

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS NATURALES PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (HYPOCREALES: CORDYCIPTACEAE) EN CULTIVO BIFÁSICO

Luis Antonio Rodríguez-Gámez, Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Isela Quintero-Zapata, Lilia Hortencia Morales Ramos, Jairo Hernán Alfaro Alvarez y Myriam Elías-Santos

RESUMEN

La búsqueda de nuevas y mejores alternativas para estimular la esporulación de hongos entomopatógenos es básica para el desarrollo de producciones masivas de inóculos destinados al control de algunos insectos plaga que causan pérdidas económicamente importantes. Se evaluó la producción de conidios de dos cepas nativas de *Beauveria bassiana* (HIB-4 e HIB-7) y una de colección (GHA) en cultivo bifásico utilizando arroz, avena, cebada, maíz, sorgo y trigo como sustratos. La producción de conidios entre los sustratos utilizados se presentó en un rango de 10^8 conidios/g y no se encontraron diferencias estadística-

mente significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes hongos evaluados, mientras que para la producción de conidios entre los diferentes sustratos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). La mayor producción se obtuvo con la avena la cual fue de $5,00 \times 10^8$ conidios/g; la menor producción de $1,72 \times 10^8$ conidios/g la presentó la cebada. Con arroz se produjo $3,15 \times 10^8$ conidios/g; con sorgo y maíz 2,68; y con trigo $2,38 \times 10^8$ conidios/g, respectivamente. En cuanto a la viabilidad, esta fue $>95\%$ para todas las cepas durante cuatro semanas de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.

Introducción

El desarrollo y aplicación de agentes de control biológico de plagas adquiere relevancia como alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el medio ambiente. La aplicación controlada en agroecosistemas de organismos vivos o sus metabolitos para el control de plagas y enfermedades implica el mejoramiento de los cultivos, al proteger las plantas del deterioro producido por agentes patógenos (Gómez *et al.*, 2002). En la naturaleza, los hongos entomopatógenos pueden eliminar plagas o mante-

nerlas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos (Azevedo, 1998). Constituyen, además, el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga; prácticamente todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por hongos (López-Llorca y Jansson, 2001). En la actualidad se conocen ~90 géneros y ~700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los géneros más importantes se encuentran *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Paecilomyces* (= *Isaria*) y *Verticillium* (= *Lecanicillium*) (López y

Hans Börjes, 2001), aunque solo un número reducido de ellos, incluyendo a Entomophthorales e Hyphomycetes, ha sido bien estudiado (Qazi y Khachatourians, 2008).

Entre los hongos entomopatógenos más conocidos esta *Beauveria bassiana*, considerada como la especie más ampliamente distribuida de su género en el mundo y que forma parte de los entomopatógenos más destacados debido a su capacidad de infectar a más de 200 especies de nueve órdenes de insectos. Este hongo ha sido aislado, cultivado y ensayado en laboratorio para el control de insectos plaga que atacan a una diver-

sidad de cultivos y, fundamentalmente, es utilizado para el control de lepidópteros, homópteros, coleópteros, hemípteros y dípteros de importancia económica (Zimmermann, 2007). Comprender los aspectos básicos del desarrollo de los hongos entomopatógenos y tener un conocimiento detallado de los requerimientos nutricionales para su crecimiento y esporulación es esencial para emprender su producción masiva y facilitar su comercialización. (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013a).

La producción de estos hongos para el control de insectos plaga se basa en la multiplicación masiva del

PALABRAS CLAVE / Avena / *Beauveria bassiana* / Conidios / Cultivo bifásico /

Recibido: 30/08/2016. Aceptado: 18/10/2017.

