



U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

“Estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma* sp), y hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae*, y *Beauveria bassiana*)”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

CECILIA BAROCIO HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Carlos González Esquivel
COTUTOR DE TESIS: Biol. Miguel Bernardo Nájera Rincón.

MORELIA, MICHOACÁN

Octubre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UNAM
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la sesión 02 del H. **Consejo Técnico** de la ENES Unidad Morelia celebrado, el día 12 de febrero del 2014, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el Examen Profesional de la alumna **CECILIA BAROCIO HERNÁNDEZ** con número de cuenta **410005468**, con la tesis titulada: "**Estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (Trichoderma spp) y hongos entomopatógenos (Metarhizium anisopliae, y Beauveria bassiana)**" bajo la dirección del **Tutor**.- Dr. Carlos Ernesto González Esquivel.

Presidente:	Dra. Marta Astier Calderón
Vocal:	Dra. Ek del Val de Gortari
Secretario:	Biól. Miguel Bernardo Nájera Rincón
Suplente:	Dr. Carlos Ernesto González Esquivel
Suplente:	M. en C. Dante Alejandro López Carmona

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Morelia, Michoacán a, 23 de septiembre del 2014.


DRA. DIANA TAMARA MARTÍNEZ RUIZ
SECRETARÍA GENERAL

Agradecimientos

Agradezco a la Licenciatura en Ciencias Ambientales y al apoyo recibido a través del proyecto de investigación titulado "Insumos biotecnológicos para la producción orgánica de planta de aguacate (FOMIX 2009-2011)", bajo la dirección de la Dra. Mayra Elena Gavito con cuyos fondos fue realizado el presente trabajo.

También mis más sinceros reconocimientos al laboratorio de Agroecología del CIEco, y a la tutoría del Dr. Carlos González Esquivel y el Biol. Miguel B. Nájera Rincón para la realización de este estudio. También una gratificación para mis compañeros de laboratorio y especialmente al Dr. John Larsen por su amable disposición y asesoría.

Asimismo, gracias a la Dra. Marta Astier Calderón, la Dra. Ek del Val de Gortari y el M. en C. Dante Alejandro López Carmona por su apoyo y disposición para ser miembros del jurado del examen profesional.

Dedicatoria

A mi familia y amigos, a mis maestros y colegas que me han acompañado durante mi desarrollo académico, profesional y personal. Gracias por su apoyo moral y experiencias compartidas que me permitieron concluir el nivel licenciatura y la presente tesis como cierre satisfactorio de mi etapa universitaria.

Resumen

Se sabe que una de las herramientas tecnológicas para la producción agrícola orgánica consiste en el uso de microorganismos benéficos, sin embargo, hay poco conocimiento sobre las interacciones entre los diferentes grupos funcionales. En respuesta a ello, este trabajo consistió en el estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma* sp), y hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*). El estudio se desarrolló en tres fases. En la Fase 1 se evaluó la calidad de los productos comerciales. En la Fase 2 se estudiaron las interacciones en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-dextrosa-agar utilizando dos métodos: el método de confrontación dual y la siembra de microorganismos a través de suspensiones con la misma densidad de esporas. En la Fase 3 se realizó un bioensayo utilizando “gallina ciega” (*Phyllophaga vetula*) para evaluar la interacción entre hongos entomopatógenos y antagonistas en presencia de un insecto hospedero.

En los resultados de las pruebas de calidad todos los productos registraron un porcentaje de contaminación mayor al 1% por lo que fue necesario realizar diluciones (1×10^{-10}) para seleccionar unidades formadoras de colonias puras (UFC) y así obtener cultivos monospóricos para las pruebas de confrontación.

En las pruebas de confrontación basadas en el método dual, el ANOVA mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las tres especies evaluadas. *T. harzianum* presentó la mayor tasa de crecimiento en los tratamientos individuales y el crecimiento de su micelio no se afectó al interactuar con los hongos entomopatógenos ($P > 0.05$). En contraste, los hongos entomopatógenos redujeron su crecimiento significativamente al estar en confrontación con *T. harzianum* ($P < 0.05$).

Las pruebas de confrontación con base en suspensión de esporas demostraron la gran velocidad de crecimiento de *T. harzianum*, respecto a *B. bassiana* y *M. anisopliae* en los tratamientos independientes. Asimismo, en los tratamientos en confrontación sólo se observó el crecimiento de UFC de *T. harzianum*, lo cual demuestra la gran capacidad antagónica y de competencia por espacio reportada en otros estudios, y que podría alterar el crecimiento de los hongos y bacterias al aplicarse en el suelo, reduciendo la población microbiana, e incluso disminuyendo los procesos biológicos.

En el bioensayo con insectos no se detectó infección por ninguno de los microorganismos estudiados. No se consideró que la densidad de esporas utilizada o las condiciones de incubación hayan influido, y se plantea la hipótesis de que la falta de infección pudo deberse a que la patogenicidad y virulencia de las cepas utilizadas no fue suficiente para infectar a *Phyllophaga vetula*, lo cual refuerza la idea de que la eficacia y confiabilidad en el uso de entomopatógenos para el control de plagas del suelo deberá sustentarse en el conocimiento profundo de las interacciones entre el insecto blanco, el patógeno y el ambiente.

Es importante tomar en cuenta que el estudio fue hecho en condiciones controladas; en éste sentido, sirve como antecedente para estudios posteriores que garanticen la eficacia de los microbios benéficos bajo condiciones de campo, donde se evalúe su interacción con los insectos plaga y otros componentes del agroecosistema. Asimismo, pretende contribuir al entendimiento de las interacciones entre microorganismos benéficos, ya que la mayoría de los estudios donde se han realizado pruebas de confrontación se hacen solamente entre el patógeno y el hospedero.

Abstract

It is known that one of the alternatives for organic agricultural production is the use of beneficial microorganisms. However, there is little knowledge on the interactions between the different functional groups. Therefore, this work consisted in the study of interactions between commercial strains of growth promoters and antagonist fungi (*Trichoderma sp*), and entomopathogenic fungi (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*). The study was carried out in three phases. In Phase 1 the quality of the commercial products was evaluated. In Phase 2 the microorganism interactions were studied in Petri dishes containing culture medium potato-dextrose agar using two methods: the dual method of confrontation and the planting of microorganisms through suspensions with the same concentration of spores. In Phase 3 a bioassay was carried out in order to evaluate the interaction between entomopathogenic fungi and antagonists in the presence of an insect host.

In the results of the quality tests all products had contamination greater than 0.1%, so it was necessary to carry out dilutions (1×10^{-10}) to select pure colony-forming units (UFC) in order to obtain monosporic cultures. In the evidence based on the dual confrontation method, the ANOVA showed significant differences ($P \leq 0.05$) between the three species evaluated. *T. harzianum* presented the highest rate of growth in the individual treatments, and the growth of the mycelium was not affected by the interaction with the entomopathogenic fungi ($P > 0.05$). In contrast, entomopathogenic fungi grew significantly slower in confrontation with *T. harzianum* ($P < 0.05$).

The confrontation tests based on spore suspension demonstrated the great speed of growth of *T. harzianum*, with regard to *B. bassiana* and *M. anisopliae* in the independent treatments. Also, in the treatments in confrontation the only growth observed was that of *T. harzianum*, which demonstrates the great capacity and antagonistic competition for space of this fungi reported in other studies, which could alter the growth of other fungi and bacteria in the soil, reduce the microbial population, and even diminishing biological processes.

In the bioassay with an insect, infection was not detected by the microorganisms in study. It is not considered that the spore density or incubation conditions could have influenced the result. It is possible that the lack of infection could be due to the low pathogenicity and virulence of the evaluated products, which was not enough for the species of white grubs, in particular *P. vetula*, which reinforces the idea that the efficiency and reliability in the use of entomopathogens to control soil pests must be based on in-depth knowledge of the interactions between the host insect, the pathogen and the environment.

It is important to take into account that the study was carried out under controlled conditions; in this sense, it serves as a background for further studies to ensure the effectiveness of the beneficial microbes under field conditions, to evaluate their interactions with insect pests, and with other components of the agroecosystem in which they will be used. It also aims to contribute to generate information that evaluates the interaction between beneficial microorganisms, since the majority of the studies using confrontation tests are carried out only between the pathogen and the host.

Índice

1	Introducción y planteamiento del problema	10
2	Antecedentes	12
2.1	Interacciones entre hongos entomopatógenos y antagonistas usados simultáneamente como agentes de control biológico.....	14
2.2	Caracterización morfológica de las especies de hongos estudiadas	15
2.2.1	<i>Beauveria Bassiana</i>	17
2.2.2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	18
2.2.3	<i>Trichoderma spp</i>	19
2.3	Caracterización de <i>Phyllophaga spp.</i>	21
2.3.1	Ciclo de vida de <i>Phyllophaga spp</i>	22
2.3.2	Importancia económica.....	23
2.3.3	Formas convencionales/alternativas de control de <i>Phyllophaga spp.</i>	24
3	Justificación	25
4	Hipótesis	26
5	Objetivo general	26
6	Objetivos específicos	26
7	Metodología	26
7.1	Fase 1: Evaluación de la calidad de los productos comerciales	26
7.1.1	Obtención de cepas comerciales de microorganismos.....	26
7.1.2	Evaluación de la calidad de inóculos comerciales y selección de las cepas a utilizar	26
7.2	Fase 2: Evaluación de interacciones in vitro	29
7.2.1	Preparación del medio de cultivo.....	29
7.2.2	Siembra de microorganismos para obtener inóculos puros	29

7.2.3	Pruebas de confrontación con base en el método dual, obtención de las soluciones madre a partir de inóculos puros y pruebas de confrontación con base en la densidad de esporas.	30
7.3	Fase 3: Bioensayo con insecto.....	31
7.3.1	Experimento piloto.....	31
7.3.2	Bioensayos de virulencia.	32
8	Diseño Experimental Fase 2 y 3	32
8.1	Variables Biológicas.....	34
9	Análisis de resultados	34
10	Resultados y discusión	35
10.1	Evaluación de la calidad de inóculos comerciales y obtención de cultivos monospóricos.	35
10.2	Crecimiento radial individual (mm) y pruebas de confrontación con base en el método dual. 37	
10.3	Crecimiento individual (UFC) y pruebas de confrontación de hongos entomopatógenos y antagonistas con base en la densidad de esporas.	41
10.4	Bioensayo con insecto.....	45
11	Conclusiones y recomendaciones	48
12	Literatura citada	50
13	Anexos	57
13.1	Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de <i>T. harzianum</i>	57
13.2	Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de <i>M. anisopliae</i>	57
13.3	Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de <i>B. bassiana</i>	57

1 Introducción y planteamiento del problema

Aunque la gran mayoría de los insectos son benéficos o inofensivos al hombre, el control de algunas especies ha sido un reto desde el comienzo de los tiempos. Actualmente, menos del 1% de las especies de insectos conocidos son considerados plagas siendo éstas aquellas con el potencial de destruir cosechas, dañar viviendas y la salud de la gente (Davidson y Lyon, 1979).

Como una medida para mitigar el efecto de las plagas, la industria química ha desarrollado gran variedad de productos, sin embargo, muchos de esos químicos han resultado dañinos para el ambiente, pues causan contaminación de los suelos agrícolas, siendo los plaguicidas el principal origen de sustancias orgánicas con capacidad contaminante, y el problema se ha intensificado debido a que dichos productos han sido ampliamente distribuidos y aplicados por productores en todo el mundo. (Millarium, 2004)

Otras desventajas de los plaguicidas químicos es que se han encarecido a la par de los combustibles fósiles necesarios para su elaboración. Además, son efectivos en un período corto, dando solamente un remedio temporal, ya que las capacidades reproductivas y evolutivas de los insectos les permiten desarrollar mecanismos de resistencia a estas y otras estrategias de control.

La necesidad de reducir el uso de agroquímicos para el control de plagas, y los efectos socioambientales negativos derivados de ello, ha incentivado el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan de forma más fácil, económica y selectiva controlar de manera eficaz algunos de los insectos que afectan a las plantas, en especial a los cultivos agrícolas.

El uso de las interacciones bióticas en relación al manejo de insectos y enfermedades en las plantas ha dado origen al “control biológico de plagas”, que hace referencia al uso intencionado de organismos residentes o introducidos que supriman la actividad de poblaciones que afectan el desarrollo en las plantas (Pal y Gardener, 2006). En otras palabras, el control biológico es el manejo de enemigos naturales que ayudan a regular las poblaciones de las plagas, ya que involucra el uso de parásitos, depredadores o patógenos tales como hongos, bacterias, virus, protozoarios y nemátodos que compiten, dañen o maten a las plagas blanco (Rosas, 1999).

El interés en los agentes de control biológico ha crecido debido a ciertas ventajas, entre las que destacan el tener un blanco específico que difícilmente desarrollará resistencia, así como el no contaminar, e incluso llegar a ser más eficientes que los químicos.

Muchos hongos patógenos son importantes como agentes de control biológico de muchos insectos y de otros artrópodos. Los intentos por manipular a los hongos como agentes de control biológico empezaron a finales del siglo diecinueve, pero fue hasta finales de la década de los sesenta, cuando el interés en el uso de los hongos como agentes de control biológico se incrementó debido a problemas con el control por agentes químicos (Roberts, 1979).

El uso de hongos entomopatógenos para el control biológico en ecosistemas manipulados ha seguido cuatro estrategias básicas (Ignoffo, 1992):

- 1) Conocimiento de los impactos del control biológico natural.
- 2) Incremento de enemigos naturales.
- 3) Aumento de los impactos a través de manipulaciones activas.
- 4) Introducción de enemigos naturales exóticos.

Se han utilizado una gran variedad de estrategias para manipular a los hongos en programas de control biológico. No obstante, el uso inteligente de los hongos como agentes de control biológico requiere el conocimiento detallado de su taxonomía, patobiología, epizootiología y de las interacciones con otros grupos funcionales y componentes de los ecosistemas en los cuales son utilizados.

2 Antecedentes

Es bien conocido que la presencia de una enfermedad en las plantas es resultado de una interacción entre la planta hospedante, el patógeno, y los organismos antagónicos que limitan la actividad del patógeno y/o elevan la resistencia de la planta. La importancia del hombre en esta relación radica en saber manejar las especificidades de cada uno para lograr que prevalezca la interacción a favor de la planta y el antagonista del patógeno. Esto no es posible sin conocimientos de la etología (comportamiento) y etiología de la enfermedad que se desea controlar, el hábito del hongo fitopatógeno, su forma de propagarse y permanecer en el ambiente (Foty, 2007).

Particularmente, los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados, pues a la fecha se han registrado más de 700 especies agrupadas en 100 géneros (Lecuona *et al.* 1996). Tienen la capacidad de encontrarse en ambientes muy variados, y son importantes reguladores naturales de muchas poblaciones de artrópodos, incluyendo varias especies de plagas o patógenos como los insectos chupadores (Hajek y St. Leger, 1994), y ciertos órdenes de insectos como *Lepidoptera* (palomillas, mariposas); *Hemiptera* (áfidos); *Hymenoptera* (abejas); *Coleoptera* (escarabajos) y *Diptera* (moscas y mosquitos), (Roberts y Yendol, 1971).

