



Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae)
Biocontrol capacity of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) in the control of aphids *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae)

Rojas-Gutiérrez René Leopoldo^{1*}, Loza-Murguía Manuel^{2,3}, VINO-NINA Lourdes¹, Serrano-Canaviri Teófilo¹

Datos del Artículo

¹Universidad Católica Boliviana San Pablo - UCBSA. Unidad Académica Campesina Tiahuanacu UAC-T. Ingeniería Agronómica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero. Tel +591-2-2895100. La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia.

²Universidad Católica Boliviana San Pablo - UCBSA. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP. Ingeniería Agronómica. Coroico-Nor Yungas-La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia. Tel +591(2)8781991.

³Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-DEI&BM. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP.

***Dirección de contacto:**

Unidad Académica Campesina Tiahuanacu UAC-T. Ingeniería Agronómica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero. Tel +591-71279117. La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia.

René Leopoldo Rojas-Gutiérrez
E-mail address:
renergy231@hotmail.com

Palabras clave:

Beauveria sp.
pulgones,
Metarhizium sp.
hongos nativos,
tiempo letal,
concentración letal.

***J. Selva Andina Res. Soc.*
2017; 8(1):48-68.**

Historial del artículo.

Recibido febrero, 2015.
Devuelto noviembre 2015
Aceptado noviembre, 2016.
Disponible en línea, febrero, 2017.

**Editado por:
*Selva Andina
Research Society***

Resumen

Con el interés de desarrollar tecnologías alternativas en el control de pulgones (*Macrosiphum euphorbiae*), se evaluó la capacidad biocontroladora de los hongos entomopatógenos *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*. Par el estudio se colectó hongos nativos de 3 partes del altiplano central (Achacachi, Viacha y Patacamaya), se aislaron de insectos momificados y purificaron en laboratorio, los aislados dieron como resultado hongos pertenecientes al género *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp. De estos aislados se sacó su concentración inicial y todos fueron ajustados a la mínima concentración presentada en uno de los aislados que fue de 9.5×10^4 conidios/mL con estas concentraciones se realizó la prueba de virulencia durante 144 h, los aislados 2BbVch, 1BbAch, 1MtAch y 3BbPtm produjeron más del 50% de mortalidad, indicando que los aislados del género *Beauveria* resultaron ser mejores. Con los aislados que demostraron mejor mortalidad se los sometió a una segunda prueba de la determinación del tiempo letal 50 y 80 (TI₅₀), (TI₈₀) en donde el aislado 2BbVch demostró un menor tiempo en controlar el 50 y 80% de afidos con 78.1 y 123.8 h respectivamente. Se determinó la concentración letal 50 y 80 (CI₅₀), (CI₈₀), en donde se pudo verificar que el aislado 2BbVch y 1BbAch requieren concentraciones mínimas de 2.5×10^4 y 5.1×10^4 conidios/mL, para controlar el 50% de pulgones y a una concentración de 1.3×10^5 y 1.8×10^5 conidios/mL para controlar 80% de pulgones.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Aiming to develop alternative technologies in controlling aphids (*Macrosiphum euphorbiae*), the biocontrol ability of entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* evaluated. Par study native fungi of 3 parts of the central highlands (Achacachi, Viacha and Patacamaya), which is isolated from the mummified insects and purified in the laboratory, the isolates were as fungi of the genus *Beauveria* result and *Metarhizium* were collected. Of these isolates its initial concentration was removed and all were adjusted to the minimum concentration lodged in one of the isolates was 9.5×10^4 conidia/mL at these concentrations the virulence test was performed for 144 hours, where isolated 2BbVch, 1BbAch, 3BbPtm 1MtAch and produced more than 50% mortality, indicating that the genus *Beauveria* isolates proved to be better. With isolates that demonstrated improved mortality were subjected to a second test determining the lethal time 50 and 80 (LT₅₀) (TL₈₀) where 2BbVch isolated showed a lower time control 50 and 80% with 78 aphids 1 and 123.8 hours respectively. 50 and the lethal concentration 80 (IC₅₀) was determined, (IC₈₀

Key words:

Beauveria sp.,
aphids,
Metarhizium sp.,
native fungi,
lethal time,
lethal concentration.

), where it was observed that the isolated 1BbAch 2BbVch and require minimal concentrations of 2.5×10^4 and 5.1×10^4 conidia/mL, to control 50% of aphids as a concentration of 1.3×10^5 to 1.8×10^5 conidia/mL for 80 % control of aphids.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

Los hongos entomopatógenos (HEP) tienen hospederos relativamente específicos con mínimo efecto en organismos benéficos, pueden ser compatibles con otros programas de manejo integrado de plagas, es conocido que tiene baja toxicidad en mamíferos, su reproducción no requiere alta tecnología de aquí que sea una alternativa viable para el uso en la agricultura (Ekesi 1999).

Los HEP constituyen actualmente una alternativa para el control de insectos transmisores de enfermedades, frente al uso indiscriminado de insecticidas (Pucheta *et al.* 2006). El interés por la investigación en América de los HEP ha sido enfatizado por Alves *et al.* 1986. En este sentido, se han reportado más de 750 especies de casi 100 géneros que pueden infectar insectos (Khachatourians 1996). *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Langenidium giganteum*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*, han sido utilizados comercialmente (Wraight *et al.* 1998). Los HEP inician el proceso de infección en los insectos cuando las esporas toman contacto con la superficie del integumento (Jones 1994) y no siempre ser ingeridos para que se realice el control (Carruthers & Hural 1990).

El contacto puede ocurrir a través de los espiráculos, partes bucales y membranas inter-tegumentales

(Kershaw & Talbot 1998). El tiempo para la colonización puede variar de 3 a 11 días dependiendo del

patógeno, del insecto y de las condiciones ambientales (Alves *et al.* 1986), la reproducción del patógeno ocurre entre las 48 y 60 h. Al consumir los nutrientes el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo todos los órganos del hospedero, finalmente las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada (Gillespie & Claydon 1989). A pesar que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger & Roberts 1997), los hongos desarrollan mecanismos que le permiten evitar las defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas (Khachatourians 1991, 1996).

Por lo expuesto, es necesario desarrollar métodos de control ecológicos u orgánicos como el control biológico, mediante trabajos de investigación con referente al control del pulgón (*Macrosiphum euphorbiae*) con HEP nativos, y establecer criterios alternativos para control de plagas en ambientes controlados, carpas solares o invernaderos, con lo que se pretende aminorar las pérdidas económicas existen-

tes debido a la proliferación de esta plaga en la actualidad, sin provocar daños al medio ambiente por ser un método de control ecológico, de ahí que el objetivo de la presente investigación fue, evaluar la capacidad biocontroladora de los hongos nativos (*Beauveria brongniartii* Sacc., y *Metarhizium anisopliae* Metsch.) sobre pulgón *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Localización. El presente trabajo de investigación se realizó en dos etapas, la primera etapa para la preparación de medios de cultivo, aislamiento, identificación, y formulación de concentraciones de hongos que se realizó en los laboratorios de la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu dependiente de la Universidad Católica Boliviana “San Pablo” ubicada a 72 km de la ciudad de La Paz carretera internacional La Paz-Desaguadero. En la segunda etapa que fue la fase experimental se realizó en la comunidad Copalacaya del municipio de Viacha, primera sección municipal de la provincia Ingavi, del departamento de La Paz ubicado en el altiplano central a 32 km, de la ciudad de La Paz y una eleva-

ción de 3877 msnm, la comunidad se encuentra situada entre los paralelos, 16°43'79" latitud sur, 68°17'48" latitud oeste.

Material biológico. Los hongos de interés se colectaron de insectos vivos y muertos dentro de cultivos como el de papa principalmente, de tres puntos del altiplano central. Los insectos de estudio, en este caso los pulgones se colectaron de las carpas solares de la granja de centro de rehabilitación Remar del municipio de Viacha ubicado a 3.5 km al este de la ciudad de Viacha.

Preparación de medios de cultivo. Se ha desinfectado el lugar de trabajo con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio al 6%, posteriormente se procedió al pesado del medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA) comercial Oxoid, en una balanza digital. Se pesó la cantidad requerida de acuerdo a la relación 500 g por 12.8 L de agua.

Se recolectaron hongos de tres zonas: Achacachi, Viacha y Patacamaya (Tabla 1), se identificaron áreas de cultivo, donde se buscó insectos muertos o momificados por algún tipo de hongo, procediéndose a la recolección del insecto con una pinza, se la llevo a un tubo de ensayo con medio de cultivo ADP, se codifico con lo siguiente: lugar de colecta, fecha y tipo de insecto encontrado.