Luis Antonio Rodríguez-Gámez. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México. e-mail: luisrdzg_6@hotmail.com

Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco. Doctora en Ciencias en Biotecnología, UANL, México. Posdoctorado, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México. Investigadora, UANL, México. e-mail: fatima_lizeth84@hotmail.com

María Guadalupe Maldonado-Blanco. Doctora en Ciencias en Biotecnología, UANL, México. Profesora Investigadora, UANL, México. e-mail: maria.maldonadobl@uanl.edu.mx

Isela Quintero-Zapata. Doctora en Ciencias en Biotecnología, UANL. Profesora Investigadora, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. e-mail: isela.quinterozp@uanl.edu.mx

Lilia Hortencia Morales Ramos. Doctora en Ciencias en Biotecnología, UANL, México. Profesora Investigadora, UANL, México. e-mail: lilia.moralesrm@uanl.edu.mx

Jairo Hernán Alfaro Alvarez. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Estudiante de Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. e-mail: jairo.alvarez@hotmail.it

Myriam Elías-Santo (Autor de correspondencia). Doctora en Ciencias en Biotecnología, UANL, México. Profesora Investigadora, UANL, México. Dirección: Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba s/n esq. Av. Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455. México. e-mail: meliassn@uanl.edu.mx

EVALUATION OF NATURAL SUBSTRATES FOR PRODUCTION OF CONIDIA OF *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (HYPOCREALES: CORDYCIPTACEAE) IN BIPHASIC CULTURE

Luis Antonio Rodríguez-Gámez, Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Isela Quintero-Zapata, Lilia Hortencia Morales Ramos, Jairo Hernán Alfaro Alvarez and Myriam Elías-Santos

SUMMARY

The search for new and better ways to stimulate sporulation of entomopathogenic fungi is essential for the development of mass production of inoculants for the control of some insect pests that cause economically important losses. The production of conidia from two native strains of *Beauveria bassiana* (HIB-4 and HIB-7) and a collection strain (GHA) in biphasic culture using rice, oats, barley, corn, sorghum and wheat as substrates was evaluated. Conidia production on the various substrates used took place in a range of 10^8 conidia/g and no significant

statistical differences ($p \leq 0.05$) between the different fungi tested were found, whereas for the production of conidia between different substrates were found statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were found. The highest production was obtained with oat at 5.00×10^8 conidia/g and the lowest, for barley, was 1.72×10^8 conidia/g. Rice production was 3.15×10^8 , sorghum and maize 2.68, and wheat 2.38×10^8 conidia/g, respectively. Viability remained $>95\%$ for the storage of all strains for four weeks, both at room temperature and refrigerated.

AVALIAÇÃO DE SUBSTRATOS NATURAIS PARA A PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (HYPOCREALES: CORDYCIPTACEAE) EM CULTIVO BIFÁSICO

Luis Antonio Rodríguez-Gámez, Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, María Guadalupe Maldonado-Blanco, Isela Quintero-Zapata, Lilia Hortencia Morales Ramos, Jairo Hernán Alfaro Alvarez e Myriam Elías-Santos

RESUMO

A procura por novas e melhores alternativas para estimular a esporulação de fungos entomopatógenos é fundamental para o desenvolvimento de produções massivas de inóculos destinados para o controle de alguns insetos praga que causam perdas economicamente importantes. Avaliou-se a produção de conídios de duas cepas nativas de *Beauveria bassiana* (HIB-4 e HIB-7) e uma de coleção (GHA) em cultivo bifásico utilizando arroz, aveia, cevada, milho, sorgo e trigo como substratos. A produção de conídios entre os substratos utilizados se apresentou em uma faixa de 10^8 conídios/g e não foram encontradas diferenças estatisticamen-

te significativas ($p \leq 0,05$) entre os diferentes fungos avaliados, enquanto que para a produção de conídios entre os diferentes substratos se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). A maior produção se obteve com aveia, a qual foi de $5,00 \times 10^8$ conídios/g; a menor produção de $1,72 \times 10^8$ conídios/g foi da cevada. Com arroz foi produzido $3,15 \times 10^8$ conídios/g; com sorgo e milho 2,68; e com trigo $2,38 \times 10^8$ conídios/g, respectivamente. Quanto à viabilidade, esta foi $>95\%$ para todas as cepas durante quatro semanas de armazenamento, tanto em temperatura ambiente quanto com refrigeração.