Los hongos entomopatógenos infectan a los insectos por medio de sus esporas, las cuales germinan en la cutícula del insecto y la penetran, gracias a algunas enzimas y fuerzas mecánicas. Algunas cepas de estos hongos producen suficientes toxinas como para causar la muerte del insecto. En otras cepas, que son productoras débiles de toxinas, el micelio se ramifica a través de los órganos internos causando así la muerte (Roberts y Yendol, 1971).

Aunque se conocen muchos microorganismos con la capacidad de reducir poblaciones de insectos plaga, solamente algunos de ellos pueden ser utilizados como agentes de control biológico y promotores del crecimiento de las plantas a nivel de producción comercial. Esto se debe a que aunque tienen la capacidad de parasitar a un gran número de artrópodos y de encontrarse en hábitats muy variados (Lecuona *et al.* 1996), las posibilidades de producción masiva y sus capacidades de ejercer un buen control en campo suelen ser las limitantes, ya que para la producción exitosa de hongos entomopatógenos el aislado debe ser específico, tener un crecimiento rápido, una abundante producción de esporas y una patogenicidad suficientemente alta sobre el insecto blanco. Además, los costos de producción deben ser bajos, con medios simples, baratos, accesibles y con un proceso de producción con un mínimo de trabajo. Por último, el producto debe poder almacenarse en condiciones ambientales, o cercanas a estas, sin perder significativamente su viabilidad y patogenicidad (Feng *et al.* 1994).

Ejemplos de la producción y uso comercial de microbios benéficos son los hongos promotores del crecimiento y antagonistas de patógenos de plantas (*Trichoderma* spp) y los hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*). Éstos, al ser un grupo taxonómica y biológicamente muy diverso, tienen una gran variedad de formas y tamaños de propágulos infectivos que presentan una

amplia gama de posibilidades para dispersarse (Nájera, 2010a). Esto se manifiesta en los cadáveres de diversos estados inmaduros y adultos de insectos donde es posible encontrar síntomas de infección ocasionada por hongos entomopatógenos, como esporulación blanca, que nos podría indicar la presencia de *Beauveria* o *Hirsutella*, mientras que si la coloración de las esporas es verde, podría indicar una infección ocasionada por *Metarhizium anisopliae* o *Nomuraea rileyi* (Poinar y Thomas, 1984). Por otro lado, *Trichoderma* spp tiene un buen efecto contra *Sclerotinia* spp (Adams y Ayers, 1979; Rabbendran *et al.*, 2006) y otros patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* (Hjeljord *et al.*, 2000), *Phytophthora* spp. (Guigón y González 2004; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006; Bae *et al.*, 2010), *Alternaria solani* (Fontenelle *et al.*, 2011), *Fusarium oxysporum* (Otado *et al.*, 2011) y *Pythium ultimum* (Vinale *et al.*, 2008).

2.1 Interacciones entre hongos entomopatógenos y antagonistas usados simultáneamente como agentes de control biológico.

Actualmente existe poco conocimiento sobre el efecto de las interacciones entre agentes de control biológico cuando son utilizados simultáneamente. Sin embargo, algunos trabajos de investigación han mostrado la compatibilidad entre algunas de las especies de hongos entomopatógenos y micoparásitos más utilizadas y comercializadas para el control biológico de plagas.

Krauss *et al.* (2004), registraron que en pruebas *in vitro* *M. anisopliae* fue altamente susceptible al interactuar con los micoparásitos estudiados (*Clonostachys spp.*, *Trichoderma harzianum* y *Lecanicillium lecanii.*). Por otro lado, *B. bassiana* solo fue afectada por *Clonostachys rosea*, mientras que *Isaria fumosorosea* resistió a todos los micoparásitos con los que interactuó. Además, en los estudios con bioensayos *M. anisopliae* resultó letal para las ninfas de “mosquita blanca” (*Bemisia tabaci*), y junto con *B. bassiana* también se probó su letalidad hacia el “gorgojo” (*Cosmopolites sordidus*), el “barrenador de la caña” (*Diatraea saccharalis*) y el coleóptero *Sitophilus oryzae*. En la investigación se concluyó que los micoparásitos y hongos entomopatógenos estudiados son elementos compatibles para el manejo integrado de plagas, ya que su coaplicación no afecta su eficacia como agentes de control biológico. Sin embargo, sí se reduce significativamente su éxito de reaslamiento, especialmente en especies pequeñas de insectos.

En otro estudio, el cual analiza los efectos de *Trichoderma* sobre el desarrollo de microorganismos no patógenos del suelo, se realizaron pruebas de confrontación o antagónicas *in vitro*, bajo la justificación de que en los últimos años se ha utilizado en la agricultura el hongo heterótrofo *Trichoderma* como controlador de organismos del suelo, lo cual podría estar alterando el equilibrio microbiológico del suelo. Los resultados indicaron que las cepas de *Trichoderma harzarium* y *Trichoderma viride* presentaron una gran capacidad antagónica, dada su alta velocidad de crecimiento y alta competencia por espacio, y en consecuencia pueden alterar el crecimiento de los hongos y bacterias en el suelo, reduciendo la población microbiana, e incluso disminuyendo los procesos biológicos (Borrero y Silva, 2005).

Si bien la utilización del hongo *Trichoderma* en la agricultura orgánica ha logrado contrarrestar microorganismos patógenos del suelo, hay evidencia de que también podría influir negativamente sobre microorganismos benéficos, especialmente aquellos cuya función es descomponer la materia orgánica. Lo anterior refuerza la necesidad de investigar los efectos de las interacciones de los microorganismos del suelo que son utilizados con fines de control biológico y como promotores del crecimiento, ya que diversos procesos biogeoquímicos, como la fertilidad, dependen la flora microbiana del suelo.

Es aquí donde resalta la utilidad de los análisis microbiológicos del suelo para aplicar las densidades adecuadas de acuerdo a la microbiota presente no sólo en el caso de aplicación de *Trichoderma*, sino de cualquier producto biológico o químico para evitar el desequilibrio microbiológico.

2.2 Caracterización morfológica de las especies de hongos estudiadas

La clasificación de hongos entomopatógenos es paralela al sistema establecido para hongos en general, por lo que uno de los criterios taxonómicos utilizados para su clasificación se basa fundamentalmente en sus características morfológicas (Berlanga, 2006). Las principales estructuras morfológicas del hongo son:

- Hifa.- (Hypha) filamento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos; puede ser cenocítico (en el micelio los núcleos en el citoplasma no están separados por tabiques que delimiten células) o septado.
- Conidióforo.- (Conidiophore) hifa simple o ramificada, que se diferencia de una somática por producir y sustentar conidios; estos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas, que pueden disponerse de manera muy diversa.
- Conidio.- (Conidium pl. Conidia) también se le llama conidiospora; espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio. Los conidios son las estructuras asexuales del orden Hypocreales y se pueden generar *de novo* (la mayoría) a partir de células hifales preexistentes.

Para diferenciar las principales especies de hongos entomopatógenos se deben reconocer algunas de las estructuras usadas en la taxonomía. A simple vista se debe observar la forma del crecimiento del micelio, la coloración, el tipo de esporulación, la coloración de las esporas y las diferencias con otros hongos.

Aunado a esto, para entender mejor la ecología de los hongos entomopatógenos han surgido nuevas clasificaciones basadas en análisis de DNA. Nuevos taxones y linajes que muy probablemente serán añadidos en un futuro, ya que aún faltan muchos estudios filogenéticos en relación con los hongos. Sin embargo, una de las clasificaciones más recientes es la de Hibbett *et al.* (2007), la cual a través de un análisis filogenético de los hongos demostró que hongos son más diversos de lo que se creía. Esta nueva clasificación resulta útil para describir las especies utilizadas en este estudio (Figura 1).

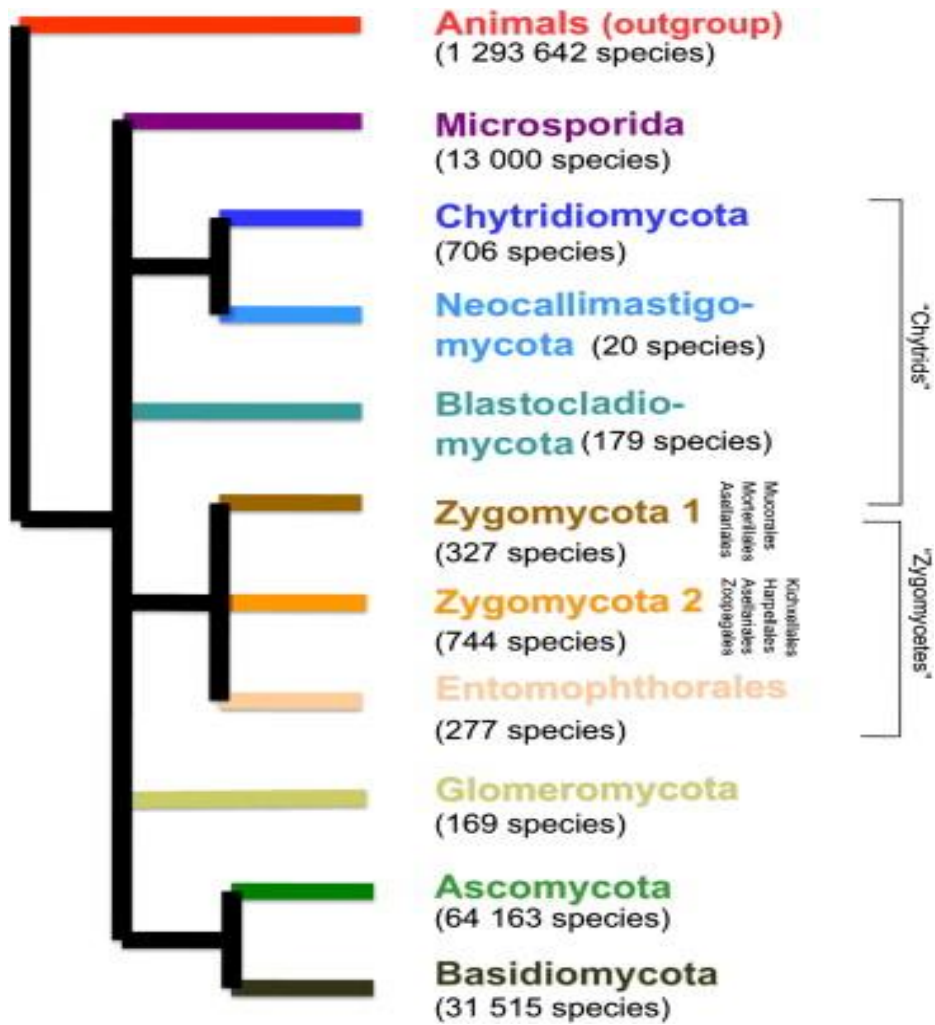


Figura 1 Filogenia de los hongos (Hibbett *et.al.* 2007)

Dos de las especies de hongos estudiadas en este trabajo (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) se encuentran dentro de la división *Ascomycota*, en donde se incluyen hongos en forma de levadura que infectan mosquitos y escarabajos de corteza, así como larvas de algunas moscas y abejas. También son patógenos de escamas y parásitos de ácaros e insectos como coleópteros, dípteros, hemípteros, ortópteros e isópteros (Berlanga, 2006).

2.2.1 *Beauveria Bassiana*

Los nuevos análisis filogenéticos moleculares confirman su posicionamiento dentro del orden de los *Hypocreales (Cordypitaceae)* (Sung *et.al* 2007). En cuanto a las especies pertenecientes a este género, hasta 1954 se habían descrito 14 especies y McLeod las redujo a dos, *bassiana* y *tenella* (Berlanga, 2006). Posteriormente, de Hoog incluyó a *B. tenella* en *B. brongniartii* (Tanada y Kaya, 1993) reconociendo tres especies (*B. bassiana*, *B. brongniartii* y *B. alba*). A partir de entonces, cuatro especies más han sido reconocidas: *B. vermiconia*, *B. amorpha*, *B. calcedonica* y *B. malawensis* (Rehner *et al.*, 2011).

El género *Beauveria* se caracteriza por formar conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos, la célula conidiógena con la base globosa o abultada presenta un adelgazamiento en la parte superior formando un esterigma curvado en forma de zig-zag (Humber, 1997). Se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillo cremoso (Ferron, 1981).

Particularmente, la especie *Beauveria bassiana* lleva el nombre del entomólogo italiano Agostino Bassi, el cual observó en 1835 la aparición de la enfermedad muscardina sobre los cuerpos de algunos gusanos de seda (*Bombyx mori*). *B. bassiana* se caracteriza por formar conidios globosos o subglobosos de 2 - 3 x 2.0 - 2.5 μm , con conidióforo formado en racimos compactos (Humber, 1997). Los cadáveres infectados por este hongo, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporas del hongo. Las células conidiógenas se extienden apicalmente densamente agrupadas, tienen una base globosa, el raquis es denticulado en forma de zig-zag y se extiende apicalmente con un conidio por denticulo. Generalmente, el conidio es de tipo esférico u ovoide (Figura 2).

Beauveria bassiana



Picudo del tabaco infectado.



Conidióforos y conidios.

Clasificación taxonómica

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>

Figura 2 Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*

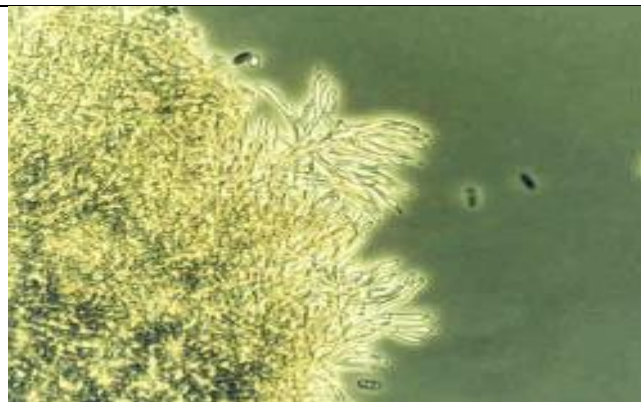
2.2.2 *Metarhizium anisopliae*

El género *Metarhizium*, presenta conidióforo ramificado; el conidio inicial es producido por el conidióforo en una abstracción simple en la parte distal. En cada conidióforo se forma una cadena de conidios basípeta, las cuales crecen densas y adheridas unas con otras formando masas prismáticas en columnas (Tanada y Kaya, 1993). Los conidios de este género son blancos cuando son jóvenes, pero conforme maduran el color se torna verde oscuro. Dicho género agrupa solamente a dos especies, *M. anisopliae* y *M. flavoviride* (Tulloch ,1976).

