos de *E. varivestis* expuestos a dos aislamientos nativos de *B. bassiana*. Columnas dentro de cada aislamiento con la misma letra no difieren significativamente (Análisis Weibull, $P < 0.05$). Las barras de error son intervalos a 95% de confianza.

IX. DISCUSIÓN

El empleo de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga se ha realizado de manera exitosa a nivel mundial (Liu y Bauer 2006, Lord 2007, Sabbahi *et al.* 2008). Sin embargo, el grado de virulencia de éstos patógenos puede depender de varios factores como el origen de los aislados o fuentes de inóculo inóculo y la variación entre las propias especies de insectos blanco. Otros factores que pueden alterar la respuesta de los insectos a los hongos son la concentración aplicada y el método de aplicación (España 2000, Behle *et al.* 2006). Además, pequeñas diferencias en las condiciones ambientales y geográficas pueden tener también efectos sobre la virulencia de los hongos entomopatógenos (James *et al.* 1998, Ceryngier 2000). En el presente estudio, los adultos de *E. varivestis* fueron muy poco susceptibles a la cepa comercial de *B. bassiana* (GHA), en contraste tres de los cuatro aislamientos nativos (Bb37, Bb38 y Bb40) afectaron negativamente la sobrevivencia del insecto a través del tiempo en comparación con la cepa GHA y el testigo. Estas diferencias en la virulencia entre aislamientos nativos y exóticos de *B. bassiana*, puede deberse a que los primeros están mejor adaptados para infectar a las especies de la misma región o área geográfica como lo reportan Cottrell y Shapiro-Ilan (2008) y puede ser el caso para la especie nativa de México, *E. varivestis*.

Al igual que en el presente estudio, otros autores han observado poca actividad de la cepa GHA en especies de coccinélidos *O. v-nigrum*, *H. axyridis* e *H. convergens* en condiciones de laboratorio (Cottrell y Shapiro-Ilan 2003), aunque todos estos son insectos depredadores. En contraste, las especies depredadoras *A. bipunctata*, *C. septempunctata*, *C. maculata* y *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) fueron altamente susceptibles al producto comercial BotanicGard® (cepa GHA) a una concentración de 1×10^9 con/mL (Roy *et al.* 2008, Smith y Krischik 2000).

En este estudio, el aislamiento nativo Bb45 también afectó a los adultos de *E. varivestis*, pero no logró competir con dos de los aislamientos evaluados (Bb37 y Bb40). Estas diferencias en la actividad entre aislamientos nativos de *B. bassiana* coincide con otros autores. España (2000) evaluó la susceptibilidad de larvas y adultos de *E. varivestis* hacia

cuatro aislamientos de *B. bassiana* procedentes de diferentes hospederos y sitios geográficos de México. El autor observó que el porcentaje de mortalidad varió entre 46 y 58 % para tres aislamientos, cuyos hospederos de origen fueron en su mayoría de otros coleópteros; el porcentaje de mortalidad más alto (76 %) fue provocado por un aislamiento obtenido de *Diabrotica* sp. (Chrysomelidae), valor que coincide con la mortalidad observada en este estudio para Bb37 (74 %) y Bb40 (64 %) a los 10 dpi. Gindin *et al.* (2009) también observaron variaciones en la virulencia entre aislamientos de *B. bassiana* procedentes de diferentes hospederos y origen geográfico hacia larvas y adultos del coleóptero *Alphitobius diaperinus* Panzer (Tenebrionidae), uno de los insectos más problemáticos en las granjas de producción de pollo de engorda en Israel. La mortalidad causada por *B. bassiana* alcanzó hasta del 75% en la etapa larval del insecto. Al igual que en este estudio, los autores observaron que algunos aislamientos mostraron una mayor actividad insecticida hacia el insecto bajo estudio.

Tafoya *et al.* (2004) en un estudio realizado en México para el control del picudo del nopal *M. spinolae*, también encontraron una mayor actividad insecticida de un aislamiento de *B. bassiana* nativo respecto a otro procedente de Ecuador, aún cuando ambos aislamientos se obtuvieron de la misma especie de insecto hospedero. En otros estudios con los coleópteros, tales como el picudo blanco del pino, *Pissodes strobi* Peck (Curculionidae) (Trudel *et al.* 2007), la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Bethylidae) (González *et al.* 2001) y las catarinas *C. maculata*, *Propylea quatuordecimpunctata* (L.) y *A. bipunctata* (Todorova *et al.* 2000, Bazzocchi *et al.* 2004), también se han registrado variaciones en la susceptibilidad hacia diferentes aislamientos de *B. bassiana*.

