

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTIVIDAD DE AISLADOS NATIVOS DE *Beauveria* Y *Metarhizium* DE ARTEAGA, COAHUILA EN EL CONTROL DEL GUSANO TELARAÑERO  
*Hyphantria cunea* DRURY (LEPIDÓPTERA: EREBIDAE)

**Tesis**

Que presenta ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS  
como requisito parcial para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

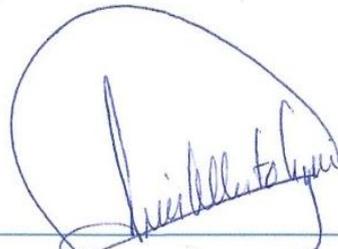
Saltillo, Coahuila

Diciembre de 2016

EFFECTIVIDAD DE AISLADOS NATIVOS DE *Beauveria* Y *Metarhizium* DE  
ARTEAGA, COAHUILA EN EL CONTROL DEL GUSANO TELARAÑERO  
*Hyphantria cunea* DRURY (LEPIDÓPTERA: EREBIDAE)

**Tesis**

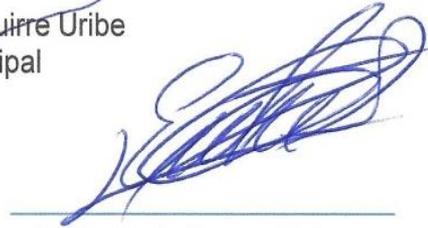
Elaborada por ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS como requisito parcial, para  
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA  
AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



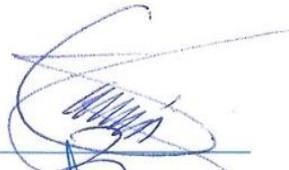
Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe  
Asesor principal



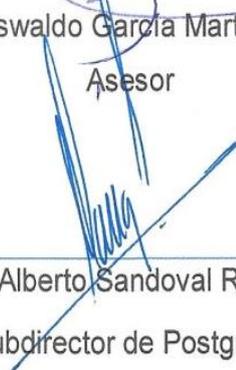
M.C. Víctor Manuel Sánchez Valdez  
Asesor



Dr. Ernesto Cerna Chávez  
Asesor



Dr. Oswaldo García Martínez  
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado

## AGRADECIMIENTOS

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT), por dar el apoyo económico y poder realizar mis estudios de posgrado

A mi *Alma Mater* por permitir forjarme y superarme como profesionista

Al *Departamento de Parasitología* por brindarme todo el apoyo con instalaciones y trámites para concluir en tiempo mi proyecto.

Al *Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe* por siempre brindarme las facilidades para desarrollar mi proyecto y tener las mejores palabras en momentos importantes.

A mi *Comité Asesor* por compartir sus conocimientos y darme los mejores consejos para darle forma a mi investigación

A *Cristal y Marisol* por regalarme parte de su tiempo y apoyo para realizar parte de mi investigación en la Empresa Green Corp.

A mis *Compañeros de Posgrado* por compartir muy buenos momentos, además de estar presentes en tiempos de presión.

## DEDICATORIAS

A *Dios* por tenerme las mejores oportunidades e iluminar mi camino en todo momento.

A mi *Esposa Yolanda e Hijas Kamila y Ximena* por siempre estar presentes en tiempos difíciles y ser el principal estímulo para seguirme superando, además de brindarme todo su amor y comprensión en tiempos de mayor presión.

A mi *Madre* Bernarda Armas por siempre regalarme su amor y apoyo incondicional para forjarme de la mejor manera.

A mis *Hermanos* Elmer, Maria, y Chanito que desde pequeños estuvieron presentes en momentos de alegría y de tristeza.

A mis *Suegros y Cuñados* que son parte de mi familia y regalarme a la mejor mujer para ser mi compañera de vida.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	2
REVISION DE LITERATURA.....	3
Control Biológico .....	3
Hongos Entomopatógenos .....	3
Generalidades.....	3
Factores ambientales .....	4
Mecanismos de infección.....	4
Géneros de hongos de importancia .....	6
Aplicación en el control biológico.....	9
Importancia de <i>Hyphantria cunea</i> .....	10
Clasificación taxonómica.....	10
Distribución.....	10
Características y ciclo de vida.....	11
Importancia económica .....	13
MATERIALES Y METODOS .....	15
Aislamiento e Identificación .....	15
Muestreo.....	15
Aislamiento.....	16
Identificación morfológica.....	16
Reproducción.....	17
Conteo y viabilidad.....	17
Caracterización molecular .....	17
Evaluación de Efectividad Biológica.....	18
Análisis estadístico.....	19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
Características de Hongos Aislados .....	20
Identificación .....	20
Conteo y viabilidad.....	21
Caracterización molecular .....	22
Efectividad Biológica.....	24
Análisis de Tiempos Letales.....	24
Análisis de Concentraciones Letales .....	29
CONCLUSIONES.....	32
LITERATURA CITADA.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (Montesinos, 2008). .....	5
Figura 2. Morfología macroscópica (A: Echeverría, 2006) y microscópica (B: Luque, 2011.) de <i>Beauveria bassiana</i> .....	7
Figura 3. A: Morfología macroscópica y B: microscópica de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Pik-Kheng y <i>et al.</i> , 2009). .....	8
Figura 4. Distribución a nivel a partir de 2010.....	11
Figura 5. Puesta de huevecillos por <i>Hyphantria cunea</i> .....	12
Figura 6. A: Larva de cabeza roja, B: Larva de cabeza negra .....	12
Figura 7. Polilla Adulto de <i>H. cunea</i> .....	13
Figura 8. Bolsa de seda en manzano creada por el gusano tejedor .....	13
Figura 9. Daño por larvas en frutos de nogal.....	14
Figura 10. Ubicación de localidades muestreadas de Arteaga, Coahuila ....	15
Figura 11. Muestreo en huerta de manzano de Los Lirios.....	16
Figura 12. Amplificación de DNA con primers generales por cepa de <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> . .....	22
Figura 13. Marcador de peso molecular a 400 Pb para <i>M. anisopliae</i> .....	23
Figura 14 Regresión Probit de tiempo letal para Bb. LI. 1.....	25
Figura 15. Regresión Probit de tiempo letal para Bb. Hua. 1 .....	25
Figura 16. Regresión Probit en tiempo letal para Bb. SaA. 1.....	26
Figura 17. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. Hua. 2 .....	26
Figura 18. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. LI. 2 .....	27
Figura 19. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. SaA. 2 .....	27
Figura 20. Regresión Probit en tiempo letal para Mix .....	28
Figura 21. Regresión Probit en tiempo letal para Entomaxx 5x .....	28
Figura 22. Regresión Probit para agentes de biocontrol en concentraciones letales. (1) Bb.LI.1, (2) Bb.Hua.1, (3) Bb.SaA.1, (4) Ma.Hua.2, (5) Ma.LI.2, (6) Ma.SaA.2, (7) MIX, (8) Entomax-5X .....	30
Figura 23. Larvas de <i>Hyphantria</i> a concentraciones de $1 \times 10^7$ UFC A: Ma. Hua 2 ( <i>Metarhizium</i> ) B: Bb. Hua 1 ( <i>Beauveria</i> ) C: Entomaxx 5X (Producto comercial) y D: Testigo .....	31

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Géneros de hongos identificados por localidad, mes e insecto trampa.....	20
Cuadro 2. Conteo y viabilidad en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para cepas aisladas por localidad.....	21
Cuadro 3. Identidad de los aislamientos obtenidos a partir de suelos agrícolas de manzano basado en la amplificación del espacio interno ITS de la región del DNA ribosomal, según BLAST en NCBI.....	23
Figura 4. Tiempo letal 50 por concentración para Bb. LI. 1.....	25
Cuadro 5. Tiempo letal 50 por concentración para Bb. Hua. 1.....	25
Cuadro 6. Tiempo letal 50 por concentración para Bb. SaA. 1.....	26
Cuadro 7. Tiempo letal 50 por concentración para Ma. Hua. 2.....	26
Cuadro 8. Tiempo letal 50 por concentración para Ma. LI. 2.....	27
Cuadro 9. Tiempo letal 50 por concentración para Ma. SaA. 2.....	27
Cuadro 10. Tiempo letal 50 por concentración para Mix.....	28
Cuadro 11. Tiempo letal 50 por concentración para Entomaxx 5x.....	28
Cuadro 12. Porcentajes de mortalidad por agente a los ocho días.....	29
Cuadro 13. Concentraciones letales y P valor analizados por el programa “R” estadístico.....	30

## RESUMEN

EFFECTIVIDAD DE AISLADOS NATIVOS DE *Beauveria* Y *Metarhizium* DE ARTEAGA, COAHUILA EN EL CONTROL DEL GUSANO TELARAÑERO *Hyphantria cunea* DRURY (LEPIDÓPTERA: EREBIDAE)

POR:

ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE—ASESOR—

SALTILLO, COAHUILA DICIEMBRE 2016

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de micro-organismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre estos está la capacidad de regular plagas para mantenerlas en niveles que no causen daños económicos. En la región norte del país existen pocos estudios sobre aislados nativos de estos agentes de control por las condiciones ambientales extremas que prevalecen en buena parte del año. La presente investigación describe la acción de control de *Beauveria* y *Metarhizium* como aislados naturales. Planteándose como objetivo el aislamiento e identificación de cepas de estos géneros de la sierra de Arteaga, Coahuila y determinar su efectividad sobre el gusano telarañero *Hyphantria cunea* Drury bajo condiciones controladas. Los resultados indican que el mayor efecto sobre larvas de *H. cunea* lo presentaron las cepas de *Beauveria* llegando a alcanzar el 100% de mortalidad en seis días después de la aplicación a una concentración de  $1 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colonia (UFC), en contraste con el 72% obtenido por la mejor cepa de *Metarhizium* a esta misma concentración aunque en un periodo de ocho días. Por lo cual se concluye que *Beauveria*, como formulado, pudiera ser considerada como principal agente de control biológico sobre esta plaga de importancia en diversos cultivos como el manzano y nogal.

