

EVALUACIÓN DE AISLADOS NATIVOS MEXICANOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) PROVENIENTES DE ZONAS CITRÍCOLAS PARA SU PRODUCCIÓN MASIVA EN CULTIVO SUMERGIDO Y BIFÁSICO

EVALUATION OF MEXICAN NATIVE ISOLATES OF *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) FROM CITRUS-GROWING AREAS OF MASS PRODUCTION IN SUBMERGED AND BIPHASIC CULTURE

F. Lizeth Gandarilla-Pacheco, Luis J. Galán-Wong, Katiushka Arévalo-Niño, Myriam Elías-Santos, Isela Quintero-Zapata*

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 66450. San Nicolás de los Garza, N. L. México. (isela.quintero@uanl.edu.mx).

RESUMEN

La comprensión de los aspectos básicos del desarrollo de los hongos entomopatógenos y el conocimiento detallado de los requerimientos nutricionales para su crecimiento y esporulación es esencial para la producción masiva y comercialización. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de blastoesporas en un medio de cultivo sumergido y de conidios en un cultivo bifásico, de cuatro aislados nativos y una cepa de *B. bassiana* con potencial para controlar *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL, México. El diseño experimental fue completamente al azar y las medias se compararon con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). En el medio de cultivo líquido formulado con glucosa y casaminoácidos, la producción de blastoesporas a las 72 h mostró para la cepa GHA la mayor ($p \leq 0.05$) concentración ($2.20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) y una biomasa de 26 g L^{-1} , y en el aislado HIB-4 ocurrió la producción menor ($p \leq 0.05$) de blastoesporas ($5.25 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) y biomasa de 7 g L^{-1} . El aislado HIB-2 presentó 56 % de germinación en tierra de diatomeas como soporte y fue el valor mayor entre los hongos estudiados. En la fase sólida (grano de arroz), a los 14 d de incubación, el aislado HIB-4 presentó una producción de 1.82×10^9 conidios g^{-1} y la cepa GHA produjo 2.35×10^8 conidios g^{-1} . La viabilidad fue superior a 90 % para todos los hongos durante 4 semanas de almacenamiento a 4°C . Así, es factible producir blastoesporas y conidios de aislados nativos de *B. bassiana* con potencial para el manejo de plagas que afectan las regiones citrícolas de México.

ABSTRACT

Comprehension of the basic aspects of entomopathogenic fungi development and detailed knowledge of nutritious requirements for their growth and sporulation are fundamental for mass production and commercialization. The objective of this study was to evaluate the production of blastospores in submerged culture medium and of conidia in biphasic culture of four native isolates and a *B. bassiana* strain showing potential for the control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), which belong to the collection of the FCB-UANL Institute of Biotechnology, México. The experimental design was completely randomized and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). In the liquid culture medium formulated with glucose and casamino acids, at 72 h, blastospore production had the highest ($p \leq 0.05$) concentration for GHA strain ($2.20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) and biomass of 26 g L^{-1} , while the HIB-4 isolate showed the lowest blastospore production ($p \leq 0.05$) ($5.25 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) and biomass of 7 g L^{-1} . Isolate HIB-2 had 56 % germination in diatomaceous earth for support, being the highest value among the studied fungi. In solid phase (rice grain), at 14 d of incubation, HIB-4 isolate presented a production of 1.82×10^9 conidia g^{-1} , and GHA strain produced was 2.35×10^8 conidia g^{-1} . Viability was higher than 90 % for all fungi during 4 weeks of storing at 4°C . Thus, it is feasible produce blastospores and conidia of native isolates of *B. bassiana* with the potential of controlling pests which affect the citrus-growing regions of México.

Key words: entomopathogenic fungi, conidia, blastospores, submerged culture, biphasic.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2012. Aprobado: febrero, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 47: 255-266. 2013.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, conidios, blastoesporas, cultivo sumergido, bifásico

INTRODUCCIÓN

En México hay una variedad amplia de cultivos con importancia económica y atacados por insectos diferentes que provocan anualmente pérdidas considerables. Los cítricos son atacados por al menos 74 especies de artrópodos perjudiciales (López-Arroyo *et al.*, 2004), como *Diaphorina citri* el vector del Huanglongbing. Esta enfermedad es una de las más devastadoras de los cítricos, afecta la calidad de los frutos para consumo humano e incluso puede causar pérdida total de áreas cultivadas (SENASICA, 2012) (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; <http://www.senasica.gob.mx>).

Una alternativa para la problemática de las plagas de cítricos y el uso desmedido de plaguicidas, es el control biológico aplicado exitosamente contra plagas en el país (Rodríguez y Arredondo, 2007). En la citricultura hay diversas plagas en las cuales se puede aplicar agentes de control biológico. Los entomopatógenos son un grupo con potencial para el manejo de plagas y entre los más destacados está *Beauveria bassiana* por su capacidad de infectar más de 200 especies en nueve órdenes de insectos y ser la especie más ampliamente distribuida de su género en el mundo (Zimmermann, 2007). Algunos productos registrados y comercializados son BotaniGard®, BeasSin® o Naturalis®-L y otros están en desarrollo (de Faria y Wraight, 2007).

Un factor clave en la selección de nuevos aislados como agentes potenciales para control biológico, específicamente en hongos entomopatógenos, es la capacidad de producción en grandes cantidades (i.e., altas tasas de esporulación), crecimiento rápido y mantener su viabilidad e infectividad (Feng *et al.*, 1994). Pero una limitante para lograr estos objetivos son el medio y el método de cultivo ya que la elección de ambos parámetros depende en gran medida de las especies fúngicas a usar y el tipo de propágulo requerido para la formulación y el método de aplicación (Derakhshan *et al.*, 2008). La mayoría de las especies de hongos puede producirse fácilmente en medios sólidos, donde el hongo crece en forma de micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas; algunos sustratos naturales son medios de cultivo adecuados,

INTRODUCTION

In México there is an extensive variety of cultivars of economic importance, attacked by different insects, annually provoking considerable losses. Citrus are attacked by at least 74 species of harmful arthropods (López-Arroyo *et al.*, 2004), like *Diaphorina citri*, vector of Huanglongbing. This is one of the most devastating citrus diseases, that affects quality of fruit for human consumption, and even may cause the total loss of cultivated areas (SENASICA, 2012) (National Service of Health, Innocuousness, and Quality of Agronomical Food; <http://www.senasica.gob.mx>).

