



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

“Aislamiento e Identificación de Hongos Entomopatógenos Nativos de la Zona Agrícola del Valle del Yaqui”

TESIS QUE PRESENTA:

Karla Susana Ramírez Armendáriz

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA BIOTECNÓLOGA

DIRECTORA DE TESIS: **Dra. Ma. Mayra de la Torre Martínez**

Cd. Obregón, Sonora

Junio 2006

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., bajo la dirección de la Dra. Ma. Mayra de la Torre Martínez.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis conté con el apoyo de una beca bajo el financiamiento del proyecto SAGARPA-2004-C01-5 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). “Biotecnología para la producción masiva de entomopatógenos nativos de zonas áridas para el control de plagas agrícolas”.

Este trabajo está dedicado a mis padres Susana Armendáriz Gómez y Jaime Ramírez Salcido y a mi hermano Jaime Ramírez Armendáriz por ser la razón de mi esfuerzo y por ayudarme a descubrir quien soy, gracias a ustedes hoy me encuentro terminando una de las etapas mas importantes de mi vida, los amo.

Karla.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la oportunidad de vivir la vida que e llevado hasta ahora.

A mi directora de tesis Dra. Ma. Mayra de la Torre Martínez, por la formación, la paciencia y el apoyo que me brindó.

Al Dr. Ali Asaff Torres, por sus consejos, su apoyo y por los agradables momentos dentro y fuera del laboratorio.

Al Ingeniero Carlos Andrés Iriarte, por apoyo incondicional que me brindó durante la realización de este trabajo.

A mis abuelos Aurelia Gómez (†), Felipe Armendáriz, Amalia Salcido (†) y Jesús María Ramírez (†), por darme los maravillosos padres que tengo.

A mis padres, Jaime Ramírez Salcido y Susana Armendáriz Gómez, por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Les estaré eternamente agradecida, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Jaime Ramírez Armendáriz, por ser mi confidente y el mejor amigo que he tenido, gracias por todo lo bueno y lo malo “chapo”.

A mis tías Elvia, Lidia, Juany, Mery, Cecy, Lorena, gracias por el cariño, por los buenos consejos y sobretodo por ser quienes son, cada una de ustedes ha

marcado mi vida de una manera distinta, muchas gracias por ser parte de mi familia.

A mi compadre Omar Tadeo Torres Armendáriz, por su gran apoyo durante mi estancia en Hermosillo.

A la familia Gamboa Ramírez, por abrirme las puertas de su casa y recibirme como un miembro más de su familia.

A mis compañeros y amigos de CIAD A.C., Ángel Aceves e Ismael Amaya, por las risas y las alegrías compartidas.

A mis “comadres”, Yolanda Reyes Vidal e Ixchel Miranda de la Torre, por darme su amistad incondicional y apoyarme en las buenas, en las malas y en las peores, ustedes se han convertido en una de esas pocas personas que dejan huella en mi corazón, muchas gracias.

A mis grandes amigas, Cecilia Chinchillas, Carolina Fuentes, Arianna Tapia y Erika Acosta, mil gracias por aceptarme como soy, por su gran apoyo durante el tiempo que llevo de conocerlas, gracias por todos esos maravillosos momentos que hemos pasamos juntas, siempre estarán en mi corazón, las quiero mucho “mantas”.

A mis compañeros de generación, Juan Villegas, Irazema Fuentes, Erika Borbón, Luis Peinado, Rubén Rodríguez, Elsa Sámano, Oscar Atahualpa, “Zhippo”, Armando López, Kitzia López, Carolina Bueno, Tadeo Lee, Edealberto Arévalo, por todos esos agradables momentos que vivimos dentro y fuera de la escuela.

A mis profesores Fco. Javier Cervantes y Ernesto García (†) por ser las personas que mas influyeron en mi formación académica durante mi estancia en el ITSON.