Palabras clave: Control biológico, Unidades Formadoras de Colonia, *Metarhizium*, *Beauveria*, Coahuila

**ABSTRACT**

EFFECTIVENESS OF NATIVE *Beauveria* AND *Metarhizium* ISOLATES  
FROM ARTEAGA, COAHUILA IN THE CONTROL OF THE SPIDER  
WEBWORM *Hyphantria cunea* DRURY (LEPIDÓPTERA: EREBIDAE)

BY:

ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

AGRARIA ANTONIO NARRO AUTONOMOUS UNIVERSITY

DR. LUIS ALBERTO AGUIRRE URIBE - ADVISER -

SALTILLO, COAHUILA DECEMBER 2016

Entomopathogenic fungi are a broad group of microorganisms that provide multiple services to agroecological systems. Among these is the ability to regulate pests to keep them at levels that do not cause economic damages. In the northern region of the country there are few studies on native isolates of these control agents due to the extreme environmental conditions prevailing in most of the year. The present research describes the control action of *Beauveria* and *Metarhizium* as natural isolates. Aiming to isolate and identify strains of these genera of the Arteaga sierra, Coahuila, and determine their effectiveness on the *Hyphantria cunea* Drury telangero worm under controlled conditions. The results indicate that the greatest effect on *H. cunea* larvae was observed in *Beauveria* strains reaching 100% mortality in six days after application at a concentration of  $1 \times 10^7$  Colony Forming Units (UFC), in contrast to The 72% obtained by the best strain of *Metarhizium* at this same concentration although in a period of eight days. It is concluded that *Beauveria*, as formulated, could be considered as the main biological control agent on this pest of importance in various crops such as apple and walnut.

Keywords: Biological control, Colony Forming Units, *Metarhizium*, *Beauveria*, Coahuila

## INTRODUCCIÓN

El empleo de microorganismos como agentes de control presenta numerosas ventajas, seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reducción de la presencia de residuos insecticidas en los alimentos e incremento de la biodiversidad del medio. Los hongos son únicos y sobresalientes entre los entomopatógenos porque infectan a los hospedantes a través del tegumento, acción por contacto, lo que les confiere ventaja para el control de varios grupos de insectos fitófagos de gran relevancia en la agricultura (Telles *et al.*, 2009).

La efectividad que han mostrado los hongos entomopatógenos resulta una alternativa importante dentro del control biológico, los cuales poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. La tendencia actual en México es utilizarlos con mayor frecuencia en la agricultura orgánica y muy poco como parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

En el mundo se han registrado aproximadamente 750 especies de hongos entomopatógenos y de estos solo nueve están recibiendo interés comercial por la facilidad que tienen de producir y formularlas como biopesticidas (Morales, *et al.*, 2009). Para López y Hans (2001), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoopthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, mientras que para la FAO (2003), los géneros de importancia son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

Respecto al cultivo del manzano, los insectos que producen mayores daños son la palomilla del manzano, pulgón lanífero y araña roja. Estas plagas pueden considerarse como claves, es decir, que se encuentran de forma permanente y persistentes; el resto de plagas como afidos, perforadores y

gusano telarañero pueden considerarse ocasionales produciendo daños importantes en ciertas épocas y muchas veces no pueden ser dominadas por las prácticas de control (Murray y Alston, 2014).

Un empleo más eficiente y generalizado de estos agentes en el control depende en gran medida de la mejora de su velocidad de acción y reducción de tiempos letales. Por este motivo, la presente investigación buscó determinar la efectividad de hongos entomopatógenos nativos de la zona manzanera de Arteaga sobre el gusano telarañero *Hyphantria cunea*.

### **Objetivos**

Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Beauveria* y *Metarhizium* por caracterización microscópica y molecular.

Determinación de efectividad biológica de *Beauveria* y *Metarhizium* sobre larvas del gusano telarañero *Hyphantria cunea* bajo condiciones controladas.

**Hipótesis:** Se encontrará al menos una cepa de hongo entomopatógeno por localidad y su efectividad biológica será estadísticamente significativa sobre *Hyphantria cunea*

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Control Biológico**

El control biológico es considerado desde un punto de vista ecológico como una fase del control natural, definiéndose como la utilización de cualquier agente de control natural, por lo que debería dividirse según Ibarra y Varela (2002) en control macrobial (con parásitos y depredadores) y control microbiano (con patógenos) para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el existiría en su ausencia. Esto significa que después de identificados, aislados y reproducidos son aplicados en forma dirigida en diluciones o liberados sobre las plagas de los cultivos para que lleven a cabo su acción colonizadora, produciendo antagonismo, enfermedades específicas en los plagas que se desea controlar o ejerciendo actividad predadora o parasitoide, con el propósito de reducir el ataque de las plagas inofensivos (Benavides y Bustillo, 2002)

Entre los métodos empleados para el control de insectos plaga está el uso de bacterias, virus, nematodos y los hongos como grupo de mayor relevancia, por su papel como biorreguladores naturales de plagas al actuar como parásitos de insectos dañinos (Madrigal, 2001). El uso de microorganismos resulta como una posibilidad de control al constituir una herramienta determinante acorde a los principios naturales en la lucha contra las plagas.

### **Hongos Entomopatógenos**

#### **Generalidades**

Los hongos entomopatógenos son microorganismos vivos que producen enfermedades a diferentes órdenes de insectos; inofensivos al hombre, animales y plantas. En condiciones naturales requieren de humedad, pH y temperatura adecuada para cada especie de hongos (Monzón, 2001).

Particularmente, los hongos han sido una de las mejores alternativas para el control de plagas en los últimos años. Más de 750 especies de hongos se han documentado infectando insectos. Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen como agente causal un hongo (Badii *et al.*, 2006).

### **Factores ambientales**

Las condiciones ambientales y en particular la humedad, son muy importantes en la infección y esporulación del hongo; en general, la alta humedad (90%) es requerida para la esporulación y desarrollo del micelio. La humedad del microambiente que rodea la espora, tiene una fuerte influencia en la germinación cuando la temperatura ambiental es de 10 a 35 grados centígrados, los cuales son favorables para la infección del hongo. La germinación, el crecimiento, la esporulación y la virulencia, son características de los hongos que pueden ser afectados por la temperatura, luz ultravioleta y la humedad. La temperatura es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de los hongos entomopatógenos; el requerimiento térmico varía según la región geográfica de origen, a un rango amplio de temperatura de 8 a 35 grados centígrados; el umbral máximo ocurre entre 35 y 37 °C, la temperatura óptima se considera de 20 a 30 °C (Fan *et al.*, 2007).

### **Mecanismos de infección**

Según Charnley y Collins (2007) los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, tienen mecanismos de invasión únicos, refiriendo que no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo sino que lo infectan por contacto y adhesión de las esporas a partes de su cuerpo (partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos, entre otros). Es así como lo enuncia Asaff *et al.*, (2002) que inician su proceso infeccioso y asociación patógeno-hospedero formando los túbulos germinales y a veces el apresorio (que sirve para el anclaje de la espora) con los cuales

ejerce una presión hacia el interior del insecto facilitando la invasión del hongo.

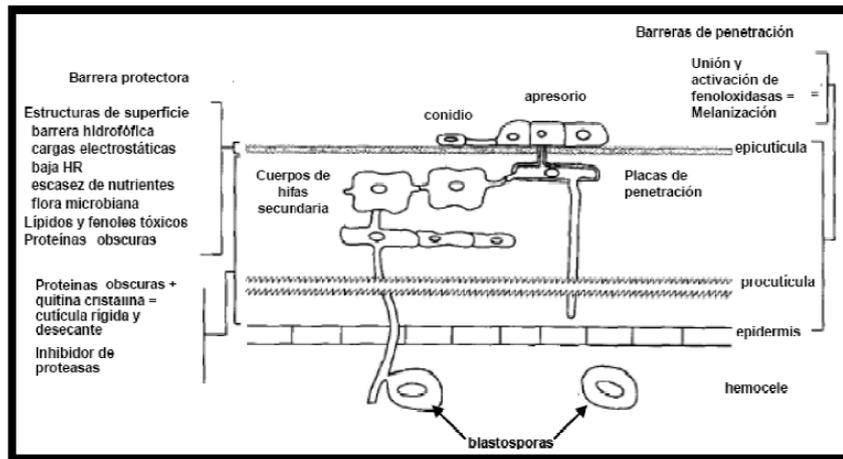


Figura 1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (Montesinos, 2008).

En síntesis según Carreño (2003), el mecanismo de acción física se divide en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espора a la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto.

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo. Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa. Se ha observado que la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico (Monzón, 2001).

La proteasa Pr1 es considerada un importante factor de virulencia en *Metharizium anisopliae*, la sobreexpresión de esta enzima en el mismo hongo reduce en un 25% el tiempo de muerte en *Manduca sexta* Linnaeus, 1773 (Lepidóptera: Sphingidae), en comparación con aquellos que fueron infectados con el genotipo silvestre. De la misma forma, la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa de *Beauveria bassiana* acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23% (Fan *et al.*, 2007). De esta

manera, se demuestra la importancia de la secreción de estas enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos, lo cual pudiera ser una herramienta para la selección de mejores cepas para la formulación de insecticidas biológicos.