Biological control, successfully applied against plagues in the country, is an alternative to problems of citrus pests and the excessive use of pesticides (Rodríguez and Arredondo, 2007). In citriculture there is a variety of plagues, in which biocontrol agents can be applied. Among them the entomopathogenic fungi with the potential of pest control, and *Beauveria bassiana* is one of the outstanding groups because of their capacity to infect more than 200 species in nine insect orders, being the genus of widest distribution all over the world (Zimmermann, 2007). BotaniGard®, BeasSin®, or Naturalis®-L are some of the recorded and commercialized products, and others are being developed (De Faria and Wraight, 2007).

A key factor in the selection of new isolates as potential biocontrol agents, specifically, in entomopathogenic fungi, is the capacity of mass production (i.e. high sporulation rate), rapid growth, and maintaining viability and infectivity (Feng *et al.*, 1994). But there is a limiting factor for achieving these goals: mean and method of culture; for the choice of either of the parameters depends to a great extent on the fungal species to be utilized and on the type of propagule required for the formulation and the method of application (Derakhshan *et al.*, 2008). Most of the fungi species can be easily produced in solid media, where the fungus grows in form of superficial mycelium and produces conidia in aerial hyphae. Some natural substrates are adequate culture media, such as rice or wheat bran. However, fungi production in solid substrates makes the process automation difficult and lacks economy of satisfactory scale. Besides, few entomopathogenic species are able to produce conidia in submerged

como arroz o salvado de trigo. Pero la producción de hongos en sustratos sólidos dificulta la automatización del proceso y carece de una economía de escala satisfactoria. Además, pocas especies de entomopatógenos pueden producir conidios en cultivo sumergido. Esta dificultad puede ser parcialmente resuelta en cultivo bifásico, en el cual el o los cultivos sumergidos se usan para producir abundante micelio que luego se transfieren a un sustrato sólido para inducir la producción de conidios aéreos (Wraight *et al.*, 2001). La mayoría de los sistemas de producción industrial de hongos usan este tipo de cultivo de dos etapas. Específicamente, *B. bassiana* fue desarrollado en cultivo sólido (Kamp y Bidochka, 2002), cultivo líquido o sumergido (Leckie *et al.*, 2008) y en una variedad amplia de sustratos naturales (Rajanikanth, *et al.*, 2011). La investigación de las condiciones nutricionales de los hongos entomopatógenos es importante para mejorar la producción en masa y acelerar la comercialización de plaguicidas biológicos potenciales (Sun y Liu, 2006), así como la selección de cepas o aislados nativos e ingredientes industrializados de costo bajo en el mercado. También debe conocer la habilidad de aislados nativos de hongos entomopatógenos para producir propágulos en diferentes condiciones nutricionales. Cuatro aislados nativos de *B. bassiana* mostraron potencial para el control de *D. citri* (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2011). Por tanto el objetivo del presente estudio fue evaluar su producción de blastoesporas y conidios, en un medio de cultivo líquido con glucosa y casaminoácidos y en un medio de cultivo bifásico con grano de arroz como sustrato, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los aislados de *B. bassiana* fueron obtenidos de suelos de la región citrícola del municipio de Ahome, estado de Sinaloa, México, 10 msnm. El método para el aislamiento de los diferentes hongos entomopatógenos fue descrito por Galán-Franco *et al.* (2011). Los cultivos madre (i.e. stock) se depositaron en la colección del laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). Para su conservación se usaron viales criogénicos (Corning, N.Y., EE.UU.) con 1 mL de glicerol al 10 % v/v y almacenadas a -80°C . Los aislados nativos utilizados corresponden a las claves HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5 y la cepa con clave GHA de *B. bassiana*.

culture. This difficulty may be partially resolved in biphasic culture, where this or the submerged cultures are utilized to produce abundant mycelium, which afterwards is transferred to a solid substrate to induce aerial conidia production (Wraight *et al.*, 2001). Most of the industrial fungi production systems use this type of biphasic culture. Specifically, *B. bassiana* was developed in solid culture (Kamp and Bidochka, 2002), liquid or submerged culture (Leckie *et al.*, 2008), and in a wide variety of natural substrates (Rajanikanth *et al.*, 2011). Research on nutritional conditions of entomopathogenic fungi is important to improve mass production and to accelerate marketing of potential biologic pesticides (Sun and Liu, 2006), as well as selection of strains or native isolates, and low-cost industrialized ingredients on the market. Likewise, it must be fundamental to recognize the ability of native isolates of entomopathogenic fungi to produce propagules under different nutritional conditions. Four native isolates of *B. bassiana* demonstrated capacity for the control of *D. citri* (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2011). Therefore, the objective of the present study was assessing their production of blastospores and conidia in liquid culture medium with glucose and casamino acids and in biphasic culture medium with rice grain substrate, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The *B. bassiana* isolates were obtained from soils of the citrus-growing region of the Ahome municipality, State of Sinaloa, Mexico, 10 masl. The method for the isolation of the different entomopathogenic fungi was described by Galán-Franco *et al.* (2011). The stock cultures were deposited in the laboratory collection L6 of the Biotechnological Institute, Faculty of Biologic Science- Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). For their preservation cryogenic vials (Corning, N.Y., U.S.) with 1mL of glycerol at 10 % v/v were used, stored at -80°C . The native isolates correspond to keys HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5 and the strain with key GHA of *B. bassiana*.

Blastospore production in submerged culture

Medium composition

The components of the basal medium per liter were the following: KH_2PO_4 , 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

Producción de blastoesporas en cultivo sumergido

Composición del medio

Los componentes del medio basal por litro fueron los siguientes: KH_2PO_4 , 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 37 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg. Al medio basal se agregaron glucosa (Jalmek, San Nicolás de los Garza, N. L., México) 80 g L^{-1} y 25 g L^{-1} de casaminoácidos (BD, N. J., EE.UU.). La solución de glucosa fue esterilizada por separado antes de agregarse al medio basal (adaptado de Jackson *et al.*, 2003; Jackson y Payne, 2007).