RESUMEN

El Valle del Yaqui ha sido ampliamente reconocido por su gran capacidad de producción y por la calidad de sus cultivos; sin embargo, con el paso del tiempo este se ha visto afectado por el ataque de múltiples plagas, principalmente plagas de insectos chupadores lo que ha llevado a los productores al abuso de plaguicidas químicos sintéticos. Lo anterior ha traído como consecuencia daños al ambiente y a la salud de la población. Para reducir estos daños se promueve el Manejo Integrado de Plagas (MIP) el cuál consiste en la implementación de sistemas de control tanto físicos, como culturales y biológicos que sean complementarios entre si. Particularmente el control biológico ha resultado ser el de mayor impacto dentro del MIP ya que cuenta con varios agentes de control dentro de los cuales los hongos entomopatógenos (EPF) destacan por ser los de mayor uso en contra de insectos chupadores. Sin embargo, los EPF requieren de condiciones ambientales favorables para su crecimiento (temperaturas moderadas y alta humedad relativa), por lo que este trabajo se enfocó al aislamiento de EPF nativos de la región ya que estos están adaptados a las condiciones medioambientales de la zona. Se lograron 189 aislamientos, los cuales fueron agrupados en 20 cepas distintas en base a su morfología colonial. Los aislados fueron sometidos a pruebas de patogenicidad preliminares y solamente 5 resultaron como entomopatógenos potenciales. Estas 5 cepas fueron sometidas nuevamente a pruebas de patogenicidad para confirmar su carácter entomopatógeno y solamente una de ellas resultó ser entomopatógena. Esta cepa fue identificada mediante microcultivo como perteneciente al género *Paecilomyces*, conociendo esto la cepa aislada fue sometida a la par con otras dos cepas pertenecientes a este género a pruebas para determinar su velocidad de crecimiento radial a distintas temperaturas. Se encontró que en el rango de

temperaturas de 27 a 30°C no había diferencia significativa en las velocidades de crecimiento de las cepas; sin embargo la velocidad de crecimiento comenzó a verse afectada a una temperatura de 32°C. Con estos resultados se establece que la cepa aislada del Valle del Yaqui es entomopatógena, porque además de dar resultados positivos en los bioensayos de patogenicidad los insectos muertos presentaron síntomas de micosis y se logró reaislar el hongo de ellos, por otra parte se concluye que no existe diferencia en las velocidades de crecimiento de las cepas estudiadas en el rango de temperaturas de 27 a 32°C.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Objetivo General	3
1.3.1 Objetivos Específicos	3
1.4 Hipótesis	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Plaguicidas químicos y su problemática actual	4
2.1.1 Problemas Ambientales y de Salud	4
2.2 El manejo integrado de plagas (MIP)	6
2.2.1 El Control Biológico como una Estrategia del MIP	6
2.2.2 Agentes de Control Biológico de Plagas	7
2.2.2.1 Agentes de Control Microbiano (Insecticidas Biológicos)	7
2.2.2.1.1 Bacterias Entomopatógenas	8
2.2.2.1.2 Virus Entomopatógenos	8
2.2.2.1.3 Nemátodos Entomopatógenos	8
2.2.2.1.4 Hongos Entomopatógenos	9
2.3 Mecanismo de patogenicidad de los hongos	9

2.4 Factores que influyen en la patogenicidad de los hongos	12
---	----

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medio de cultivo	14
3.2 Microorganismos	14
3.3 Colecta de insectos muertos o enfermos con síntomas de micosis en cultivos	14
3.4 Aislamiento y purificación de cepas de hongos con potencial entomopatógeno	15
3.5 Conservación de las cepas aisladas	15
3.6 Producción y recuperación de las esporas	17
3.7 Cuantificación de las esporas	
3.7.1 Cuenta Total	16
3.7.2 Cuenta Viable	16
3.8 Cría de <i>Galleria melonella</i>	17
3.9 Pruebas de patogenicidad	18
3.10 Microcultivo	19
3.11 Determinación del crecimiento radial a distintas temperaturas	19

3.12 Análisis estadístico	19
---------------------------	----

IV RESULTADOS

4.1 Aislamiento y purificación de las cepas	20
---	----

4.2 Selección de las cepas entomopatógenas	21
--	----

4.3 Identificación del género del aislado entomopatógeno	23
--	----

4.4 determinación de la velocidad de crecimiento radial de distintas cepas del género <i>Paecilomyces</i> .	24
--	----

V CONCLUSIONES	26
-----------------------	----

VI BIBLIOGRAFÍA	27
------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dieta para <i>Galleria melonella</i>	17
Tabla 2. Datos referentes a la recolección de algunos de los aislados	20
Tabla 3. Mortalidad en <i>Galleria melonella</i> ocasionada por las cepas de hongos	21
Tabla 4. Bioensayos con <i>Galleria melonella</i> y los aislados 1K, 2K, 4K, 6K, 13K.	23
Tabla 5. Comparación de las velocidades de crecimiento radial de cepas pertenecientes al género <i>Paecilomyces</i> .	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos	10
Figura 2. Cepas de hongos con potencial entomopatógeno aisladas de mosquita blanca y pulgón presentes en algodón.	20
Figura 3. Cepas seleccionadas como posibles entomopatógenos	22
Figura 4. Microcultivo de la cepa 13K	24
Figura 5. Imagen ilustrada de <i>P. macrosporus</i> (Barnett H.L & Hunter B, 1998)	24

I INTRODUCCIÓN

El Valle del Yaqui, Sonora, es ampliamente reconocido como una de las regiones más modernas en materia de agricultura de riego, por su constante crecimiento económico y porque es el lugar de origen de la revolución verde (Lares, 2002). Sin embargo, con el propósito de elevar la productividad de los cultivos y protegerlos contra las plagas y enfermedades, se ha abusado de los plaguicidas químicos sintéticos, sin tomar en cuenta el riesgo que representan para el ecosistema regional y en particular para la salud de la población.