### **Géneros de hongos de importancia**

Entre los hongos más utilizados como insecticidas biológicos se incluye a *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Rodríguez y Arredondo, 2007). De Faria y Wraight, (2007) mencionan que entre los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%).

### ***Beauveria***

Este hongo ataca a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola, entre las que están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (Monzón, 2001). El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ó *B. tenella*, *B. amorpha* y *B. velata*, sin embargo las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* y *B. brongniartii* (Carreño, 2003).

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Beauveria* Vuill. (1912)

## Morfología

La colonia de *Beauveria* en PDA a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca y a medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta y cremosa (Figura 2). El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor (Cañedo y Ames, 2004).

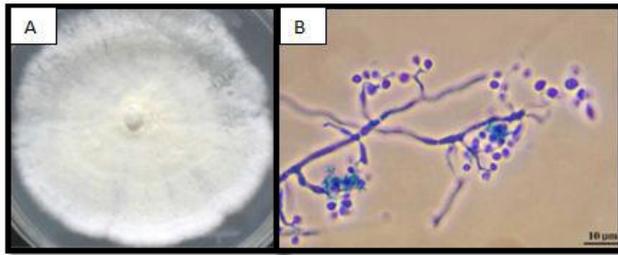


Figura 2. Morfología macroscópica (A: Echeverría, 2006) y microscópica (B: Luque, 2011.) de *Beauveria bassiana*

Se caracteriza por presentar conidióforos sencillos, aproximadamente de 1-2  $\mu$  de diámetro, están irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Carreño, 2003), midiendo aproximadamente de 2 a 3 X 2 a 2.5  $\mu$  (Cañedo y Ames, 2004).

## ***Metarhizium***

Este hongo entomopatógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar *Aeneolamia varia* Fabricius, 1787 (Hemíptera: Cercopidae), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001).

## Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium* (Metchnikoff) Sorokin (1883)

## Morfología

Presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino (Figura 3) (Monzón, 2001).

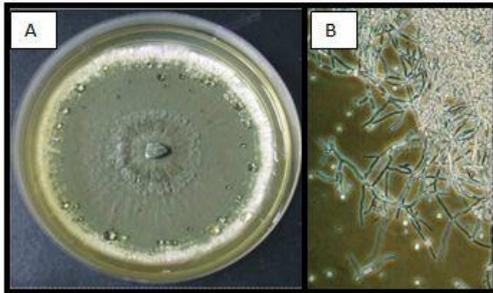


Figura 3. A: Morfología macroscópica y B: microscópica de *Metarhizium anisopliae* (Pik-Kheng y *et al.*, 2009).

Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 $\mu$  de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro. Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 $\mu$  de longitud y de 2 a 4 $\mu$  de diámetro. Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3.5 a 9 $\mu$  de longitud x 1.5 a 3.5 $\mu$  de diámetro (Cañedo y Ames, 2004).

## Aplicación en el control biológico

Meyling y Eilenberg (2007), afirman que los hongos entomopatógenos presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde prestan importantes servicios ecosistémicos tanto en la producción agrícola.

Angel *et al.*, (2005), evaluaron la sensibilidad de huevos, pupas y adultos de *Haematobia irritans* Linnaeus, 1758 (Díptera: Muscidae) en tres aislados de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroserus* utilizados a una concentración (conidias/ml) de  $1 \times 10^6$  para huevos,  $1 \times 10^8$  para pupas y las dos para adultos, encontrando que todos los estadios son susceptibles a la acción de los hongos entomopatógenos con una reducción en la eclosión de 3,8 a 6,3% respecto a un 72% de eclosión del tratamiento testigo, mortalidad entre 50 y 71,3% en pupas y 90% en adultos.

Merino *et al.* (2007), evaluaron la efectividad de 29 aislados de *M. anisopliae* y 30 de *B. bassiana*, sobre obreras y machos de *Vespula germanica* Fabricius, 1793 (Díptera: Vespidae) a una concentración de 0 a  $1 \times 10^8$  conidias x ml<sup>-1</sup> en medio acuoso azucarado. *B. bassiana* obtuvo mejor desempeño generando mortalidad que osciló entre 70 a 97%, concluyendo que a concentración mayor de  $10^7$  conidios x ml<sup>-1</sup> la mortalidad de la población es superior a 90%.

Mata y Barquero (2010), evaluaron la factibilidad de producción de *B. bassiana* en medio líquido para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867 (Coleóptera: Curculionidae) hallando que el medio de cultivo consistente en azúcar, extracto de levadura y peptona es en donde ocurre el mejor crecimiento del hongo al cuarto día, sin ser afectado por el pH inicial, ni la temperatura de 28 °C, además genera mortalidad del 86,7%. Es así que a partir de ensayos de producción.

## **Importancia de *Hyphantria cunea***

El gusano telarañero, *Hyphantria cunea* (Drury), es una importante plaga en árboles, arbustos y ornamentales, así como de varios cultivos agrícolas, atacando en total 636 especies de plantas. Las larvas producen nidos enormes y son capaces de defoliar completamente los árboles y arbustos. Considerada nativa de América del Norte, esta especie se ha convertido en una plaga invasora en toda Europa y Asia, por lo que está bien estudiada (Wagner, 2005).

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Filo: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Superfamilia: Noctuoidea

Familia: Erebidae

Genero: *Hyphantria*

Especie: *H. cunea* (Drury, 1773)

### **Distribución**

El gusano telarañero se presenta en prácticamente toda América del Norte hasta su límite más septentrional en el sur de Canadá. El límite de *H. cunea* en la cordillera norte se produce en la latitud de 50-55 °.

Fue introducida en Yugoslavia en los años 40, y desde entonces ha invadido la mayor parte de Europa. Ahora también habita partes de China y Corea del Norte, de nuevo debido a la introducción accidental, y se encuentra en Japón (Heppner, 2007).



Figura 4. Distribución mundial a partir de 2010

### **Características y ciclo de vida**

El número de generaciones por año depende en gran medida de la latitud. Las poblaciones del sur pueden completar cuatro generaciones en un año, mientras que en el norte el gusano de la caída completa sólo un ciclo de vida. Las larvas univoltinas con cabeza negra y cuerpo oscuro tienden a aparecer por encima de 40 ° de latitud, mientras que los ciclos multivoltinos con larvas de cuerpo verde, rojo o cabeza negra tienden a encontrarse en la parte sur del área de distribución (Takeda, 2005).

Los adultos emergen ya en marzo en el sur, pero no vuelan hasta finales de la primavera o principios del verano en las zonas del norte. Sobre todo, los adultos aparecen de mayo a agosto y depositan sus huevos.

La larva de la bolsa como es también llamada en la fase adulta es blanco brillante, con un cuerpo peludo. En la parte sur de su área de distribución, la polilla es blanca con manchas de ala oscura, mientras que en la parte norte casi siempre es puramente blanca (MPG 2010).

### **Huevo**

La masa de huevos de *H. cunea* es verde casi iridiscente en color. El lote de huevos contiene 400-1000 huevos. Los huevos suelen depositarse en la parte inferior de las hojas en la primavera. La masa de huevo está ligeramente cubierta con escamas del abdomen de la hembra. Esta muere después de la oviposición, nunca se mueve de la hoja (Yang y Zhang, 2007).



Figura 5. Puesta de huevecillos por *Hyphantria cunea*

### Larva

Las larvas maduras son peludas y tienen un cuerpo de color verde lima con manchas negras o pueden tener un color más oscuro, especialmente en los últimos instares. Las cápsulas de cabeza en algunas poblaciones pueden ser de color rojo o negro. En otras poblaciones, son totalmente negras. Se cree que las larvas de cabeza negra son más frecuentes en los climas del norte, mientras que se cree que las larvas de cabeza roja son dominantes en los climas del sur. Se han observado algunas diferencias de comportamiento entre diferentes formas de larvas. Por ejemplo, las larvas de la morfina de cabeza roja permanecen dentro de la tienda durante toda la fase larvaria, mientras que la morfología de cabeza negra sale de la carpa en su quinto estadio (Yang y Zhang, 2007).

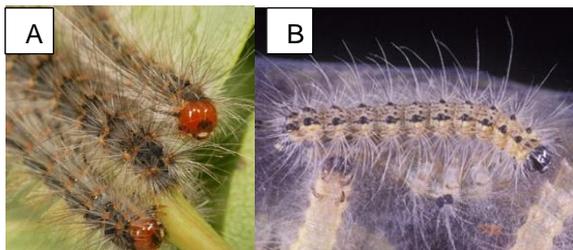


Figura 6. A: Larva de cabeza roja, B: Larva de cabeza negra

### Pupa

Larvas de plena madurez dejar la banda para convertirse en crisálidas en la hojarasca o corteza grietas. Los gusanos de la caída hibernan en la etapa pupal. La pupación ocurre en capullos delgados. Las pupas son marrones (Yang y Zhang, 2007).

## Adulto

El adulto en su mayoría es blanco en el norte, pero en el sur se puede marcar con puntos negros o marrones en las alas anteriores. Es bastante 'peluda' y las patas delanteras tienen manchas amarillas o de color naranja brillante. Las alas inferiores tendrán menos marcado que las alas anteriores, y el abdomen a menudo tiene un puñado de pelos de color marrón. Tiene una envergadura de 35-42 mm (Yang y Zhang, 2007).