Producción de blastoesporas

Todos los hongos fueron cultivados 14 a 21 d en agar papa dextrosa (DIBICO, México, D.F.) a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Después se prepararon suspensiones de 5×10^5 conidios mL^{-1} con agua destilada estéril para inocular el cultivo líquido (sumergido). Se usaron matraces bafleados (Pyrex, N.Y., EE.UU.) de 250 mL con 100 mL de medio, se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y 300 rpm en un incubador con agitación orbital (New Brunswick Scientific, N. J., EE.UU.) (adaptado de Jackson y Payne, 2007). Al final del crecimiento se determinó la concentración de blastoesporas y biomasa, y después del secado el porcentaje de viabilidad.

Mediciones de crecimiento

Durante el crecimiento de los hongos en medio líquido se contaron blastoesporas mL^{-1} (24, 48 y 72 h) y al final (72 h) se determinó el peso seco. La concentración de blastoesporas se definió usando una cámara de Neubauer (Fisher Scientific, Pittsburgh, EE.UU.) después de realizar diluciones (10^{-6} a 10^{-8}). Para medir la biomasa se determinó el peso seco, se tomó 1.0 mL de cultivo y se filtró a vacío a través de membranas de microfibras de vidrio con filtros de 110 mm de diámetro (GF/A; Whatman Inc., Clifton, N.J., EE.UU.) y se lavaron con 1.0 mL de agua destilada. Los filtros se secaron 24 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ y se pesaron. La concentración de blastoesporas se expresó en blastoesporas mL^{-1} , y la biomasa con base al peso seco en g L^{-1} .

Recuperación y formulación de blastoesporas

Las blastoesporas fueron recuperadas mediante secado por aire. Después de 72 h de incubación se cosecharon los cultivos de todos los experimentos o suspensiones de esporas, las blastoesporas fueron filtradas dos veces a través de una doble gasa para eliminar el exceso de micelio. Después el cultivo se separó en dos partes: la primera fue formulada con tierra de diatomeas 5 % (p/v) (Sigma Aldrich, San Luis MO, EE.UU.), y la segunda con Silica

0.3 g ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 37 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg. Glucose (80 g L^{-1}) (Jalmek, San Nicolás de los Garza, N. L., México) and 25 g L^{-1} of casamino acids (BD, N. J., U.S.A.) were added to the basal medium. The glucose solution was sterilized separately before being added to the basic medium (adapted by Jackson *et al.*, 2003; Jackson and Payne, 2007).

Blastospore production

All the fungi were cultivated 14 to 21 d, in potato dextrose agar (DIBICO, Mexico D.F.) at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, suspensions of 5×10^5 conidia mL^{-1} were prepared using sterile distilled water to inoculate the liquid (submerged) culture. Baffled Erlenmeyer flasks were utilized (Pyrex, N.Y., U.S.) of 250 mL, containing 100 mL of culture medium; they were incubated at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ and 300 rpm in an incubator with orbital agitation (New Brunswick Scientific, N.J., U.S.) (adapted by Jackson and Payne, 2007). At the end of growth, the concentration of blastospores and biomass, and after the drying process, the percentage of viability was determined.

Growth measurement

During the growing of the fungi in liquid culture medium blastospores mL^{-1} (24, 48, and 72 h) were counted, and at the end (72 h), dry weight was determined. The concentration of blastospores was defined using a Neubauer camera (Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.) after carrying out dilutions (10^{-6} to 10^{-8}). In order to measure biomass dry weight was determined; 1.0 mL of culture medium was filtered at vacuum through glass micro-fiber membranes with filters of 110 mm diameters (GF/A; Whatman Inc., Clifton, N.J., U.S.) and washed with 1.0 mL of distilled water. The filters were dried 24 h at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ and weighed. The concentration of blastospores was expressed in blastospores mL^{-1} , and biomass based on dry weight in g L^{-1} .

Recuperation and formulation of blastospores

The blastospores were recovered by the method of air-drying. After 72 h of incubation the cultures of all the experiments or spore suspensions were recollected, the blastospores were filtered twice through double gauze in order to eliminate the excess of mycelium. Subsequently the culture was divided in two parts: the first was formulated with 5 % diatomaceous earth w/v (Sigma Aldrich, San Luis MO, U.S.) and the second one with 5 % (w/v) Silica (silicon oxide 99 % pure; Materias Primas Monterrey, Monterrey, México); both suspensions were vacuum-filtered through a Buchner funnel, using Whatman filter paper No.1. The obtained filtrates were dried 24 h at environmental temperature ($25\text{-}28 \text{ }^\circ\text{C}$), placed in plastic bags and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

5 % (p/v) (óxido de silicio 99 % puro; Materias Primas Monterrey, Monterrey, México); ambas suspensiones se filtraron a vacío a través de un embudo Buchner usando papel filtro Whatman No. 1. Los filtrados obtenidos se secaron 24 h a temperatura ambiente (25-28 °C), se colocaron en bolsas de plástico y almacenaron a 4 °C.

Estudios de sobrevivencia

La viabilidad de las formulaciones de blastosporas de *B. bassiana* se determinó por secado con aire. De cada bolsa se tomaron 50 mg de blastosporas secas y se adicionaron a 50 mL de caldo papa dextrosa (Bioxon, N. J., EE.UU.) en un matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL de capacidad. Después de 6 h de incubación a 28 °C y 300 rpm en un incubador con agitación orbital (New Brunswick Scientific, N. J., EE.UU.), se contaron 100 blastosporas microscópicamente para evaluar el tubo germinativo. El criterio para tomar en cuenta una espора viable es cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espора (Goettel e Inglis 1997). La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación.

Producción de conidios en sustrato sólido

Preparación del precultivo

Todos los aislados de *B. bassiana* fueron cultivados en agar papa dextrosa (DIBICO, México, D.F.) entre 14 y 21 d a 25 ± 2 °C. Después se prepararon suspensiones de 5×10^6 conidios mL⁻¹ con agua destilada estéril para inocular 1000 µL en matraces Erlenmeyer bafleados (Pyrex, N.Y., EE.UU.) de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud (Bioxon, N. J., EE.UU.). Se incubaron por 72 h, a 28 °C y 300 rpm en un incubador con agitación orbital (New Brunswick Scientific) (adaptado de Jackson y Payne, 2007).