Para reducir estos efectos negativos se promueve la implementación de sistemas agrícolas rentables, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos presentes en el campo. Particularmente se promueve el Manejo Integrado de Plagas, el cuál esta definido como la integración de sistemas de control tanto culturales, como físicos, químicos y biológicos, que sean complementarios entre sí, y que tienen la finalidad de disminuir el daño que ocasionan las plagas. Dentro del Manejo Integrado de Plagas se encuentra el control biológico, el cuál se define a su vez como la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de las plagas, para limitar su población y el daño que éstas causan sobre los cultivos. El control biológico utiliza diversos organismos llamados agentes de control, entre ellos se encuentran depredadores, parásitos, microorganismos entomopatógenos como bacterias, virus, nemátodos y hongos. También emplea feromonas y extractos vegetales.

Entre las principales plagas que atacan los cultivos del Valle del Yaqui se encuentran insectos chupadores como el pulgón de algodón *Aphis gossypii* y la

mosquita blanca del género *Bemisia*. Este tipo de insectos plaga son controlados a nivel mundial con hongos entomopatógenos (Alean, 2003), sin embargo, su eficacia depende de factores bióticos y abióticos, ya que las esporas o propágulos tienen que germinar y penetrar al insecto. Dado que en la zona agrícola del Valle del Yaqui hay temperaturas muy elevadas, la eficiencia de las formulaciones comerciales de hongos entomopatógenos para el control de plagas puede ser muy baja, por lo tanto en este trabajo se promueve el aislamiento de hongos nativos con potencial entomopatógeno, ya que éstos están adaptados a las condiciones medioambientales de la zona.

1.1 Justificación

En la actualidad existe un interés creciente por utilizar hongos entomopatógeno en el control de insectos plaga, como una alternativa al uso de productos químicos, ya que son más amigables con el ambiente. Por lo tanto, el aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos nativos, así como la evaluación de su patogenicidad y virulencia, es de suma importancia, ya que estos hongos crecen, se desarrollan y sobreviven bajo las condiciones ambientales de la zona y/o región de donde son aislados.

1.2 Planteamiento del problema

¿Como reducir los daños causados por los plaguicidas químicos sintéticos sin afectar la productividad y calidad de los cultivos procedentes de la zona agrícola del Valle del Yaqui?

1.3 Objetivo general

Aislar hongos entomopatógenos nativos de la zona agrícola del Valle del Yaqui e identificarlos mediante bioensayos en laboratorio, esto para contribuir con el control biológico de plagas agrícolas de la región.

1.3.1 Objetivos específicos

- Aislar y purificar cepas de hongos que probablemente sean entomopatógenos.
- Hacer una selección primaria de las cepas aisladas mediante bioensayos en laboratorio.
- Evaluar la patogenicidad de las cepas seleccionadas.
- Identificar el género de la cepa o cepas entomopatógenas aisladas
- Evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas a distintas temperaturas.

1.4 Hipótesis

Existen hongos entomopatógenos nativos en el Valle del Yaqui capaces de controlar las plagas agrícolas de la región.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Plaguicidas químicos y su problemática actual

De acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología, se denomina plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. Por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos y las que interfieren con el bienestar del hombre y de los animales. Sin embargo, el uso intensivo y descuidado de estas sustancias ha traído consigo el empobrecimiento de los suelos, la disminución de la biodiversidad, la contaminación de las fuentes de abastecimiento de agua subterráneas y superficiales (incluyendo las aguas costeras y marinas), además de daños a la salud de los trabajadores, consumidores y población en general (Cortinas de Nava, 2000).

2.1.1 Problemas Ambientales y de Salud

Por ser sustancias diseñadas o seleccionadas para causar la muerte de seres vivos, los plaguicidas químicos sintéticos pueden afectar la biodiversidad directa e indirectamente, de la siguiente forma (Cortinas de Nava, 2000):

- a) Directamente. Estas sustancias afectan directamente a la biodiversidad cuando matan o interfieren con los procesos biológicos de organismos

que no eran el blanco de su acción, con la subsecuente reducción en la diversidad de especies y del tamaño de las poblaciones. Los impactos directos comprenden desde una variedad de efectos agudos o inmediatos, hasta efectos tóxicos subcrónicos o crónicos, causando su acumulación a través de las cadenas alimentarias.