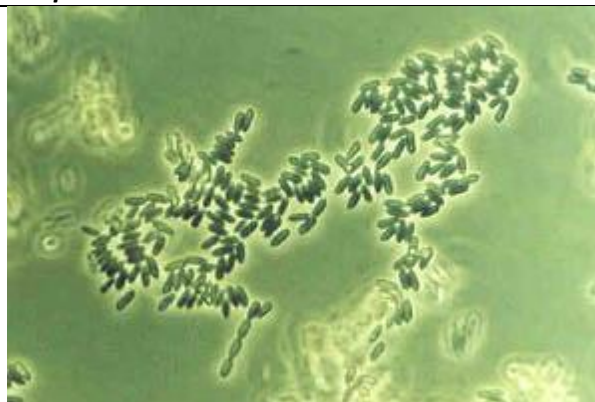
Específicamente, la especie *Metarhizium anisopliae* presenta conidios de forma cilíndrica u ovals, es frecuentemente angosto en la parte media, y usualmente truncado en ambos lados, desarrollando colonias verdes (Figura 3). Tiene dos variedades: *M. anisopliae* var. *anisopliae* con conidios de 3.5 -9.0 μm de largo (usualmente 5.0 -8.0 μm) y *M. anisopliae* var. *mayor* cuyos conidios miden de 9.0 - 18.0 μm de largo (usualmente entre 10 - 14 μm) (Humber 1997).

Los cadáveres infectados por éste hongo se encuentran completamente cubiertos con micelio, el cual es blanco al principio de la infección, pero adquiere una coloración verdosa cuando esporula. Las células conidiógenas (fiálidas) tienen ápices redondeados o cónicos y están arreglados en densos himenios. Los conidióforos se ramifican repetidamente formando una estructura semejante a un candelabro. Los conidios son aseptados, cilíndricos u ovoides y forman cadenas usualmente arregladas en columnas o en masas sólidas de cadenas paralelas (Carballo e Hidalgo, 1999).

Metarhizium anisopliae



Conidióforos



Conidios.

Clasificación científica

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>

Figura 3. Clasificación científica de *Metarhizium anisopliae*

2.2.3 *Trichoderma spp*

Pertenece a la división Ascomycota, subdivisión Deuteromycetes, que se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura, como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum var. narcissi* y *Trichoderma narcissi* (Farr. y Rossman, 2006)

Es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. El rango de hospedantes sobre los que tiene efecto es principalmente sobre patógenos fúngicos de suelo y foliares (*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Alternaria*, etc.) y sobre nemátodos (*Meloidogyne*, *Globodera*, etc.) (Elósegui, 2006).

Particularmente, la especie *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) forma colonias de rápido crecimiento, con micelio aéreo flucoso color blanco a ligeramente gris o raramente amarillo. Su conidiación produce pústulas aplanadas, concéntricas, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco. Tiene hifas hialinas, clamidosporas abundantes, solitarias y subhialinas, de amarillo pálido a caramelo con la edad; subglobosas a elipsoidales o piriformes. Sus conidióforos son hialinos, con paredes lisas, rectos o doblados y muy ramificados. Las primeras ramas nacen formando ángulos rectos o dobladas hacia el ápice en grupos de dos o tres. La estructura completa es más o menos piramidal con un ápice estéril cuando está creciendo el hongo. Las fiálides (células productoras de conidios) son ampuliformes o subglobosas; muy constreñidas en la base, hinchadas en el medio, y abruptamente estrechas en el ápice. Los conidios son subglobosos, ovoides o

ligeramente elipsoidales con ápice ampliamente redondeado, con pared lisa o ligeramente rugosa, subhialinos y color verde pálido (Elósegui, 2006; Figura 4).

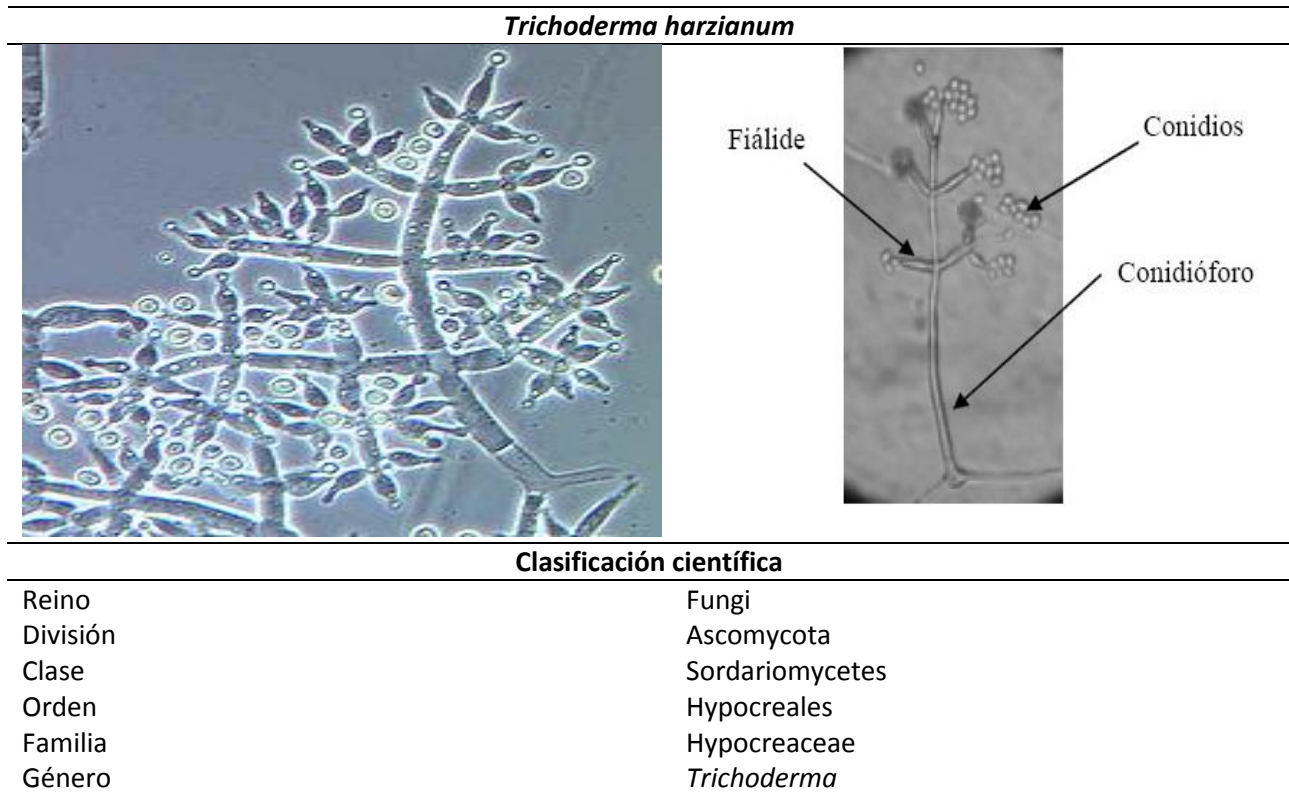


Figura 4 Clasificación científica de *Trichoderma harzianum*.

Cabe aclarar que no se trata de un hongo micorrízico, sino un hongo endófito de raíces, es decir, un hongo que habita en el interior de las raíces colonizándolas, y ofrece protección contra patógenos, además de estimular el crecimiento de raíces (Foty, 2007). Se comporta como saprófito en la rizósfera, siendo capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Se considera que su acción es antagonista, siendo capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio y por competir por el sustrato y por espacio. Asimismo, actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas y micoparasitismo. (Harman y Kubicek, 1998; Chet *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1995).

Trichoderma tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de enzimas inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat (donde los hongos son causantes de diversas enfermedades), le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de plaguicidas y otros químicos (Chávez, 2006).

Uno de los principales beneficios que *Trichoderma spp* ofrece a la agricultura, está la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento como metabolitos secundarios que catalizan el crecimiento y desarrollo de los tejidos de las raíces acelerando la división celular lo que permite plantas con mayor vigor que las plantas que sin dicho microorganismo (López *et al.*, 1999).

2.3 Caracterización de *Phyllophaga spp.*

El denominado complejo “gallina ciega” está formado por géneros y especies de la superfamilia *Scarabaeoidea*. En México se encuentran principalmente las subfamilias *Melolonthinae*, y en menor medida las subfamilias *Cetoniidae* y *Scarabaeidae*, cuyas larvas consumen raíces o materia orgánica del suelo en diferentes proporciones durante su desarrollo. El complejo “gallina ciega” es distinto en cada localidad, y cambia fácilmente por factores ambientales y/o inducidos por la especie humana (Morón y Rodríguez, 2010).

Nombres como gallina ciega, gusano blanco, nixticuil, nextocuil, kolom, rosquilla o ricoco, son algunos de los nombres conocidos en México para nombrar a las larvas. En su fase adulta son conocidos como escarabajos sanjuaneros, mayates, ronrones, temoles, pipioles, etc, y tienen una vida activa de 5 a 20 días hasta 2 a 8 meses, mientras que las larvas pueden existir durante 80 a 120 días hasta 4 a 32 meses (Morón 1984; 2003; 2004; Morón *et al.*, 1997).

La “gallina ciega” de la subfamilia *Melolonthinae* es el grupo más estudiado en México. Dentro sobresalen las especies del genero *Phyllophaga* (Figura 5) por su abundancia, biomasa, diversidad y amplia distribución. A pesar de que varias especies de este género tienen una amplia distribución en México, no se localizan en cualquier terreno cultivado. Sin embargo, hay siete estados de la República mexicana con localidades donde se ha considerado a la “gallina ciega” una amenaza importante para la producción: Chiapas, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla y Tamaulipas (Morón, 2006).

De acuerdo con Morón y Rodríguez (2010), se han hecho estudios sobre plagas del suelo en 26 entidades federativas, el 20% de los trabajos tienen un ámbito nacional o regional, y sólo el 5% se han desarrollado en condiciones de laboratorio. El tema del control biológico y los estudios sobre hongos entomopatógenos se han incrementado durante la última década, así como los avances en el estudio de las plagas subterráneas.

Phyllophaga spp



Clasificación taxonómica

Clase	Insecta
Orden	Coleoptera
Superfamilia	Scarabaeoidea
Familia	Melolonthidae
Subfamilia	Melolonthinae
Género	<i>Phyllophaga</i>
Nombre común	Gallina ciega

Figura 5 Clasificación taxonómica de *Phyllophaga spp.*

2.3.1 Ciclo de vida de *Phyllophaga spp*

Hasta hace poco se reunió la información básica sobre el ciclo de vida de algunas de las especies más comunes de gallina ciega (Morón y Rodríguez, 2010). De acuerdo a la especie y a el patrón climático de la región, se conocen tres tipos de ciclo vital de gallinas ciegas en México: anual, bianual y bivoltino (Morón *et al.*, 2010).

El ciclo anual es el más común en las especies de gallinas ciegas en México, entre las que se encuentran géneros de importancia agrícola como *Phyllophaga spp.* (Figura 6), siendo el patrón en el ciclo vital semejante entre las especies anuales: los adultos emergen en mayo o junio, al inicio del periodo de lluvias o riego. Al final de la primavera o inicios de verano, después del apareamiento, las hembras depositan los huevos en grupos en suelo húmedo a una profundidad de 10-20 cm. La eclosión ocurre después de dos a cuatro semanas. La duración promedio de las larvas de primer y segundo estadio es de 30 y 40 días, respectivamente. El tercer estadio es el más voraz y longevo, ocurre a mediados de verano y hasta la primavera siguiente, cuando construye una celda para pupar que dura 15-30 días, donde permanecen hasta que existan condiciones apropiadas de humedad en el suelo para emerger. La

longevidad de los adultos varia de 15-30 días, aunque algunas hembras pueden permanecer hasta tres meses en el suelo esperando la lluvia para emerger (Morón *et al.*, 2010).

Los esfuerzos para combatir la gallina ciega se han enfocado principalmente en su tercer estadio larval, porque es la etapa que más causa daños, pero también es más difícil contrarrestarla con los recursos convencionales de control. Por ello, persiste el reto de buscar enemigos naturales susceptibles de multiplicarse y dispersarse en forma masiva para enfrentar poblaciones de gallina ciega y obtener una regulación a mediano y corto plazo (Morón *et al.*, 2010).

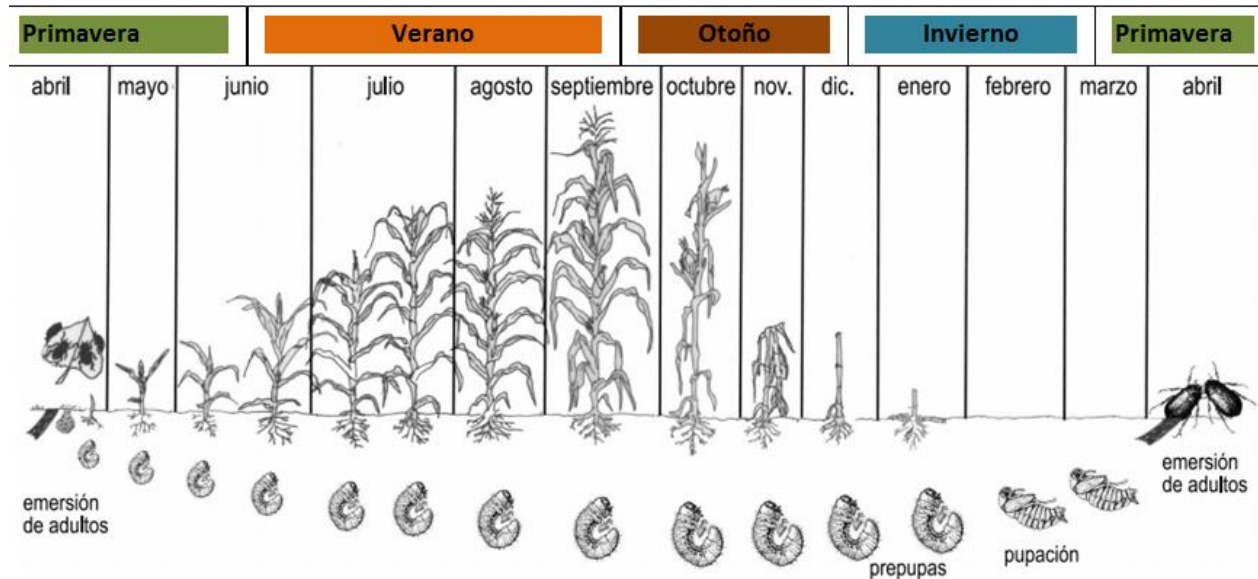


Figura 6. Ciclo de vida de *Phyllophaga* spp. Tomado y modificado de Cano, 2007.