En el presente trabajo se encontró que los valores de las CL₅₀s calculados para los aislamientos Bb37 y Bb40 no difirieron en ninguno de los estados de desarrollo de *E. varivestis* evaluados (larvas de tercer estadio y adultos). James y Lighthart (1994) reportaron una situación similar en larvas de *H. convergens* expuestas a dos aislamientos de *B. bassiana* (ARSEF 2883 y ARSEF 252), en donde los valores de las CL₅₀s fueron iguales cuando los insectos se trataron mediante el método por inmersión. En nuestro caso, los resultados indican que los aislamientos de *B. bassiana* procedentes de distintos hospederos pueden tener el mismo potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de *E. varivestis*.

Además, aunque en nuestro estudio los bioensayos no se diseñaron con la finalidad de comparar la susceptibilidad entre larvas y adultos tratados con un mismo aislamiento (Bb37 o Bb40), los valores de las CL_{50} s indicaron que las larvas de tercer estadio fueron más susceptibles que los adultos. Asimismo, España (2000) observó que los distintos estadios larvales de *E. varivestis* fueron más susceptibles que los adultos cuando los insectos se trataron con aislados nativos de *B. bassiana* procedentes de distintos hospederos.

Existen evidencias que la cutícula de los insectos influye en el proceso de la patogénesis (Butt *et al.* 1995), por lo tanto las diferencias en susceptibilidad entre distintos estados de desarrollo puede deberse al grado de esclerotización de la cutícula. Insectos de cuerpo blando (ej., áfidos), así como en la etapa larvaria de los coleópteros, la cutícula presenta una barrera más vulnerable a la infección comparada con la cutícula más esclerotizada de los adultos (Butt *et al.* 1995, Todorova *et al.* 2000). Por otro lado, estos resultados son importantes desde el punto de vista práctico, ya que una menor cantidad de inóculo podría afectar a estados de desarrollo muy voraces y vulnerables de *E. varivestis*, como es el caso de las larvas de tercer estadio (Pinto *et al.* 2002).

En otros estudios con coleópteros, los valores de las CL_{50} s han sido variables y diferentes a los obtenidos en el presente estudio. Por ejemplo, Cottrell y Shapiro-Ilan (2003) estimaron una CL_{50} de 2.5×10^5 conidios/mL de *B. bassiana* para adultos de *O. v-nigrum* tratados por inmersión con un aislado nativo; mientras que para *H. axyridis* una concentración de 3.9×10^8 conidios/mL no fue suficiente para causar el 50% de mortalidad del insecto. Un valor muy alto de la CL_{50} (3.48×10^{10} con/mL) se determinó para larvas de tercer estadio de *Diabrotica speciosa* Germar (Chrysomelidae) tratadas con el aislamiento de *B. bassiana* FHD13 procedente de *Maecolaspis bridarolli* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Consolo *et al.* 2003).

Como ya se señaló anteriormente, existen diferencias en la susceptibilidad hacia los hongos entomopatógenos entre insectos huéspedes y sus estados de desarrollo debido a una serie de factores relacionados con el ambiente y la logística de su aplicación (Behle *et al.* 2006, Liu y Bauer 2006, Gindin *et al.* 2009). Adicionalmente, existen evidencias de que la

variación en la virulencia de *B. bassiana* se puede relacionar con la producción y actividad enzimática durante la penetración en la cutícula del hospedero, la actividad enzimática del hongo durante los procesos de germinación de la espora, crecimiento de la hifa y penetración de ésta a la cutícula (Hajek y Leger 1994; Fan *et al.* 2007). Zimmermann (2007) señala que especies del género *Beauveria* producen enzimas proteolíticas, cuando se lleva a cabo la penetración del hongo se producen propágulos que se distribuyen y le permiten invadir otras partes del cuerpo de su hospedero y la producción de toxinas.