- b) Indirectamente. La biodiversidad también se ve afectada por la muerte de plantas expuestas a herbicidas, en las cuáles suelen vivir, reproducirse o alimentarse insectos y hongos, que son la fuente de alimento de numerosas especies de aves y mamíferos. Al reducirse la abundancia de una gran variedad de plantas e insectos, se disminuye también el número de aves y mamíferos.

Además, el uso desmedido de plaguicidas suele destruir a los enemigos naturales de las plagas, tales como los depredadores y parásitos, y por otra parte, contribuye a la selección de poblaciones resistentes a los mismos, lo cuál trae como consecuencia la aparición de plagas secundarias, que ya no se pueden controlar con ese producto. Respecto al daño al ser humano, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca de tres millones de personas sufren cada año de envenenamientos agudos y severos por exposición a los plaguicidas y aproximadamente veinte mil pueden morir. Por otra parte, algunos plaguicidas son cancerígenos, mientras que otros tienen efectos en la reproducción por su efecto en la reducción de la cuenta de espermatozoides en el esperma humano (CropLife International, 1998).

Por lo anterior, ha crecido a nivel mundial, la demanda de que se promueva el manejo racional de los plaguicidas químicos sintéticos, lo cuál significa aprovecharlos en el combate de las plagas, pero bajo condiciones en las que se prevengan y reduzcan los riesgos para la salud y el ambiente (Cortinas de Nava, 1995).

2.2 El manejo integrado de plagas (MIP)

El concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP), fue desarrollado primero por los entomólogos en los años 50, como un enfoque que aplicaba principios ecológicos en el uso de métodos de control biológico y químico contra insectos dañinos. Posteriormente se amplió el concepto y se incluyeron todos los métodos de control de insectos plaga y últimamente se ha ampliado aún más, incluyendo toda las clases de plagas, tales como patógenos, insectos, nemátodos, malezas y vertebrados (Romero, 2004).

Así el MIP se puede definir como la estrategia que utiliza diferentes técnicas de control (biológicas, culturales, físicas y químicas) complementarias entre sí, para controlar a las plagas y reducir el daño que ocasionan sobre un determinado cultivo, con el propósito de minimizar el uso de plaguicidas químicos sintéticos y de evitar la aparición de poblaciones de plagas resistentes. Con el uso del MIP se trata de garantizar tanto la rentabilidad de la agricultura, como la seguridad ambiental y la inocuidad alimentaria.

2.2.1 El Control Biológico como una Estrategia del MIP

El control biológico fue originalmente definido como la acción de parásitos, depredadores u organismos patógenos para mantener a las poblaciones de otros organismos a un nivel mas bajo del que tendrían en su ausencia (DeBach, 1964, citado por Alean, 2003), por lo que Asaff y colaboradores (2002), definen al control biológico como la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su población.

Entre las principales ventajas del control biológico están: poco o ningún efecto colateral hacia otros organismos, incluyendo al hombre e insectos benéficos; la reducción de poblaciones de insectos plaga resistentes a plaguicidas químicos. Además la relación costo-beneficio es favorable; se evita el resurgimiento de plagas secundarias, no existen problemas de intoxicaciones, por lo que los insectos y los organismos entomopatógenos utilizados como agentes de control parecen ser los mejores sustitutos de los insecticidas de amplio espectro (Romero, 2004).

2.2.2 Agentes de Control Biológico de Plagas

Como agentes de control biológico se utilizan tanto insectos como microorganismos, virus y nemátodos. Los insectos pueden ser depredadores o parasitoides. Los primeros consumen insectos y activamente buscan a la presa, que es su alimento, y se caracterizan por tener un rango amplio de presas. Los parasitoides se desarrollan en su huésped y lo destruyen. Son los estados larvales o inmaduros del insecto los que son parásitos, mientras que los parasitoides adultos son de vida libre, y es la hembra adulta la que busca al huésped y oviposita, sobre, dentro o cerca de él (Roberts *et al.*, 1991).

2.2.2.1 Agentes de Control Microbiano (Insecticidas Biológicos)

La existencia de enfermedades en los insectos fue registrada desde tiempos remotos, sin embargo, hasta hace poco estas alteraciones se asociaron con sus agentes causales (patógenos). Afortunadamente, la mayoría de los microorganismos capaces de causar enfermedades en insectos no son dañinos para otros animales o plantas, lo que favorece su uso como agentes de control (Lamas *et al.*, 2003).