2.3.2 Importancia económica

Algunos trabajos han cuantificado las pérdidas en el rendimiento de diversos cultivos y regiones agrícolas en México, principalmente de maíz, ya que se ha registrado que la superficie infestada por Gallina Ciega ha correspondido al 50% de las tierras dedicadas al cultivo de maíz en México. En algunos casos concretos la pérdida ha representado un 45% del rendimiento de maíz como en el centro de Jalisco entre 1977 y 1979, y de entre 0.4 y 1.3 t/ha de maíz anualmente en Tamaulipas y Puebla. También está como ejemplo la pérdida de 32 mil toneladas de cereales valoradas en 57 millones de pesos en Morelos (Morón y Rodríguez, 2010). En realidad, un aspecto importante para abordar el problema de las plagas subterráneas como la “Gallina ciega” es la dificultad para evaluar los daños que ocasionan, y esta falta de evaluaciones confiables ha relegado el estudio de estas plagas por considerarlas menos importantes que otras con efectos más visibles o directos.

Además del maíz, el daño causado por gallina ciega puede manifestarse en otros cultivos interés agrícola y forestal como: agave, amaranto, cacahuate, caña de azúcar, chile, flores de ornato, frijol, fresa, lechuga, nopal, papa y sorgo (Villalobos y Nuñez, 2010).

2.3.3 Formas convencionales/alternativas de control de *Phyllophaga* spp.

El manejo integrado de plagas en el momento indicado es la mejor herramienta para controlar esta plaga. La siembra de cultivos en meses bien definidos, la eliminación de plantas hospederas, así como una buena preparación del terreno y el uso de insecticidas biológicos son medidas eficientes antes del uso de insecticidas químicos (FMC, 2008).

Los insecticidas químicos son utilizados de forma convencional por su rapidez de acción, su eficacia y por su espectro de control. Sin embargo, la necesidad de generar alternativas de control que contribuyan al diseño de agroecosistemas sustentables y al manejo agroecológico han ampliado las propuestas para prevenir y afrontar los efectos negativos que ocasionan las plagas del suelo en los cultivos. Algunas de estas propuestas son el control cultural, el físico y el biológico, los cuales se describen brevemente a continuación.

El control cultural de plagas es básicamente preventivo, y se realiza a través de prácticas agronómicas que contribuyen a mantener un ecosistema menos favorable para el establecimiento, desarrollo y supervivencia de organismos dañinos: fecha de siembra, rotación y asociación de cultivos, manejo del suelo y agua, métodos de labranza, biofumigación, diversificación de agroecosistemas, etc. Por otra parte, el control físico y mecánico se refiere uso de aparatos o fuentes de energía para atraer y eliminar las plagas o alterar su hábitat: trampas de luz, recolecta manual, barreras físicas, solarización, etc. Mientras que el control biológico puede definirse como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño al hombre (plagas) (Nájera, *et al.* 2010).

El control biológico como forma alternativa para el manejo de plagas como la gallina ciega consiste en el uso de uno o más organismos para reducir la densidad de una planta o animal que causan daño a los cultivos (DeBach, 1964). Bajo este esquema, una de las alternativas para el control de la gallina ciega ha sido el uso de enemigos naturales.

Hablando específicamente sobre los hongos entomopatógenos, son frecuentes las referencias de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, que se han empleado y comercializado con éxito variable como medios de control para algunas especies de rutelinos y melolontinos americanos (Morón *et al.*, 2010).

3 Justificación

Los programas de manejo que se llevan a cabo para mejorar la productividad y afrontar los problemas que ocasionan las plagas, utilizan varias técnicas de fertilización y control incluyendo la aplicación de fertilizantes e insecticidas químicos convencionales dirigidos al suelo o asperjados al follaje (Saul *et al.* 1983). Sin embargo, la necesidad de reducir el uso de agroquímicos para favorecer el crecimiento de los cultivos y controlar los insectos plaga, ha fomentado el desarrollo de nuevas alternativas de producción que complementen o sustituyan las prácticas de control convencionales, haciendo énfasis en disminuir el impacto ambiental y aumentar la aceptación por parte de los productores de diversos sistemas agrícolas.

De esta manera, desde el enfoque de la agricultura agroecológica se ha propuesto como alternativa incorporar el uso de microorganismos benéficos como los hongos promotores del crecimiento y entomopatógenos, los cuales ofrecen un gran potencial, como agentes de control de plagas agrícolas (Lecuona *et al.* 1996.). Derivado de ello, con el fin de promover la producción agroecológica se ha incrementado el uso y la oferta de agentes de control biológico para un número creciente de plagas y enfermedades, por lo que han surgido varias empresas y marcas dedicadas a identificar y seleccionar diversas cepas de hongos entomopatógenos con potencial para ser producidos y comercializados de manera intensiva. De esta forma pretenden representar una alternativa al alcance de los productores, y ser integradas a las acciones que se realizan en los programas de manejo de plagas en sistemas agrícolas convencionales y principalmente en agroecosistemas orgánicos.

No obstante, hay poco conocimiento sobre las interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microbios benéficos, lo cual es de importancia durante la aplicación simultánea de diversas cepas y productos, ya que su eficiencia es influida por las interacciones entre los microorganismos que los componen, y juega un papel importante en la aceptación por parte del productor. Además, debido a la escasa información sobre su interacción tanto en sistemas agrícolas mixtos como en monocultivos, autores como Lacey *et al.* (2001) y Krauss *et al.* (2004) enfatizan en la necesidad de expandir el entendimiento de los insectos patógenos en los sistemas agrícolas, así como la compatibilidad entre los más importantes grupos de hongos registrados comercialmente para su uso como agentes de control biológico: entomopatógenos, micoparásitos, antagonistas y promotores del crecimiento (Smith, 1993; Ferrón, 1978).

Dado que dentro de las especies de hongos entomopatógenos y antagonistas-promotores del crecimiento mayormente comercializados como agentes de control biológico se encuentran *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* (Krauss *et al.*, 2004; McSpadden, 2002), fueron las especies seleccionadas en este estudio para evaluar sus interacciones con la finalidad de generar información básica que contribuya al conocimiento de las interacciones entre cepas comerciales de agentes de control biológico para el desarrollo de agroecosistemas sustentables.

4 Hipótesis

Existen interacciones (sinergia/antagonismo) entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos benéficos asociados a la rizósfera comercializados para su uso como agentes de control biológico.

5 Objetivo general

Determinar el tipo de interacciones entre diferentes grupos funcionales de microorganismos benéficos de la rizósfera a través del estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas como *Trichoderma* spp, y hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

6 Objetivos específicos

1. Evaluar la calidad de los productos comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma harzianum*), y hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*).y obtener inóculos puros.
2. Evaluar las interacciones entre *Trichoderma harzianum*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.
3. Evaluar el efecto de la aplicación combinada de *Trichoderma harzianum* *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre un insecto blanco.

7 Metodología

7.1 Fase 1: Evaluación de la calidad de los productos comerciales

7.1.1 Obtención de cepas comerciales de microorganismos

Se obtuvieron productos comerciales (cepas) del laboratorio de Agroecología del Centro de investigaciones en Ecosistemas UNAM Morelia, donados por empresas productoras de los mismos, en presentaciones de 500g de formulados en polvo.

7.1.2 Evaluación de la calidad de inóculos comerciales y selección de las cepas a utilizar

Se evaluó la calidad de las cepas comerciales de *Trichoderma harzianum*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* para asegurar que se encontraban en condiciones óptimas en cuanto a densidad, viabilidad y pureza. Como indicadores de buena calidad se tomaron como referencia los siguientes parámetros:

- Densidad de conidios igual o superior a 1×10^9 por mililitro o gramo de producto.
- Viabilidad mayor a 90 %.
- Libre de todo tipo de contaminación (pureza 99.9%).

7.1.2.1 Densidad de conidios

En base a la metodología propuesta por Nájera (2010), se pesó un gramo de formulado (producto comercial y se le agregaron 500 ml de agua destilada con 200 μ L de dispersante (Tween 0.05%), y se colocó la suspensión en el agitador (CORNING PC-420D) durante 20 minutos a 500 revoluciones por minuto (rpm) para favorecer el desprendimiento de esporas. Posteriormente se llevó la suspensión a la cámara de Neubauer tomando 100 μ L y colocándolos en el espacio entre el cubre objetos y la cámara, dejando reposar un minuto. Por último se contaron las esporas contenidas en 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer (los 4 cuadrantes de los vértices y el cuadrante central) con un microscopio óptico (Wuzhou N-400M) utilizando el objetivo 40X.

7.1.2.2 Porcentaje de viabilidad

Se pesó 1 gramo del formulado (producto comercial y se colocó en 500 ml de agua destilada con 200 µL de dispersante (Tween 0.05%). Posteriormente se colocó en el agitador (CORNING PC-420D) durante 20 minutos a 500rpm. Posteriormente, en la campana de flujo laminar se colocaron 100µL de la suspensión por cada caja Petri (se hicieron tres repeticiones) con medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA) y se homogeneizaron con una "L" de vidrio estéril a lo largo y ancho de la caja. Se dejaron incubar durante 16 horas a una temperatura de 27°C.

Después de este tiempo se contaron 900 esporas al azar (300 por cada caja Petri) bajo el microscopio óptico (Wuzhou N-400M) al objetivo de 40X. Se determinó la cantidad de esporas germinadas y no germinadas y se calculó el porcentaje de germinación para determinar su viabilidad. El criterio tomado para considerar un conidio como germinado fue que el tubo germinativo fuera igual o mayor que el tamaño del conidio (Berlanga y Hernández, 2006).

7.1.2.3 Pureza

Se pesó un gramo del producto comercial y se agregó en 10 ml de agua destilada estéril con dispersante (Tween 0.05%) en un tubo de ensaye con tapón de rosca, y se agitó vigorosamente. Se hizo una serie de 10 diluciones tomando 1 ml de la suspensión de conidios y transfiriéndolo a otro tubo de ensaye con 9 ml de agua destilada estéril más dispersante (Tween 0.05%), etiquetando la primera dilución como (10^{-1}). Se agitó esta primera dilución y se repitió el procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-10} .

Se tomaron 0.2 ml (200 µL) de las diluciones y se dispersaron sobre la superficie de dos cajas de Petri con medio PDA. Se prepararon dos cajas por cada dilución y se etiquetaron. Posteriormente se incubaron las cajas a 26°C durante 5 días. Después se procedió a realizar un conteo de las colonias en cada dilución.

El promedio de colonias por dilución se calculó sumando las colonias de las dos cajas y dividiéndolas entre dos. Del mismo modo, se contó y se obtuvo el promedio de contaminación o presencia de otros microorganismos en las cajas, anotando la dilución en la que se encontraban. Finalmente, con el número de colonias del hongo y de los contaminantes se procedió a determinar el porcentaje de los contaminantes en el formulado. La contaminación debe ser menor a 0.1%, y se determinó con la siguiente fórmula:

Colonias de contaminante x 100 = % de contaminación

Colonias del hongo

7.2 Fase 2: Evaluación de interacciones in vitro

7.2.1 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó medio de cultivo PDA con 50 mg de antibiótico emicina líquida con oxitetraciclina (Pfizer), en base al procedimiento propuesto por Nájera (2010b).

Se añadieron 39g de PDA a un litro de agua esterilizada y se colocó en el agitador durante 20 minutos a 120°C y 1000 rpm para homogeneizar los compuestos de la mezcla y eliminar grumos. Posteriormente se introdujo en la autoclave para su esterilización durante 15 minutos a 15 libras de presión.

El llenado de cajas Petri con el medio de cultivo se llevó a cabo en cámara de flujo laminar. Antes de comenzar el llenado, cuando el medio se encontraba a 50° C, se le agregaron 2 ml de antibiótico.

7.2.2 Siembra de microorganismos para obtener inóculos puros

Una vez efectuado el control de calidad, se hicieron suspensiones de 1g en 500ml de agua destilada para cada especie de hongo. Posteriormente se hicieron diluciones traspasando con micropipetas 1ml de cada suspensión a tubos Falcon que contenían 8ml de agua destilada estéril y 1ml de dispersante Tween 0.1% hasta alcanzar la dilución 1×10^9 .

Para la siembra se aplicaron 100µl de cada dilución sobre la superficie de medio de cultivo (PDA+ extracto de levadura) y se distribuyó el líquido en toda la superficie de una caja de Petri de 120 x 15 mm mediante un movimiento rotatorio y con ayuda de una varilla estéril. Se hicieron 2 repeticiones para cada dilución.

Después de una semana se seleccionó la caja y la dilución donde se desarrolló mejor cada hongo, y donde no presentó contaminantes. A partir de la caja seleccionada para cada hongo se sembraron 5 nuevas cajas en medio de cultivo PDA con el fin de obtener inóculos puros. Esto se hizo en la campana de flujo laminar pasando esporas de la caja seleccionada a otra caja con medio de cultivo PDA+ extracto de levadura, con ayuda de un asa bacteriológica.

7.2.3 Pruebas de confrontación con base en el método dual, obtención de las soluciones madre a partir de inóculos puros y pruebas de confrontación con base en la densidad de esporas.

Después de una semana aproximadamente, cuando las cajas fueron cubiertas por los hongos, se seleccionaron tres de las cajas para cada hongo (puras y con mejor desarrollo), de las cuales una se utilizó para las pruebas de confrontación y las dos restantes para la obtención de las soluciones madre.

7.2.3.1 Pruebas de confrontación con base en el método dual.

Una vez seleccionada la caja Petri con las cepas puras de los hongos estudiados se les hicieron pruebas de confrontación *in vitro* basadas en el método de cultivo dual (Martínez y Solano, 1994), que consistió en colocar en una caja de Petri con medio PDA y antibiótico, un disco de micelio (de 6 mm de diámetro) de los hongos a confrontar, ayudándose de la base de una punta de micropipeta, de acuerdo a los tratamientos:

En los tratamientos con un solo hongo, se colocó el disco de micelio en el centro de la caja. Para los tratamientos con dos hongos se colocó en los extremos un disco de micelio de los hongos a interactuar. En los tratamientos con tres hongos se colocaron los discos de micelio formando un triángulo equilátero.

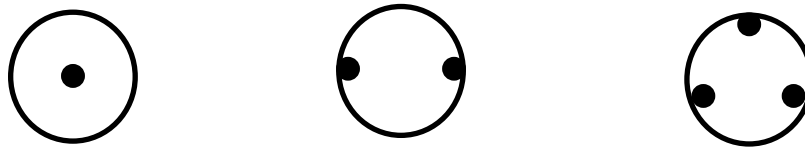


Figura 7. Modelo de siembra de tratamientos independientes y en interacción.

Los tratamientos se dejaron incubar a 26°C durante 7 días. Para determinar la velocidad de crecimiento de los hongos estudiados, se midió diariamente el crecimiento radial a partir del centro del disco. Al final del periodo de incubación, se identificaron los efectos o interacciones que existen entre los microorganismos mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), aplicando la fórmula:

$$\text{PICR} = \left[\frac{R1 - R2}{R1} \right] \times 100$$

Donde R1 es el crecimiento radial del testigo y R2 el crecimiento radial de los hongos en confrontación (Martínez *et al.*, 2008). Se realizaron tres repeticiones para cada confrontación. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con base en crecimiento radial en milímetros al final del periodo de incubación.