Figura 7. Polilla de *H. cunea*

## Importancia económica

En la naturaleza, dentro de su rango nativo, el gusano telarañero no suele dañar los árboles, ya que la defoliación ocurre justo antes de la caída de la hoja. Sin embargo, *H. cunea* se sabe que causa daños a los árboles ornamentales. En lugares donde es invasora puede atacar especies de árboles de importancia económica como el manzano y el nogal llegando a causar hasta un 70% de pérdidas si se presentan las condiciones favorables (Heppner, 2007).



Figura 8. Bolsa de seda en manzano construida por el gusano tejedor

La bolsa de telaraña encierra el follaje en el extremo de una rama, por lo cual en ocasiones se hace difícil su control. Las orugas pueden construir grandes bolsas de seda que a veces se extienden por varias ramas. En la

madurez, las larvas pueden alcanzar una pulgada de longitud. A lo largo de su desarrollo, las orugas son capaces de hacer varias tiendas si el nido es perturbado (Takeda, 2005).



Figura 9. Daño por larvas en frutos de nogal

Cuando el daño es severo en huertos comerciales son necesarias las podas sanitarias para destruir y quemar las tiendas tratando de minimizar el daño para el ciclo siguiente (Heppner, 2007).

## MATERIALES Y METODOS

El aislamiento de hongos entomopatógenos se inició por el muestreo de diferentes localidades de la zona manzanera de Arteaga, Coahuila (Figura 10). Ubicando como puntos de referencia a muestrear los ejidos de San Antonio de las Alazanas ( $25^{\circ}16'02.30''N$   $100^{\circ}34'40.05''O$ ), Huachichil ( $25^{\circ}12'56.50''N$   $100^{\circ}49'42.87''O$ ) y Los Lirios ( $25^{\circ}23'38.13''N$   $100^{\circ}33'35.51''O$ ).

Una vez obtenidas las muestras de suelo se trasladaron al departamento de parasitología agrícola de la UAAAN para su procesamiento.



Figura 10. Ubicación de localidades muestreadas de Arteaga, Coahuila

### Aislamiento e Identificación

#### Muestreo

Las muestras de suelo se obtuvieron a partir de la selección de una hectárea de cultivo de manzano que fuese representativa y de poco laboreo (mínimas o nulas aplicaciones químicas) con registros de infecciones por hongos entomopatógenos sobre insectos plaga. Los muestreos se realizaron uno por mes durante el año junio 2015 a mayo 2016.

Se tomaron cinco puntos al azar y de cada punto se colectaron 10 submuestras de 10 cm<sup>3</sup> de suelo cada una. El material se colocó en bolsas negras de plástico y se homogenizaron en una muestra única y se trasladó al laboratorio en bolsa negra, esto para cada localidad (Sun, 2002).



Figura 11. Muestreo en huerta de manzano de Los Lirios

### **Aislamiento**

El aislamiento se realizó mediante la técnica de insecto trampa descrita por Quesada y *et al.*, (2007) con algunas modificaciones que consistió en colocar en frascos de plástico 100 gr de suelo y cinco larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1756 (Lepidóptera: Pyralidae) y cinco de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleóptera, Tenebrionidae) por separado para cada muestra de suelo.

Se revisaron a diario por 5 días hasta observar un cambio de apariencia en el insecto indicativo de alguna infección, estos se separaron y se les proporcionó las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento del hongo. El micelio que colonizaba el insecto se aisló en medios nutritivos Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud hasta obtener cultivos puros para su posterior identificación.

### **Identificación morfológica**

La identificación hasta genero fue mediante características morfológicas vistas al microscopio compuesto del total de hongos aislados (conidióforo, esporas, hifas, blastosporas) de acuerdo a las claves taxonómicas descritas por Alves *et al.*, 1998 y Samson *et al.*, 1988.

## Reproducción

Una vez purificados los hongos se reprodujeron en caldo papa (concentrado líquido a punto de ebullición de papa, extracto de levadura, Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y KCl), el cual se inoculó por separado de cada una de las cepas. Posteriormente se indujo el crecimiento sobre una incubadora con agitación (VWR) a 150 revoluciones/min a temperatura ambiente por un total de cinco días.

## Conteo y viabilidad

Con la finalidad de conocer la producción de esporas para cada cepa en medio líquido y realizar los cálculos para ajustar concentraciones, se realizó el conteo con ayuda de un hemocitómetro (Propper). La viabilidad se determinó partiendo de una solución madre ajustada a 1x10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colonia (UFC), se le realizaron diluciones exponencial para facilitar el conteo en placa y posteriormente se inoculó en medio nutritivo con 100 µl por cada concentración, el resultado se obtuvo a las 48 H mediante la fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \frac{(\Sigma \text{ colonias})(\text{fact. Dilucion})}{\text{volumen inoculado}}$$

A partir del resultado del conteo y viabilidad se seleccionaron a las mejores 6 cepas a utilizar para la evaluación de la efectividad biológica.

## Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó en el centro de investigación de la empresa Green Corp. La identificación para especie por esta técnica fue para la mejor cepa de *Beauveria* y *Metarhizium* por localidad, en la prueba de viabilidad. Se inició por la extracción de ADN mediante la técnica descrita por Niazmand *et al.*, en 2013, se corroboró la integridad de ADN mediante electroforesis en transluminador (VWR) y se amplificó el gen 18s con los primers generales pN3 (CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C) y pN10 (TTC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G) en el termociclador (MAXIGENE): Ciclo de desnaturalización inicial 3 min a 94°C; 1 min a 94°C,

1 min a 60°C, 1 min a 72°C, 40 ciclos y 5 min a 72°C, extensión final. La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en un equipo Illumina sequencing systems (Hiseq2000 or Hiseq2500). Una vez obtenida la secuencia, se realizó el alineamiento de las mismas en la base de datos del banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y se tomó un mínimo del 97% de identidad máxima para la identificación de las cepas.

Por otro lado se realizó la amplificación de DNA de las cepas de *Metarhizium* mediante los oligonucleótidos específicos: ITSMET (TCTGAATTTTTATAAGTAT) y ITS4: (TCCTCCGCTTATTGATATGC) para *M. anisopliae* bajo la misma técnica de extracción y condiciones. Dando como resultado positivo el bandeo a 400 Pares de bases (Pb) comparado con el marcador de peso molecular Ladder.

### **Evaluación de Efectividad Biológica**

Para determinar la acción de control para cada uno de los hongos seleccionados con buena viabilidad, se utilizó al gusano telarañero *H. cunea* el cual se considera plaga de importancia en manzano y nogal, las larvas se recolectaron de árboles de manzano en su cuarto estadio, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito al 5%. La técnica utilizada para esta evaluación fue la de inmersión descrita por González, 1993. para esto previamente ya se habían ajustado las concentraciones a utilizar ( $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10$  UFC), que consiste en sumergir la larva por 10 segundos en la concentración de esporas del hongo, posteriormente se le retiro el exceso de líquido y se colocó en placas Petri con discos de papel estraza, de esta forma cada unidad experimental estuvo conformada por 5 larvas impregnadas por las diversas concentraciones del hongo por separado colocadas en una placa Petri estéril, el testigo consistió en impregnar al mismo número de larvas con agua destilada con tween al 0.05% bajo condiciones de temperatura ambiente, cada tratamiento consto de 4 repeticiones respectivamente en las mismas condiciones. La variable a obtener fue la mortalidad representada en porcentajes, determinada por el estímulo sobre la larva con una aguja de

disección sin llegar a dañarla tomando como muerte a la larva que no presentaba ningún movimiento, las evaluaciones fueron cada 24 Hr por 8 días.

En base a la respuesta mostrada en tiempo letal por las diferentes cepas se seleccionó a la mejor de *Beauveria* y *Metarhizium* con la finalidad de determinar su respuesta en conjunto etiquetándola para fines prácticos como Mix, además se confrontó contra un producto comercial a base de hongos entomopatógenos Entomaxx 5x de la empresa Green Corp evaluándolo bajo las mismas condiciones.

### **Análisis estadístico**

El bioensayo fue bajo el modelo de diseño completamente al azar. La mortalidad en el testigo se utilizó para corregir el resto de las mortalidades registradas mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), la cual no se debe a la aplicación de los hongos y es incluida para determinar si la mortalidad en los insectos tratados puede ser atribuido a la aplicación de los mismos. Los datos de la mortalidad de los bioensayos fueron asumiendo el modelo Probit con el programa estadístico "R" (versión 3.2). Se estimaron los Tiempos Letales  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$ , además de las concentraciones letales  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  con sus límites de confianza al 95% para cada de hongo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características de Hongos Aislados

#### Identificación

De un total de 36 muestras de suelo procesadas, 13 dieron positivo para la presencia de hongos entomopatógenos sobre insectos trampa, de las cuales cuatro correspondieron al género *Beauveria* y nueve para *Metarhizium*, obteniendo la mayor cantidad de la localidad de Los Lirios (Cuadro 1).