2.2.2.1.1 Bacterias Entomopatógenas

Hasta el momento sólo se conocen 3 especies de bacterias con posibilidad de ejercer control sobre insectos, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus popilliae*. *B. thuringiensis* presenta algunas subespecies y muchas variedades, durante su proceso de esporulación produce cristales proteícos con efecto insecticida. Estas bacterias han sido encontradas colonizando insectos de los órdenes Díptera, Ortóptera, Hymenóptera y Coleóptera (Fernández-Larrea, 1999).

2.2.2.1.2 Virus Entomopatógenos

Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas y se multiplican en los tejidos de los insectos hasta, eventualmente, ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación. En el ambiente pueden estar presentes naturalmente, enfermando a pocos insectos (en forma enzootica). Pero utilizándolos masivamente pueden ocasionar la muerte de grandes poblaciones de plagas de importancia económica (Alves y Pereira 1989; Evans y Entwistle 1987, citado por Rizo y Narváez, 2001).

2.2.2.1.3 Nemátodos Entomopatógenos

Los nemátodos son organismos que causan esterilidad o muerte del insecto hospedero. Existen asociaciones naturales entre insectos y nemátodos, en donde algunos nemátodos son capaces de parasitar insectos sanos, como son los casos

de los nemátodos de los géneros *Steinernema* (Familia Steinernematidae) y *Heterorhabditis* (Familia Heterorhabditidae). Estos dos géneros tienen una bacteria simbiote que además les sirve como alimento vivo. El nemátodo se introduce en el insecto a través del ano, boca o de los espiráculos y ya en el interior libera a la bacteria, para *Steinernema* el simbiote pertenece al género *Xenorhabdus* y para *Heterorhabditis* es del género *Photorhabdus*. Las bacterias simbiotes causan una septicemia al insecto y son capaces de matarlo en 48 horas, convirtiendo los cadáveres en un hábitat conveniente para el crecimiento y reproducción de nemátodos. Los nemátodos de insectos son principalmente parásitos obligados y facultativos, pueden atacar a los estadios biológicos de larva, a la pupa y al adulto (Alatorre, 1996 citado por Lamas *et al.*, 2003).

2.2.2.1.4 Hongos Entomopatógenos

Actualmente se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que atacan plagas de cultivos de importancia económica, especialmente insectos chupadores. Hasta la fecha se han identificado más de 750 especies de hongos entomopatógenos, pero solo unos cuantos se usan comercialmente, entre los que se encuentran *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus*. A diferencia de otros agentes entomopatógenos, los cuáles deben ser ingeridos para invadir al hospedero, los hongos generalmente penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como insecticidas de contacto. Esta cualidad única les permite ampliar el espectro de hospederos y atacar a insectos chupadores, entre otros (Asaff *et al.*, 2002).

2.3 Mecanismo de patogenicidad de los hongos

Los hongos entomopatógenos infectan a su hospedero por un mecanismo de parasitismo. El desarrollo de la infección consta de los pasos que se ilustran en la Figura 1 y se describen a continuación