7.2.3.2 Obtención de las soluciones madre a partir de inóculos puros.

Las cajas de Petri con las cepas puras seleccionadas para la obtención de las soluciones madre de cada hongo se lavaron con una mezcla de 20 ml de H₂O (18 ml de H₂O destilada estéril y 2 ml de dispersante (Tween 0.1%). Para ello, se vació primero la mitad del agua (10ml) en la caja seleccionada y con ayuda de un asa bacteriológica se removieron las esporas para que quedaran suspendidas en el agua, cuidando de no raspar el medio de cultivo. Posteriormente, con ayuda de un embudo esterilizado se pasó el lavado a un tubo de ensayo, y se repitió el proceso con la otra mitad del agua esterilizada con dispersante sobrante.

Éstas fueron las soluciones madre del inóculo puro a partir del cual se hizo una serie de 10 diluciones las cuales fueron etiquetadas indicando el número de dilución.

7.2.3.3 Pruebas de confrontación con base en suspensiones a densidades iguales.

Se determinó la densidad por ml de esporas de cada dilución obtenida de las soluciones madre y se eligieron aquellas que tuvieron densidades similares entre los tres diferentes microorganismos en estudio (*B. bassiana*, *T. harzianum*, *M. anisopliae*). Posteriormente se ajustaron las diluciones elegidas a una misma densidad mediante una regla de tres, calculando los microlitros necesarios de cada dilución para lograr una densidad de 1×10^5 esporas por mililitro. Por último, en campana de flujo laminar, con ayuda de micropipetas se prepararon en tubos de ensayo las diferentes mezclas en función de los tratamientos, aforando a 1ml con agua destilada estéril cuando fue necesario.

Se sembraron 100µl de las mezclas preparadas con la densidad ajustada a 1×10^5 esporas por mililitro de cada hongo por tratamiento, y fueron colocados con una micropipeta en medio de cultivo PDA distribuyendo el líquido en toda la superficie de la caja mediante un movimiento rotatorio y con ayuda de una varilla estéril. Se hicieron 3 repeticiones para cada tratamiento. Se monitoreó el crecimiento de los tratamientos contando el número de UFC en cada tratamiento, se tomaron fotos y se hicieron observaciones durante 8 días.

7.3 Fase 3: Bioensayo con insecto

7.3.1 Experimento piloto.

Se lavaron larvas (vivas y sin alimento) de gallina ciega de la especie *Phyllophaga vetula* en tercer estadio, utilizando un vaso de precipitado de 250ml con hipoclorito de sodio al 5% y tres vasos de precipitado del mismo tamaño con agua destilada para enjuagar. Se sumergieron las larvas 1 minuto en cada vaso y se pasaron a cajas tipo multipozos. Se efectuaron 8 tratamientos con 6 repeticiones cada uno. Previa evaluación de la calidad de los productos comerciales utilizados, las larvas se inocularon utilizando una micropipeta con 5 µl de suspensión con densidad de 1×10^7 en cada tratamiento y se incubaron a 26°C durante 7 días.

7.3.2 Bioensayos de virulencia.

Una vez evaluada la calidad de los productos a utilizar, se prepararon soluciones fúngicas con una densidad de 1×10^7 en tubos de ensaye procurando un volumen final de 60ml para los 7 tratamientos. En los tratamientos con dos especies a confrontar se utilizaron 30ml de suspensión de cada una, y en el tratamiento con tres especies se utilizaron 20ml de suspensión de cada una para completar los 60ml de volumen final.

Antes de la inoculación con el hongo, las larvas fueron depositadas en cajas multipozos con papel filtro (una por cada tratamiento y repetición). Por cada tratamiento se trataron 4 larvas en tercer estadio avanzado de gallina ciega *Phyllophaga vetula* con tres repeticiones cada uno (12 larvas por tratamiento). Se utilizaron como testigo 12 larvas inoculadas solo con agua.

Posteriormente fueron inoculadas con 50 μ l de las suspensiones fúngicas depositándolas a lo largo de toda la larva. Las cajas multipozos se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético (*ziplock*) con papel filtro humedecido para conservar la humedad, las cuales se depositaron en un contenedor cubierto con una bolsa negra para evitar que la luz afectara a las larvas, y se incubaron durante 24 horas a 26°C. Cumplido ese tiempo se pasaron a temperatura ambiente conservando las condiciones de humedad durante 20 días.

8 Diseño Experimental Fase 2 y 3

Para la Fase 2 se efectuó el control de calidad de los formulados comerciales de los microorganismos en estudio:

Trichoderma harzianum (T)

Metarhizium anisopliae (M)

Beauveria bassiana (B)

Posteriormente, las pruebas de confrontación *in vitro* se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas. Se utilizó un diseño completamente al azar con 7 tratamientos con 3 repeticiones cada uno (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Diseño experimental Fase 2

Factor	Nivel	Total
Microorganismos	M	
	T	
	B	
	M-T	7
	M-B	
	T-B	
	M-T-B	
Repeticiones	3	3
Unidades Experimentales		21

Para la Fase 3 (Bioensayos de virulencia) se utilizaron el mismo número de tratamientos y repeticiones de la Fase 2, inoculando 4 larvas (vivas y sin alimento) en el tercer estadio avanzado de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) (12 larvas por tratamiento), y se utilizaron como testigo 12 larvas inoculadas solo con agua.

Tabla 2. Tratamientos y combinaciones en función de los microorganismos en estudio

Combinaciones (tratamientos)		
B-M	M-T	T
B-T	M	
B-M-T		
B		

T=*Trichoderma harzianum*, M=*Metarhizium anisopliae*, B=*Beauveria bassiana*,

8.1 Variables Biológicas

Tabla 3. Variables biológicas dependientes e independientes medidas en casa fase del experimento

	<u>VARIABLES MEDIDAS</u>	<u>FASE</u>
<u>DEPENDIENTES</u>	Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , y las combinaciones entre ellos	<u>1, 2, 3.</u>
<u>INDEPENDIENTES</u>	Tasa de crecimiento (mm/día) (Ver metodología).	<u>2</u>
	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRC) (Ver metodología).	<u>2</u>
	Número de unidades formadoras de colonias (UFC) (Ver metodología).	<u>2</u>
	Numero de larvas infectadas (Ver metodología).	<u>3</u>

9 Análisis de resultados

En la Fase 2 los resultados se analizaron mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y para ver si existían diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis de varianza de una vía y una prueba de Tukey utilizando el paquete Statgraphics versión 15.2.06. (Anexos). En la Fase 3 se evaluó cualitativamente el número de larvas infectadas a través de síntomas visibles.

10 Resultados y discusión

10.1 Evaluación de la calidad de inóculos comerciales y obtención de cultivos monospóricos.

Los resultados de las pruebas de calidad se presentan en la Tabla 4. Debido a que todos los productos registraron un porcentaje de contaminación mayor al 0.1%, fue necesario realizar diluciones (1×10^{-10}) para seleccionar unidades formadoras de colonias puras (UFC) y así obtener cultivos monospóricos. La Figura 8 ejemplifica la contaminación de los bioinoculantes de *M. anisopliae* y *T. harzianum*, a diferentes diluciones; mientras que la Figura 9 muestra los cultivos monospóricos obtenidos.

Tabla 4. Control de calidad de bioinoculantes comerciales: hongos entomopatógenos y antagonistas.

Especie	Densidad de esporas/gramo reportadas en el producto comercial.	Densidad de esporas/gramo observadas en el control de calidad	Viabilidad (%)	Pureza (%)
<i>B. bassiana</i>	5.3×10^9	4.76×10^9	91.5	98.42
<i>M. anisopliae</i>	5.0×10^9	4.37×10^9	94.2	98.53
<i>T. harzianum</i>	1.2×10^{11}	1.08×10^9	9.0	84.62

Como se aprecia en la Tabla 4, las diferencias entre la densidad reportada en el envase del producto y las observadas en el control de calidad es mínima en el caso de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Por el contrario, en *T. harzianum* se registró una diferencia de 100 veces menos esporas respecto a las reportadas en el envase del producto.

En cuanto a los resultados de viabilidad, se aprecia que *B. bassiana* y *M. anisopliae* tienen porcentajes aceptables de acuerdo a los parámetros de calidad establecidos, mientras que en *T. harzianum* se registró una viabilidad muy por debajo del parámetro. No obstante, fue interesante observar cómo a pesar de ello y de tener una densidad menor a la reportada en el envase, las esporas de *T. harzianum* que germinan logran colonizar y competir eficientemente en los tratamientos individuales y en interacción.

Evidenciar las diferencias entre las características reportadas en las etiquetas de los productos y las obtenidas en el control de calidad resulta importante porque la congruencia entre las mismas ayuda a garantizar su uso como una opción viable de control biológico que represente una alternativa exitosa, confiable y honesta para los usuarios ante control químico y sus efectos ambientales negativos.

Asimismo, dicha congruencia respaldaría las dosis y formas de aplicación recomendadas en las etiquetas, las cuales no siempre son claras y específicas respecto a la cantidad a utilizar de acuerdo al tipo de cultivo y superficie en la que se aplicará.

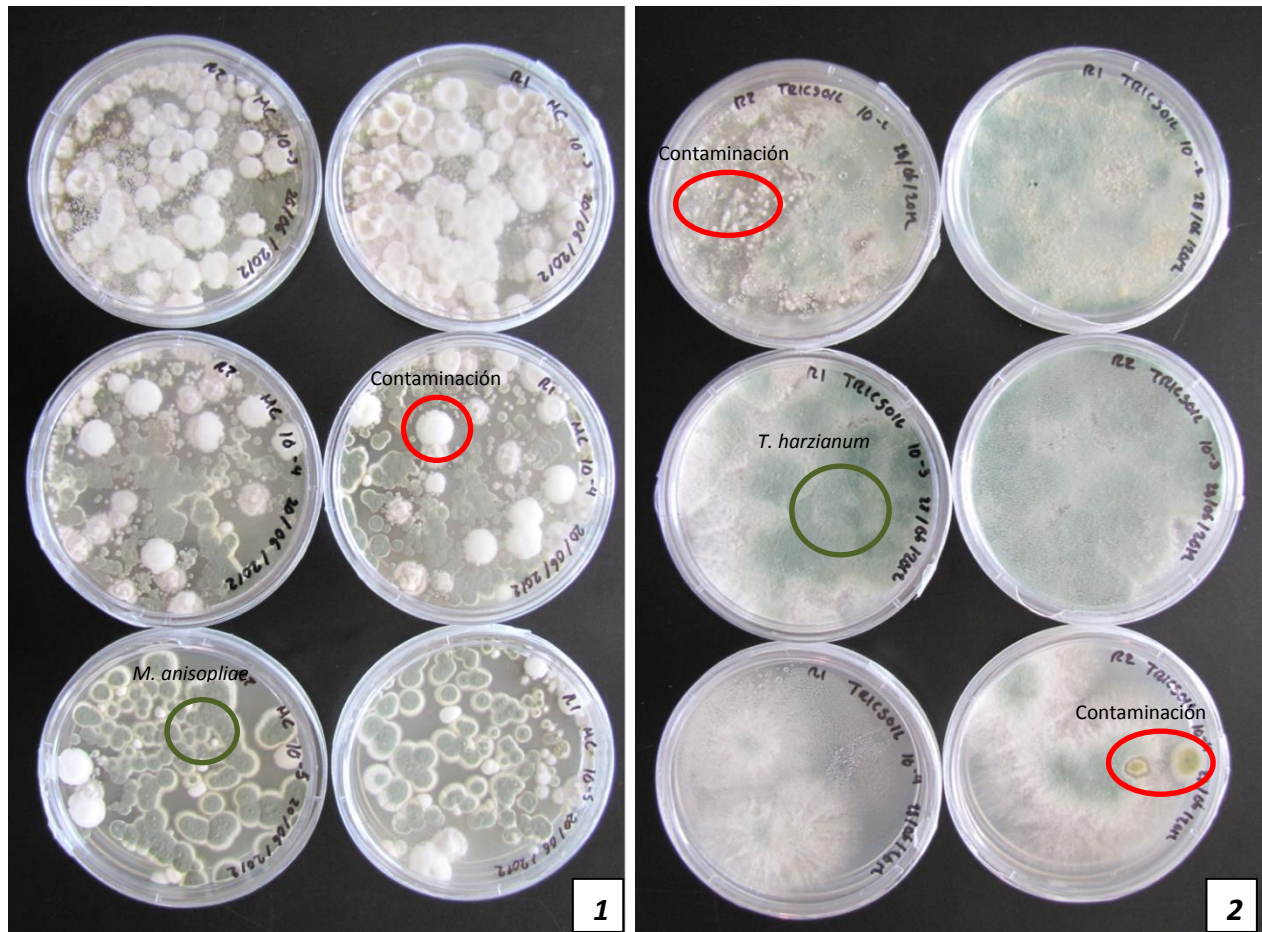


Figura 8 Contaminación de los bioinoculantes de *M. anisopliae* (1) y *T. harzianum* (2).

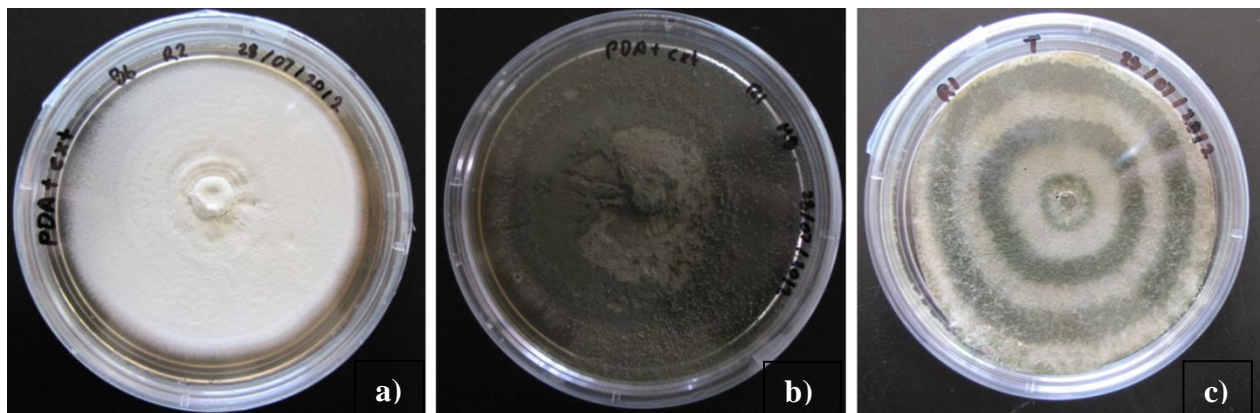


Figura 9 Cultivos monospóricos obtenidos en medio de cultivo PDA. a) *B. bassiana*, b) *M. anisopliae* y c) *T. harzianum*

10.2 Crecimiento radial individual (mm) y pruebas de confrontación con base en el método dual.

Las pruebas de confrontación *in vitro* a partir de cultivos puros (Figura 10) mostraron diferencias significativas entre las tres especies evaluadas ($P \leq 0.05$, Anexos). *T. harzianum* presentó la mayor tasa de crecimiento en los tratamientos individuales y los mayores porcentajes de inhibición (PICR) en los tratamientos en interacción con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Tabla 5 y Tabla 6).