Los valores del TMM calculados para las larvas de tercer estadio y los adultos tratados con Bb37 y Bb40 no difirieron entre sí, aunque este parámetro sí varió cuando ambos estados de desarrollo se trataron con cada aislamiento, en donde las larvas de tercer estadio murieron (87-100 h) en un menor tiempo comparado con los adultos (130-134 h) (Figura 4). Estos resultados pueden indicar que ambos aislamientos tienen la misma capacidad para producir la enfermedad y, además, una mayor capacidad para causar daño a los órganos o tejidos de las larvas comparado con los adultos (Thomas y Elkinton 2004). Aunque los valores del TMM podrían compararse con el tiempo letal medio (TL₅₀) determinado en otros estudios, es importante señalar que en nuestro caso los individuos vivos se excluyeron. De acuerdo con Thomas y Elkinton (2004), las pruebas de virulencia son más certeras cuando los individuos vivos son excluidos, esto debido a que en muchos ensayos los sobrevivientes son aquellos que no fueron infectados.

Cottrell y Shapiro-Ilan (2003) reportan valores del TL₅₀ de 230, 180 y 130 h para adultos de *O. v-nigrum* tratados con *B. bassiana* mediante inmersión en soluciones fúngicas de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 con/mL, respectivamente. El último valor coincide con el TMM estimado para los adultos de *E. varivestis* (130 – 134 h) tratados con Bb37 y Bb40, pero la concentración utilizada en esta investigación fue 10 veces mayor que la concentración más alta utilizada para *O. v-nigrum*. En otro estudio con larvas de *E. varivestis* tratadas con aislados de *B. bassiana* se observó que el TL₅₀ se incrementó en la mayoría de los casos de una manera proporcional (de 139 a 401 h) a la edad de la larva (del primer al cuarto estadio) (España 2000). Estos valores en su mayoría fueron mayores a los observados en este estudio,

lo cual puede deberse a que se utilizó una concentración 100 veces mayor que la utilizada por España (2000) (1×10^7 con/mL).

Los hongos entomopatógenos forman parte del grupo de patógenos más comercializados para el control de plagas a nivel mundial, cuyos formulados han sido desarrollados mayoritariamente por empresas trasnacionales (Tamez-Guerra *et. al.* 2001). En el presente estudio, se demuestra que algunos aislamientos nativos de *B. bassiana* pueden ser una alternativa prometedora para el control de *E. varivestis*, pero se recomienda continuar con la realización de evaluaciones en laboratorio de los aislamientos Bb37 y Bb40 sobre otras etapas de desarrollo de *E. varivestis*, debido a que en pruebas preliminares (datos no mostrados) se ha observado una disminución en la eclosión de huevecillos y en la emergencia de adultos provenientes de pupas tratadas con ambos aislamientos, lo que sugiere que podría ser un factor importante en la reducción de la población del insecto. También se recomienda que estos resultados sean validados en condiciones de campo debido a la variación que se puede esperar por las condiciones ambientales y los métodos de aplicación. Además, está ampliamente documentado que para tener un mayor impacto sobre las poblaciones de insectos plaga, los hongos entomopatógenos deben de ser empleados bajo varias estrategias enmarcadas en un contexto de manejo integrado de plagas.

X. CONCLUSIONES

- ❖ En condiciones de laboratorio, tres de los cuatro aislamientos nativos de *B. bassiana* (Bb37, Bb38 y Bb40) evaluados mostraron una mayor actividad insecticida hacia los adultos de *E. varivestis* respecto a la cepa comercial GHA.
- ❖ Los aislamientos Bb37 y Bb40 mostraron igual actividad sobre larvas y adultos de *E. varivestis*, aunado a ello se observó que el tiempo medio requerido para provocar la mortalidad en los insectos fue menor en las larvas comparado con los adultos.
- ❖ Con base a los resultados observados, se concluye que los aislamientos nativos de *B. bassiana* puede ser una mejor y viable alternativa para el manejo de las poblaciones de *E. varivestis*, especialmente durante sus etapas larvales. Sin embargo, es necesario continuar investigando sobre la actividad de estos aislamientos en condiciones de laboratorio y campo con el objetivo de determinar sus efectos en otros estados de desarrollo, las condiciones idóneas de su aplicación, su persistencia, efectos sobre los insectos no blancos y la compatibilidad con otros métodos de control.

XI. LITERATURA

Acosta, G. J. A., R. Rosales S., R. Navarrete M. y E. López S. 2000. **Desarrollo de variedades mejoradas de frijol para condiciones de riego y temporal en México.** *Agricultura Técnica en México* 26 (1): 79-98.