Tabla 1 Sitios de recolección de las muestras de *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp.

Nº de colecta	Insecto hospedero original	Localidad	Ubicación geográfica	Código
1	<i>Premnotripes</i> spp.	Ayata Ajllata Provincia Omasuyos	16°01'26" S 68°46'59" O	1Bb
2	<i>Phyllophaga</i> spp.	Copalacaya Provincia Ingavi	16°43'47" S 68°17'47" O	2Bb
3	<i>Premnotripes</i> spp.	Patacamaya Provincia Aroma	17°12'36" S 67°55'02" O	3Bb
4	<i>Copitarsia</i> spp.	Ayata Ajllata Provincia Omasuyos	16°01'37" S 68°47'15" O	1Mt
5	<i>Premnotripes</i> spp.	Copalacaya Provincia Ingavi	16°42'10" S 68°16'36" O	2Mt
6	<i>Premnotripes</i> spp.	Patacamaya Provincia Aroma	17°13'29" S 67°54'26" O	3Mt

Los tubos con las muestras fueron llevadas al lugar de estudio en una caja de plastofom Tecnopor, las

muestras fueron incubadas a temperatura ambiente media de 12 °C por un lapso de 25 días hasta la

aparición de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) dentro del tubo.

Aislamiento del hongo. Después del desarrollo en ADP se procedió al aislamiento de la UFC's de acuerdo al color del medio y aspecto, con ayuda de un aza se tomó parte de la UFC's para su repique en otro medio de cultivo en tubos y cajas Petri estériles, se esperó su desarrollo a temperatura ambiente por 25 días hasta completo desarrollo, se realizaron varios repiques hasta obtener cultivos puros, (Castillo 2009).

Preparación de la muestras. Se realizó tinción con azul lactofenol (Cañedo & Ames 2004) que permite distinguir con facilidad las características morfológicas de los hongos en el microscopio, se cubrió con una gota de azul de lactofenol al centro del portaobjeto con el gotero, con ayuda de cinta adhesiva transparente se tocó a la colonia del hongo aislado e inmediatamente se pegó sobre la gota del colorante en el porta objeto para después observar al microscopio localizando con el objetivo de 10X, luego a 40X y por ultimo con el objetivo de 100X para poder observar la morfología típica del hongo.

La identificación de los hongos se la realizo de acuerdo a las características descritas por: (Mier *et al.* 2002) la caracterización macroscópica y microscópica, incluye color de colonia, aspecto, consistencia, superficie, velocidad de crecimiento, tamaño, hifas, conidios y células conidiogemas.

Preparación de soluciones. A los tubos con cultivos puros se llenó con salina fisiológica para desprender los conidios y suspenderlas, de cada muestra se extrajo 25 mL de suspensión y se llevó a un matraz erlenmeyer estéril, se la agito en el agitador magnético para la dispersión de las conidios en la suspensión. Una alícuota de 1 mL aproximadamente de la solución fue tomada con la ayuda de una micropipeta y se la llevo a una cámara Neubauer para el con-

teo de conidios, este procedimiento se la realizo para cada muestra de aislados hongos.

Recolección de insectos. En ambientes protegidos de dimensión 20 x 8 m, ubicados al este de la ciudad de Viacha perteneciente a la granja del centro de rehabilitación Remar, se pudo evidenciar la presencia de insectos plaga entre ellos los pulgones, que se encontraron en una carpa de cultivos asociados con lechuga, alfalfa, acelga, brócoli.

Para la recolección de los insectos se siguió el procedimiento descrito por Zanabria (2009) se fabricó un frasco colector por succión de insectos pequeños de cuerpo blando. Se procedió con la colecta de los plantines existentes dentro de la carpa, y luego los insectos colectados fueron llevados en frascos al lugar de estudio.

Los insectos colectados se llevaron a un estereomicroscopio para su identificación de acuerdo a las claves taxonómicas descritas por: Hermoso de Mendoza 1996, Cermeli 1970. quienes mencionan que para la identificación de insectos de la familia Aphididae se toma en cuenta la morfología externa, como la forma de la cabeza, tipo de antenas, tipo de patas forma de las alas y forma de los sifones en la cauda todo esto para llegar con exactitud con la especie.

Evaluación del porcentaje de mortalidad

Ajuste de la concentración. Todos los aislados fueron ajustados a la mínima concentración presentada en uno de los aislados después del lavado de las muestras y realizadas el conteo de conidias con la cámara Neubauer que fue de 9.5×10^4 conidios/mL.

Aplicación de la concentración. Con las suspensiones de conidios de concentración ajustadas se empapo en el papel toalla o absorbente con la ayuda de una micropipeta la cantidad de 2 mL en cajas Petri esterilizadas, se tomó como tratamiento los aislados

de hongos con tres repeticiones cada uno más el testigo con sus respectivas repeticiones.

Los insectos colectados previamente fueron desinfectados con hipoclorito de sodio comercial al 1%, se colocaron en un número de diez por caja para su respectiva evaluación Montalva (2008).

Etapas de evaluación. El tiempo de evaluación se realizó hasta el momento en que uno de los tratamientos o cualquiera de sus repeticiones mostrara el 100% de mortalidad de los pulgones sometidos a prueba, lo que dio un tiempo de 144 h, las observaciones de mortalidad fueron realizadas cada 12 h.

Determinación del porcentaje de mortalidad. La evaluación se realizó contando los insectos muertos, con la ayuda de una lupa se observaron las características descritas por Becerra (2010), quien menciona que un insecto muerto se identifica de acuerdo a la coloración del insecto con respecto a su color natural, del volteo y movilidad de las patas.

El porcentaje de mortalidad de los insectos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de insectos muertos}}{\text{Total de insectos}} \times 100$$

Determinación del tiempo letal medio. Con los resultados de la prueba anterior, se identificó a los aislados que presentaron mortalidad por encima de 50%, esto por demostrar su capacidad patogénica con respecto a los demás aislados.

Con el fin de determinar el tiempo de mortalidad que provoca cada concentración, se evaluó el tiempo letal 50 y 80 (TI₅₀) y (TI₈₀) que significa el tiempo que tarda en eliminar el 50 y 80% de la población expuesta de los áfidos.

Para este cometido se tomaron datos de las pruebas realizadas anteriormente en intervalos de tiempo de 12 h que fueron las siguientes: 0, 12, 42, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 h.

Los datos fueron sometidos a un análisis de regresión probit de una relación tiempo respuesta, para determinar el tiempo letal correspondiente.

Determinación de la concentración letal media.

Para esta prueba se realizaron diluciones seriadas con los aislados que presentaron más del 50% de mortalidad de pulgones en las pruebas realizadas previamente, a partir de una concentración inicial de 9.5×10^4 conidios/mL como se describe a continuación:

Las diluciones seriadas dieron como resultado las siguientes concentraciones: 9.5×10^4 conidios/mL., 9.5×10^3 conidios/mL. 9.5×10^2 conidios/mL. 95 conidios/mL.

Con estas concentración se realizó la prueba de mortalidad de pulgones en el mismo intervalo de tiempo realizadas en la prueba anterior de 0 hasta las 144 h, con intervalos de 12 h, la prueba se realizó en el tiempo en que la mortalidad de los pulgones llegó a más del 50% en las distintas concentraciones aplicadas esto con el fin de determinar cuál es la concentración letal para eliminar el 50 y el 80% de la población de áfidos expuestos.

Diseño experimental

Factores de estudio. El factor de estudio (variable independiente) fueron los diferentes aislados de hongos nativos.

Variables de respuesta. i) Descripción macroscópica (color, aspecto, superficie, pigmentación del hongo en el medio de cultivo) y descripción microscópica (forma de conidióforos, estructura), ii) Porcentaje de mortalidad de pulgones a las 144 horas. iii) Tiempo letal 50 y 80 (TI₅₀), (TI₈₀), iv) Concentración letal 50 y 80 (CI₅₀), (CI₈₀).