Cuadro 1. Géneros de hongos identificados por localidad, mes e insecto

#	Cepa	Hongo	Localidad	Mes	Huésped
1	Bb. Lir 1	<i>Beauveria</i> spp.	Los Lirios	Julio	Galleria
2	Bb. Lir 2	<i>Beauveria</i> spp.	Los Lirios	Abril	Galleria
3	Ma. Lir 1	<i>Metarhizium</i> spp.	Los Lirios	Septiembre	Tenebrio
4	Ma. Lir 2	<i>Metarhizium</i> spp.	Los Lirios	Agosto	Tenebrio
5	Ma. Lir 3	<i>Metarhizium</i> spp.	Los Lirios	Mayo	Tenebrio
6	Bb. SaA 1	<i>Beauveria</i> spp.	San Antonio de las Alazanas	Junio	Galleria
7	Ma. SaA 1	<i>Metarhizium</i> spp.	San Antonio de las Alazanas	Abril	Tenebrio
8	Ma. SaA 2	<i>Metarhizium</i> spp.	San Antonio de las Alazanas	Mayo	Galleria
9	Ma. SaA 3	<i>Metarhizium</i> spp.	San Antonio de las Alazanas	Octubre	Tenebrio
10	Bb. Hua 1	<i>Beauveria</i> spp.	Huachichil	Junio	Galleria
11	Ma. Hua 1	<i>Metarhizium</i> spp.	Huachichil	Septiembre	Tenebrio
12	Ma. Hua 2	<i>Metarhizium</i> spp.	Huachichil	Agosto	Tenebrio
13	Ma. Hua 3	<i>Metarhizium</i> spp.	Huachichil	Noviembre	Tenebrio

En este trabajo se obtuvo una sola muestra de suelo útil por trapeo con *Galleria* y *Tenebrio*, lo que representó 33% de éxito. Este comportamiento puede deberse al tiempo en contacto con este solo fue de nueve días, además de que la cantidad de propágulos del hongo de interés presente en el suelo es muy variable y depende de condiciones específicas de cada ecosistema.

Sun (2002) logró 6,7% de éxito para *Metarhizium* y 10% de éxito para *Beauveria* en trapeos con la termita *Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909 (Isóptera: Rhinotermitidae), a partir de 90 muestras originales de suelo,

porcentajes superiores de éxito con respecto al procesamiento de termitas muertas sospechosas de micosis; sin embargo, Zimmermann (1986) [citado por Sun, 2002] se refiere al método de trapeo con *Galleria* como uno de los más exitosos para detectar entomopatógenos. Por otro lado, Dhoj *et al.*, (2006) recomiendan también el método de trapeo con *Galleria* en contacto con muestras de suelo, porque fundamentalmente es el que lleva poca especialización y el tiempo del ensayo es corto con un porcentaje de éxito alrededor de 75% para fitosanidad, aislamiento, identificación y caracterización, obteniendo los hongos *Beauveria* y *Metarhizium*. Estos mismos autores usaron 150 g de suelo aproximadamente por cada individuo de *Galleria* y pusieron en contacto con el suelo al insecto trampeador hasta 18 días.

### Conteo y viabilidad

Las cepas de *Beauveria* resultaron mejor en conteo y viabilidad como se puede observar en el Cuadro 2, llegando a alcanzar hasta  $1.4 \times 10^7$  UFC en medio nutritivo esto para la cepa de *Beauveria* de la localidad de Huachichil (Bb. Hua. 1), de igual forma para *Metarhizium* fue la perteneciente a esta localidad (Ma. Hua. 2)  $7.9 \times 10^6$  UFC.

Cuadro 2. Conteo y viabilidad en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para cepas aisladas por localidad

#	Cepa	Conteo	Viabilidad
1	<b><i>Beauveria</i> 1 Los Lirios</b>	$2.6 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$
2	<i>Beauveria</i> 2 Los Lirios	$1.8 \times 10^8$	$8.5 \times 10^6$
3	<i>Metarhizium</i> 1 Los Lirios	$1.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^6$
4	<b><i>Metarhizium</i> 2 Los Lirios</b>	$1.7 \times 10^8$	$5.8 \times 10^6$
5	<i>Metarhizium</i> 3 Los Lirios	$1.2 \times 10^8$	$2.7 \times 10^6$
6	<b><i>Beauveria</i> 1 San Antonio</b>	$2.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$
7	<i>Metarhizium</i> 1 San Antonio	$1.2 \times 10^8$	$4.6 \times 10^6$
8	<b><i>Metarhizium</i> 2 San Antonio</b>	$1.7 \times 10^8$	$6.3 \times 10^6$
9	<i>Metarhizium</i> 3 San Antonio	$1.3 \times 10^8$	$2.9 \times 10^6$
10	<b><i>Beauveria</i> 1 Huachichil</b>	$2.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$
11	<i>Metarhizium</i> 1 Huachichil	$1.1 \times 10^8$	$4.1 \times 10^6$
12	<b><i>Metarhizium</i> 2 Huachichil</b>	$1.8 \times 10^8$	$7.9 \times 10^6$
13	<i>Metarhizium</i> 3 Huachichil	$1.4 \times 10^8$	$3.7 \times 10^6$

De esta prueba se seleccionaron tres cepas de *Beauveria*: Bb. Hua. 1, Bb. LI. 1 y Bb. SaA. 1 y tres de *Metarhizium*: Ma. Hua. 2, Ma. LI. 2 y Ma. SaA. 2 para determinar su efectividad y caracterización molecular, esto por mostrar los mejores resultados en viabilidad.

### Caracterización molecular

La amplificación mediante los primers generales fue positiva para las seis cepas seleccionadas (Figura 12). Por lo que la extracción fue correcta obteniendo DNA puro para la secuenciación.

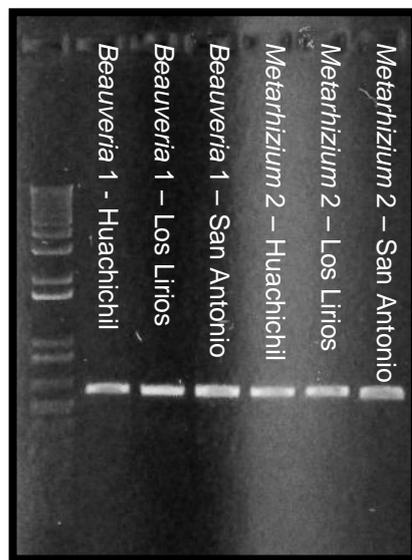


Figura 12. Amplificación de DNA con primers generales por cepa de *Beauveria* y *Metarhizium*.

La identificación por técnicas moleculares para las especies de *Metarhizium* por localidad dieron positivo con los primers específicos marcando a las 400 Pb (Figura 13) por lo que con este resultado se tiene la certeza de que las cepas aisladas para este hongo pertenecen a la especie *M. anisopliae*.

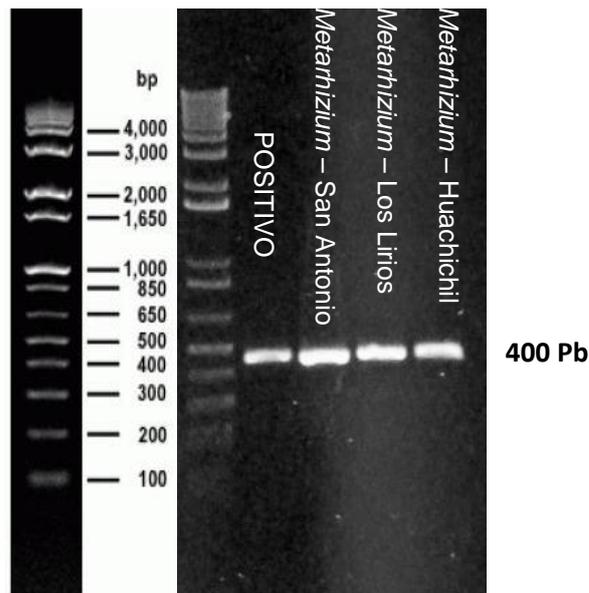


Figura 13. Marcador de peso molecular a 400 Pb para *M. anisopliae*

Al realizar una búsqueda de identidad para cada una de las secuencias obtenidas, como se observa en el Cuadro 3, se identificó las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* con un porcentaje de identidad del 99%.

Cuadro 3. Identidad de los aislamientos obtenidos a partir de suelos agrícolas de manzano basado en la amplificación del espacio interno ITS de la región del DNA ribosomal, según BLAST en NCBI.

Clave de control	Acceso	Cobertura	Valor de E	Identidad	Genero/especie
Ma. LI. 2	FJ589645.1	99 %	0.0	99 %	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Ma. Hua. 2	FJ545295.1	99 %	0.0	99 %	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Ma. SaA. 2	KU847858.1	98%	0.0	99 %	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Bb. LI. 1	AY531978.1	99 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>
Bb. Hua. 1	KP862968.1	100 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>
Bb. SaA. 1	FJ792827.1	100 %	0.0	99 %	<i>Beauveria bassiana</i>

La importancia del uso de técnicas moleculares en la patología de insectos y la microbiología en general radica en tener la certeza de la identificación de la especie con la que se está trabajando, tal como lo mencionan Cruz y Rincon (2016) en donde encontraron que la morfología de las hifas de un

solo aislado de *M. anisopliae* podía variar dentro del mismo cultivo, así como entre diferentes sustratos. Además, ellos concluyeron que la morfología de las conidias era el único carácter morfológico útil para la identificación. Sin embargo, en el caso de la diferenciación entre *M. anisopliae*, inclusive este carácter resultaba limitado. De ahí la trascendencia de las actuales técnicas moleculares de identificación, ya que, para la epidemiología, ecología y el manejo integrado de plagas es importante identificar las especies de entomopatógenos con exactitud. En el presente trabajo se pudieron identificar a dos especies distintas de hongos entomopatógenos a nivel morfológico y molecular, empleando éstas mismas técnicas. Con esto, se puede inferir que los hongos entomopatógenos se pueden aislar con relativa facilidad del suelo, pero aún es necesario realizar bioensayos para determinar su nivel de patogenicidad.