Preparación e inoculación del sustrato

Se utilizaron bolsas de polietileno de alta densidad (HDPE) con capacidad de 1 kg. En cada bolsa se colocaron 50 g de arroz (*Oryza sativa* L.) y 60 % de agua bidestilada, se esterilizaron a 121 °C, 15 PSI por 15 min. Todas las bolsas se inocularon con 1000 µL de cada una de las suspensiones del precultivo tratando de esparcirlas de manera uniforme sobre el sustrato y al terminar fueron selladas herméticamente. Posteriormente se incubaron 14 d a temperatura ambiente (25-28 °C) y se expusieron a la luz blanca de las lámparas del laboratorio (12:12 h 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

Studies of survival

Viability of *B. bassiana* blastospore formulations was determined by air-drying. From every bag, 50 mg of dry blastospores were added to 50 mL potato dextrose broth (Bioxon, N.J., U.S.) on baffled Erlenmeyer flasks of 250 mL capacity. After 6 h of incubation at 28 °C and 300 rpm in an incubator with orbital agitation (New Brunswick Scientific, N.J., U.S.), 100 blastospores were microscopically counted in order to assess the germinative tube. The criterion for taking into account a viable spore is when a germinative tube is formed half as long as the spore diameter (Goettel and Inglis, 1997). Viability was expressed as percentage of germination.

Conidia production in solid substrate

Preparation of the pre-culture

All isolates of *B. bassiana* were cultivated in dextrose potato agar (DIBICO, Mexico, D.F.) between 14 and 21 d, at 25 ± 2 °C. Subsequently, suspensions of 5×10^6 conidia mL⁻¹ were prepared with sterile distilled water, in order to inoculate 1000 µL on baffled Erlenmeyer flasks (Pyrex, N.Y., U.S.) of 250 mL, containing 100 mL of Sabouraud dextrose broth (Bioxon, N.J., U.S.). They were incubated for 72 h, at 28 °C and 300 rpm in an orbital agitation incubator (New Brunswick Scientific) (adapted by Jackson and Payne, 2007).

Preparation and inoculation of the substrate

High density polyethylene bags (HDPE) of 1 kg capacity were utilized. Fifty grains of rice (*Oryza sativa* L.) and 60 % of bi-distilled water were filled in each bag and sterilized at 121 °C, 15 PSI for 15 min. All bags were inoculated with 1000 µL of each of pre-culture suspensions, trying to spread them evenly on the substrate, and at finishing they were hermetically sealed. Later on they were incubated for 14 d at environmental temperature (25-28 °C) and exposed to white light of the laboratory lamps (12:12 h L:D). The bags were agitated every 3 d to scatter the spores homogeneously on the substrate. At the end of the growth time the conidia concentration and viability percentage were determined (adapted by Sandoval-Coronado *et al.*, 2010).

Measuring of substrate productivity

At 14 d of incubation conidia concentration was determined per gram of rice of each of the bags. Dilutions 10^{-6} to 10^{-9} were carried out in a Tween 80 solution (Sigma Aldrich, San Luis MO, U.S.) at 0.1 % (v/v), and the conidia were quantified using a Neubauer camera (Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.).

porcentaje de viabilidad (adaptado de Sandoval-Coronado *et al.*, 2010).

Medición de la productividad del sustrato

A los 14 d de incubación se determinó la concentración de conidios por gramo de arroz de cada bolsa. Se realizaron diluciones 10^{-6} a 10^{-9} en una solución Tween 80 (Sigma Aldrich, San Luis MO, EE.UU.) al 0.1 % (v/v) y se contaron los conidios usando una cámara de Neubauer (Fisher Scientific, Pittsburgh, EE.UU.).

Viabilidad de las esporas

Se adicionó 1 g de arroz a 50 mL de caldo papa dextrosa (Bioxon, N. J., EE. UU.). Este cultivo se mantuvo en agitación rotatoria 6 h a 300 rpm a 25 ± 2 °C. Después de la incubación se tomaron muestras directas de los cultivos y se contaron 100 esporas (germinadas y no germinadas), para cuantificar la proporción de esporas viables según el criterio de la longitud del tubo germinativo. La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores promedios más la desviación estándar (DE). 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 parámetro se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para las medias. Los datos fueron analizados con el programa IBM SPSS® v.19 Inc., Nueva York, EE.UU. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en dos ocasiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de blastoesporas

La producción de blastoesporas en medio líquido aumentó exponencialmente y a las 24 y 72 h la producción mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los hongos. A las 24 h de incubación el aislado HIB-3 mostró la menor producción de blastoesporas, mientras que el HIB-4 presentó el índice más elevado. A las 72 h se detuvo la fermentación y al final de la misma la cepa GHA presentó la producción mayor de blastoesporas (Cuadro 1).

Spore viability

One gram of rice was added to 50 mL of potato dextrose broth (Bioxon, N.J., U.S.). This culture medium was kept in rotary agitation during 6 h at 300 rpm, at 25 ± 2 °C. After incubation, direct samples of 100 germinated and ungerminated spores were taken from the cultures and the proportion of viable spores quantified, following the criterion of length of the germinative tube. Viability was expressed in germination percentage.

Statistical analysis

The results were expressed as mean values with the standard deviation (DE). Data normality was verified by the Kolmogorov-Smirnov test, previously converting the results to their logarithm (\log_{10}) in order to introduce them to the statistical program; in case of complying with this parameter an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test ($p \leq 0.05$) were conducted for the media. The data were analyzed by means of the IBM SPSS® program v.19 Inc. New York, U.S. The experiments were carried out in triplicate and repeated at least on two occasions.

RESULTS AND DISCUSSION

Blastospore production

Blastospore production in liquid medium grew exponentially; at 24 and 72 h it showed significant differences ($p \leq 0.05$) among the fungi. At 24 h of incubation, isolate HIB-3 had the lowest blastospore production, whereas HIB-4 presented the highest rate. At 72 h the fermentation stopped and at its end GHA strain showed the highest blastospore production (Table 1).

Dry biomass

Biomass production in liquid medium had significant differences ($p \leq 0.05$) among *B. bassiana* isolates at 72 h. The GHA strain showed the largest production (26 gL^{-1}) and isolate HIB-4 only 7 gL^{-1} . The isolates HIB-2 (15.3 gL^{-1}), HIB-3 (13.3 gL^{-1}), and HIB-5 (18.4 gL^{-1}) were not different ($p > 0.05$) (Figure 1).