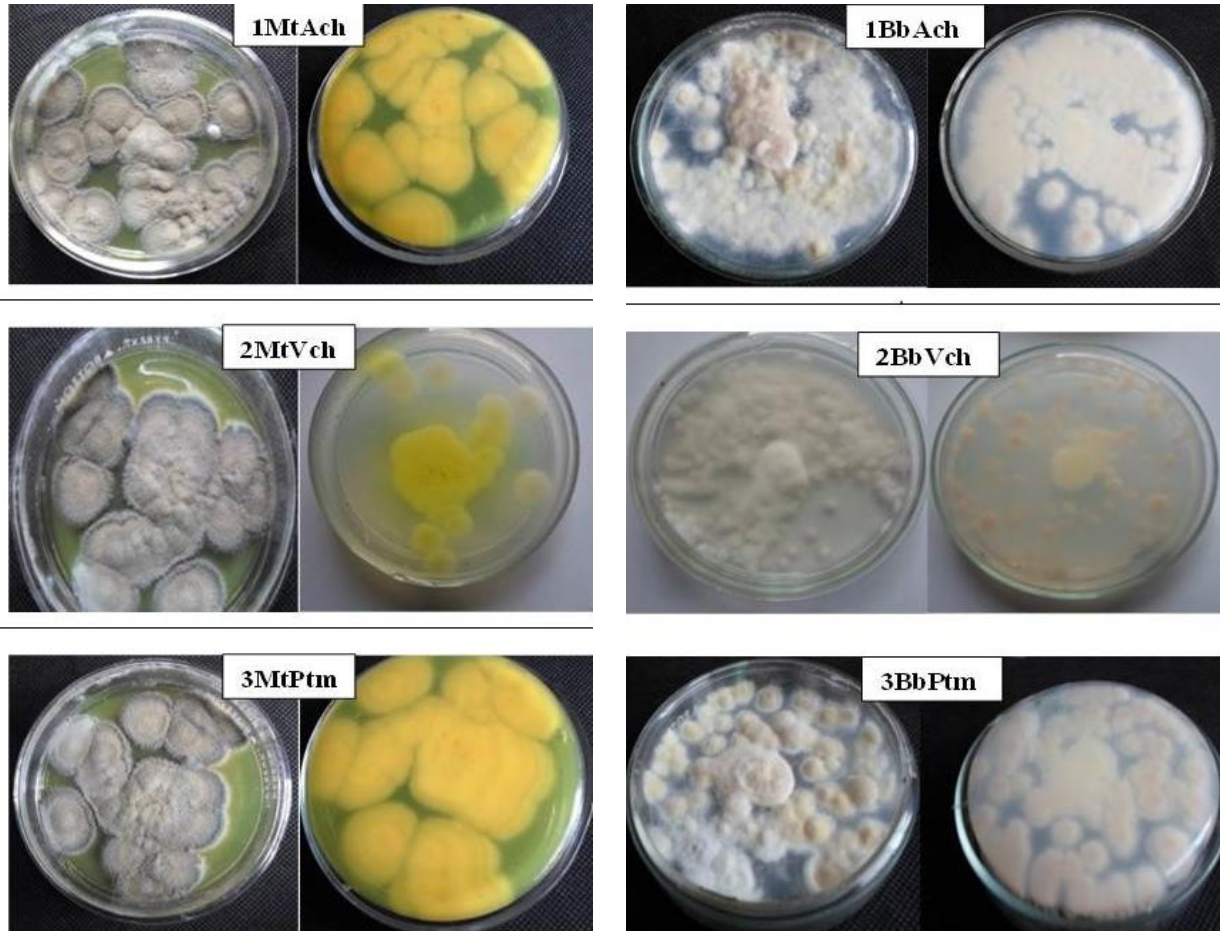
Los datos obtenidos en el presente trabajo previo a la evaluación del análisis estadístico fueron corregidos con la fórmula de (Abbott 1925) esto para des-

cartar otros factores que hayan provocado mortalidad, ajenos a los hongos.

$$MC = \left(\frac{\%Mortalidad - \%Mortalidad\ tetigo}{100 - \%Mortalidad\ tesigo} \right) \times 100$$

Identificación de aislados de hongos nativos del género Beauveria y Metarhizium

Figura 1 Características macroscópicas de aislados hongos entomopatógenos



Así mismo las datos corregidos, antes de realizar el análisis de varianza (ANVA) fueron transformados a una transformación angular para datos expresados en porcentaje según la fórmula: $\arcsen\sqrt{n}$ en donde n es el dato en porcentaje según Arteaga (2003). Para ambas evaluaciones tanto en el tiempo letal 50 y 80 (TI₅₀), (TI₈₀) y concentraciones letales 50 y 80 (CI₅₀), (CI₈₀) con los datos obtenidos fueron sometidos

a análisis de regresión probit de una relación dosis respuesta descrita por Castillo (2004). *Modelo estadístico.* Los resultados obtenidos, para su interpretación fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) con el diseño completamente al azar (DCA) utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.2 con un nivel de confianza de 95% con el siguiente modelo lineal Delgado-Callisaya (2013).

$$Y_{ij} = \mu + A_i + E_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = variable de respuesta (mortalidad de pulgones).

μ = Media general.

A_i = Efecto de la i - ésimo aislamiento.

E_{ij} = Error experimental.

Para la determinación tanto del tiempo letal como de la concentración letal los datos fueron sometidos a una evaluación de regresión probit de una relación

dosis respuesta con los respectivos límites de confianza con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS, centurión, XV.

Resultados

Figura 2 Características microscópicas de aislados de hongos entomopatógenos

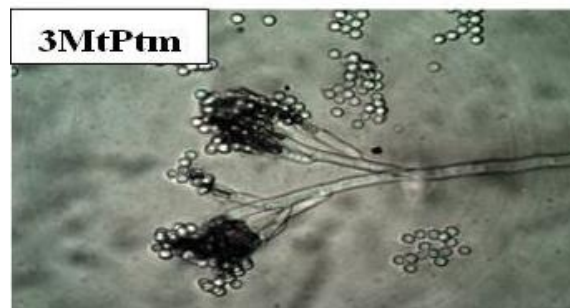
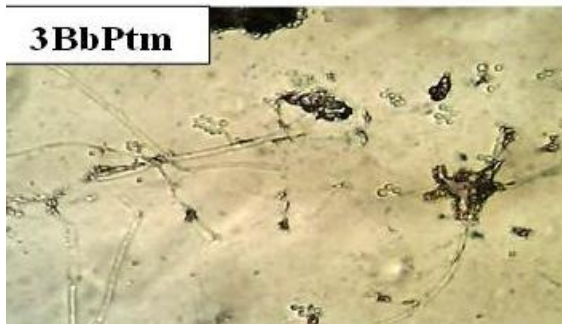
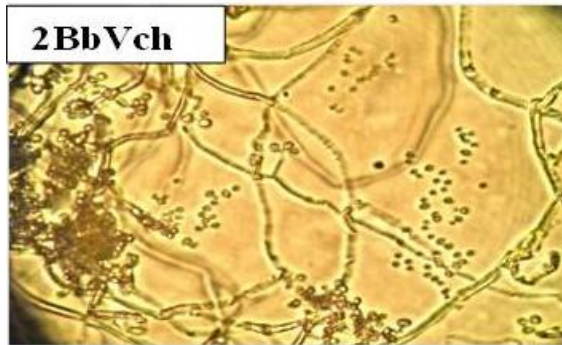
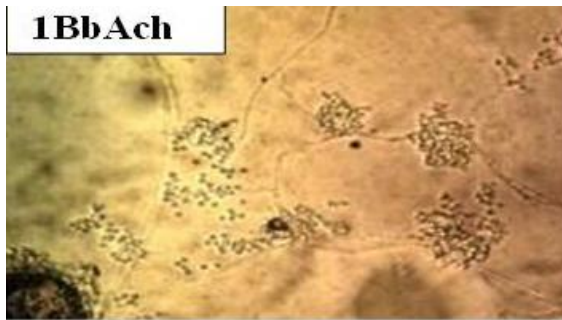


Tabla 2 Concentraciones iniciales de aislados de los hongos *Beauveria* y *Metarhizium*

Código	Concentración
1BbAch	1.25 x 10 ⁵ conidios/mL
2BbVch	9.5 x 10 ⁴ conidios/mL
3BbPtm	6.7 x 10 ⁵ conidios/mL
1MtAch	4.1 x 10 ⁵ conidios/mL
2MtVch	3.6 x 10 ⁵ conidios/mL
3MtPtm	1.16 x 10 ⁶ conidios/mL

Tabla 4 Análisis de medias Duncan de la mortalidad de los pulgones a efecto de los diferentes aislados de hongos nativos

Aislamientos	Promedio	Grupo Duncan
2BbVch	82.3	A
1BbAch	75.0	A
1MtAch	66.7	BA
3BbPtm	60.7	BAC
2MtVch	43.0	BC
3MtPtm	36.7	C

Tabla 3 Análisis de varianza de la virulencia de aislados de hongos nativos *B. brongniartii* y *M. anisopliae* en el control de pulgón *Macrosiphum euphorbiae*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Aislamiento	5	4796.944444	959.388889	5.62	0.0068
Error	12	2048.666667	170.722222		
Total corregido	17	6845.611111			