Aitkin, M., D. Anderson, B. Francis and J. Hinde. 1989. **Statistical Modelling in GLIM.** Oxford Sci. Pubs., Oxford, UK.

Akbar, W., J. C. Lord, J. R. Nechols y T. M. Loughin. 2005. **Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers.** *Journal of Economic Entomology* 98 (3): 683-688.

Alatorre, R. R. 2007. **Hongos entomopatógenos.** *En: Teoría y aplicación del control biológico.* Eds. Rodríguez del Bosque L. A. y Arredondo B. H. C. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.

Amarasekare, K. G. y J. V. Edelson. 2004. **Effect of temperature on efficacy of insecticides to differential grasshopper (Orthoptera: Acrididae).** *Journal of Economic Entomology* 97 (5): 1595-1602.

Anónimo, 2008. **Informes anuales de las campañas fitosanitarias.** Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato. s/p.

Arthropod Pesticides Resistance Database USDA.

<http://www.pesticideresistance.org/search/12/0/547/0/> (Accesada en Junio, 2010).

Attygalle, A. B.; K. D. McCormick, C. L. Blankespoor, T. Eisner, y J. Meinwald. 1993. **Azamacrolides: A family of alkaloids from the pupal defensive secretion of a ladybird beetle (*Epilachna varivestis*).** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 5204-5208.

Attygalle, A. B.; C. L. Blankespoor, T. Eisner, y J. Meinwald. 1994. **Biosynthesis of a defensive insect alkaloid: Epilachnene from oleic acid and serine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 12790-12793.

Badii, M. H., L. O. Tejada, A. E. Flores, C. E. López, C. E. Ruíz y H. Quiroz. 2000. **Historia, fundamentos e importancia del control biológico.** *En: Fundamentos y perspectivas del control biológico.* Eds. Badii M. H., Flores A. E. y Galán W. L. J. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Barbercheck, M. E. y H. K. Kaya. 1990. **Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*.** *Journal of Invertebrate Pathology* 55: 225-234.

Barrigossi, J. A. F., G. L. Hein y L. G. Higley. 2001a. **Life tables and larval dispersal of Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinelidae) on dry bean in the high plains.** *Environmental Entomology* 30 (2): 235-243.

Barrigossi, J. A., L. J. Young, C. A. Gotway, G. L. Hein y L.G. Higley 2001b. **Spatial and probability distribution of Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinelidae) eggs mass populations in dry bean.** *Environmental Entomology* 30 (2): 244-253.

Barrigossi, J. A. F., G. L. Hein y L. G. Higley. 2003. **Economic injury levels and sequential sampling plans for Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinelidae) on dry bean. Field and forage crops.** *Journal of Economic Entomology* 96 (4): 1160-1167.

Bazzocchi, G. G., A. Lanzoni, G. Accinelli, A. Burgio. 2004. **Overwintering, phenology and fecundity of *Harmonia axyridis* in comparison with native coccinellid species in Italy.** *BioControl* 49:245-260.

Behle, R. W., C. García G., P. Tamez-Guerra., M. R. McGuire y M. A. Jackson. 2006. **Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant.** *Southwestern Entomologist* 31 (4): 289-295.

- Bernhardt, J. L. y M. Shepard. 1978. **Overwintered Mexican Bean Beetles: Emergence from overwintering sites, fecundity, fertility, and longevity.** *Annals of the Entomological Society of America* 71: 724-727.
- Biddle, A. J., S. H. Hutchins y J. A. Wightman. 1992. **Pests of legummous crops.** *En: Vegetable Crop Pests.* Eds. Mckinlay P. G. Macmillan Press. London.
- Bing, L. A. y L. C. Lewis. 1991. **Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.** *Environmental Entomology* 20 (4): 1207-1211.
- Bruck, J. D. y L. C. Lewis. 2001. **Adult *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) infection at emergence with indigenous *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes).** *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 288-289.
- Butt, T. M., L. Ibrahim, S. J. Clark y A. Beckett. 1995. **The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles.** *Mycological Research* 99 (8): 945-950.
- Camarano, S., A. González y C. Rossini. 2009. **Biparental endowment of endogenous defensive alkaloids in *Epilachna paenulata*.** *Journal of Chemical Ecology* 35: 1-7.
- Ceryngier, P. 2000. **Overwinter of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) at different altitudes in the Karkonosze Mts, SW Poland.** *European Journal of Entomology* 97: 323-328.
- Consolo, V. F., G. L. Salerno y C. M. Berón. 2003. **Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*.** *BioControl* 48: 705–712
- Cottrell, T. E. y D. I. Shapiro-Ilan. 2003. **Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*.** *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 137–144.