Tabla 5. Tasa de crecimiento radial individual de hongos entomopatógenos y antagonistas a los 7 días.

Especie	Crecimiento radial total (mm)*	Tasa de crecimiento (mm d-1)
<i>B. bassiana</i>	10.0 a (± 0.8)	1.25
<i>M. anisopliae</i>	14.3 b (± 1.6)	1.79
<i>T. harzianum</i>	84.0 c (± 0.0)	10.50

*Valores con letra diferente son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). Se muestra la media estimada a partir de 3 repeticiones analizadas con una prueba de Tukey.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los tratamientos en interacción

Tratamiento	PICR (%)
<i>B. bassiana</i> - <i>M. anisopliae</i>	5.15 (± 0.9)
<i>B. bassiana</i> - <i>T. harzianum</i>	36.41 (± 1.8)
<i>B. bassiana</i> - <i>M. anisopliae</i> - <i>T. harzianum</i>	49.11 (± 1.2)
<i>M. anisopliae</i> - <i>B. bassiana</i>	-11.67 (1.6)
<i>M. anisopliae</i> - <i>T. harzianum</i>	23.66 (± 1.4)
<i>M. anisopliae</i> - <i>T. harzianum</i> - <i>B. bassiana</i>	49.00 (± 1.2)
<i>T. harzianum</i> - <i>B. bassiana</i>	0.78 (± 0.8)
<i>T. harzianum</i> - <i>M. anisopliae</i>	1.19 (± 0.0)
<i>T. harzianum</i> - <i>M. anisopliae</i> - <i>B. bassiana</i>	19.44 (± 13.5)

*PICR= $[(R1-R2)/R1] \times 100$, donde R1 es el crecimiento radial del testigo y R2 el crecimiento radial de los hongos en confrontación (Martínez *et al.*, 2008).

*Valores negativos significan crecimiento mayor en tratamientos en interacción que en tratamientos individuales.

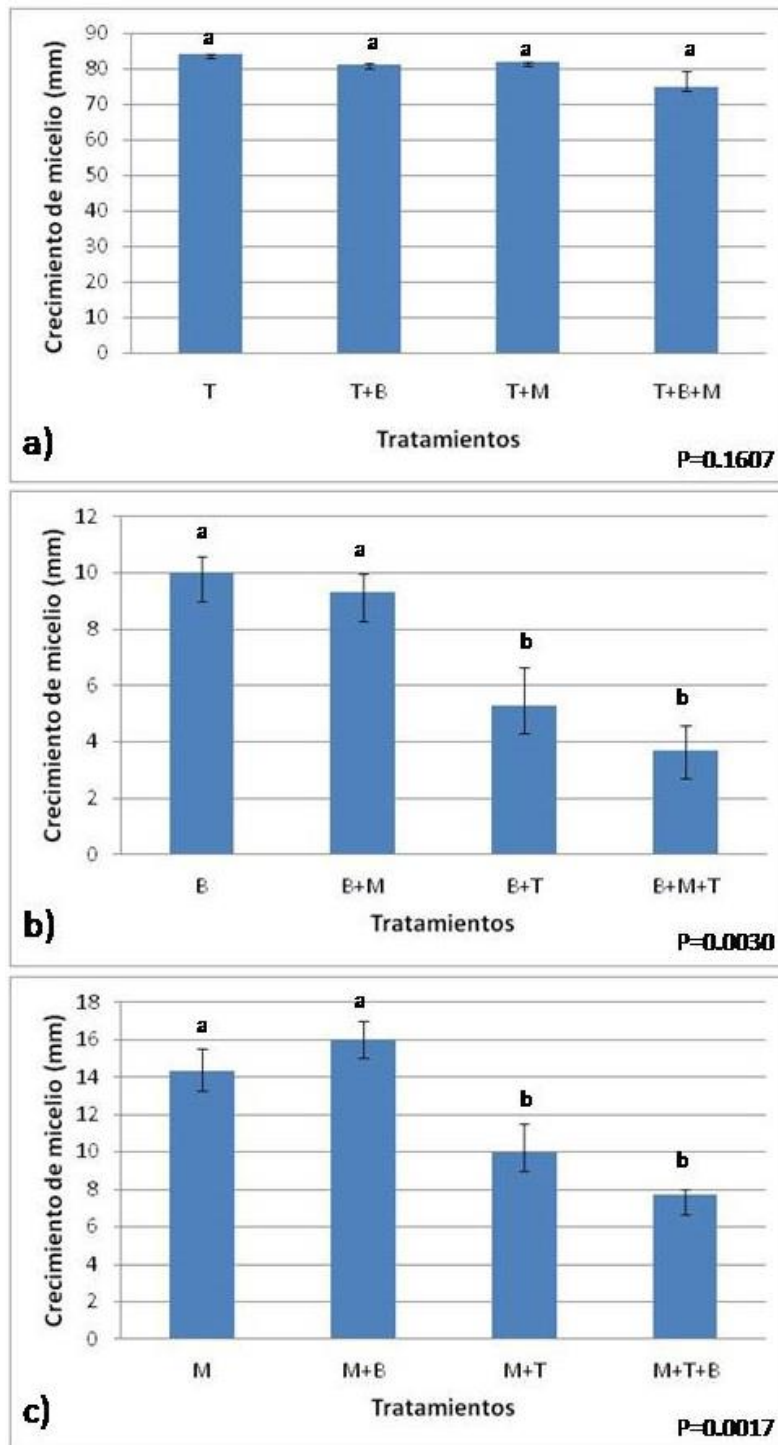
En respaldo a los datos anteriores, el ANOVA aplicado a los experimentos de confrontación registró diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$) siempre que *T. harzianum* estuvo presente (Figura 10 y Anexos). El crecimiento del micelio de *T. harzianum* no se afectó al interactuar con los hongos entomopatógenos, ya que en el análisis no se detectó diferencia significativa ($P > 0.05$). En contraste, los hongos entomopatógenos redujeron su crecimiento significativamente al estar en confrontación con *T. harzianum*.

Lo anterior puede deberse a la acción antagonista de *T. harzianum*, capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio y competir de manera eficiente por sustrato y espacio. Asimismo, actúa por medio de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas y micoparasitismo. (Harman y Kubicek, 1998; Chet *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1995). En la misma línea, otras investigaciones indicaron que las cepas de *T. harzianum* y *T. viride* presentan una gran capacidad

antagónica, dada su alta velocidad de crecimiento y alta competencia por espacio, y en consecuencia pueden alterar el crecimiento de los hongos y bacterias en el suelo, reduciendo la población microbiana, e incluso disminuyendo los procesos biológicos (Borrero y Silva, 2005).

En el caso de *B. bassiana*, aunque redujo su crecimiento en la confrontación con *M. anisopliae*, la diferencia no fue significativa. Sin embargo, cuando se confrontó con *T. harzianum* y con *M. anisopliae* + *T. harzianum* la reducción en el crecimiento de micelio fue significativa ($P \leq 0.05$). Con respecto a *M. anisopliae*, la confrontación con *B. bassiana* no redujo el crecimiento de su micelio, y aunque su crecimiento fue mayor en relación al testigo sin confrontar, la diferencia no fue significativa. En cambio, al confrontar el crecimiento de *M. anisopliae* en presencia de *T. harzianum* y *T. harzianum* + *B. bassiana*, la reducción del crecimiento de micelio fue significativa ($P \leq 0.05$; Figura 10).

Esto coincide con estudios hechos por Krauss *et al* (2004) con *M. anisopliae* y *B. bassiana* concluyendo que son compatibles para el manejo integrado de plagas, dado que su coaplicación no afecta su eficacia como agentes de control biológico al comprobarse que los bioensayos donde se utilizó *M. anisopliae* junto con *B. bassiana*, resultaron letales hacia el “gorgojo” (*Cosmopolites sordidus*), el “barrenador de la caña” (*Diatraea saccharalis*) y el coleóptero *Sitophilus oryzae*.

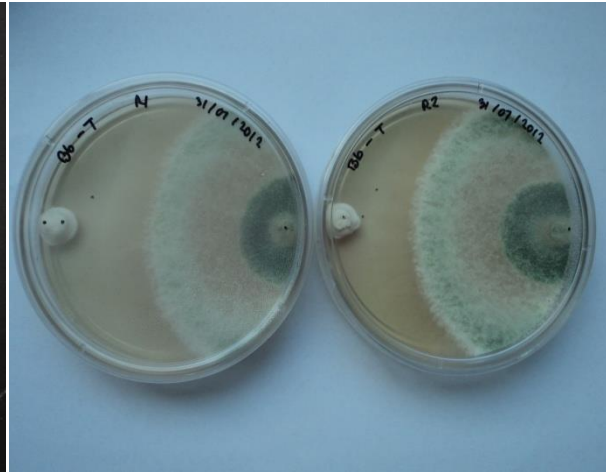


T= *T. harzianum*; B= *B. bassiana*; M= *M. anisopliae*

Figura 10. Crecimiento promedio (mm/día) durante siete días en interacción in vitro: a) *T. harzianum*, b) *B. bassiana* y c) *M. anisopliae*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Se muestra la media estadística con barras de error estándar estimadas a partir de $n=3$ y analizadas con una prueba de Tukey.



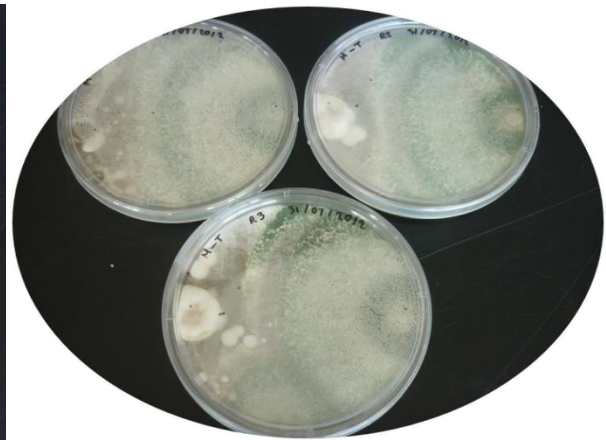
Crecimiento de *T. harzianum*



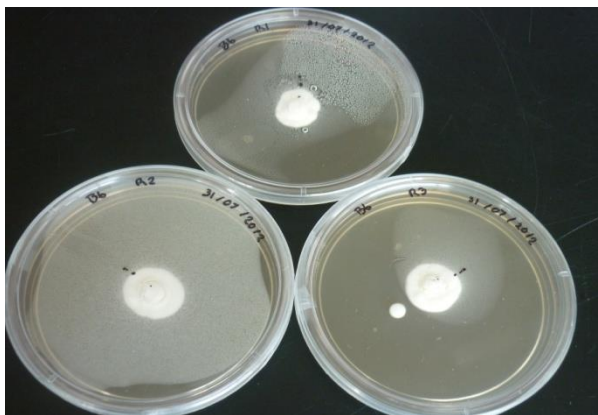
Crecimiento de *B. bassiana* en interacción con *T. harzianum*



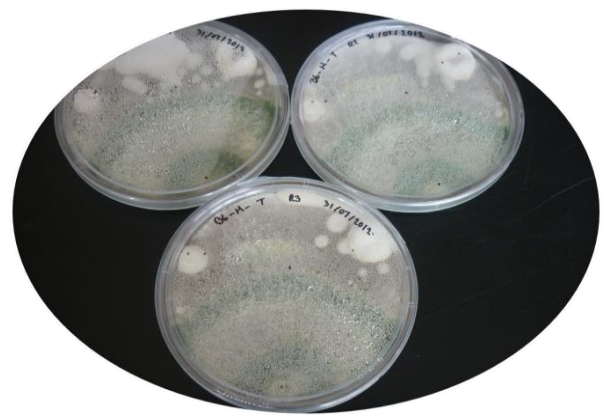
Crecimiento de *M. anisopliae*



Crecimiento de *M. anisopliae* en interacción con *T. harzianum*.



Crecimiento de *B. bassiana*



Crecimiento de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *T. harzianum* en interacción.

Figura 11. Crecimiento radial de hongos entomopatógenos y antagonistas en pruebas de confrontación *in vitro*.

10.3 Crecimiento individual (UFC) y pruebas de confrontación de hongos entomopatógenos y antagonistas con base en la densidad de esporas.

Las Tablas 7 y 8 muestran el número promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) de *T. harzianum*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* de manera independiente y en interacción durante los primeros cinco días después de la siembra. En las Figuras 12 y 13 puede observarse el crecimiento gradual de las UFC en los tratamientos individuales y en confrontación.

Puede observarse que en el tratamiento con *T. harzianum* a partir del tercer día ya no es posible contar las UFC dada su velocidad de crecimiento, la cual ocasiona que las colonias se junten y confundan unas con otras. Esto concuerda con estudios que demuestran dicha velocidad de crecimiento y alta competencia por espacio (Belanger *et al.*, 1995; Chet *et al.*, 1997; Harman y Kubicek, 1998; Borrero y Silva, 2005). Por otro lado, el número de UFC de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sembrados en forma independiente aún pudo contarse hasta el cuarto día (Tabla 7).

Tabla 7. Promedio de UFC en siembras de *T. harzianum* (T) *M. anisopliae* (M) y *B. bassiana* (B) de manera independiente

Día	M	B	T
1	0	0	0
2	0	49.3 (± 2.0)	9.6 (± 1.5)
3	79 (± 7.0)	116.3 (± 3.0)	∞
4	81.6 (± 11.2)	121.6 (± 5.8)	
5	∞	∞	

En cuanto a la interacción de los microorganismos estudiados (Tabla 8), en la confrontación entre *M. anisopliae*-*B. bassiana*, sólo se identificaron UFC de *M. anisopliae*, mientras que en el tratamiento *M. anisopliae*-*T. harzianum* sólo se registraron colonias de *T. harzianum*. En ambos tratamientos fue posible contar las colonias hasta el cuarto día, a diferencia del tratamiento inoculado únicamente con *T. harzianum*, en el cual solo fue posible contar hasta el tercer día, lo cual permite plantear la hipótesis de que la interacción con *M. anisopliae* retrasa el crecimiento de *T. harzianum*.

Cabe resaltar que lo observado en la interacción de *M. anisopliae* con *B. bassiana* no coincide con los resultados obtenidos en este mismo estudio en la evaluación con el método dual, ni con los registrados por Krauss *et al.* (2004), que incluyeron a *M. anisopliae* y *B. bassiana* concluyendo que son compatibles para el manejo integrado de plagas.