CV 21.5 %

Figura 3 Comparación de medias de la mortalidad de los pulgones a efecto de aislados nativos de *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

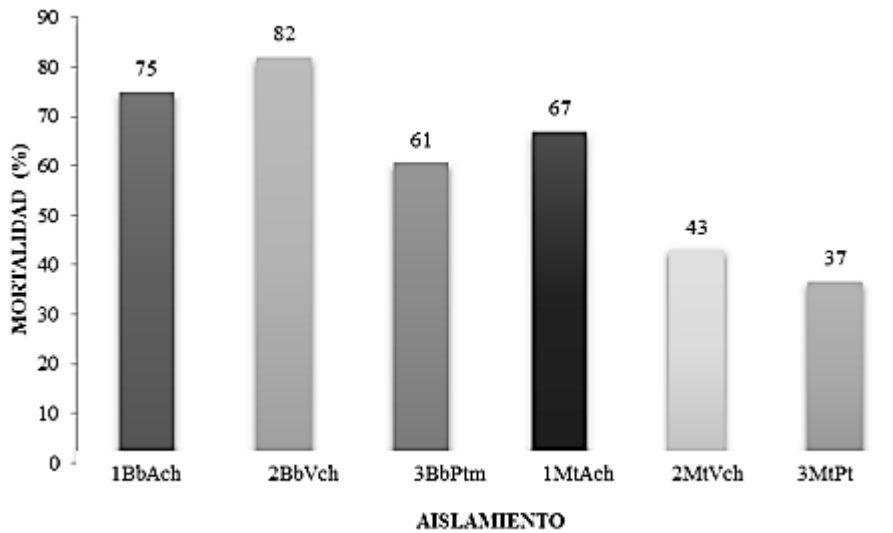


Tabla 5 Tiempo letal 50% de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

Aislado	Tl 50 (h)	Límites de confianza 95%		Ecuación de regresión
		inferior	Superior	
2BbVch	78.1	73.89	82.31	$Y = -1.436 + 0.018X$
1BbAch	90.3	86.10	94.80	$Y = -1.681 + 0.019X$
1MtAch	103.8	99.06	109.02	$Y = -1.844 + 0.018X$
3BbPtm	110.4	105.63	115.85	$Y = -2.043 + 0.018X$

Figura 4 Comparación de tiempos letales 50% de aislados de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

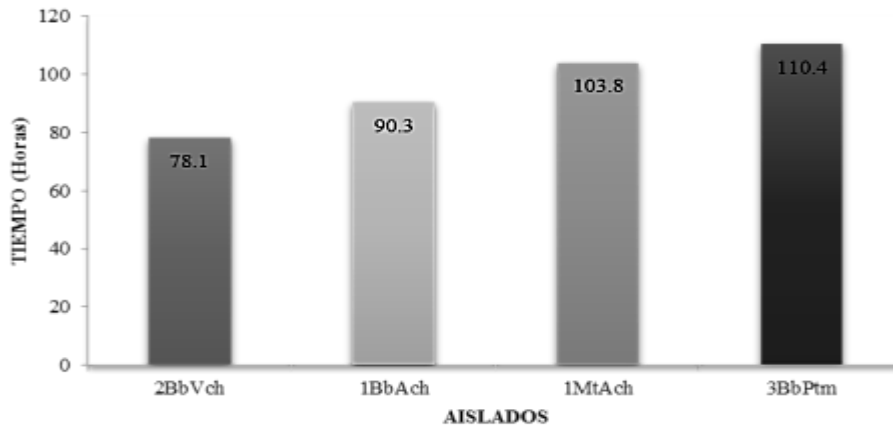


Tabla 6 Tiempo letal 80 Tl₈₀ de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

Aislado	Tl 80 (h)	Límites de confianza 95%		Ecuación de regresión
		inferior	Superior	
2BbVch	123.8	117.73	130.99	$Y = -1.436 + 0.018X$
1BbAch	135.6	128.94	143.43	$Y = -1.681 + 0.019X$
1MtAch	151.2	143.23	160.79	$Y = -1.844 + 0.018X$
3BbPtm	155.9	147.86	165.80	$Y = -2.043 + 0.018X$

Figura 5 Comparación de tiempos letales 80% de aislados de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

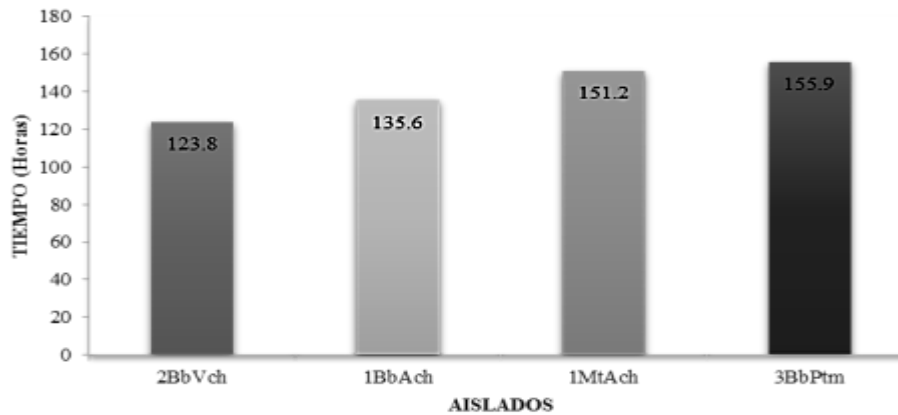


Figura 6 Análisis de regresión lineal probit que representa el tiempo letal 50 y 80 para el aislado 2BbVch

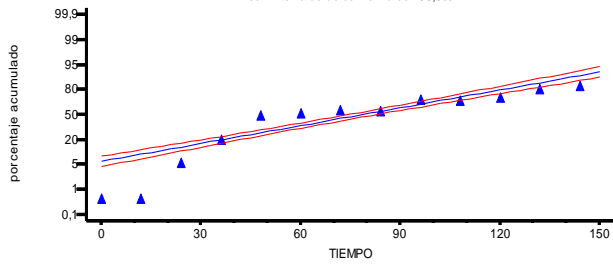


Figura 7 Análisis de regresión lineal probit que representa el tiempo letal 50 y 80 para el aislado 1BbAch

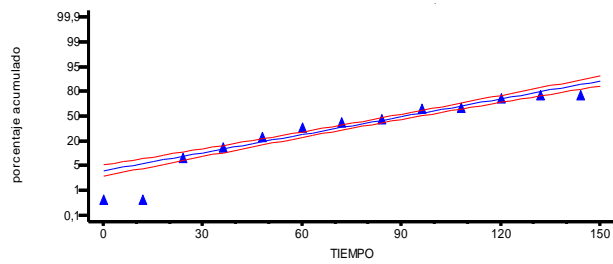


Figura 8 Análisis de regresión lineal probit que representa el tiempo letal 50 y 80 para el aislado 1MtAch

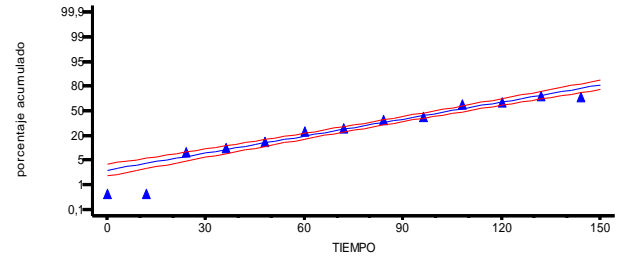


Figura 9 Análisis de regresión lineal probit que representa el tiempo letal 50 y 80 para el aislado 3BbPtm

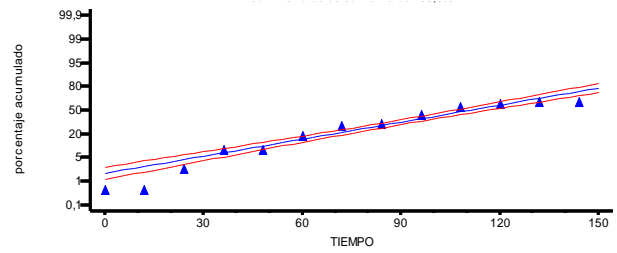


Tabla 7 Concentración letal 50% de la mortalidad de los pulgones a efecto de aislados de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

Especie	CL 50 (Conidias/mL)	Límites de confianza 95%		Ecuación de regresión
		inferior	Superior	
2BbVch	2.5×10^4	8111.2	43804.6	$Y = -0.19891 + 0.000008X$
1BbAch	5.1×10^4	30178.9	88762.8	$Y = -0.30952 + 0.000006X$
1MtAch	1.3×10^5	77251.1	2.1×10^6	$Y = -0.45136 + 0.000003X$
3BbPtm	1.2×10^5	77035.8	340665	$Y = -0.54802 + 0.000004X$