Cottrell, T. E. y D. I. Shapiro-Ilan. 2008. **Susceptibility of endemic and exotic North American Ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic fungal entomopathogens.** *European Journal of Entomology* 105: 455-460.

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

Dhaliwal, G. S., O. Koul y R. Arora. 2004. **Integrated pest management: retrospect and prospect.** *En: Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges.* Eds. O. Kuol., G. S. Dhaliwal y G. W. Cuperus. CAB International.

Economic Research Service USDA. <http://www.ers.usda.gov/> (Accesada en mayo de 2010)

España, L. M. P. 2000. **Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), y su virulencia sobre *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae).** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.

Fan, Y., E. Groden, M. Liebman y A. R. Alford. 1993. **Response of dry bean yield to injury by Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) in low-input and conventional cropping systems.** *Journal of Economic Entomology* 86: 1574-1578.

Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, M. J. Bidochka y Y. Pei. 2007. **Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase.** *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 295-302.

Faria, M. y S. P. Wraight. 2001. **Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi.** *Crop Protection* 20: 767-778.

Farrar, R. R. y R. L. Ridgway. 1998. **Quantifying time-mortality relationships for nuclear polyhedrosis viruses when survivors are present.** *Environmental Entomology* 27: 1289-1296.

- Fieller, E. C. 1944. **A fundamental formula in the statistics of biological assay, and some applications.** *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 17: 117-123.
- Feng, M. G., T. J. Poprawski y G. G. Khachatourians. 1994. **Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control.** *Current Status Review Biocontrol Science and Technology* 4: 3-34.
- Feng, M. G., B. Chen y S. H. Ying. 2004. **Trials of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* and imidacloprid for management of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown lettuce.** *Biocontrol Science and Technology* 14 (6): 531 - 544
- García, G. C., H. Medrano R., J. Morales C. y V. Hernández V. 1999. **Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae).** *Southwestern Entomologist* 24 (3): 255-260.
- García, G. C. y J. L. Carrillo S. 2006. **Procedimiento para retardar la emergencia de *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Hymenoptera: Eulophidae) y la actividad de *Epilachna varivestis* (Mulsant) en laboratorio.** *Folia Entomológica Mexicana* 45 (2): 219-220.
- Gindin, G., I. Glazer, A. Mishoutchenko y M. Samish. 2009. **Entomopathogenic fungi as a potential control agent against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* in broiler houses.** *BioControl* 54: 549-558.
- González, G. M. T., A. Valencia J., A. E. Bustillo P. 2001. **Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo.** *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)* 60: 31-35.
- Guerrero, R. E., M. J. Valdéz G., M. K. Byerly M. y B. J. A. Meza 1979. **El combate de la conchuela del frijol en Durango.** CEVAG-INIA-SARH. *Folleto Técnico*.
- Hajek, A. E. y R. J. St. Leger. 1994. **Interactions between fungal pathogens and insect host.** *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.

Hallsworth, J. E. y N. Magan. 1996. **Culture age, temperature, and pH affect the Polyol and Trehalose contents of fungal propagules.** *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2435-2442.

Ho, Wang-Ching y Wen-Hsiung Ko. 1997. **A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi.** *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38: 41-44.

Holder, D. J. y N. O. Keyhani. 2005. **Adhesion of the Entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata.** *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5260-5266.

Ibarra, E. J., M. A. Del Ricón C., E. Galindo, M. Patiño, L. Serrano, R. García, J. A. Carrillo, A. B. Pereyra, P. A. Alcázar, O. H. Luna, L. Galán W., L. Pardo, C. Muñoz G., I. Gómez, M. Soberón y A. Bravo. 2006. **Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos.** *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2): 113-120.

Jackson, M. A., Christopher A. Dunlap, S. T. Jaronski. 2010. **Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol.** *BioControl* 55:129-145.

James, R. R., B. A. Croft, B. T. Shaffer y B. Lighthart. 1998. **Impact of Temperature and Humidity on Host-Pathogen Interactions Between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid.** *Environmental Entomology* 27 (6): 1506-1513.