Blastospore survival

Viability of blastospores, recovered on inert supports, showed significant differences ($p \leq 0.05$)

Biomasa seca

La producción de biomasa en medio líquido a las 72 h mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los aislados de *B. bassiana*. La cepa GHA mostró la mayor producción (26 g L^{-1}) y el aislado HIB-4 tuvo sólo 7 g L^{-1} . Los aislados HIB-2 (15.3 g L^{-1}), HIB-3 (13.3 g L^{-1}) y HIB-5 (18.4 g L^{-1}) no fueron diferentes ($p > 0.05$) (Figura 1).

Sobrevivencia de las blastoesporas

La viabilidad de las blastoesporas recuperadas en los soportes inertes mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los hongos. El aislado HIB-2 presentó el porcentaje de germinación mayor (56 %) y la cepa GHA sólo alcanzó 23 % de germinación en la tierra de diatomeas, mientras que para la Silica el mayor índice de germinación fue para la cepa GHA (39 %) y el menor para el aislado HIB-5 (19 %) (Figura 2).

Las fermentaciones para la producción de blastoesporas pueden proveer ciertas ventajas con respecto a los medios de cultivo sólidos. Samson *et al.* (1988) describen las fermentaciones líquidas como rápidas y sin problemas de contaminación, y una de sus ventajas radica en poder controlar los parámetros durante el proceso. Hay estudios de fermentaciones para mejorar la producción de conidios o blastoesporas

Cuadro 1. Blastoesporas obtenidas en cultivo líquido de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos de incubación.

Table 1. Blastospores obtained in liquid culture medium of *Beauveria bassiana* at different times of incubation.

Clave	Blastoesporas $\text{mL}^{-1} \dagger$		
	24 h	48 h	72 h
HIB-2	1.28×10^5 ab	8.30×10^6	2.18×10^8 b
HIB-3	7.10×10^4 a	8.30×10^6	1.71×10^8 ab
HIB-4	3.00×10^5 b	7.77×10^6	5.25×10^7 a
HIB-5	1.42×10^5 ab	6.69×10^6	1.54×10^8 ab
GHA	1.42×10^5 a	5.90×10^6	2.20×10^8 b
Media \pm DE	$1.14 \times 10^5 \pm .29$	$7.30 \times 10^6 \pm .06$	$1.45 \times 10^8 \pm .25$

Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Treatments with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

† Medio de cultivo basado en glucosa y casaminoácidos, incubado a 300 rpm y 28 °C ♦ Culture medium based on glucose and casamino acids, incubated at 300 rpm and 28 °C.

among the fungi. The highest germination percentage (56 %) was recorded for isolate HIB-2 and strain GHA only reached 23% of germination in diatom earth; in silicate, the highest germination rate was for strain GHA (39 %) and the lowest one for isolate HIB-5 (19 %) (Figure 2).

The fermentation for blastospore production may provide certain advantages with respect to solid culture media. Samson *et al.* (1988) describe the liquid fermentations as rapid and without contamination problems, one of their advantages being the ability to control the parameters during the process. There are studies on fermentations to improve conidia and blastospore production of different entomopathogenic fungi which vary the carbon and nitrogen content in culture media, being the two principal nutritional requirements in sporulation development (Jackson *et al.*, 2003).

In the present study blastospore production of native isolates and a strain of *B. bassiana* were assessed in liquid culture medium, which is mainly used for producing spores of *P. fumosoroseus* (Jackson and Payne, 2007). The results at 72 h had yields similar to those reported for *P. fumosoroseus*, but *B. bassiana* seems to prefer nitrogen sources other than the casamino acids. Thus, strain GHA produces up to 5.1×10^9 blastospores mL^{-1} in a medium with 40 g L^{-1} of glucose and 6 g L^{-1} of collagen peptone at 120 h of

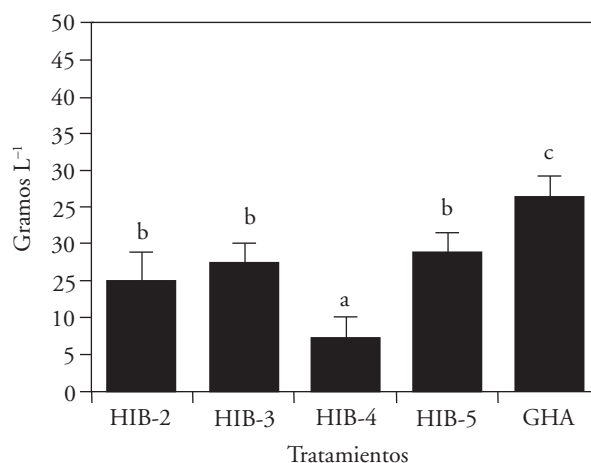


Figura 1. Biomasa seca de *Beauveria bassiana*. Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Dry biomass of *Beauveria bassiana*. Treatments with different letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

de diferentes hongos entomopatógenos, los cuales varían el contenido de carbono y nitrógeno en los medios de cultivo, por ser los dos requerimientos nutricionales principales en el desarrollo de la esporulación (Jackson *et al.*, 2003).

En el presente estudio se evaluó la producción de blastoesporas de aislados nativos y una cepa de *B. bassiana* en un medio de cultivo líquido que se utiliza principalmente para producir esporas de *P. fumosoroseus* (Jackson y Payne, 2007). Los resultados a las 72 h mostraron rendimientos similares a los reportados para *P. fumosoroseus*, pero *B. bassiana* parece preferir fuentes de nitrógeno distintas a los casaminoácidos. Así, la cepa GHA produce hasta 5.1×10^9 blastoesporas mL^{-1} en un medio con 40 g L^{-1} de glucosa y 6 g L^{-1} de peptona de colágena a las 120 h de incubación, mientras que a las 72 h con 80 g L^{-1} de glucosa y 12 g L^{-1} de peptona de colágena la producción es 8.90×10^8 blastoesporas mL^{-1} (Sandoval Coronado *et al.*, 2010). Además de los factores nutricionales, la producción de blastoesporas puede ser afectada por el sistema de agitación usando para su producción, como lo reportan Villalba *et al.* (2010). Ellos evaluaron la producción de blastoesporas de un cepa de *B. bassiana* mediante agitación orbital, lineal y mecánica, y esta última mostró una concentración 20 veces superior a la de los otros sistemas de agitación. En el presente estudio se usó un agitador orbital lo cual pudo influir en la producción de blastoesporas obtenida ya que este tipo de agitación permite el crecimiento del hongo con la elongación polar y bipolar del micelio en mayor proporción, respecto a la división de las blastoesporas que es menor debido al movimiento dirigido en un solo sentido, el cual no permite un intercambio gaseoso adecuado. Por tanto, no se espera encontrar una mayor masa de cuerpos hifales o blastoesporas bajo este sistema, porque no hay una fuerza con suficiente capacidad para separar estas células del micelio y generar un nuevo ciclo de crecimiento vegetativo para el hongo.