hongo de interés y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural que proporcione los nutrientes necesarios para la mayor producción de conidios al menor costo. Este procedimiento se ha desarrollado desde hace varias décadas con diversas técnicas de formulación. Actualmente se conocen diferentes métodos de producción de hongos entomopatógenos, artesanal, semi-industrial e industrial, y dicha producción se puede realizar en cultivos líquidos, cultivo mixto (bifásico) y sólido (Jenkins *et al.*, 1998).

Para la producción masiva de hongos entomopatógenos comúnmente se usa como sustrato sólido el grano de arroz (*Oryza sativa* L.) por mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutri-

cional y algunas condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en términos de aireación y humedad (Bhanu-Pakrasha *et al.*, 2008). Otros sustratos comúnmente utilizados son: cebada, avena, frijol, sorgo, trigo, soya, mijo, cacahuete, garbanzo, lenteja, chícharo, caupí (frijol africano) y estiércol de vaca (Figueroa *et al.*, 2007; Sahayraj y Namasivayam, 2008; Bhadauria *et al.*, 2012; Gangwar 2013).

Los hongos se han reproducido para su uso como agentes biológicos de plagas desde hace casi un siglo, para lo cual se ha utilizado diferentes métodos de reproducción (Vélez *et al.*, 1997). Para utilizar hongos entomopatógenos como insecticidas deben producirse cantidades masivas del hongo, el cual debe mantener su capacidad infectiva por un

período de tiempo considerable. La mayoría de las especies de hongos son producidas en medios sólidos, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas. Por otro lado, la producción de hongos en sustratos sólidos dificulta la automatización del proceso y carece de eficiencia económica, a escala satisfactoria, en la producción de conidios. Este problema puede ser parcialmente resuelto por un proceso de producción de dos fases (cultivo bifásico), en el que los cultivos sumergidos son utilizados para producir una gran cantidad de micelios y/o blastosporas, que es colocada después sobre un sustrato sólido para obtener los conidios necesarios (Jenkins *et al.*, 1998; Wraight *et al.*, 2001).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la producción

de conidios de dos aislados nativos y una cepa de *B. bassiana* que han mostrado potencial para el control de insectos plaga en estudios anteriores (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013b, c), mediante una alternativa de cultivo bifásico utilizando blastosporas como pre-inóculo sobre diferentes sustratos sólidos, específicamente cereales de bajo costo comercial.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Los hongos se obtuvieron de la colección del laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). Fueron conservados en viales criogénicos con 1ml de glicerol 10% v/v y almacenados en

congelación a -80°C . Los aislados nativos utilizados corresponden a las claves HIB-4, HIB-7 y la cepa con clave GHA de *Beauveria bassiana*.

Producción de blastosporas para el precultivo

La cepa y los aislados nativos de *B. bassiana* se descongelaron por 45min a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y se cultivaron en agar papa dextrosa. Las cajas se incubaron durante 14 días a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo fotoperiodo 12:12h. Después se prepararon suspensiones de 5×10^5 conidios/ml con agua destilada estéril para inocular 10ml en matraces Erlenmeyer bafleados de 500ml conteniendo 90ml de caldo papa dextrosa. Se incubaron por 72h a 28°C y 250rpm en un incubador con agitación orbital. Al final del tiempo de crecimiento se determinó la concentración total de blastosporas y mediante diluciones seriadas se ajustó la concentración a 1×10^6 blastosporas/ml de cada uno de los hongos utilizados para inocular cada uno de los sustratos.