Figura 10 Comparación de concentraciones letales (CL_{50}) de aislados de hongos nativos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

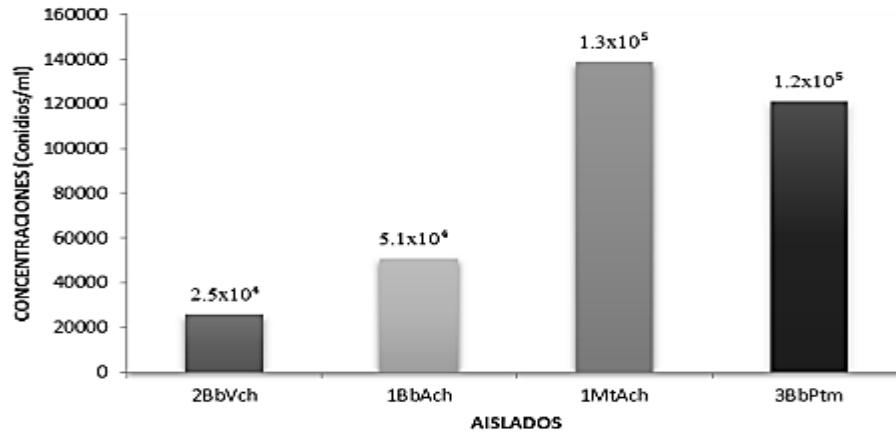


Tabla 8 Concentración letal 80% de la mortalidad de los pulgones a efecto de las especies de hongos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*

Especie	CL 80 (Conidios/mL)	Límites de confianza 95%		Ecuación de regresión
		inferior	Superior	
2BbVch	1.3×10^5	99605.9	216316	$Y = -0.19891 + 0.000008X$
1BbAch	1.8×10^5	131130	362985	$Y = -0.30952 + 0.000006X$
1MtAch	3.9×10^5	214151	1.1×10^7	$Y = -0.45136 + 0.000003X$
3BbPtm	3.1×10^5	190880	949458	$Y = -0.54802 + 0.000004X$

Figura 11 Comparación de concentraciones letales (CL_{80}) de aislados de hongos nativos *B. brongniartii* y *M. anisopliae*. En control de pulgones

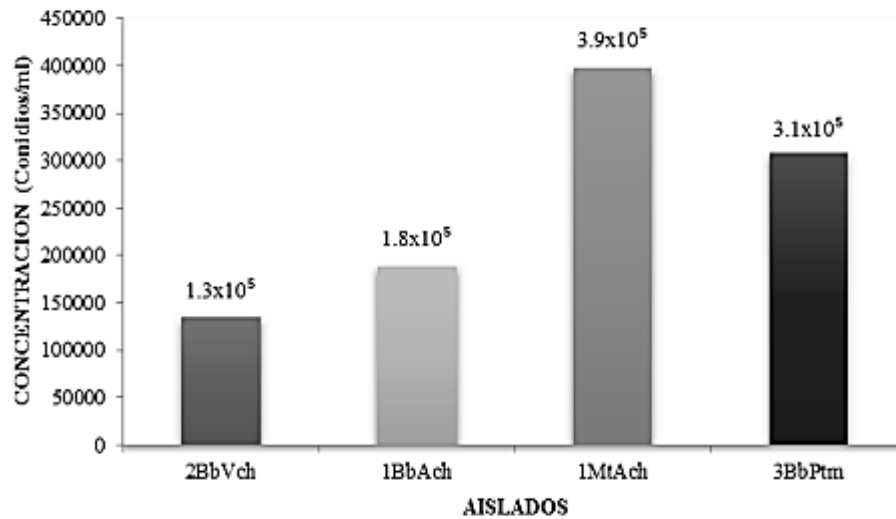


Figura 12 Análisis de regresión lineal probit que representa la concentración letal 50 y 80 para el aislado 2BbVch

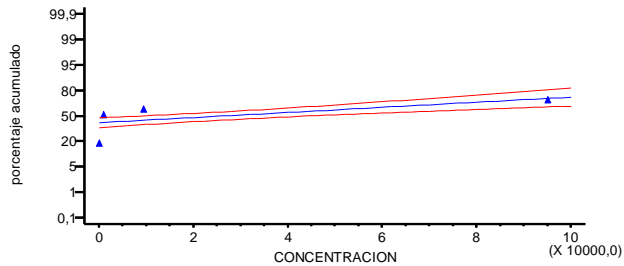


Figura 13 Análisis de regresión lineal probit que representa la concentración letal 50 y 80 para el aislado 1BbAch

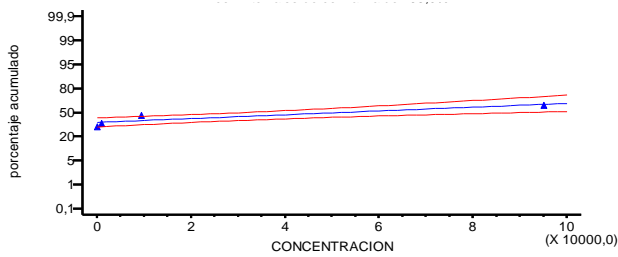


Figura 14 Análisis de regresión lineal probit que representa la concentración letal 50 y 80 para el aislado 1MtAch

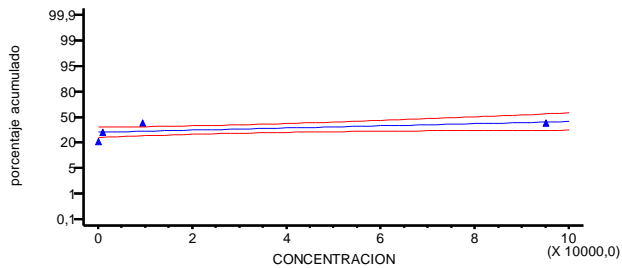
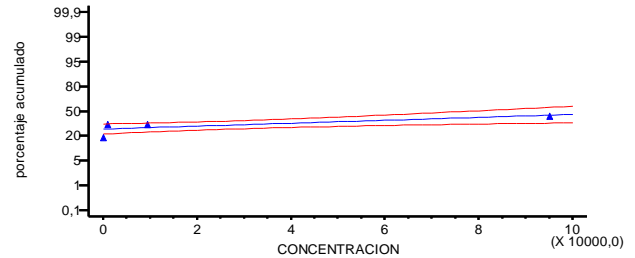


Figura 15 Análisis de regresión lineal probit que representa la concentración letal 50 y 80 para el aislado 3BbPtm



Discusión

Los aislamientos 1Bb, 2Bb, 3Bb, 1Mt, 2Mt y 3Mt, que desarrollaron en medio de cultivo ADP (bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente), las colonias pertenecientes al código Bb, presentaron colonias de color blanco crema de aspecto algodonoso pulverulento con superficie semi elevada de crecimiento moderado después de 20 días, que coincide con las características descritas por: Echevarría 2006, Hill & Allen (2000). Figura 1.

Las UFC's con código Mt presentaron color blanco crema al inicio de su desarrollo (formación de hifas), pero a medida que desarrollo el mismo se empezó a notar un cambio de coloración de blanco crema verde claro lo que indica, el desarrollo de conidias, el aspecto de las colonias es de coloración uniforme pulverulento de superficie semi-elevada, todo esto concuerda con lo descrito por: Pik-Kheng *et al.* 2009, Cano *et al.* 2004.

Ambos aislamientos de códigos Bb y Mt, presentaron pigmentación en el medio de cultivo, en los aislamientos de código Bb se presentó pigmentación de una coloración amarillo a un color rosa claro. En los aislamientos de código Mt la pigmentación fue de una coloración amarillo intenso característico de los hongos del genero *Metarhizium*.

Según Vargas 2003, las UFC's presentan pigmentación debido a la liberación de toxinas secretadas durante el crecimiento de las mismas, beuvericina en el caso de los hongos del genero *Beauveria*, y destruxinas en el caso de los hongos del genero *Metarhizium*, que serían causante de muerte de los insectos. Tabla 2.

La observación al microscopio, permiten identificar con más seguridad al género del hongo, en el caso de los aislamientos de código Bb a una objetivo de 40X observamos a conidios solitarios y en grupos ralos irregularmente denso también se puede observar la forma de conidióforos que forman racimos con hifas en zigzag en el ápice. Las conidias se producen en cada punto de flexión, los conidios tienen una base apicularmente estrecha que son hialinos y elipsoides característico de las hongos del genero *Beauveria*, descripción que coincide con lo que indica Luque 2011, Barnett & Hunter 1998. Figura 2.