En la interacción *B. bassiana*-*T. harzianum* sólo se registraron UFC de *T. harzianum*, y a partir del tercer día ya no fue posible contar las colonias. Sucedió lo mismo cuando *T. harzianum* fue sembrado de manera independiente, por lo que la interacción con *B. bassiana* parece no afectarlo. Lo mismo se

registró en el tratamiento donde interactuaron los tres microorganismos donde sólo fue posible estimar el crecimiento de *T. harzianum*, y al tercer día ya fue imposible contar.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el método de confrontación dual de este estudio, y otros resultados que indican que *T. harzianum* presenta una gran capacidad antagónica, dada su alta velocidad de crecimiento y competencia por espacio, y en consecuencia pueden alterar el crecimiento de los hongos y bacterias en el suelo, reduciendo la población microbiana, e incluso disminuyendo los procesos biológicos (Borrero y Silva, 2005).

Tabla 8. Promedio de UFC en la interacción entre *T. harzianum* (T), *B. bassiana* (B) y *M. anisopliae* (M).

Días	M-B		M-T		B-T		M-B-T		
	M	B	M	T	B	T	M	B	T
1	66.3 (± 7.5)	0	0	0	0	0	0	0	118 (± 21.0)
2	75.3 (± 11.5)	0	0	2.3 (± 1.1)	0	185.6 (± 35.5)	0	0	142 (± 1.4)
3	85.6 (± 8.4)	0	0	4.0 (± 2.0)	0	∞	0	0	∞
4	81.3 (± 8.4)	0	0	4.3 (± 1.5)					
5	∞			∞					

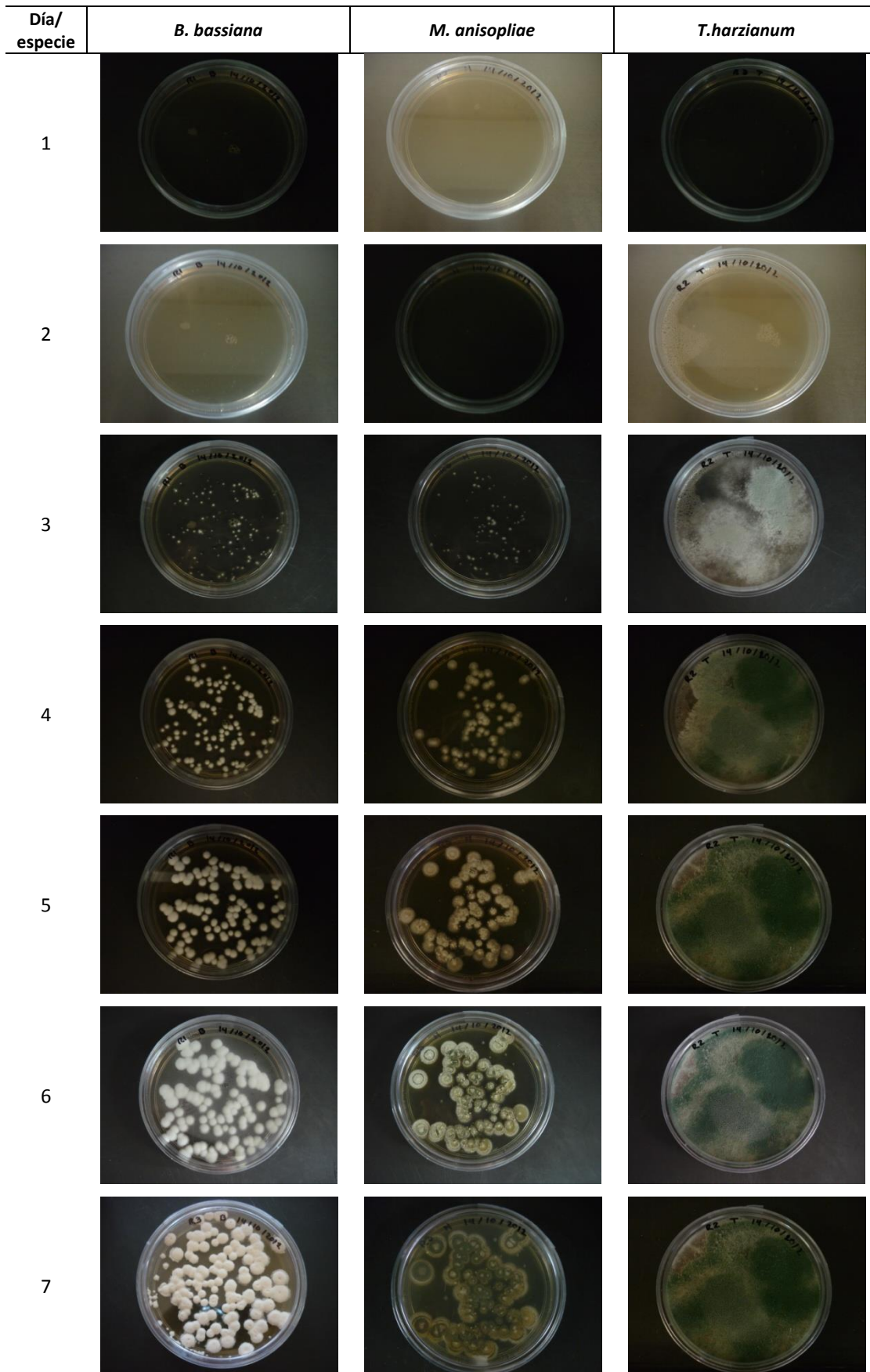


Figura 12. Formación de UFC de *T. harzianum*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* de manera independiente

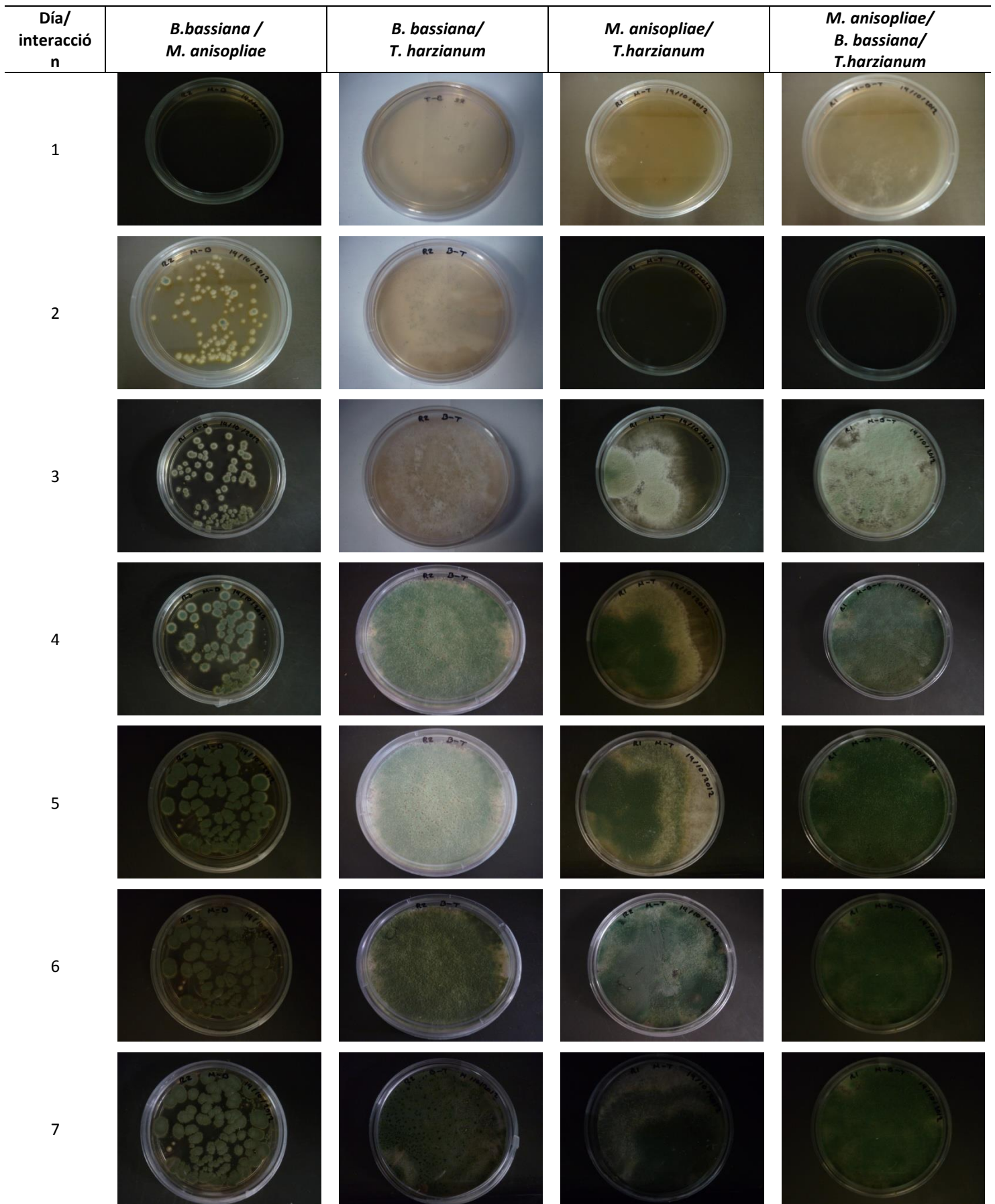


Figura 13 Formación de UFC de *T. harzianum* *B. bassiana* y *M. anisopliae* en confrontación

10.4 Bioensayo con insecto

No se registró mortalidad de larvas en los tratamientos inoculados con *B. bassiana* o con *M. anisopliae*. Tampoco se registró infección en el tratamiento que combinó los tres microorganismos en estudio (Figura 14). Por el contrario, a partir del tercer día de observación se registró mortalidad asintomática de larvas en algunos tratamientos (Figura 15). Solamente se observó un caso de mortalidad con síntomas de infección por *B. bassiana*, sin embargo ésta fue en el tratamiento testigo.

La no infección de larvas pudo deberse a que la susceptibilidad de larvas a los hongos entomopatógenos utilizados en la evaluación fue insuficiente. Se sabe que la patogenicidad, virulencia y densidad de esporas son factores importantes en los bioensayos con insectos (Zhioua *et al.*, 1997; Butt y Goettel, 2000). En este caso, la densidad de esporas utilizada fue de 1×10^7 conidios/ml, la cual es óptima de acuerdo a bioensayos en los cuales se evaluó a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), en los que fueron registradas mortalidades entre 26.6% y 88.6% con diversos aislados (Brito *et al.*, 2008). Asimismo, en *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), se observó una mortalidad entre 11% y 34% al utilizar dosis entre 1.3 a 2.9×10^7 conidios/ml con cinco cepas de *M. anisopliae* (De la Rosa Reyes *et al.*, 1995). Otro ejemplo es el trabajo de Toriello *et al.*, (2008) donde se evaluó la virulencia y termotolerancia de *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* en pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) inoculándolos con 2 ml de una suspensión fúngica de 10^7 conidios/ml, alcanzando una mortalidad del 60-100%. Lo anterior comprueba que la densidad de esporas utilizada en el ensayo con *Phyllophaga vetula* era adecuada para provocar infección, y permite plantear la hipótesis de que los aislados utilizados no tuvieron la virulencia suficiente hacia el insecto blanco *P. vetula*.o bien, que esta variedad de *Phyllophaga* tiene la capacidad de tolerar las cepas de microorganismos utilizadas.

Por otra parte, las condiciones de incubación como humedad y temperatura son factores que afectan la eficacia de los hongos entomopatógenos, la virulencia en insectos, la viabilidad de esporas, el crecimiento vegetativo y la tasa de penetración del tubo germinativo en el insecto. Toriello *et al.* (2008) estimaron un crecimiento óptimo para aislados mexicanos entre 25 y 30°C, lo cual concuerda con los resultados de Berlanga y Hernández (2002), quienes encontraron altos porcentajes de germinación en cultivos de *M. anisopliae* a 27°C, y con Fargues *et al.* (1992), quien reportó una temperatura óptima entre 25 y 28 °C para *M. anisopliae* y de 25°C para *B. bassiana*.

No se considera que las condiciones de incubación empleadas en el experimento fueron la causa de la falta de infección de las larvas, ya que tanto la humedad como la temperatura se mantuvieron en el rango óptimo en este experimento. Esto permite suponer que la falta de infección fue ocasionada por la baja patogenicidad y virulencia de las cepas en *P. vetula*, lo cual refuerza la idea de que la eficacia y confiabilidad en el uso de entomopatógenos para el control de

plagas del suelo deberá sustentarse en el conocimiento profundo de las interacciones entre el insecto blanco, el patógeno y el ambiente

Se detectó la presencia de microorganismos diferentes a los estudiados en el 50% de los tratamientos (4 tratamientos), y en el 6.25 % del total de larvas (6 larvas). En la Figura 15 pueden observarse algunos ejemplares. La muerte e infección pudo deberse al manejo de los insectos y al desarrollo de microbios simbiosis presentes en las larvas, en particular los asociados al tracto digestivo.

Nájera y Jackson (2010) destacan la importancia de las interacciones entre las larvas de Melolonthidae y los microbios presentes en el tracto digestivo. La microflora del intestino es sumamente variable, y cambia en función del sitio de colecta y dieta de los insectos. Morfológicamente, en la cámara de fermentación de los insectos habitan diversos microorganismos (bacterias y protozoarios) que influyen en el proceso de digestión y extracción de nutrientes. Con base en esto se plantea la hipótesis de que la presencia de microorganismos diferentes a aquellos con los cuales las larvas fueron inoculadas, se deba al desarrollo de microbios en el tracto digestivo que iniciaron el proceso de degradación y descomposición una vez muertas las larvas. Asimismo, se plantea que la causa de muerte pudo deberse al manejo de los insectos, y probablemente al estrés derivado del mismo.

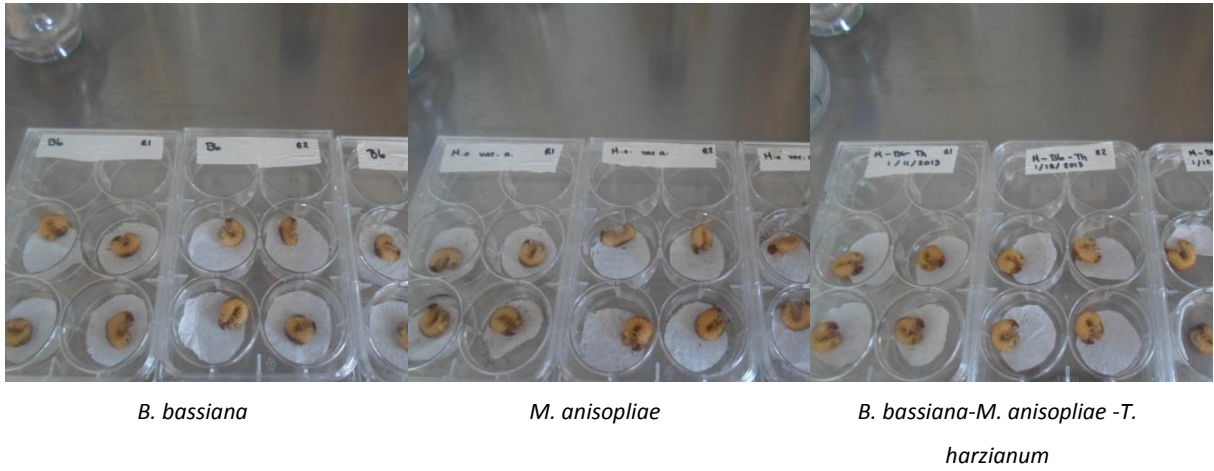


Figura 14 Tratamientos sin muerte de larvas de *P. vetula*



Figura 15 Larvas infectadas por microorganismos diferentes a *T. harzianum*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

11 Conclusiones y recomendaciones.

Al evaluar la calidad de los productos comerciales, es posible concluir que no cumplieron con los estándares de densidad de esporas, viabilidad y pureza, por lo que es fundamental hacer pruebas de control de calidad de los productos que contengan microorganismos para el control biológico, y se recomienda que los usuarios realicen o soliciten dichas pruebas antes de utilizarlos.