James, R. R., y B. Lighthart. 1994. **Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi.** *Environmental Entomology* 23 (1): 190-192.

Karam, M. A., G. Ramírez., L. P. Bustamante-Montes y J. M. Galván. 2004. **Plaguicidas y salud de la población.** *Ciencia Ergo Sum* 11 (3): 246-254.

Keller, S., P. Kessler y C. Schweizer. 2003. **Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*.** *BioControl* 48: 307-319.

Klinger, E., E. Groden y F. Drummond. 2006. ***Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado potatoe beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Environmetal Entomology* 35 (4): 992-1000.

Kogan, M. y S. G. Tumipseed. 1987. **Ecology and management of soybean arthropods.** *Annual Review of Entomology* 32:507-38.

Lacey, L. A., R. Frutos, K. H. Kaya y P. Vails. 2001. **Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?.** *Biological Control* 21: 230-248.

Lacey, L. A. y D. Shapiro-Ilan. 2003. **The potential role for microbial control of orchid insect pests in sustainable agriculture.** *Food, Agriculture and Environment* 1 (2): 326-331.

Lord, J. C. 2007. **Enhanced efficacy of *Beauveria bassiana* for Red Flour Beetle with reduced moisture.** *Journal of Economic Entomology* 100 (4): 1071- 1074.

Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station, 2005. **Análisis Probit de modelos paralelos GenStat Ver. 8.2.** (PC/Windows XP).

Liu, H. y Bauer L. S. 2006. **Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** *Journal of Economic Entomology* 99 (4): 1096-1103.

McPherson, R. M., J. R. Ruberson, R. D. Hudson y D. C. Jones. 1996. **Soybean maturity group and incidence of velvet bean caterpillars (Lepidoptera: Noctuidae) and Mexican bean beetles (Coleoptera: Coccinellidae).** *Journal of Economic Entomology* 89: 1601-1607.

Moino, A., S. Batista A., R. Biaggioni L., P. M. Oliveira J. N., R. M. Pereira y S. Aparecida V. 2002. **External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and**

***Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola* 59 (2): 267-273.**

Nayaranan, K. 2004. **Insect defense: its impact on microbial control of insect pest. *Current Science* 86 (6): 800-814.**

Nolting, S. P. y A. R. Edwards. 1989. **Yield response of soybeans to defoliation by the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Economic Entomology* 82 (4): 1212-1218.**

Numerical Algorithms Group. 1993. **The GLIM System: Release 4 Manual.** Clarendon Press, Oxford, UK.

Peña, G., J. Miranda R., G. De la Riva, L. Pardo L., M. Soberon y A. Bravo. 2006. **A *Bacillus thuringiensis* S-Layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1): 353-360.**

Pimentel, D. 2005. **Environmental and economic costs of the application of pesticides primary in the United States. *Environment Development Sustainability* 7: 229-252.**

Pinto, V. M., J. Vera G., L. L. Landois P. y J. L. Leyva V. 2002. **Simulación de la dinámica poblacional de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Muls., mediante un modelo fenológico de desarrollo acumulativo. *Agrociencia* 36 (1): 115-122.**

Pinto, V. M., P. O. Cruz C., S. Ramírez A., J. F. Solís A. y L. E. Castillo M. 2004. **Evaluación de alternativas para el manejo integrado de plagas del frijol ejotero en Chapingo, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (4): 385-389.**

Posada, F. J. y F. E. Vega. 2005. **A new method to evaluate the biocontrol potencial of single spore isoletes of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science*. 5 (37): 1-10.**

Poprawski, T. J., J. C. Legaspi y P. E. Parker. 1998. **Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae).** *Environmental Entomology* 27 (3): 785-795.

Pucheta, D. M., A. Flores M., S. Rodríguez N. y M. de la Torre. 2006. **Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos.** *Interciencia* 31 (12): 856-860.

Reinert, J. A., T. A. Knauf, S. J. Maranz y M. Bishr. 1999. **Effect of *Beauveria bassiana* fungus on the boxelder and red shouldered bugs (Hemiptera: Rhopalidae).** *Florida Entomologist* 82 (3): 469-474.

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

Roy, H. E., P. M. J. Brown, P. Rothery, R. L. Ware y M. E. N. Majerus. 2008. **Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellids: *Hamonía axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*.** *BioControl* 53: 265-276.