Preparación de los sustratos

Se utilizó arroz (*Oryza sativa* L.), avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), maíz quebrado (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* L.) y trigo (*Triticum sativum* L.) como sustratos. Para eliminar la mayor cantidad de partículas ajenas al sustrato cada uno de éstos se lavó por 2min separadamente con agua corriente a presión y se dejó escurrir por 10min sobre el mismo colador donde fue lavado. Después se colocaron 50g (peso húmedo) del sustrato en bolsas de polietileno de alta densidad (HDPE) de 1kg de capacidad y 25ml de agua bidestilada. Las bolsas fueron selladas con grapas metálicas modelo N° 400, se les colocó una cruz de cinta masking N° 110, a la cual se denominó sitio de inoculación, en el centro de la bolsa. Todas las bolsas fueron esterilizadas en una autoclave automática a 121°C , 15PSI por 15 min.

Inoculación de los sustratos

Una vez esterilizadas, las bolsas se dejaron enfriar durante 24h para ser inoculadas. Para la inoculación de los diferentes hongos se utilizaron jeringas estériles con la que se inyectaron las bolsas en el sitio de inoculación. Todas las bolsas fueron inoculadas aplicando 5ml por bolsa de cada uno de los sustratos con una suspensión de 1×10^6 blastosporas/ml, asegurándose de esparcir sobre todo el sustrato la suspensión del hongo. Posteriormente se incubaron durante 14 días a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y se expusieron a la luz blanca de las lámparas del laboratorio (12:12h L:O). Las bolsas fueron agitadas cada tercer día para esparcir las esporas homogéneamente sobre el sustrato. Al final del tiempo de crecimiento se determinó la concentración de conidios y el porcentaje de viabilidad.

Medición de la productividad del sustrato

A los 14 días de incubación se determinó la concentración de conidios por gramo de sustrato de cada una de las bolsas, tomando 1g de cada uno de los sustratos y agregándolos en tubos de ensayo conteniendo solución estéril Tween 80 al 0,1% (v/v). Se homogenizaron en un agitador vibratorio (vórtex) durante 2min para desprender los conidios, se realizaron diluciones seriadas y se contaron los conidios usando una cámara de Neubauer.

Determinación de la viabilidad

Como variable de calidad se determinó la viabilidad (supervivencia) de los conidios producidos sobre avena, ya que fue el sustrato de mayor producción promedio, tanto para la cepa como para los dos aislados nativos de *B. bassiana*. La prueba se realizó semanalmente durante un mes de almacenaje de las bolsas a una temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (en refrigerador) y $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ambien-

te) en agar papa dextrosa y agar agua.

Análisis de los datos

Los resultados se expresaron como valores promedios. Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, previa conversión de los resultados a su logaritmo (\log_{10}) para introducirlos en el programa estadístico, y en caso de cumplir con este criterio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Scheffé ($p \leq 0,05$) para las medias. Los datos fueron analizados mediante el programa IBM® SPSS® v.19.

Resultados y Discusión

La producción de conidios entre los sustratos utilizados se presentó en un rango de 10^8 conidios por gramo y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes hongos evaluados ($f = 1,84$; $p = 0,16$). Para la cepa GHA la producción promedio fue de $2,55 \times 10^8$, mientras que para los aislados HIB-4 e HIB-7 rondaron los $2,80 \times 10^8$ y $9,44 \times 10^8$ conidios/g, respectivamente (Figura 1). Al evaluar la producción de conidios entre los diferentes sustratos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). En promedio, la mayor producción se obtuvo con la avena la cual fue de $5,00 \times 10^8$ conidios/g; la menor

producción ($1,72 \times 10^8$ conidios/g) se presentó en cebada. En arroz hubo una producción de $3,15 \times 10^8$, en sorgo y maíz de $2,68 \times 10^8$, y en trigo de $2,38/10^8$ conidios/g respectivamente (Figura 2).