### **Efectividad Biológica**

Las cepas pertenecientes a *Beauveria* mostraron mayor efecto sobre el gusano telarañero *H. cunea* en tiempo y concentración letal, a diferencia de lo ejercido por *Metarhizium*, de los cuales la que presentó mejores resultados fue la perteneciente a la localidad de Huachichil.

### **Análisis de Tiempos Letales**

*Beauveria* - Los Lirios (Bb. LI. 1)

La efectividad mostrada por esta cepa fue contundente a la concentración  $1 \times 10^8$  UFC en comparación con el resto de agentes de control, obteniendo un  $TL_{50}$  de 31.77 Hr como se muestra en el cuadro 4, aunque existe un marcado desbalance con las concentraciones menores de hasta 173 Hr. y reflejado en la regresión Probit de la Figura 14.

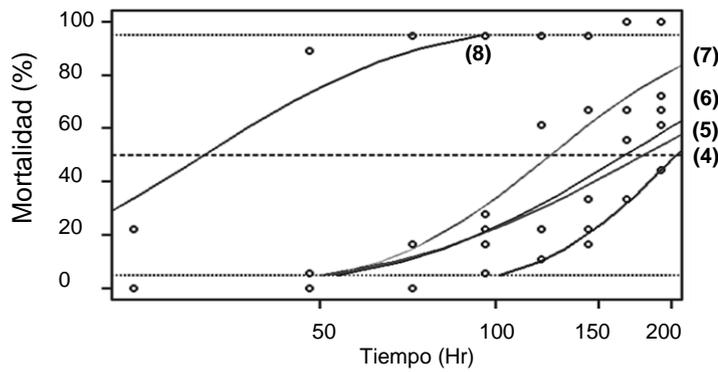


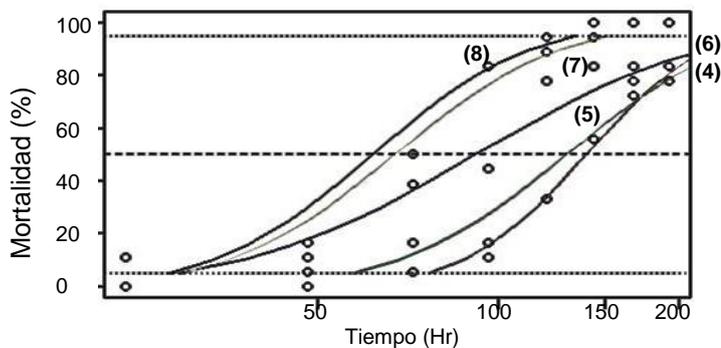
Figura 4. Tiempo letal 50 por concentración para Bb. Li. 1

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	31.7749
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	124.4478
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	166.7255
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	179.4419
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	204.6441

Figura 14 Regresión Probit de tiempo letal para Bb. Li. 1

### *Beauveria* - Huachichil (Bb. Hua. 1)

La mayor estabilidad en tiempo de respuesta de los hongos evaluados fue para esta cepa de *Beauveria*, presentando diferencia entre concentración mayor y menor de solo 78 Hr como lo muestra en el Cuadro 5, lo cual indica que en campo tendría buenos resultados a concentraciones menores y similares en las 3 últimas demostrado en el intercepto de la Figura 15 después de las 200 Hr.



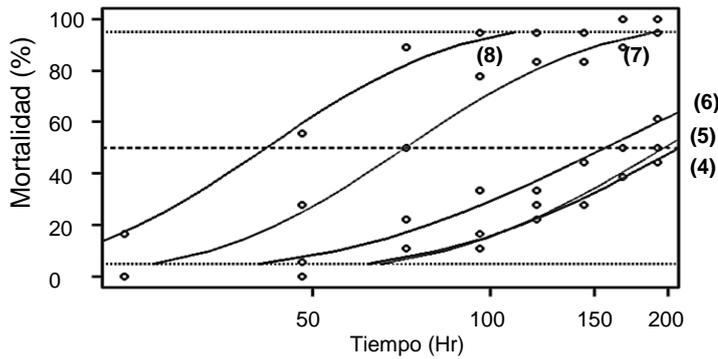
Cuadro 5. Tiempo letal 50 por concentración para Bb. Hua. 1

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	61.66274
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	67.22976
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	91.73959
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	129.8062
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	139.9231

Figura 15. Regresión Probit de tiempo letal para Bb. Hua. 1

### *Beauveria* - San Antonio de las Alazanas (Bb. SaA. 1)

El mecanismo de acción de esta cepa sobre *Hyphantria* fue evidente en las 2 concentraciones mayores llegando a alcanzar el TL<sub>50</sub> antes de las 80 Hr como se muestran en la Figura 16, comparado con la dilución siguiente (1x10<sup>6</sup>) siendo necesarias más del doble de Horas (Cuadro 6).



Cuadro 6. Tiempo letal 50 por concentración para Bb.

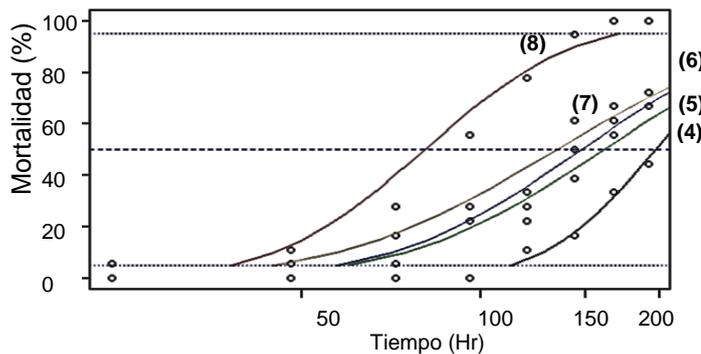
Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	41.80789
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	71.83279
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	156.5529
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	197.0537
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	209.382

Figura 16. Regresión Probit en tiempo letal para Bb. SaA. 1

Zibae et al., 2013 obtienen en su evaluación un 90% de mortalidad a los 11 días para *B. bassiana* sobre el gusano telarañero, comparado con el TL<sub>95</sub> en 151.82 Hr obtenido por la cepa Bb. Hua 1.

#### *Metarhizium* – Huachichil (Ma. Hua. 2)

Por parte de las cepas de *Metarhizium* la que fue más estable es la perteneciente a esta localidad, con menos diferencia en Hr entre concentración mayor y menor como se observa en el Cuadro 7, en la cual también se muestra la diferencia significativa entre concentraciones por el valor de P.



Cuadro 7. Tiempo letal 50 por concentración para Ma. Hua. 2

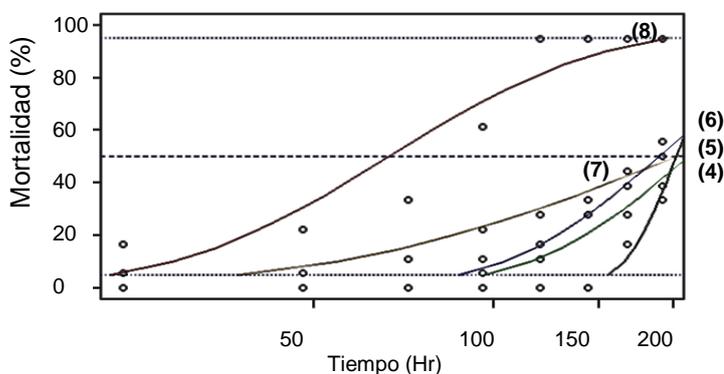
Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	80.77873
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	134.8862
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	148.358
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	161.7794
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	197.4271

Figura 17. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. Hua. 2

#### *Metarhizium* – Los Lirios (Ma. Ll. 2)

El tiempo de acción para esta cepa fue claramente contrastante con un TL<sub>50</sub> para la concentración mayor de solo 67 Hr, las concentraciones menores

rondaron hasta 200 Hr para ejercer control sobre el 50 % de la población como se muestra en la regresión Probit de la Figura 18.



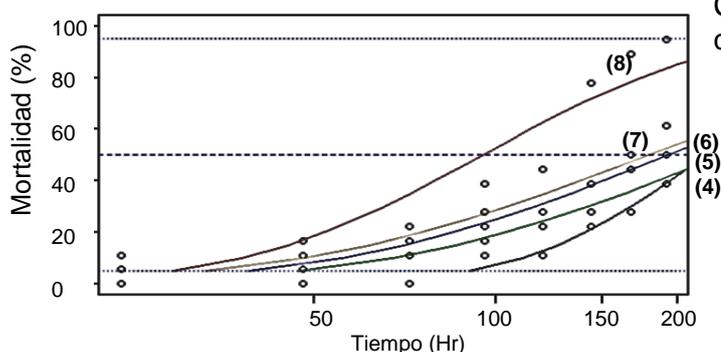
Cuadro 8. Tiempo letal 50 por concentración para Ma. LI. 2

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	67.05361
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	203.4199
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	189.7866
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	202.8936
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	212.8795

Figura 18. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. LI. 2

### *Metarhizium* – San Antonio de las Alazanas (Ma. SaA. 2)

Del total de hongos evaluados esta cepa fue la que requirió mayor tiempo para ejercer acción sobre el gusano telarañero, siendo necesarias casi 100 Hr a 1x10<sup>8</sup> UFC para obtener el TL<sub>50</sub> (Cuadro 9), respecto a su regresión Probit de la Figura 19 se observa que después de las 200 Hr el efecto será muy similar en concentraciones menores.