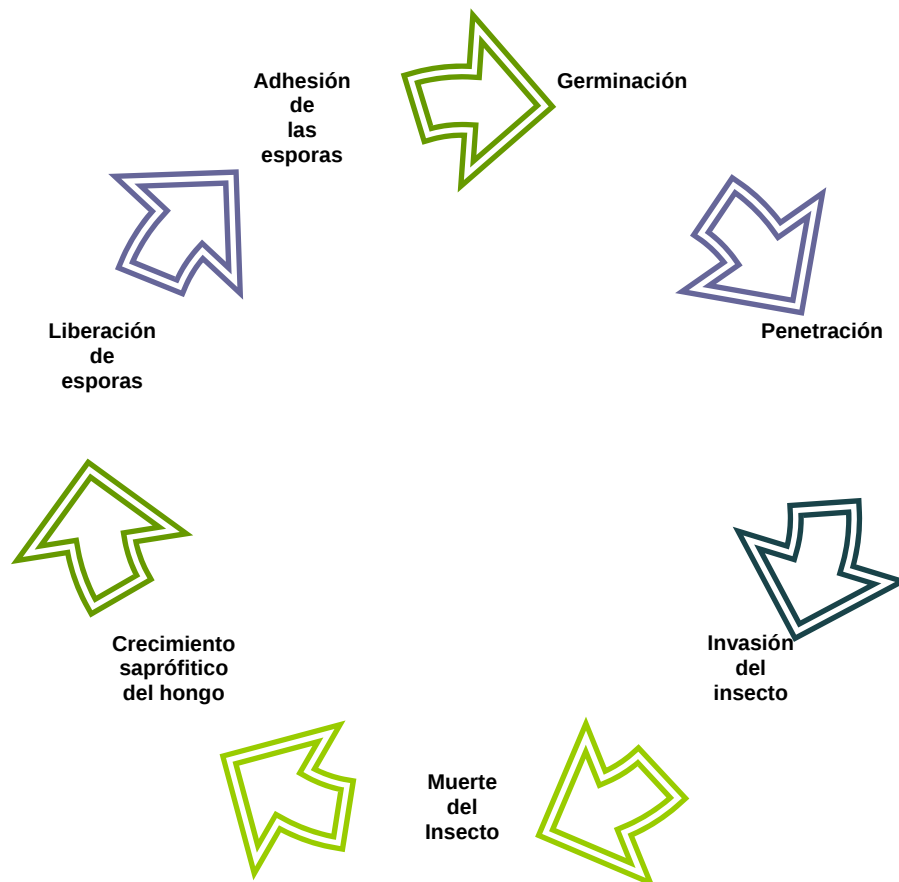


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos.

1 Adhesión. El prerequisite para que se inicie la infección es la adhesión de la espora a la cutícula del insecto. Varios mecanismos se han propuesto, pero ni la interacción específica debida a las lectinas presentes en la superficie del hongo, ni interacciones electrostáticas no-específicas fueron fundamentales para esta unión. También, se ha propuesto que la hidrofobicidad de las esporas juega un papel

predominante pero no se ha correlacionado hidrofobicidad con virulencia (Hegedous y Kachatourians, 1995).

2 Germinación. La espora germina en la cutícula y forma un tubo germinal, en ciertas especies como *Paecilomyces farinosus* se forman apresorios, que son brotes producidos al final de los tubos germinales, los cuáles penetran a la cutícula y actúan como un mecanismo de fijación e inician la infección dentro del huésped. Sin embargo, los apresorios no siempre se forman, aun en las especies que pueden producirlos (Roberts *et al.*, 1991).

3 Penetración. La penetración del tubo germinal se produce por un sistema de enzimas (lipasas, quitinasas y proteasas) liberadas al comienzo de la germinación de la espora, estas enzimas degradan la cutícula del insecto en la zona de penetración de la espora (Roberts 1984; citado por Vargas, 2003). La producción de enzimas extracelulares, es un factor que regula la actividad patógena de los hongos y es característica intrínseca de las especies de hongos entomopatógenos.

4 Invasión del insecto. Una vez en el interior del insecto, el hongo se multiplica en el hemocele, ya sea como micelio o como blastosporas e invade los órganos del insecto, degradando los tejidos para utilizarlos como nutrientes.

5 Muerte del insecto. La muerte puede ser ocasionada por toxinas producidas por el hongo y/o por el crecimiento vegetativo del mismo. El crecimiento vegetativo del hongo en el interior del insecto ocasiona la ruptura de áreas membranosas, también se observan zonas esclerotizadas, produciéndose micosis y finalmente la muerte; mientras que la muerte rápida (48 horas o menos) es atribuida a la producción de toxinas (Roberts & Humber, 1984, citado por Vargas, 2003), permitiendo que otros organismos oportunistas invadan el hemocele resultando en un crecimiento reducido del hongo dentro del hospedero.

6 Crecimiento saprofítico. El hongo continúa su crecimiento en el exterior del insecto y produce esporas, que a su vez pueden iniciar nuevamente el proceso de infección (Eyal *et al.*, 1994, citado por Carmona, 2002).

2.4 Factores que influyen en la patogenicidad y virulencia de un hongo entomopatógeno

La patogenicidad está definida como la habilidad cualitativa de un microorganismo para penetrar a un insecto y someterlo a un proceso dinámico que da origen a la aparición de una enfermedad (Alves y Pereira, 1989), la virulencia es el grado de patogenicidad de un organismo contra un insecto hospedero específico bajo condiciones controladas, mientras que la agresividad es la habilidad de un patógeno para invadir a su hospedero. Con mucha frecuencia los términos agresividad, patogenicidad y virulencia son empleados como sinónimos en patología de insectos y se utilizan para indicar los distintos niveles de enfermedad provocados por microorganismos. (Shaner *et al.*, 1992).

El factor más importante a considerar para la utilización de hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga, son sus limitaciones bióticas y abióticas. Las limitaciones bióticas incluyen antagonistas microbianos en el tegumento del hospedero, en la superficie de las hojas o en el suelo donde son aplicados. También se consideran limitaciones bióticas los hábitos alimenticios del hospedero, su condición fisiológica, las respuestas inmunes específicas del hospedero, la edad y la cepa del hongo (Hegedous y Kachatourians, 1995). Los factores abióticos incluyen la inactivación por luz solar, la presencia de insecticidas y fungicidas, la temperatura y humedad límites para la germinación y el crecimiento del hongo (Roberts *et al.*, 1991). Fargues y colaboradores (1977), consideran que a temperaturas elevadas se acorta el periodo durante el cual los

hongos pueden permanecer viables antes de penetrar al insecto. Otro factor que limita la capacidad de germinar e infectar a los insectos de los hongos entomopatógenos es la humedad.