Con respecto a la supervivencia de los conidios en avena los resultados en temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y de refrigeración ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para los hongos evaluados en medio papa dextrosa fue de 100% durante las tres primeras semanas y en el medio agar agua fue del 100% durante las primeras tres semanas en refrigeración, mientras que a temperatura ambiente fue muy similar a la registrada en la cuarta semana (Tabla I).

Para la producción masiva de hongos entomopatógenos comúnmente se usa como sustrato sólido el grano de arroz por mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutricional y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad (Bhanu *et al.*, 2008; Sahayaraj y Namasivayam, 2008). Sin embargo, existen diferentes estudios en los que se ha buscado otras opciones como sustratos con el objetivo de reducir costos de producción y/o mejorar los rendimientos en la producción de conidios, reportados por diversos autores en años recientes. Entre los sustratos evaluados se encuentran cebada, avena, frijol, sorgo,

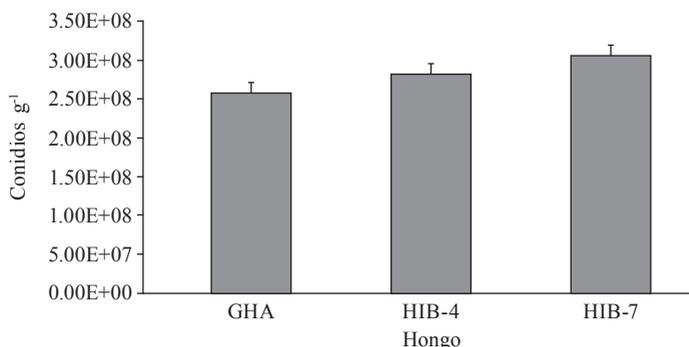


Figura 1. Producción promedio de conidios entre los diferentes hongos evaluados (GHA, HIB-4 e HIB-7) de *Beauveria bassiana* a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo 12:12h. Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Líneas en las barras indican el error estándar.

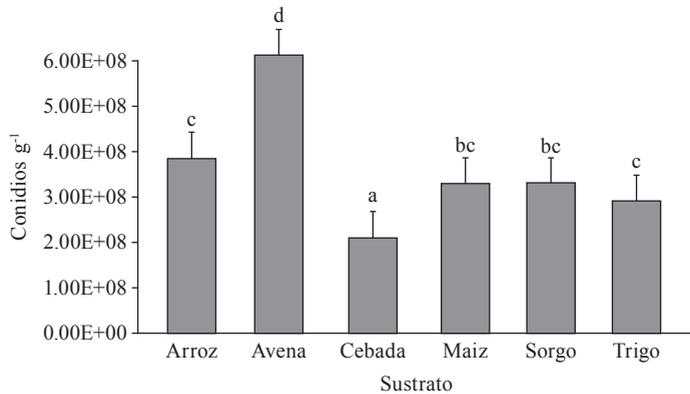


Figura 2. Producción promedio de conidios entre los diferentes sustratos evaluados a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 25 ±2°C y fotoperiodo 12:12h. Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes (p≤0,05). Líneas en las barras indican el error estándar.

TABLA I
SOBREVIVENCIA A LAS CUATRO SEMANAS DE CONIDIOS PRODUCIDOS EN BOLSAS DE AVENA COMO SUSTRATO SÓLIDO, EN DOS MEDIOS Y DOS TEMPERATURAS

Clave	Germinación (%)				
	Día 0*	PDA		AA	
		25 ±2°C	4 ±2°C	25 ±2°C	4 ±2°C
GHA	100	98	99	95	97
HIB-4	100	97	98	94	97
HIB-7	100	98	99	93	98
Media ±DE	100	97,6 ±0,57	98,6 ±0,57	94 ±1	97,3 ±0,57

*Corresponde a la sobrevivencia de los conidios a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio 25 ±2°C y fotoperiodo 12:12h. PA: agar papa dextrosa, AA: agar agua.

trigo, soya, mijo, cacahuete, garbanzo, lenteja, chícharo, caupí (frijol africano), estiércol de vaca, por mencionar algunos (Figueroa *et al.*, 2007; Sahayaraj y Namasiyayam, 2008; Bhadauria *et al.*, 2012; Gangwar, 2013). En el presente trabajo se utilizaron arroz, avena, cebada, maíz quebrado, sorgo y trigo considerando su bajo costo, fácil adquisición y los trabajos previos a esta investigación.