Eyal *et al.* (1994) reportan que la formulación de medios de cultivo con fuentes complejas de nitrógeno como líquido de remojo de maíz y de carbono como melazas favorecen primordialmente la producción de micelio, mientras que el uso de monosacáridos como la glucosa favorece la formación de blastoesporas. Lo anterior se debe a que las fuentes de nitrógeno orgánico favorecen el crecimiento hifal porque en esta etapa del desarrollo del microorganismo la reserva

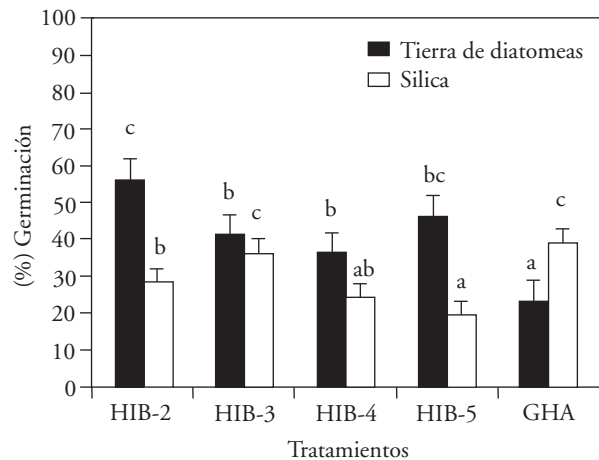


Figura 2. Sobrevivencia de blastoesporas de *B. bassiana* formuladas con dos soportes inertes. Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Survival of *B. bassiana* blastospores formulated with two inert supports. Treatments with different letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

incubation, whereas at 72 h with 80 g L^{-1} of glucose and 12 g L^{-1} of collagen peptone the production is 8.90×10^8 blastospores mL^{-1} (Sandoval-Coronado *et al.*, 2010). Besides the nutritional factors, blastospore production may be affected by the agitation system utilized for its production, as Villalba *et al.* (2010) report. They evaluated the production of blastospores from a *B. bassiana* strain by means of orbital, linear, and mechanical agitation; the latter showed a concentration 20 times superior to that of the other agitation systems. In the present study the use of an orbital agitator may have influenced the blastospore production, since this type of agitation allows for the fungus mycelium growth in major proportion with polar and bipolar elongation, as compared to blastospore division, which is lesser due to the movement in one single direction and not permitting adequate gas interchange. Therefore, we do not expect to find a greater amount of hyphal bodies or blastospores under this system, because there is not sufficient capacity to separate these mycelium cells generating a new vegetative growth cycle for the fungus.

Eyal *et al.* (1994) report that the formulation of culture media with complex nitrogen sources such as soaking liquid of maize and carbon like molasses, primarily, favor mycelium production, whereas

endógena de nitrógeno se ha agotado ya que se usa para sintetizar proteínas *de novo* durante los eventos iniciales de la germinación (Smith y Grula, 1981).

Una clave para la recuperación de las blastoesporas es la elección de una técnica de secado adecuada. Numerosos materiales inertes y orgánicos se usan como agentes para estabilizar diferentes propágulos de hongos (Jackson *et al.*, 1997). Los resultados del presente estudio muestran que el soporte usado para el secado afectó la sobrevivencia de las blastoesporas. Sandoval-Coronado *et al.* (2001) reportan una viabilidad de 69.6 % en un medio con casaminoácidos y 21.9 % en un medio con peptona de colágena como fuente de nitrógeno para blastoesporas de *P. fumosoroseus* con tierra de diatomeas al 5 %, y concluyen que el medio de producción y el soporte usado durante el secado pueden afectar la tolerancia a la desecación y estabilidad en el almacenamiento de las blastoesporas. Por tanto, el medio de producción debe proporcionar un ambiente nutritivo que maximice la producción de blastoesporas capaces de resistir la desecación, mientras que los soportes deben proveer una matriz que proteja a las blastoesporas de las condiciones de almacenamiento. Esto coincide con el informe de Jackson (1999) de que la fuente de nitrógeno presente en el medio puede impactar en la tolerancia a la desecación de las blastoesporas.

Producción de conidios en sustrato sólido

La producción de conidios en grano de arroz (*Oryza sativa* L.) fue 10^8 a 10^9 conidios g^{-1} y hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los hongos evaluados. El valor mínimo de 2.35×10^8 conidios g^{-1} se registró para la cepa GHA y el máximo de 1.82×10^9 conidios g^{-1} para el aislado HIB-4; los aislados HIB-2, HIB-3 e HIB-5 presentaron una producción de 1.22×10^9 , 3.90×10^8 y 8.90×10^8 conidios g^{-1} (Figura 3). Los valores de germinación en promedio fueron superiores al 90 % a las cuatro semanas de almacenamiento (Cuadro 2).

El arroz es el sustrato más usado para la producción masiva de hongos entomopatógenos 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. En algunos hongos como *Lecanicillium lecanii*, la cantidad de conidios puede disminuir debido

the use of monosaccharides, like glucose stimulate blastospore formation. The aforementioned is due to the fact that the sources of organic nitrogen favor hyphal growth, because at this stage of microorganism development, the endogenous nitrogen reserve are exhausted since it is used for synthesizing proteins *de novo* during the initial events of germination (Smith and Grula, 1981).

A key to recover blastospores is the election of an adequate drying technique. Numerous inactive and organic materials are utilized as agents to stabilize different fungi propagules (Jackson *et al.*, 1997). The results of the present study show that the support used for drying affected blastospore survival. Sandoval-Coronado *et al.* (2001) report viability of 69.6 % in a medium with casamino acids and 21.9 % in medium with collagen peptone as nitrogen source for *P. fumosoroseus* blastospores with diatom earth at 5 %, and they conclude that the production medium and the support used during drying might affect the drying-tolerance and stability in blastospore storage. Therefore, the production medium must provide nutritious environment maximizing blastospore production, capable of resisting desiccation, while the supports must provide a matrix that may protect the blastospores from storage conditions. This agrees with the reference given by Jackson (1999), where the nitrogen source present in the medium may impact on blastospore drying-tolerance.