Es por todo lo anterior que se promueve la implementación de hongos entomopatógenos nativos para el control biológico de plagas, en regiones donde las condiciones ambientales son extremas, ya que éstos han superado las limitaciones bióticas y abióticas de donde son aislados y por lo tanto su efectividad como un agente de control biológico será mayor que la de hongos provenientes de otros sitios, con condiciones ambientales más benéficas. Por ejemplo, entomopatógenos aislados de regiones frías no funcionarán adecuadamente en climas tropicales.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medios de cultivo

Se utilizaron Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y Agar Dextrosa de Papa, ambos marca DIFCO.

3.2 Microorganismos

Además de las cepas aisladas en este trabajo, se utilizaron cepas de *Paecilomyces fumosoroseus* pfrd (Pfrd) de la Colección del Centro Nacional de Referencia y Control Biológico DGSV-SAGARPA, *Paecilomyces spp.* (PAE) y *Metarthizium anisopliae* de Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V.

3.3 Colecta de insectos muertos o enfermos con síntomas de micosis en cultivos

En el transcurso de los meses de Octubre del 2005 a Marzo del 2006 se llevó a cabo la colecta de insectos con síntomas de micosis (insectos con crecimiento micelial externo, que lucían deshidratados o estaban muy adheridos a las hojas del cultivo). Los campos de colecta se encuentran ubicados en Quetchehueca, Villa Juárez y Campo 16, todos ellos pertenecen a la zona agrícola del Valle del Yaqui. Se colectaron ninfas de mosquita blanca (*Bemisia spp.*) y pulgón (*Aphis gossypii*) que se encontraban presentes en cultivos de algodón, algodón de

sombra, mora y papa. Al momento de la recolección de insectos la temperatura ambiente oscilaba entre 24 y 29°C (<http://espanol.weather.com/weather/climatology/MXSR0159>)

3.4 Aislamiento y purificación de cepas de hongos con potencial entomopatógeno

Para el aislamiento de los hongos se utilizó la técnica sugerida por Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V., la cuál consistió en observar a los insectos colectados bajo un microscopio estereoscópico Stemi DV4 (Karl Zeiss) para identificar signos de micosis en la superficie. De aquellos que presentaban signos, se tomó con un asa estéril un inóculo de la zona infectada y se sembró por estría en cajas Petri con SDA; que se incubaron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en una estufa Quincy Lab. Inc. modelo 12-140 hasta observar crecimiento. En los casos donde crecieron hongos con distinta morfología macroscópica en la misma caja, se tomó con el asa estéril un inóculo del crecimiento de cada uno y se sembró por estría cruzada en placas con medio SDA. El procedimiento se repitió hasta tener colonias aisladas.

3.5 Conservación de las cepas aisladas

Las cepas fueron conservadas mediante resiembras periódicas en placas con medio SDA en refrigeración a una temperatura de aproximadamente 4°C .

3.6 Producción y recuperación de las esporas

A partir de una de las cajas de conservación de cada aislado, se tomó un inóculo que se sembró en cajas de Petri con medio SDA. Las cepas fueron incubadas por

10 días a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se incubaron de 2 a 4 días a temperatura ambiente en presencia de luz natural para inducir su esporulación.

Las esporas fueron recuperadas de las cajas de Petri añadiendo 4mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, y raspando la superficie con un asa estéril para obtener una suspensión, 1 mL de esta suspensión se transfirió a tubos de ensayo con tapón de rosca y 9 mL de agua estéril.

3.7 Cuantificación de las esporas

3.7.1 Cuenta Total

Se le realizó un conteo por duplicado de esporas de las suspensiones en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico Axiolab plus (Karl Zeiss) a 1000x.

3.7.2 Cuenta Viable

Con base en la concentración de esporas/mL de cada suspensión, se realizaron las diluciones necesarias para hacer la cuenta viable. Se sembraron 200 microlitros de las diluciones adecuadas en placas con medio SDA, éstas fueron incubadas a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se realizó conteo de UFC a las 48, 72 y 96 horas, determinando el % de viabilidad de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Esporas Germinadas}}{\text{Esporas Totales}} \times 100 \quad (1)$$

3.8 Cría de *Galleria melonella*

Se inició una colonia de *Galleria melonella* a partir de un lote de insectos procedente de la casa comercial Maskota de la Ciudad de Puebla y fue mantenida en recipientes de plástico con la dieta sugerida por Alatorre, 1997 (Tabla 1). Orugas de esta colonia fueron utilizadas en los bioensayos denominados primera y segunda repetición. Para la selección de cepas entomopatógenas se utilizaron orugas de *Galleria melonella* provenientes de una tienda de mascotas de El Paso Texas EU.