Uno de los problemas más comunes cuando se utiliza un sustrato para la producción de conidios se relaciona con la alta compactación que se ejerce sobre el sustrato. Cortez-Madrigal (2007) reporta que en hongos como *Lecanicillium lecani*, la cantidad de conidios se puede ver afectada por este factor, que evita aireación interna y, por consiguiente, reduce en la producción conidial.

Este problema pudo presentarse en el presente trabajo con *B. bassiana*, ya que algunos de los sustratos utilizados, como avena, maíz quebrado y principalmente arroz, presentaron dificultades por su tendencia a permanecer apelmazados después de la esterilización debido a un exceso de humedad.

En el presente estudio la producción obtenida fue del orden de 10⁸ conidios/g. Al comparar la producción entre los seis sustratos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, siendo en avena donde se obtuvo los mejores rendimientos en comparación con la cebada, que presentó la menor producción, mientras que el arroz, sorgo, maíz y trigo mostraron resultados similares. Estos resultados coinciden con los reportados por Lucero-Mafla *et al.*, (2004) quienes reportan

valores para cepas de *B. bassiana* de 2,5×10⁸ a 5×10⁹ esporas/g utilizando trigo como sustrato. Sahayaraj y Namasiyayam (2008) utilizando trigo, arroz, raghi (mijo africano), sorgo, mijo perla y maíz obtuvieron producciones de 11,76; 11,24; 10,72; 10,24; 9,78 y 9,44×10⁸ conidios/g, respectivamente. La avena es uno de los cereales más completos y de más alto valor nutricional, ya que es rica en carbohidratos complejos, vitaminas del complejo B, minerales y aminoácidos como leucina, treonina, isoleucina y metionina, lo cual coincide con lo señalado en Volcy y Pardo (1994), quienes mencionan que un buen sustrato para la producción de conidios debe poseer un alto contenido de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas del complejo B y una concentración alta de iones necesarios para el crecimiento y esporulación. Bhadauria *et al.*, (2012) al evaluar quince sustratos diferentes, entre ellos arroz, maíz, sorgo y trigo, encontraron la mayor producción de 9,06×10⁷ conidios/g en caupí (frijol africano, frijol de cabecilla negra), seguido por el chícharo y frijol, en los cuales obtuvieron 8×10⁷ conidios g⁻¹. Posada-Flores (2008) y Gandarilla-Pacheco *et al.*, (2013a) reportan valores menores a 1×10¹⁰ conidios/g en medio de cultivo bifásico utilizando arroz como sustrato para *B. bassiana*. La variabilidad en la producción de conidios entre los diferentes sustratos evaluados en el presente y anteriores trabajos puede deberse en parte a que el rendimiento de esporas por gramo de sustrato también se ve influenciado por la cepa y por el estado de la misma, pudiendo variar entre 5×10³ y 2.5×10¹¹ conidios/g de sustrato (Monzón, 2001). Para considerar un sustrato como idóneo a los fines de la producción de conidios de una cepa o aislado de un hongo entomopatógeno debe tomarse en cuenta su bajo costo, fácil adquisición, producción de alta concentración de conidios y capacidad para mantener la virulencia de la cepa (Roberts y Yendol, 1971).

Sin embargo, el rendimiento de la esporulación sobre un sustrato también puede ser influenciado por factores como la técnica de cultivo, concentración del inóculo inicial, condiciones de temperatura, humedad, aireación, y tiempo de incubación (Figueroa *et al.*, 2007), así como las por diferencias nutricionales entre los sustratos.