Cuadro 9 Tiempo letal 50 por concentración para Ma. SaA. 2

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	95.52101
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	180.027
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	193.756
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	224.184
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	239.3192

Figura 19. Regresión Probit en tiempo letal para Ma. SaA. 2

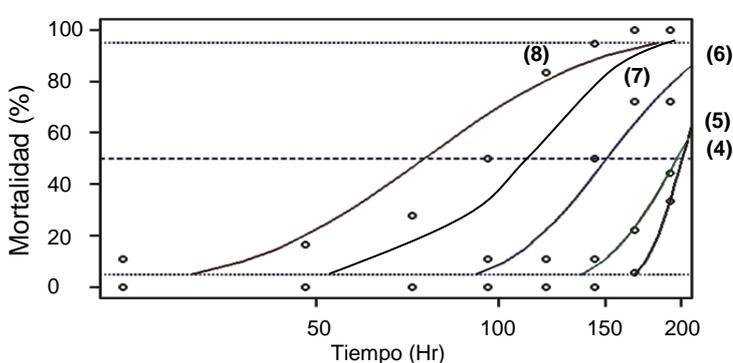
El aislado de *Metarhizium* que presentó rápida acción sobre *Hyphantria* fue Ma. Hua. 2 perteneciente a la localidad de Huachichiles con un TL<sub>50</sub> de 134.88 Hr, comparado con el 78.33% a 1x10<sup>7</sup> UFC en 12 días sobre el gusano telarañero reportado por Saruhan y Tuncer en 2016.

De esta prueba se pudo conformar una mezcla entre la cepa de cada género que presentó mejor tiempo letal, para lo cual se seleccionó a la cepa de

*Beauveria* Bb. Hua. 1 y Ma. Hua. 2 de *Metarhizium* ambas de la localidad de Los Lirios. Para fines prácticos se le nombro a este consorcio como MIX, con la finalidad de evaluar la respuesta de estos hongos en asociación.

### Mix (Consortio de géneros)

La acción de los hongos en consorcio resultó menos eficiente que por separado, ya que fue necesario mayor tiempo para obtener el TL<sub>50</sub> comparado con los porcentajes mostrados por *Beauveria*. Sin embargo el valor de "P" muestra diferencia significativa entre concentraciones (Cuadro 10) para este Mix.



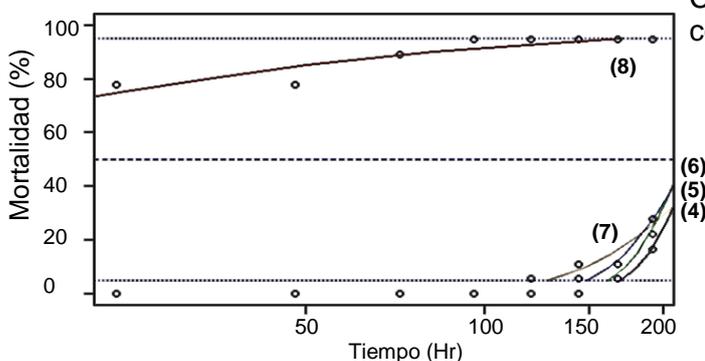
Cuadro 10. Tiempo letal 50 por concentración para Mix

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	75.50788
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	116.5698
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	150.9311
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	197.1854
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	201.1833

Figura 20. Regresión Probit en tiempo letal para Mix

### Entomaxx 5X (producto comercial)

La regresión Probit para el producto comercial (Figura 21) muestra que su efecto es rápido en la concentración directa, sin embargo, a concentraciones menores el efecto disminuye considerablemente siendo necesarias más de 200 HR (Cuadro 11), por lo que a concentraciones bajas pudieran funcionar mejor en campo cualquiera de las cepas aisladas.



Cuadro 11. Tiempo letal 50 por concentración para para Entomaxx 5x

Concentración	TL <sub>50</sub> (Hr)
1x10 <sup>8</sup> UFC (8)	6.288577
1x10 <sup>7</sup> UFC (7)	217.4781
1x10 <sup>6</sup> UFC (6)	221.7467
1x10 <sup>5</sup> UFC (5)	224.903
1x10 <sup>4</sup> UFC (4)	250.4768

Figura 21. Regresión Probit en tiempo letal para Entomaxx 5x

## Análisis de Concentraciones Letales

En general las cepas de *Beauveria* fueron más eficaces en el control de *H. cunea*, reflejándose de mejor forma en concentraciones bajas, las cuales estuvieron por arriba del 44% de efectividad, resultando más evidente si se compara con lo ejercido por el producto comercial que no pasa del 30 % en la concentración de  $1 \times 10^7$  UFC como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Porcentajes de mortalidad por agente a los ocho días

Concen.	Bb.LI.1	Bb.Hua.1	Bb.SaA.1	Ma.Hua.2	Ma.Li.2	Ma.SaA.2	MIX	Entomaxx 5X
$1 \times 10^4$	44.44	77.77	44.44	44.44	33.33	38.88	33.33	16.66
$1 \times 10^5$	61.11	83.33	50	66.67	38.88	50	44.44	22.22
$1 \times 10^6$	66.66	83.33	61.11	66.67	50	50	72.22	27.77
$1 \times 10^7$	72.22	100	94.44	72.22	55.55	61.11	88.88	27.77
$1 \times 10^8$	100	100	100	100	94.44	94.44	100	94.44

La cepa de *Beauveria* Bb. Hua. 1 fue la única que alcanzó la mortalidad de 100% a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC, a diferencia del 76% reportado como máxima mortalidad por Zibae *et al.*, en 2013 sobre esta plaga a la misma concentración de este hongo.

Mediante el valor de P arrojados por el programa estadístico se puede deducir que hay diferencia significativa de los agentes de control sobre *H. cunea*, aunque existieron datos en los cuales no pudieron ser analizados correctamente por el contraste entre la concentración mayor y menor como lo fue para el producto Entomaxx 5x (Cuadro 13).

Cuadro 13. Concentraciones letales y P valor analizados por el programa “R” estadístico.

Trat.	CL50	LCL	UCL	CL05	CL95	P valor	Hr
Bb.LI.1	134924.6	451.697	1366864	21.7554	836787802	0.00716373	168
Bb.Hua.1	14924.59	1044.37	57705.24	14.4868	15375614	1.077202e-05	144
Bb.SaA.1	144800.7	4921.042	953264.6	161.6141	129736410	0.001709929	168
Ma.Hua.2	114842.5	686.4481	991087.6	20.52927	642438348	0.00470008	168
Ma.LI.2	5245967	466345.7	437152368	17022.41	161670240	0.008656967	144
Ma.SaA.2	177523.1	944.2841	1798051	22.724434	11567344795	0.005685304	192
MIX	407928.6	250670.3	657941	10509.45	15833916	9.303296e-22	168
Entomax-5X	31622985	31573533	31672514	9634011	103800289	0.0	120

Trat. Agente control, **CL** (Concentración Letal), **LCL** (Limite fiducial inferior), **UCL** (Limite fiducial superior, **P valor** (valor de significancia), **Hr** (tiempo en horas donde cada cepa obtuvo el 100% de mortalidad).

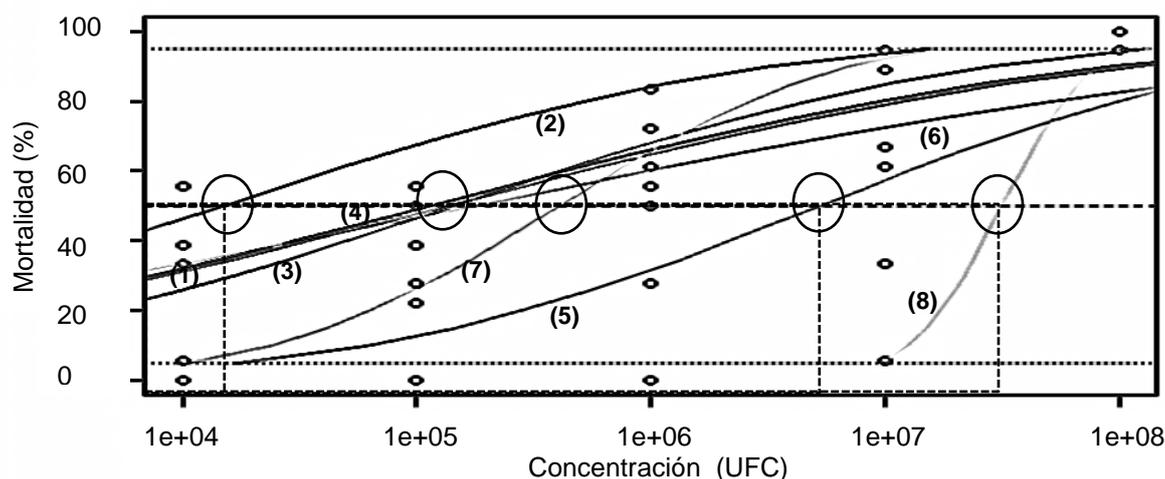


Figura 22. Regresión Probit para agentes de biocontrol en concentraciones letales. (1) Bb.LI.1, (2) Bb.Hua.1, (3) Bb.SaA.1, (4) Ma.Hua.2, (5) Ma.LI.2, (6) Ma.SaA.2, (7) MIX, (8) Entomax-5X

La regresión Probit (Figura 22) muestra las concentraciones letales necesarias para la  $CL_{50}$  por agente de control, ubicando a la mayoría dentro del intervalo  $1 \times 10^5$  UFC aproximadamente, saliéndose de este parámetro la cepa de *Beauveria* de Huachichil requiriendo  $1 \times 10^{4.2}$  UFC, el mix y el producto comercial necesitaron alrededor de  $1 \times 10^7$  UFC por lo que el mejor control al menos para *H. cunea* resultaría la cepa de *Beauveria* por si sola.