Sánchez-Arroyo, H. 2007. **Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis* Mulsant).** University of Florida. Publication number: EENY-15.

Sabbahi, R., A. Merzouki y C. Guertin. 2008. **Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiorgynchus ovatus*.** *Journal of Applied Entomology* 132 (2): 151-160.

Schaafsma, A. W. y G. R. Ablett. 1994. **Yield loss response of navy bean to partial or total defoliation.** *Journal of Production Agriculture*. 7 (2): 202-205.

Shipp, J. L., Y. Zhang, D. W. A. Hunt y F. Ferguson. 2003. **Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pest.** *Environmental Entomology* 32 (5): 1154-1163.

Shirai, Y. y K. Yara, 2001. **Potential distribution area of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Japan, estimated from its high-temperature tolerance.** *Applied Entomology and Zoology* 36 (4): 409–417.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. **Anuario estadístico de la producción agrícola.** <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventana.php?idLiga=1043&tipo=1> (Accesada en enero de 2009).

Smith, S. F. y V.A. Krischik. 2000. **Effects of biorational pesticides on four coccinellid species (Coleoptera: Coccinellidae) having potential as biological control agents in interiorscapes.** *Journal of Economic Entomology*. 93 (3):732-736.

Sosa, D. R. G., S. A. Batista, y M. M. Tigano. 1994. **Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp.** *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 29 (3): 401-409.

Stevens, R. E., A. L. Steinhauer y J. R. Coulson. 1975. **Suppression of mexican bean beetle on soybeans with annual inoculative releases od *Pediobius foveolatus*.** *Environmental Entomology* 4: 947-952.

Tafoya, F., M. Zuñiga-Delgadillo, R. Alatorre, J. Cibrian-Tovar, y D. Stanley. 2004. **Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the Cactus Weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions.** *Florida Entomologist* 87 (4): 533-536.

Tamez-Guerra, P., C. García G., H. Medrano R., L. J. Galán W. y C. F. Sandoval C. 1999. **Spray dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant.** *Southwestern Entomologist*. 24: 37 - 48.

Tamez-Guerra, P., L. J. Galán W., H. Medrano R., C. García G., C. Rodríguez P., R. A. Gómez F. y R. S. Tamez. 2001. **Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México.** *Ciencia UANL* 4 (2): 143-152.

Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. **Insect Pathology**. San Diego, CA: Academia Press, Inc.

Thomas, S. R y J. S. Elkinton. 2004. **Pathogenicity and virulence**. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 146-151.

Thompson, S. R., R. L. Brandenburg y J. J. Arends. 2006. **Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass**. *Biological Control* 39: 401-407.

Throne, J. E. y J. C. Lord. 2004. **Control of Sawtoothed grain beetles (Coleoptera: Silvanidae) in stored oats by using an entomopathogenic fungus a conjunction with seed resistance**. *Journal of Economic Entomology* 97 (5): 1765-1771.

Todorova, S. I., D. Coderre J. y C. Côté. 2000. **Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolates toward *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) and their predator *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera : Coccinellidae)**. *Phytoprotection* 81 (1): 15-22.

Trudel, R., R. Lavallée, C. Guertin, C. Côté, S. I. Todorova, R. Alfaro and H. Kope. 2007. **Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the White Pine Weevil, *Pissodes strobe* (Coleoptera: Curculionidae)**. *Journal of Applied Entomology* 131 (2): 90-97.

Wagner, B. L. y L. C. Lewis. 2000. **Colonization of corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana***. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3468-3473.

Wraight, S. P. y M. E. Ramos. 2001. **Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata***. *Biological Control* 23: 164-178.

Wraight, S. P. y M. E. Ramos. 2005. **Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* based biopesticides applied against weld**

populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 139–150.

Van Driesche, G. y S. Bellows. 1996. **Biological Control.** Chapman & Hall. New York.

Vestergaard S, A. Cherry, S. Keller y M. Goettel. 2003. **Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents.** En: Hokkanen HMT, Hajek A. E., editors. **Environmental impacts of microbial insecticides.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Ying, S. H. y M. G. Feng. 2004. **Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents.** *Journal of Applied Microbiology* 97 (2): 323-331.

Zimmermann, G. 2007. **Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*.** *Biocontrol Science and Technology* 17 (6): 553-596.