Conclusiones

La producción de conidios de los hongos evaluados en los diferentes sustratos utilizados se mantuvo en el rango de 10⁸ conidios/g. Sin embargo, estos resultados muestran la capacidad de los hongos evaluados para utilizar la avena como un sustrato ventajoso para desarrollar su crecimiento y esporulación.

REFERENCIAS

- Azevedo JL (1998) Controle microbiano de insetos pragas e seu melhoramento genético. En Melo IS, Azevedo JL (Eds.) *Controle Biológico*. Vol. 1. Embrapa. Jaguariúna, Brasil. pp. 69-96.
- Bhadauria BP, Puri S, Singh PK (2012) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products. *Bioscan* 7: 229-232.
- Bhanu-Prakasha GVS, Padmaja V, Siva-Kiran RR (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* 99: 1530-1537.
- Cortez-Madrigal H (2007) Producción de *Lecanicillium (=Verticillium) lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agríc. Téc. Méx.* 33: 83-87.
- Figueroa LM, Varela A, Corredor D (2007) Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromicotina: Hyphomycetes). *Rev. Invest.* 7: 127-131.
- Gandarilla-Pacheco FL, Galán-Wong LJ, Arévalo-Niño K, Elías-Santos M, Quintero-Zapata I (2013a) Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Báls.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia* 47: 255-266.

- Gandarilla-Pacheco FL, Galán-Wong LJ, López-Arroyo JI, Rodríguez-Guerra R, Quintero-Zapata I (2013b) Optimization of pathogenicity tests for selection of native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Fla. Entomol.* 96: 187-195.
- Gandarilla-Pacheco FL, Galán-Wong LJ, López-Arroyo JI, Quintero-Zapata I (2013c) Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Liviidae). *Southw. Entomol.* 38 :325-338
- Gangwar GP (2013) Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Agric. Sci. Dig.* 33: 321-323.
- Gómez E, Álvarez RM, San Juan AN, Zayas MA, Hernández J, Lemes T, Croche G, Cruz X (2002) Nematicida a partir del hongo *Verticillium lecanii*. *Terralia* 24: 30.
- Jenkins NE, Heviefó G, Langewald J, Cherry A, Lomer CJ (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocont. News Inf.* 19: 21-31.
- López-Llorca LV, Jansson HB (2001) Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuad. Biodivers.* 6: 12-15.
- Lucero-Mafla AM, Peña-Villamil LA, Bacca-Ibarra T (2004) Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Corpoica* 5: 43-48.
- Monzón A (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integr. Plagas* 63: 95-103.
- Posada-Flórez FJ (2008) Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* in Colombia. *J. Insect Sci.* 8: 1-13.
- Qazi SS, Khachatourians GG (2008) Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. En Brakhage AA, Zipfel PF (Eds.) *Human and Animal Relationships, The Mycota VI*. 2ª ed. Springer. Berlín, Alemania. pp. 33-53.
- Roberts DW, Yendol WG (1971) Use of fungi for microbial control of insects. En Burgues H, Hussey N (Eds) *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press. London, RU. pp. 125-149.
- Sahayaraj K, Namasivayam SKR (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 1907-1910.
- Vélez PA, Posada FJ, Marín P, González MT, Osorio E, Bustillo AE (1997) *Técnicas para el Control de Calidad de Formulaciones de Hongos Entomopatógenos*. Boletín Técnico N° 17. Centro Nacional de Investigaciones del Café. Manizales, Colombia. 37 pp.
- Voley C, Pardo V (1994) *Principios de Micología*. 19ª ed. Universidad Nacional de Colombia. 141 pp.
- Wraight S, Jackson M, Kock S (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En Butt TM, Jackson C, Magan, N (Eds.) *Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial*. CABI. Wallingford, RU. pp. 253-280.
- Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontr. Sci. Technol.* 17: 553-596.