Conidia production in solid substrate

Conidia production on rice grain (*Oryza sativa* L.) was 10^8 - 10^9 conidia g^{-1} , and there were significant differences ($p \leq 0.05$) among the assessed fungi. The minimum value of 2.35×10^8 conidia g^{-1} was registered for strain GHA, and the maximum of 1.82×10^9 conidia g^{-1} for isolate HIB-4; the isolates HIB-2, HIB-3, and HIB-5 had an average production of 1.22×10^9 , 3.90×10^8 , 8.90×10^8 conidia g^{-1} (Figure 3). The germination values on average were higher than 90 % at 4 weeks of storage (Table 2).

Rice is the most used substrate for mass production of entomopathogenic fungi, maintaining physical conditions with an adequate surface, efficient for mycelial growth, adequate nutritional balance, and specific conditions according to the requirements of isolation with respect to aeration and moisture. In some fungi, like *Lecanicillium lecanii*, the amount of

a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz, lo que evita aireación interna y reducción de la producción conidial (Cortez-Madrigal, 2007). Esto pudo ocurrir con *B. bassiana*, ya que el grano de arroz presentó dificultades por su tendencia a permanecer apelmazado después del proceso de esterilización. Es probable que este sustrato requiera un menor tiempo de hidratación, aunque los rendimientos obtenidos coinciden con los reportados por Posada-Flórez (2008) de valores menores a 1×10^{10} conidios g^{-1} arroz para *B. bassiana* en un medio de cultivo bifásico, con una germinación promedio de 24 y 48 h del 80 y 75 % en periodos de 15, 25, 35 y 45 d.

El rendimiento de la esporulación sobre un sustrato puede ser influenciado por factores como la técnica de cultivo, concentración del inóculo inicial, condiciones de temperatura, humedad, aireación, y tiempo de incubación (Figuroa *et al.*, 2007). Incluso la elección del sustrato es un factor crítico ya que hay marcadas diferencias principalmente de origen nutricional, y dependerá de factores de acuerdo a cada caso. Para considerar un sustrato como idóneo para la producción de conidios de una cepa o aislado de un entomopatógeno debe tener una alta productividad y rendimiento, lo cual depende de un contenido

conidia may diminish, due to the strong compaction the fungus exerts on rice, which avoids internal aeration and may reduce conidial production (Cortez-Madrigal, 2007). This may have caused difficulties with *B. bassiana*, since the rice grains tend to stick together after the sterilization process. Probably, this substrate requires less hydration time, although the yields obtained agree with those reported by Posada-Flórez (2008), of values lower than 1×10^{10} conidia g^{-1} rice for *B. bassiana* in biphasic culture medium with mean germination of 24 and 48 h out of 80 and 75 %, in periods of 15, 25, 35 and 45 d.

Sporulation yield on a substrate may be influenced by factors, such as culture technology, concentration of the initial inoculum, conditions of temperature, moisture, aeration, and time of incubation (Figuroa *et al.*, 2007). Even the choice of the substrate is a critical factor, since there are marked differences, mainly of nutritional origin, and it will depend on factors according to each case. Considering a substrate as suitable for conidia production of a strain or an isolate of an entomopathogen, it must have high productivity and yield, depending on high contents of carbohydrates, nitrogen, microelements, B-complex vitamins, and high concentration of ions, needed for sporulation development and pathogenicity conservation of entomopathogenic fungi (Volcy and Pardo, 1994). The above-said would

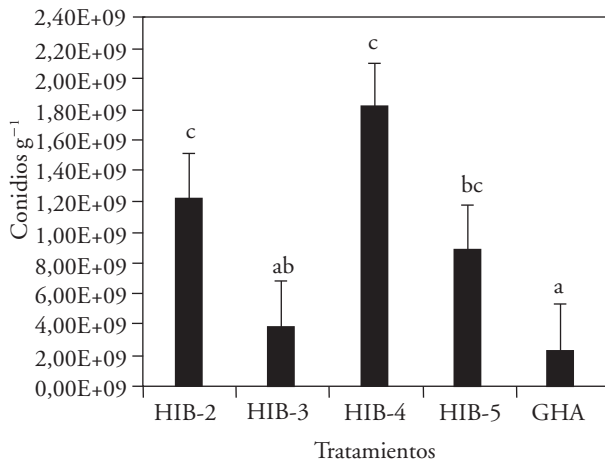


Figura 3. Conidios obtenidos en grano de arroz (*Oryza sativa* L.) de *B. bassiana* a los 14 d de incubación bajo condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C). Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Conidia of *B. bassiana* obtained on rice grain (*Oryza sativa* L.) at 14 d of incubation under laboratory conditions (25 ± 2 °C). The treatments with different letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Estabilidad de conidios de *B. bassiana* almacenados a 4 ± 2 °C durante cuatro semanas.

Table 2. Stability of *B. bassiana* conidia stored at 4 ± 2 °C during four weeks.

Claves	Germinación (%)				
	Día 0 [†]	Semana			
	1	2	3	4	
HIB-2	100	100	100	97	97
HIB-3	100	100	98	90	85
HIB-4	100	100	100	100	98
HIB-5	100	100	100	98	95
GHA	100	100	100	100	97
Media ± DE	100	100	99.6 ± .81	97 ± 3.76	94.4 ± 4.9

Conidios producidos en bolsas de arroz como sustrato sólido a 28 °C ♦ Conidia produced in bags of rice as solid substrate at 28 °C.

[†] Corresponde a la sobrevivencia de los conidios a los 14 d de incubación bajo condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C) ♦ Corresponds to conidia survival at 14 d of incubation under laboratory conditions (25 ± 2 °C).

alto de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas del complejo B y una concentración alta de iones necesarios para el crecimiento, esporulación y conservación de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos (Volcy y Pardo, 1994). Lo anterior impactaría directamente en su uso potencial como fuentes de inóculo para controlar plagas de importancia agrícola.