Con imágenes del código Mt a un objetivo de 40X, podemos observar que la forma que presentan las células conidiogenas (fialidas), forma cilíndrica ápice redondeado o cónico y arreglado en densos himenios. Los conidióforos son ramificados repetidamente formando estructura semejante a un candelabro. Los conidios aceptados ovoides, formado cadenas usualmente arregladas en columnas prismáticas o cilíndricas o en masas solidas de cadenas paralelas, lo que concuerda con Cano *et al.* 2004, Cañedo & Ames 2004.

Cabe señalar que los resultados obtenidos bajo condiciones controladas, no pueden ser comparados con otras investigaciones similares debido a la escasa información que existe sobre afidos o pulgones controlados con hongos entomopatógenos de la especie en estudio. Sin embargo se han observado que existen estudios bajo condiciones de laboratorio

en otros cultivos y ordenes de ácaros y otros insectos de cuerpo blando, lo cual sirve como referencia comparativa para este trabajo.

Las concentraciones iniciales post lavado de aislados de hongos de medios de cultivo, se puede evidenciar, el aislado 2BbVch presenta menor concentración, de ahí que fueron ajustadas a 9.5×10^4 conidios/mL, para determinar la prueba de virulencia de diferentes aislados de hongos para el control de afidos. Tabla 2.

El análisis de varianza (ANVA) las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los aislados nativos de HEP, con coeficiente de variación 21.5 % que indica que hubo precisión en el ensayo por estar en el rango de aceptación y no presentar dispersión con respecto a la media. Tabla 3.

Los promedios de mortalidad de pulgones por efecto de los aislados de hongos nativos, y evidenciar 2BbVch de la localidad Viacha y 1BbAch de Achacachi correspondiendo al género *Beauveria* siendo estadísticamente similares en su capacidad de causar mortalidad de afidos con promedios de 82.3 y 75.0% respectivamente, el aislamiento 1MtAch de Achacachi del género *Metarhizium* con relativa inferioridad a las anteriores con promedio 66.7%, 3BbPtm de Patacamaya del género *Beauveria* presento valores inferiores estadísticamente con respecto a 2BbVch, 1BbAch y 1MtAch con 66.7% de mortalidad sobre pulgones, así mismo 2MtVch y 3MtPtm de Viacha y Patacamaya respectivamente, presentaron estadísticamente los valores más bajos de mortalidad, 43.0 para 2MtVch y 36.7% para 3MtPtm.

De acuerdo a los datos obtenidos los aislados de *Beauveria* la mortalidad fue considerable en pulgones y 1 aislado del genero *Metarhizium* causo mortalidad superior al 50% a las demás del mismo género. Tabla 4.

Humber (1991) señala que *Beauveria* como HEP es eficiente en el control de insectos de las familias Aphididae y Aleyrodidae. Con relación a *Metarhizium sp.*, Hall (1980), señala que este entomopatógeno es eficiente en el control de insectos del orden homoptera de las familias Aphididae y Cercopidae.

Becerra (2010) en un trabajo similar en la evaluación con formulaciones comerciales y aislados nativos de HEP en la mortalidad de pulgones de calabaza japonesa, halló una mortalidad de 63% a 5.25 días para ambas especies de hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, a diferencia del presente trabajo, se encontró que el hongo del género *Beauveria* fue superior a *Metarhizium*, esto puede deberse a que no se trató la misma especie de pulgón y que en el anterior trabajo se realizó las pruebas con afidos de género Mizus.

Por su parte Orduño-Cruz (2009) en estudio con aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de picudo del nopal, *B. bassiana* resultó ser más patogénica provocando mortalidad media de 61%, por su parte la especie *M. anisopliae*, resultó ser inferior en provocar mortalidad con 24 % con respecto a la otra especie de hongo, estos datos son relativamente similares a los resultados del presente trabajo.

Hernández-López (2010), en un trabajo realizado con diferentes aislados de hongos nativos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, para el control de larvas de gallina ciega sus resultados de los aislados del hongos pertenecientes al género *Beauveria* fueron superiores en mortalidad con relación a *Metarhizium*.

Cortes *et al.* (2010) utilizando cepas de *Beauveria bassiana*, con la finalidad de evaluar patogenicidad en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*, en condiciones de laboratorio, durante 16 días (384 h) las

mortalidades acumuladas fueron 68 y 93% a concentración 1×10^6 y 1×10^7 respectivamente, nuestros datos son relativamente similares.

De manera general la diferencia de virulencia de diferentes aislados de hongos puede estar relacionada en primer lugar por las dos especies diferentes de hongos con las que se trabajó, ya que cada especie libera diferentes tipos de enzimas y toxinas que tiene un comportamiento diferente frente a un hospedero. Segundo, existe entre aislados de una misma especie de HEP según Franco-Chávez *et al* (2012), esta diferencia puede deberse a las condiciones abióticas en que fueron descritas en todos los aislados y puede variar por la secreción de enzimas y toxinas al hospedero común, cuando un HEP desarrolla en condiciones abióticas favorables también tiene la capacidad de producir más toxinas.

El comportamiento que presentaron diferentes aislados, se puede evidenciar que *Beauveria* causó mortalidad superior a 50%, tan solo 1 aislado de *Metarhizium* causó mortalidad por encima del 50%, España-Luna (2000) menciona que los aislados que superan 50% de mortalidad en un insecto determinado, son hongos con valor patogénico considerable. Figura 3.

La diferencia de comportamiento entre aislados de hongos de un mismo género puede estar relacionada con su procedencia, o el tipo de hospedero en el que fue aislado, y no son similares, como se mencionó anteriormente, esto significa que hongos de una misma especie pero de diferentes colecciones tienen comportamiento diferente a una plaga en común. Ignofo (1992) asume que la diferencia de comportamiento entre aislados de hongos de una misma especie pero de diferentes procedencias, por factores abióticos como temperatura y humedad, a las que se aisló, los hongos del presente estudio aislados de Achacachi y Viacha causaron mayor morta-

lidad que los hongos de Patacamaya, se asume que esta diferencia de comportamiento esta relacionado por las condiciones de humedad en su aislamiento, en Patacamaya la humedad es menor que a las otras localidades.

De los aislamientos evaluados anteriormente, más del 50% de mortalidad corresponden a 1BbAch, 2BbVch, 3BbPtm y 1MtAch, se puede observar el resumen de análisis estadístico de regresiones probit de datos de tiempo letal 50% a efecto de aislados de hongos *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp., a concentración (9.5×10^4) con límites de confianza inferior y superior al 95% y la ecuación lineal en donde $Y =$ mortalidad/tamaño y $X =$ tiempo. Tabla 5.

De acuerdo a los análisis de regresión probit indica que el tiempo letal 50% pertenece al aislamiento 2BbVch por presentar 78.1 h (3.2 días) en controlar el 50% de la población expuesta de pulgones, al respecto a 1BbAch fue el segundo con 90.3 h (38 días) en controlar poblaciones expuestas de afidos, estos dos primeros aislados del genero *Beauveria*. Con respecto a el único aislado de hongo del genero *Metarhizium* presento un tiempo letal medio de 103.8 h (4.3 días) en controlar poblaciones de afidos, al respecto el aislamiento 3Bb en 110.4 h (4.6 días). Figura 4.

Con estos datos podemos indicar que aislados del genero *Beauveria* siguen siendo superiores en el control de afidos frente a aislados del genero *Metarhizium*, por su parte Kim *et al.* (2001) desarrollo un ensayo con HEP *L. lecanii*, *B. bassiana* y *Paecilomyces* spp. En la que *L. lecanii* fue más virulento contra pulgones *Aphis gossypii* provocando 100% de mortalidad con un tiempo TI_{50} de 2.7 días.

El análisis estadístico de regresiones probit de datos de tiempo letal 80% a efecto de aislados de hongos *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp., a una concentración (9.5×10^4) con límites de confianza inferior y

superior al 95% y ecuación lineal en donde $Y =$ mortalidad/tamaño y $X =$ tiempo. Tabla 6.

De acuerdo a los análisis de regresión probit, el tiempo letal 80% de 2Bb en 123.8 h (5.1 días) en controlar 80% de la población expuesta de pulgones, al respecto el aislamiento 1BbAch fue segundo con 135.6 h (5.6 días) en controlar poblaciones expuestas de afidos, estos dos primeros aislados del genero *Beauveria* sp. Con respecto a el único aislado de hongo del genero *Metarhizium* sp., presento 151.2 h (6.3 días) en controlar poblaciones de afidos, al respecto el aislamiento 3Bb con 155.9 h (6.5 días). Figura 5.