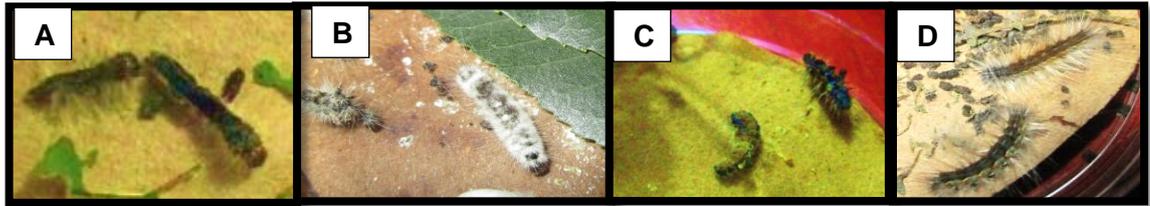


Figura 23. Larvas de *Hyphantria* a concentraciones de  $1 \times 10^7$  UFC **A:** Ma. Hua 2 (*Metarhizium*) **B:** Bb. Hua 1 (*Beauveria*) **C:** Entomaxx 5X (Producto comercial) y **D:** Testigo

La micosis de las cepas de *Beauveria* sobre las larvas de *Hyphantria* fue evidente como se observa en la Figura 23 (B), al igual que la colonización por las cepas de *Metarhizium*, lo cual resulta importante para suponer que estos hongos se pueden establecer de buena forma en campo provocando infecciones entre insectos plaga de la misma población e incluso de un ciclo a otro, al cumplir su ciclo biológico en el insecto dispersándose mediante esporas, como lo describe Echeverría (2006) la producción de esporas es en sí el medio por el cual se dispersa el hongo, y coloniza mayores zonas e insectos, por tanto una mayor producción de esporas es en el caso de emplearse como controlador biológico, una característica deseable, ya que la dispersión, transporte y permanencia en campo, serían conseguidos sin necesidad de mucho tiempo y esfuerzo.

Tomando en cuenta lo que menciona Giraldo (2009) en campo son de acción lenta dependiendo generalmente de las condiciones ambientales de temperatura y de elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. Generalmente tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima o al menos en que esta deje de alimentarse.

## CONCLUSIONES

La mayor cantidad de aislados fue de la localidad de Los Lirios, seguida de Huachichil y San Antonio de las Alazanas. Encontrando como especies predominantes a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

Los mejores resultados en Tiempo y Concentración Letal para *Beauveria* (Bb. Hua. 1) y *Metarhizium* (Ma. Hua. 2) fueron las cepas pertenecientes a la localidad de Huachichil, quedando como referencia para posteriores aislamientos de organismos benéficos.

La efectividad mostrada por las cepas del género *Beauveria* reflejan la mayor susceptibilidad de *Hyphantria cunea* a este organismo, lo que resultaría como una importante alternativa de control en campo.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. of Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Alves, S. B., Ferraz, L. C. C. B. y Castello Branco Jr, A. (1998b) "Chaves para identificação de patógenos de insetos", in S. B. Alves (ed) *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd edition, FEALQ, Piracicaba Brazil.
- Angel, C. Lezamar. Molina, J. Galindo, E.; López, M.; Rebolledo, O. 2005. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 50, 8p.
- Asaff Torres, A., Y. Reyes Vidal, V.E. López y López, M. de la Torre, 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva* 21:291-295.
- Badii, M. H., Abreu. J. L. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience.* 1(1): 82-89.
- Bateman, R; M. Carey; D. Batt; C. Prior; Y. Abraham; D. Moore; N. E. Jenkins; J. Fenlon. 1996. «Screening for Virulent Isolates of Entomopathogenic Fungi Against the Dessert Locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.)», *Biocontrol Science and Technology* 6:549-60.
- Benavides, P. Bustillo, E. 2002. Participación del control cultural, químico y biológico en el manejo de la broca del café. *Revista Colombiana de entomología.* 28(28): 161-165 pp.
- Cañedo V., Ames T. 2004. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos.* Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pp 62.
- Carreño I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus Socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia. pp 116.
- Charnley, A, Collins, S. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek, C.P., I.S. Druzhinina (eds.), *Environmental and Microbial Relationship. The Mycota IV.* Springer-Verlag Belin Heidelberg. pp. 159-187.

- Cruz, A. Rincon, M. 2016. Aislamiento e identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos con actividad hacia el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. *Entomología mexicana*, 3: 197-202 ISSN: 2448-475X
- De Faria, M. Wraight, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43:237-256.
- Dhoj, Y.; S. Keller; P. Nagel: «Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi to White Grubs of Maize Based Cropping System in Nepal. Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, June 2006, [http://www.umad.de/infos/cleanair13/pdf/full\\_348.pdf](http://www.umad.de/infos/cleanair13/pdf/full_348.pdf).
- Echeverría F. 2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. pp 105.
- Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, K. Jin, M. J. Bidochka, Y. Pei, 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73:295-302.
- FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO, p. 33-35.
- Giraldo J. 2009. Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, *Revista Ganadero*. Tolima, Colombia. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/uso-hongos-entomopatogenos-controlt2540/p0.htm>
- Heppner, J. 2007. Los Lepidópteros de Florida: Introducción y catálogo, Parte 1. Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor de la Florida, División de Industria Vegetal. 670 pp.
- Ibarra, A. Varela, A. 2002. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas. *Revista Colombiana de Entomología*. 28(2): 129-137 pp.

- López, V. Hans, J. 2011. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad, v. 3, n. 6, p. 12 – 15, 2001. Disponible en: <http://www.ua.es/es/informacion/biodiversidad/cuadbiod06.pdf> >.
- Luque A. 2011. Micología. Centro de Referencia de Micología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR. pp 34.
- Mata, M. Barquero, M. 2010. Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas. PROMECAFE, v. 122, p. 8-19.
- Merino, L.; France, A.; Gerding, M. 2007. Selection of native fungi strains pathogenic to *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). Agric. Téc., v. 67, n. 4, p. 335-342.
- Meyling, V.; Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control, v. 43, n. 2, p. 145-155., <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Montesinos R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Pp 82.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63: 95 - 103.
- Morales, V., Garay, B., Romero, A., Sánchez, J. 2009. Insecticidas biológicos en el control de insectos plaga: agrícolas, forestales, de almacén y urbanas en México. Artículo científico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas. (CATIE, Costa Rica) 63:95-103.
- MPG, Grupo de los fotógrafos de la polilla. 2010. 930319 - 8140 - *Hypantiria cunea* -. (Drury, 1773) *Grupo de América del Norte de la polilla de los fotógrafos*. [Http://mothphotographersgroup.msstate.edu/species.php?hodges=8140](http://mothphotographersgroup.msstate.edu/species.php?hodges=8140) (13 de diciembre de 2010).

- Murray, A. Alston, D. 2014. Plagas Frutales: Manzana, Entomologista de Extensión. Universidad Estatal de Utah y el Laboratorio de Diagnóstico de Plagas de Utah. Utah pest. IPM-006-11.
- Niazmand A. Choobineh D. Hajmansoor S. 2013. A Simple and Rapid Method to Extract Genomic DNA from Urediniospores of Rust Diseases for Molecular Analysis. STAPFIA 99: 235-238
- Pik-Kheng Hoe, Choon-Fah J. Bong, Kadir Jugah., Amartalingam Rajan. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) Isolates and their Effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 4 (4): 289-297.
- Quesada E., Navas J.A., Maranhao E.A., Ortiz A., Santiago C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
URL <http://www.R-project.org/>.
- Rodríguez L. A., Arredondo H. C. 2007. Libro: Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. pp. 303.
- Samson, R. A., Evans, H. C. y Latgé, J. P. (1988) Atlas for Entomopathogenic Fungi, Springer-Verlag, New York.
- Saruhan, I. Tuncer, C. 2016. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* and Some Entomopathogenic Fungi on Larvae of Fall Webworm, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 55139, Samsun, Turkey. Journal of Entomology and Zoology Studies 2016; 4(5): 171-176.
- Sun, J. 2002. Screening and Characterization of Pathogenic Fungi for Possible Control of *Coptotermes formosanus*. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Entomology.  
[http://etd.lsu.edu/docs/submitted/etd-0415102-230223/unrestricted/Sun\\_dis.pdf](http://etd.lsu.edu/docs/submitted/etd-0415102-230223/unrestricted/Sun_dis.pdf)
- Takeda, M. 2005. La diferenciación en el ciclo de vida de las poblaciones simpátricas de dos formas de *Hypantria* polilla en el centro de Missouri. Journal of Entomological Science 8: 211-218.

- Téllez, A. Cruz, R. Flores, M. Asaff, T. Aranacuenca, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, v. 30, p. 73-80.
- Wagner, D. 2005. *Orugas del Este de Norteamérica*. Princeton University Press. Princeton, 512 pp.
- Yang, Z. Zhang, A. 2007. Las investigaciones sobre las técnicas para el control biológico del gusano tejedor de otoño, *cunea Hyphantria*, una grave plaga de insectos invasivos a China. *Boletín Chino de Entomología* 44: 465-471.
- Zibae, I, Bandani, A. Sendi, J. 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to Fall Webworm (*Hyphantria cunea*) (Lepidoptera: Arctiidae) on Different Host Plants. University of Tehran, Karaj, Iran; Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. *Plant Protect. Sci.*, 49: 169–176.