CONCLUSIONES

Los análisis a los entomopatógenos utilizados en el presente estudio mostraron que la biomasa recuperada estuvo acorde a la concentración de blastoesporas, mientras que en la formulación, recuperación y germinación hubo diferencias entre los hongos evaluados. Respecto a la producción y viabilidad de conidios en el medio bifásico, estos resultados fueron superiores a los obtenidos para las blastoesporas en el medio líquido. Este estudio contribuye a comprender algunos aspectos esenciales para seleccionar un método de cultivo, así como los requerimientos nutricionales para la producción de conidios y blastoesporas de aislados nativos de *B. bassiana* con potencial para manejar plagas con importancia agrícola.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a F. L. Gandarilla Pacheco (Reg. No. 266825) y a los proyectos PAICYT CN 1008-11 y PROMEP /103.5/09/1306. P/CA: UANL-CA- 11. Los autores agradecen la ayuda en aspectos técnicos a K.C. Jiménez y L. E. Araujo.

LITERATURA CITADA

Cortez-Madrigal, H. 2007. Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agric. Téc. Méx.* 33: 83-87.

de Faria, M. R., and S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43: 237-256.

Derakhshan, A., R. J. Rabindra, B. Ramanujam, and M. Rahimi. 2008. Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Pak. J. Biol. Sci.* 11: 1506-1509.

Eyal, J., J. F. Walter, L. Osborn, and Z. Landa. 1994. Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. U.S. Patent # 5,360,607.

directly impact on their potential use as inoculum sources for pest control of agricultural importance.

CONCLUSIONS

The analyses on entomopathogens utilized in the present study showed that the recovered biomass was according to the observed blastospore concentration, whereas in formulation, recovering, and germination there were differences among the assessed fungi. With respect to production and viability of conidia in biphasic medium, these results were higher than those obtained for blastospores in liquid medium. This study contributes to comprehending some fundamental aspects for selecting a culture method as well as the nutritional requirements for the production of conidia and blastospores of native isolates of *B. bassiana* with potential for pest management of agricultural importance.

—End of the English version—



Feng, M. T., G. Poprawski, and G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Techn.* 4:3-34.

Figuerola, L. M., A. Varela, y D. Corredor. 2007. Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycota: Hyphomycetes). *Revista de Investigación* 7: 127-131.

Galán- Franco, L. A., A. Morales-Loredo, G. Álvarez-Ojeda, J. I. López-Arroyo, K. Arévalo-Niño, C. Sandoval-Coronado, and I. Quintero-Zapata. 2011. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of México. *Southwest. Entomol.* 36:443-449.

Gandarilla-Pacheco F. L., J. I. López-Arroyo, I. Quintero-Zapata, R. Rodríguez-Guerra, y C. F. Sandoval-Coronado. 2011. Bioensayos para la evaluación de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *In: Elías-Santos M., K. Arévalo-Niño, I. Quintero-Zapata, C. Solís-Rojas, C. F. Sandoval-Coronado, H. A. Luna-Olvera, B. Pereyra-Alfárez, L. H. Morales-Ramos, y M. G. Maldonado- Blanco* (eds). *Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico*. Monterrey, N. L., México, UANL, FCB-IB. pp: 135-140.

Goettel, M. S., and G. D. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In: Lacey L.A.* (ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 213-249.

Jackson, M. A. 1999. Method for producing dessication tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. U.S. Patent #5, 968,808.

- Jackson, M. A., M. R. Mc Guire, L. A. Lacey, and S. P. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101: 35-41.
- Jackson, M. A., S. Cliquet, and L. B. Iten. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci. Techn.* 13: 23-33.
- Jackson, M. A., and A. R. Payne. 2007. Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocontrol Sci. Techn.* 17: 709-719.
- Kamp, A. M., and M. J. Bidochka. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 74-77.
- Leckie, B. M., B. H. Ownley, R. M. Pereira, W. E. Klingeman, C. J. Jones, and K. D. Gwinn. 2008. Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Sci. Techn.* 18: 697-710.
- López-Arroyo, J. I., J. Loera Gallardo, M. A. Miranda Salcedo, M. A. Reyes Rosas, y M. A. Rocha Peña. 2004. Manejo integrado de plagas de cítricos. *In: Memorias del Simposio Internacional Manejo Fitosanitario del Cultivo de los Cítricos*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Veracruz, Ver. México.
- Posada-Flórez, F. J. 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.
- Rajanikanth, P., G. V. Subbaratnam, and S. J. Rahaman. 2011. Evaluation of pathogenicity to *Spodoptera litura* Fabricius of different *Beauveria bassiana* Vuillemin isolates mass multiplied on economically viable substrates. *Int. J. Bio-resource Stress Manage.* 2: 293-297.
- Rodríguez del Bosque L. A., y H. C. Arredondo Bernal. 2007. Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México, D.F. 303 p.
- Samson, R., H. Evans, and J. Latgé. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 300 p.
- Sandoval-Coronado, C. F., I. Quintero-Zapata, M. G. Maldonado-Blanco, M. Elías-Santos, y L. J. Galán-Wong. 2010. Producción de blastoesporas de *Beauveria bassiana* en un medio de cultivo líquido a base de glucosa y peptona de colágena. *In: Coria-Ávalos V. M., M. B. N. Lara-Chávez, G. Orozco-Gutiérrez, H. J. Muñoz-Flores, y R. Sánchez-Martínez (eds). Memoria XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico*. Michoacán, México, INIFAP-CIRPAC. pp: 416-419.
- Sandoval-Coronado, C. F., H. A. Luna-Olvera, K. Arévalo-Niño, M. A. Jackson, T. J. Poprawski, and L. Galán-Wong. 2001. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. *World J. Microb. Biot.* 17: 423-428.
- Smith, R., and J. Grula. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 222-230.
- Sun, M. H., and X. Z. Liu. 2006. Carbon requirements of some nematophagous entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia* 161: 295-305.
- Villalba, P. L., H. Grillo-Ravelo, y R. Cupull. 2010. Evaluación de tres sistemas de agitación para la producción de blastospores del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Centro Agrícola.* 37: 17-21.
- Volcy C., y V. Pardo. 1994. Principios de Micología. Décimo novena edición. Centro de publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. 141 p.
- Wraight, S., M. Jackson, and S. Kock. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *In: Butt, T. M., C. Jackson, and N. Magan (eds). Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial*. CABI Publishing Series. Wallingford, U.K. pp: 253-280.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Techn.* 17: 553-596.