Con estos datos podemos mencionar que los aislados del genero *Beauveria* sp., siguen teniendo comportamiento superior en el control de afidos con respecto a aislados del genero *Metarhizium* sp., por su parte Mamani (2011) en un estudio realizado con dos aislados de hongos nativos de *Beauveria brongniartii* en el control de *Premnotrypes latithorax* encontró tiempos letales TI_{80} de 7.7 y 10.8 días, estos datos son superiores a los descritos en el presente estudio debido a que la especie de insecto evaluado no es el mismo, pero se utiliza como referencia ya que la especie de hongo evaluado es la misma.

En las figuras 6, 7, 8 y 9, el comportamiento de la línea de tendencia de la ecuación de la recta en donde la línea azul representa la línea de tendencia y el color rojo representa los límites de confianza al 95%, no presenta dispersión con relacion a la ecuación de la recta por lo que asumimos que no hay desviación excedida.

La línea de tendencia indica el comportamiento de cada aislado de forma ascendente, quiere decir que a medida que pasa el tiempo la mortalidad de los pulgones va incrementando.

De manera general las pruebas realizadas de tiempo letal 50 y 80 de aislados de hongos nativos de *Beauveria* sp., demuestran comportamiento superior a *Metarhizium* sp., valores de mortalidad menores en tiempo de control de los pulgones, lo que indica que *Beauveria* sp., además de presentar valor patogénico considerable tienen un menor tiempo en controlar poblaciones expuestas de áfidos o pulgones con respecto a hongos del género *Metarhizium* sp.

Becerra (2010) en un estudio similar con aislados de hongos nativos y formulaciones comerciales de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de pulgones de calabaza Japonesa *Myzus persicae*, que a un mismo tiempo ambas especies de hongos no presentan diferencias en comportamiento, es decir los hongos tienen un mismo grado de virulencia para controlar insectos plaga como pulgones, que no concuerda con los resultados del presente trabajo, puede deberse a que los aislados de hongos del género *Beauveria* sp., pertenecen a *Beauveria brongniartii*, que puede ser más virulento o patogénico que la especie *Beauveria bassiana*.

Para la evaluación de concentraciones letales CI_{50} y CI_{80} , a partir de concentración inicial de 9.5×10^4 conidios/mL se realizaron diluciones seriadas de 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000, el cual se inoculó a poblaciones de pulgones.

La evaluación se realizó en intervalos de tiempo de 12 h de 0 hasta 144, la toma de datos fue hecha en el momento en que los tratamientos presentaron medias de más del 50% de mortalidad lo que dio a horas 96.

En la tabla 7, el análisis estadístico de regresiones probit de datos de la concentración letal CI_{50} a efecto de dos especies de hongos *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp., con los respectivos límites de confianza inferior y superior al 95% y la ecuación lineal en donde $Y = 50\%$ y $X = \text{tiempo}$. Cabe recalcar que

los datos obtenidos son inversos con respecto al modelo ajustado.

En la figura 10, se observa el análisis de regresión probit, los aislados 2BbVch y 1BbAch presentaron concentraciones letales medias de 2.5×10^4 conidios/mL y 5.1×10^4 conidios/mL respectivamente, estos datos están dentro del rango de concentraciones planteadas, por otro lado 1MtAch y 3BbPtm las están por encima de lo sugerido con 1.3×10^5 conidios/mL y 1.2×10^5 conidios/mL respectivamente.

Se debe mencionar, los aislados de código Bb son pertenecientes a hongos del género *Beauveria* sp., y los aislados de código Mt pertenece al género *Metarhizium* sp.

Los datos sugieren que 1MtAch y 3BbPtm requieren concentraciones superiores a los planteados y no así para 2BbVch y 1BbAch que presentaron superiores respecto a los otros dos aislamientos en el control de poblaciones de áfidos.

De acuerdo a estos datos podemos indicar que aislados de *Beauveria* sp., son superiores por la menor concentración de conidios/mL, para controlar el 50% de la población de áfidos, y no así con los aislados del género *Metarhizium* sp., que requiere concentración elevada para dicho cometido, por otro lado (Montalva 2008) en un experimento en laboratorio con *Lecanicillium lecani*, en el control de pulgones determinó una concentración letal CI_{50} de 3.7×10^7 conidios/mL, dato superior al del presente trabajo. Por su lado Becerra (2010) en un experimento similar aplicando formulaciones no comerciales de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, para control de pulgones de calabaza japonesa halló una concentración letal de 1×10^7 , valor superior al del presente trabajo, por lo que las especies evaluadas tienen alto valor de patogenicidad por causar mortalidad a concentraciones bajas.

Tabla 8, muestra el resumen del análisis estadístico de regresiones probit de datos de la concentración letal Cl_{80} a efecto de dos especies de hongos *Beauveria sp.*, y *Metarhizium sp.*, con los respectivos límites de confianza inferior y superior al 95% y la ecuación lineal en donde $Y = 80\%$ y $X = \text{tiempo}$.

Figura 11, acuerdo a los análisis de regresión probit, los datos obtenidos de concentración letal 80 de 2BbVch de 1.3×10^5 conidias/mL, que resultó ser superior para el control del 80% de los áfidos, para 1BbAch los datos de 1.8×10^5 conidias/mL, es considerable por demostrar concentraciones reducidas para el control de 80% de pulgones pero superior al aislado 2BbVch, los aislados 1Mt y 3Bb señalan concentraciones letales 80 de 3.9×10^5 conidias/mL y 3.1×10^5 conidias/mL superior a aislados 2BbVch y 1BbAch, quiere decir que 1MtAch, es cuatro veces más alto en concentración que 2BbVch, 1BbAch dos veces más alto en concentración que 2BbVch.

Las concentraciones letales 80 establecidas sugieren que se requieren de mayores concentraciones a las evaluadas para generar la muerte del 80% de los individuos. De acuerdo a los datos descritos podemos estimar que aislados de *Beauveria sp.*, es superior por presentar menor concentración para controlar 80% de poblaciones de áfidos, y no así con la especie *Metarhizium sp.*, requiriendo concentraciones elevadas para dicho cometido, en un experimento similar Aliaga & Cruz (2009) en la determinación de la concentración letal 50 y 90 con *Beauveria bassiana* en el control de *Aphis craccivora* indico una concentración letal 90 Cl_{90} de 2.3×10^{31} siendo demasiado alta en relación a nuestros datos, por lo que podemos mencionar que los aislados demuestran comportamiento superior en el control de áfidos.

Figura 12, 13, 14 y 15, se puede observar el comportamiento de la línea de tendencia de la ecuación

de la recta en donde la línea azul representa la línea de tendencia y el color rojo representa los límites de confianza al 95%, que como se puede observar en los gráficos no presenta dispersión con respecto a la ecuación de la recta por lo que asumimos que no hay una desviación excedida en todo caso el ensayo es preciso.

De manera general podemos mencionar que las pruebas hechas tanto de la concentración letal 50 como 80, de hongos nativos pertenecientes al género *Beauveria sp.*, presentan comportamiento superiores respecto a *Metarhizium sp.*, demostrando valores de concentración inferiores para el control de poblaciones expuestas de pulgones.

Las diferencias en el comportamiento de ambas especies de hongos evaluadas para el control de áfidos podrían estar relacionadas con sus características genéticas y fisiológicas, ya que existen diferencias entre géneros de hongo que pueden presentar diferencias en su patogenicidad hacia un insecto determinado.

(Franco-Chávez *et al.* 2012) menciona que esta variación de patogenicidad por características genéticas es debida a que el comportamiento de individuos de una misma especie no es siempre la misma por las características fenotípicas y genotípicas que presentan y fisiológicas debido a que los hongos de una misma especie son también diferentes en cuanto a la producción de enzimas y toxinas influenciadas por factores abióticos, que limita el grado de infección entre hongo de una misma especie en un hospedero común.

Por otra parte, se asume que los hongos que desarrollan en alturas por encima de los 2500 msnm, son hongos que crecen en condiciones extremas, es decir con bajo porcentaje de humedad, temperaturas bajas y alta radiación solar que, estos hongos tiene un valor patogénico alto, ya que tienden a desarro-

llar toxinas en su hospedero de forma rápida para su supervivencia, además los conidios liberados para su reproducción son más viables que los HEP de los trópicos.

Finalmente, los hongos sometidos a pruebas de evaluación de identificación tanto macroscópicamente y microscópicamente, de los 6 aislados 3 fueron identificados como *Beauveria brongniartii* y 3 a *Metarhizium anisopliae*.