Aunque en las pruebas de confrontación con base en el método dual pudieron observarse interacciones de antagonismo por competencia de espacio entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *T. harzianum*, hay que destacar que los resultados obtenidos en evaluaciones *in vivo* no siempre corresponden a los registrados *in vitro*, por lo que es necesario complementar la información generada con estudios en condiciones de invernadero y campo.

Debido al rápido crecimiento de *T. harzianum*, más que lograr evaluar la interacción de los microorganismos, lo que permitió el experimento fue comparar de forma indirecta la viabilidad, la capacidad de formar colonias y la velocidad del crecimiento de los microorganismos. *Trichoderma harzianum* fue el microorganismos benéfico que creció más y que no fue afectado por la interacción con *B. bassiana*, *M. anisopliae*.

T. harzianum creció más lento en de forma independiente que en asociación con *M. anisopliae*, lo que podría indicar que la interacción retrasó el crecimiento de *T. harzianum* y que probablemente haya una competencia entre ellos.

Los resultados de las pruebas de confrontación sugieren que la aplicación de *T. harzianum* en conjunto con hongos entomopatógenos no es viable, ya que coincide y comprueba los modos de acción de *Trichoderma* frente a hongos entomopatógenos por competencia de espacio y nutrientes (Rey *et al.*, 2000, Hermosa *et al.*, 2012), dada su plasticidad ecológica y velocidad de esporulación, crecimiento y desarrollo (Infante *et al.*, 2009).

La posible causa de la no infección del insecto blanco pudo deberse a la baja patogenicidad de los aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados. Asimismo, la muerte e infección de las larvas con microorganismos distintos a los evaluados pudo deberse al manejo de los insectos y al desarrollo de microbios simbioses presentes, en particular los asociados al tracto digestivo.

Es importante tomar en cuenta que el estudio fue hecho en condiciones controladas, sirviendo como antecedente para complementarse con estudios en campo que garanticen la eficacia de los microbios benéficos donde se evalúe su interacción con los insectos plaga y otros componentes del agroecosistema en el cual serán utilizados.

El experimento realizado en la presente tesis pretende contribuir a generar información que evalúe la interacción entre microorganismos benéficos, ya que la mayoría de los estudios donde se realizan pruebas de confrontación se hacen entre el patógeno y el hospedero.

Una recomendación derivada de los resultados obtenidos en este estudio que pudiera tomarse en cuenta para el manejo de gallina ciega en México utilizando enemigos naturales como los hongos entomopatógenos, es que aunque existen avances en la detección en campo y pruebas en laboratorio, se debe hacer énfasis en la selección de cepas altamente virulentas, desarrollar tecnologías de producción, formulación y aplicación de las mismas; promover un sistema de certificación de calidad serio de los productos comerciales y sustentar la eficacia y confiabilidad en el uso de entomopatógenos para el control de plagas del suelo en el conocimiento profundo de las interacciones entre el insecto blanco, el patógeno y el ambiente.

12 Literatura citada

Adams, P. B., Ayers W.A (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. The American Phytopathological Society. 69 (8): 896-898.

Bae H., Roberts D. P., Lim H.-S., Strem M. D., Park S.-C., Ryu C.-M., Melnick R. L. y Bailey B. A.(2010). Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(3): 336-351

Belanger R.; Dufour N.; Caron J.; Benhamou N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Sci techol* (5): 41-54.

Berlanga A., Hernández V.M. (2002). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae*. var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca picefrons picefrons*. *Manejo Integrado de Plagas* (63):51-55.

Berlanga A. (2006). Reconocimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima, México.

Berlanga A.; Hernández V.M. (2006). Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima, México.

Borrero C. A., Silva M.R (2005). Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxysol clase IV del piedemonte llanero. *Orinoquia*. 9(2): 6-14

Brito E. S., De Paula A. R., Vieira L. P., Dolinski C., Samuels R. I. (2008). Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol science and technology*. 18(7): 665-673.

Butt T. M., Goettel M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. En: Navon A., Ascher K. R. S. (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. CABI Publishing, Wallingford: 141-155.

Cano E.B. (2007). Taxonomía, daño al cultivo y distribución del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeidae), que atacan el maíz en Guatemala. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*. (16): 85-98.

Carballo M., Hidalgo E. (1999). Reconocimiento de organismos entomopatógenos de importancia en el control de plagas insectiles. En: Hidalgo E. (Ed.) Curso de Control de Plagas Agrícolas y Forestales con Agentes Microbiológicos.

Chávez M. (2006). Producción de *Trichoderma* y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial-Microbiología Agrícola y veterinaria. Bogotá D.C.

Chet I, Ibar J., Hadar I. (1997). Fungal antagonistic and mycoparasites. En: Wick Low D.T., Soderstrom B. (Eds.). The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. New York: Springer Verlag: 165-192.

Davidson R H., Lyon W.F. (1979). Insect Pests of Farm, Garden and Orchard. 7a Edición. New York. John Wiley and Sons.

De La Rosa W., Godinez J. L., Alatorre R. (1995). Biological activity of five strains of *Metarhizium anisopliae*, upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Col.: Scolytidae). *Entomophaga*, 40 (3-4):, 403-412.

DeBach P. (1964). Biological Control of Insects Pests and Weeds. Chapman and Hall, London: 844.

Fargues J., Maniania N.K, Delmas J.C, Smith N. (1992). Influence de la temperature sur la croissance in vitro d'Hyphomycetes entomopathogenes. *Agronomie* (12): 557-56.

Farr D.F., Rossman A.Y. (2006) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Consultado el 23 de julio 2012 en Retrieved July 23, 2012, en <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994). Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*.

Ferron P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. (23):409-442.

Ferron, P. (1981). Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. En Burges, H. D. Microbial control of pest and plant diseases 1970- 1980 p.

FMC Agroquímica de México (2008). Tomado de la web http://www.fmcagroquimica.com.mx/pdf/info_tecnica/gallina_ciega.pdf

Fontenelle A. D. B., Guzzo S.D., Lucon C.M.M., Harakava R. (2011). Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30(11): 1492-1500.

Foty (2007). Todo sobre *Trichoderma*. Consultado en Foro electrónico Infojardín. <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=39804>.

Guigón C., González P.A. (2004). Selección de cepas de *Trichoderma spp.* con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum L.*). Revista Mexicana de Fitopatología, (22):117-124.

Hajek A.E., St. Leger R.J. (1994). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. Annu. Rev. Entomol. (39): 293-322.

Harman G., Kubicek C. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor and Francis.(1):25-40.

Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Reeb V. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological research*. 111(5): 509-547.

Hjeljord L. G., Stensvand A. y Tronsmo A (2000). Effect of Temperature and Nutrient Stress on the Capacity of Commercial *Trichoderma* Products to Control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in Greenhouse Strawberries. *Biological Control* 19(2): 149-160.

Humber R.A. (1997). Identification Fungi:153-186. En: Lacey L. (Ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press: 409.

Ignoffo C M., García C. (1992). Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight. *Environ. Entomol.* (24):4, 913-917.

Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos Fitopatógenos. *Rev. Protección Vegetal*, (24): 14-21.

Krauss U., Hidalgo E., Arroyo C., Piper.S.R (2004) Interaction between the entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys spp.*, *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. *Biocontrol Sci. Technol.* (14): 331-346.

Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K., Vail P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological Control* (21): 230/248.

Lecuona R., B. Papierok y Riba.G. (1996). Hongos entomopatógenos: 35–60. En: Lecuona R. E. (Ed). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina.

López H; Pérez M; Llobel A; Vázquez M; Bonillas Z. (1999). Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora Cinamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo serie Horticultura.* (5): 261-265.

Lozoya Saldaña H., Coyote Palma M. H., Ferrera Cerrato R y Lara-Hernández M-E. (2006). Microbial antagonism against *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia* 40(4): 491-499.

Martínez B., Reyes Y., Infante. D., González E., Baños H., Cruz A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev. Protección Vegetal*, 23: 118-125.

Martínez B., Solano T. (1994). Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. *Rev. Protección Vegetal*, 10: 221-225.

Mcspadden Gardener, B. (2002) Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens. <http://www.oardc.ohio/state.edu/apsbcc/productlist.html>.

Millarium, (2004). Ingeniería Civil y Medio Ambiente. Contaminantes del suelo. Consultado en: <http://www.miliarium.com/Proyectos/SuelosContaminados/ArchivosMemoria/ContaminantesSuelos.asp>

Morón M.A, Rodríguez del Bosque L.A. (2010). Importancia, historia y retos. En: Rodríguez del Bosque L.A., Morón M.A. Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Mundi Prensa, México. (1): 3-17.

Morón M.A. (1997). Melolonthinae. En: M.A. Morón, .Ratcliffe B.C., Deloya C. (Eds) Atlas de los escarabajos de México. Coleóptera Lamellicornia, Familia Melolonthidae. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Sociedad Mexicana de Entomología, México:(I): 205-264.

Morón M.A. (2004). Escarabajos: 200 millones de evolución. Segunda Edición. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México y Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) Zaragoza, España:204.

Morón M.A. (2006). Revisión de las especies de *Phyllophaga* (*Phytalus*) grupos obsoleta y pallida (Coleóptera: Melolonthidae). *Folia Entomol. México*. 45 (1): 1-104.

Morón M.A, Rodríguez del Bosque L.A., Aragón A., Ramírez C. (2010). Biología y hábitos de coleópteros escarabaeoideos. En: Rodríguez del Bosque, Morón M.A. Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Mundi Prensa, México. (4): 65-82.

Morón M.A. (1984). Escarabajos, 200 millones de años de evolución. Publicación 14. Instituto de Ecología, México: 131.

Morón M.A. (2003). Diversidad distribución e importancia de las especies *Phyllophaga* Harris en México (Coleóptera : Melolonthidae) En: A. Aragón-García, M. A. Morón y A. Marín-Jarillo (Eds.),

Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Publicación especial Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México: 1-27.

Nájera M.B, Jackson A (2010). Interacciones bióticas y abióticas entre plagas del suelo y entomopatógenos. En: Rodríguez del Bosque, Morón M.A. Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Mundi Prensa, México. (6):97-124.

Nájera M.B., Castro A., Aragón A. (2010). Prácticas culturales y físicas. En: Rodríguez del Bosque, Morón M.A. Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Mundi Prensa, México:149-168.

Nájera . M.B. (2010a). Memoria del Segundo Curso-Taller de hongos entomopatógenos: herramienta para el control Microbiano de Insectos. INIFAP, Fundación PRODUCE y PROCAL. Los reyes, Michoacán.

Nájera-Rincón M.B. (2010b). Producción de hongos entomopatógenos: Herramienta para el Control Microbiano de Insectos .INIFAP.

Orestes Elósegui Claro (2006) Métodos Artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de La Habana, Cuba.

Otadoh, J.A., Okoth, S.A., Ochanda, J., Kahindi, J.P. (2011). Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* F. sp. *Phaseoli*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (13):99-107.

Pal K. K., McSpadden B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.APSnet.

Poinar OG, Thomas MG (1984). Laboratory guide to insect pathogen and parasites Plenum press. Nueva York y London.

Rabbendran N., Jones E.E., Moot D.J., Stewart A. (2006). Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control*, (39): 352-362.

Rehner S.A., Minnis A.M, Sung G-H, Luangsaard JJ, Devotto L, Humber RA. (2011). Phylogenetic systematics of the anamorphic entomopathogen *Beauveria*. *Mycologia*. (103):1055-1073.

Rey M., Delgado-Jarana J., Rincón A.M., Limón M. C., Benítez T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol* (17): 31-36.

Roberts D. W., Yendol W.G. (1971). Use of Fungi for Microbial Control of Insects. Capitulo 5 en Microbial Control of Insects and Mites. H.D. Burges, N.W. Husey. Academic Press London:125-149.

Roberts D.W. (1979). Past history and current status of the development of entomopathogenic fungi in the United States, en: Ignoffo C.M.(Eds) Proceedings of Project V Microbial Control of Insect Pests. . Washington, DC.: American Society for Microbiology.

Roberts D.W. (1989). World picture of Biological Control of insects by fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, (84):89-100.

Rosas N.M. (1999). Desarrollo de formulados asperjables de *Beauveria Bassiana* (Balsamo Vuillemin) utilizando diversos polímeros. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad De Ciencias Biológicas. División De Estudios De Postgrado.

Saul S. H., Tsuda D., Wong T.T.Y. (1983). Laboratory and field trials soil applications of methoprene and other insecticides for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 76: 174–177

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

Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. (2007). Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. Stud Mycol (57) :5–59, doi:10.3114/sim.2007.57.01

Tanada Y., Kaya K.H (1993). Insect pathology. Academic Press Inc.: 318-387.

Toriello C., Montoya E., Zavala M., Navarro H., Basilio D., Hernández V., Mier T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Revista mexicana de micología(28):57-66. Consultado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300007&lng=es&tlng=es .

Tulloch M. (1976). The genus *Metarhizium*. Trans. Bol. Mycol Soc. (66): 407-411..

Villalobos F.J., Núñez M.E. (2010). Manejo sustentable. En: Rodríguez del Bosque, Morón M.A. Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, Mundi Prensa, México. (12):215-236.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry (40):1–10.

Zhioua E., Browning M., Johnson P.W., Ginsberg H.S, LeBrun R.A, (1997). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae). Journal of Parasitology (83): 815-818.

13 Anexos

13.1 Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de *T. harzianum*.

ANOVA Table for Growth of T by Treatment T

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	104,25	3	34,75	2,24	0,1607
Within groups	124,0	8	15,5		
Total (Corr.)	228,25	11			

13.2 Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de *M. anisopliae*.

ANOVA Table for Growth M by Treatment M

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	140,917	3	46,9722	13,42	0,0017
Within groups	28,0	8	3,5		
Total (Corr.)	168,917	11			

13.3 Análisis de varianza de los tratamientos independientes y en interacción de *B. bassiana*

ANOVA Table for Growth of B by Tratamineto B

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	84,9167	3	28,3056	11,32	0,0030
Within groups	20,0	8	2,5		
Total (Corr.)	104,917	11			