La evaluación de las mortalidades dieron como resultado que los aislados nativos del género *Beauveria* sp., tiene un mayor capacidad de controlar la población de pulgones 144 h (6 días), aislados 2BbVch, 1BbAch y 3BbPtm lograron eliminar 82.33, 75 y 60.67% de afidos respectivamente, y no así, aislados nativos de *Metarhizium* sp., que demostraron valores para los aislados 1Mt, 2Mt y 3Mt de 66.67, 46 y 36.6% de mortalidad dentro de estos aislados solo el aislamiento 1Mt logro resaltar con una mayor patogenicidad.

Los tiempos letales 50 y 80 de los aislamientos de los hongos del género *Beauveria* sp., demostró ser superior en el control del 50 y 80 % con 78.06 y 123.83 h para 2Bb siendo superior para el control de la población de afidos a diferencia de aislados del género *Metarhizium* sp., 1Mt fueron menores en el comportamiento del control de pulgones con tiempos letales 50 y 80 de 103 y 151,16 h.

Las concentraciones letales 50 y 80 resulto ser mayor en comportamiento en aislados nativos de hongos del género *Beauveria* sp., a concentraciones Cl_{50} y Cl_{80} de 2.5×10^4 y 1.3×10^5 conidios/mL, perteneciente a 2Bb y no así en los aislados del género *Metarhizium* sp., 1Mt con 1.3×10^5 y 3.9×10^5 conidios/mL, que resultaron ser inferiores en el control de afidos, ya que requieren concentraciones superiores a los propuestos para causar mortalidad.

Conflictos de intereses

El trabajo de investigación ha sido autofinanciado por los autores y no genera conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen al responsable del Laboratorio de la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu dependiente de la Universidad Católica Boliviana “San Pablo”

Al personal técnico de los ambientes controlados (carpas solares) de la granja de centro de rehabilitación Remar del municipio de Viacha.

Literatura citada

- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol. 1925; 18: 265-7.
- Aliaga JC, Cruz JS. 2009. Determinación de las Cl_{50} y Cl_{90} del hongo *Beauveria bassiana* CBLE-265 para el control de las plagas *Spodoptera frugiperda* y *Aphis craccivora*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. 2009.
- Alves SB, Pereira RM, Stimac JL, Vieira SA. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperature. Biocont Sci Technol. 1986; 6: 575-81.
- Arteaga Y. Diseños experimentales. 1ra Edición. Editorial Agaetra. Bolivia. 2004; p. 1-19.
- Barnet HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ta edición. The American Phytopa-

- thological Society. St Paul Minnesota. USA. 1998. p. 217.
- Becerra CA. Efectividad biológica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin, sobre pulgón en Calabaza Japoneza (*Cucurbita moschata* var. Chirimen). [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Nayarit. Mexico Xalisco Nayarit. 2010.
- Cañedo V, Ames T. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro internacional de la papa (CIP) Lima, Perú, 2004. p. 62.
- Cano E, Castillo P, Gutiérrez C, Jiménez E, Laguna T, Molina JdD, et al. Manejo Integrado de Plagas: Cultivo del Tomate, Guía MIP. (Disco compacto). Managua, Nicaragua. 2004.
- Carruthers IR, Hural K. Fungi as natural occurring entomopathogens. En Baker RR., PE. Dunn y AR. Liss (Eds.) New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. Academic Press. New York, EUA. 1990. p. 115-38.
- Castillo G. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y Aplicaciones. IMTA, Jiutepec, México. 2004.
- Cermeli M. Los áfidos de importancia agrícola en Venezuela y algunas observaciones sobre ellos (Hemiptera: Apydidae). Agronomía Trop. 1970; 20(1): 15-61.
- Cortes G, Maruris M, Encarnación AD, Vasques AR, Torres GF. Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin sobre gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Mostch) en condiciones la laboratorio. 2010. Memoria del XLV congreso nacional de entomología. Nuevo Vallarta, Nayarit, México. 27-30 junio de 2010, p. 165-8.
- Delgado-Callisaya P. Principios de investigación científica y uso óptimo del análisis estadístico. La Paz-Bolivia. 2013. p. 92-3.
- Echeverría F. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. 2006, p. 105.
- Ekesi S. Selection of virulent isolates of entomopathogenic hyphomycetes against *Clavigralla tomentosicollis* Stål., and evaluation cage experiment using three cowpea varieties. Mycopathologia. 1999; 148: 3: 131-9.
- España-Luna MP. Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), y su virulencia sobre *Epilachna varivestis* (Coleóptera: Coccinellidae). [Tesis de Maestría]. Universidad de la Colima, México. 2000. p. 105.
- Franco-Chávez KG, Rodriguez-Navarro S, Cervantes-Mayagoitia JF, Barranco-Florido JE. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente. 2012; 12(23); 143-60.
- Gillespie AT, Claydon N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. Pesticide Sci. 1989; 27: 203-15.
- Hall RA. Comparicion of laboratory infection of aphids by *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecani*. Ann Appl Biol. 1980; 95: 159-62.
- Hermoso De Mendoza A. Los pulgones de los cítricos. Levante Agrícola. Primer trimestre: 1996, 39-45.
- Hernández-López J. Virulencia de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (ascomicetes: Hypocreales) en larvas de gallina ciega (Cole-

- optera: Scarabaeidae) y su interacción con algunos factores bióticos y abióticos. [Tesis de Maestría]. Colegio de Posgraduados. México. 2010. p. 59.
- Hill DE, Hallen PC. Biopesticides for the control of greenhouse whitefly (PhD project). Are at the USDA-ARS parasite biology and epidemiology laboratories Bldg. 1040, 10300 Baltimore ave. 2000.
- Humber RA. Fungal pathogens of aphids. In: Proceedings Aphid-plant interactions: Populations to Molecules, Oklahoma EUA. 1991. p. 45-56.
- Ignoffo CM. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Fla Entomol. 1992; 75: 516-25.
- Jones RL. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Vol. 3. Brighton, RU. 1994. p. 1275-82.
- Kershaw MJ, Talbot NJ. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Genet Biol. 1998; 23: 18-33.
- Khachatourians GG. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En Howard DH, Miller JD (Eds.) The Mycota VI. Human and animal relationship. Springer. Berlin, Alemania. 1996. p. 331-64.
- Khachatourians GG. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En Arora DK, L. Ajello y KG. Mukerji (Eds.) Handbook of Applied Mycology Vol. 2: Humans, Animals and Insects. Dakker. New York, EUA. 1991. p. 613-61.
- Kim JJ, Lee MH, Yoon CS, Kim HS, Yoo JK, Kim KC. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. J Natl Inst Agric Sci Technol. 2002; 7:14.
- Luque A. Micología. Centro de referencia de micología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. 2011. p. 34.
- Mamani FO. Evaluación de la capacidad entomocida y multiplicación en tres sustratos de aislados nativos de *Beauveria bongniartii* para el control de gorgojo de los andes *Premnotrypes latithorax* bajo condiciones de laboratorio. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Católica Boliviana "San Pablo" Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. Bolivia. 2011.
- Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2002, p 90.
- Montalva C. Evaluación de la virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecani* (Zim) Zare y Gamms para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton). [Tesis de Licenciatura]. Universidad Austral de Chile, Chile. 2008.
- Orduño-Cruz N. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre picudo del nopal *Matamasius snpinolae*. [Tesis de Maestría]. Colegio de postgraduados. Institución de Investigación en Ciencias Agrícolas, México. 2009. p. 79.
- Pik-Ken Hoe, Choon-Fah J. Bong, Kadir Jugah., Amartalingam Rajan. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (Deuteromycota: Hypomycetes) Isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* Am J Agri Biol Sci. 2009; 4(4): 289-97.
- Pucheta-Díaz M, Flores-Macías A, Rodríguez-Navarro S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI. 2006; 31(12): 856- 60.

- St. Leger RJ, Roberts DW. Engineering improved mycoinsecticides. Trends Biotechnol. 1997; 15: 83-7.
- Vargas-Flores M. Características de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (secardo) petch y su virulencia en *phthorimea operculella* (Seller) y *Symmetrischema tangolians* (gyen). [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional de San Marcos. Lima Perú. 2003. p. 78.
- Wraight S, Carruthers R, Bradley C, Jaronsky S, Lacey L, Wood P, et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biol. Control. 1998; 17: 203-17.
- Zanabria E. Manual de prácticas de entomología agrícola. Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú departamento académico de agricultura y Universidad Católica Boliviana “San Pablo” UAC-Tiahuanacu. Bolivia. 2009.
-