Tabla 1. Dieta para *Galleria melonella*

INGREDIENTE	CANTIDAD
Avena	2400mL
Sales Wesson (Sigma)	30mg
Levadura de cerveza (Golden Haryest)	60g
Agua desionizada	100mL
Miel de abeja	200ml
Glicerol (Cruz-Rosa)	200mL
Vitaminas Clusivol (Wyeth, S.A de C.V)	12mL

Las sales de Wesson y la levadura se suspendieron en agua desionizada a 60°C, la miel y el glicerol se mezclaron por separado y posteriormente se añadieron a la mezcla de sales y levadura, finalmente esta mezcla se añadió a la avena, mezclando perfectamente todos los ingredientes, y fue esterilizada en autoclave durante 15 min a 121°C.

3.9 Pruebas de patogenicidad

Se prepararon suspensiones de esporas de cada uno de los aislados a una concentración de 1×10^7 esporas/mL en Tween 80 al 0.01%. Diez larvas de *Galleria melonella* por tratamiento, fueron sumergidas en la suspensión de esporas durante 10 segundos con una leve agitación, posteriormente las larvas fueron pasadas a cajas Petri estériles con la dieta sugerida por Alatorre. Como testigo positivo se usó una suspensión de 1×10^7 esporas/mL de *Metarhizium anisopliae* y para el testigo negativo las larvas fueron sumergidas en una solución de Tween 80 al 0.01%. Las cajas se mantuvieron a aproximadamente 27°C y se registró la mortalidad cada 24 horas por un lapso de 10 días; al cabo de los cuáles se calculó el % de mortalidad y % de mortalidad corregida con base al testigo negativo según la fórmula de Abbott.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Larvas Muertas}}{\text{Larvas Vivas}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

m_e = mortalidad en el tratamiento.

m_b = mortalidad en el blanco

3.10 Microcultivo

Se colocó una gota de Agar Dextrosa de Papa en portaobjetos excavados, posteriormente con un asa estéril se tomó una muestra de micelio de la cepa de interés y se inoculó por picadura en los portaobjetos, éstos se incubaron a 27°C en una estufa Quincy Lab. Inc. modelo 12-140 por 5 días, al cabo de los cuáles se observaron bajo un microscopio óptico Axiolab plus (Karl Zeiss) a 400x.

3.11 Determinación de la velocidad de crecimiento radial a distintas temperaturas

A partir de cajas de conservación de las distintas cepas se sembró por picadura en el centro de una caja de Petri con SDA cada una de las cepas y se incubaron a 27, 30 y 33°C; midiendo y registrando diariamente el diámetro de la colonia formada durante 5 días, a partir de las 48 horas de incubación. Cada experimento se hizo por triplicado. Posteriormente se realizó el cálculo de la velocidad de crecimiento radial mediante una regresión lineal de los datos experimentales de radio en función del tiempo de incubación, tomando la pendiente como la velocidad de crecimiento radial medida en $\mu\text{m/hr}$.

3.12 Análisis estadístico

El análisis de varianza y la prueba de diferencia de medias se hicieron mediante la prueba de Tukey-Kramer, a un nivel de significancia de 0.0001. Se utilizó el programa NCSS 2000.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y agrupación de las cepas

Se obtuvieron 189 aislados, los cuáles se agruparon en 20 cepas distintas en base a su morfología colonial y fueron denominadas como 1K hasta 20K. En la Tabla 2 y Figura 2 se muestra información referente a algunos de los aislados.

Tabla 2. Datos referentes a la recolección de algunos de los aislados

FECHA	CAMPO	CULTIVO	INSECTO	ASILADOS
08-OCT-2005	Quetchehueca	Algodón	Pulgón	10
08-OCT-2005	Quetchehueca	Mora	Mosquita blanca	7
08-OCT-2005	Quetchehueca	Algodón de Sombra	Pulgón	1
18-NOV-2005	Campo 16	Algodón	Pulgón	4
20-FEB-2006	Villa Juárez	Papa	Mosquita blanca	20
24-FEB-2006	Quetchehueca	Algodón	Mosquita blanca	4



(A)



(B)

Figura 2. Ejemplos de cepas de hongos con potencial entomopatógeno aisladas del Valle del Yaqui (A) cepa 6K aislada de mosquita blanca en papa (B) cepa 9K aislada de pulgón en algodón.

4.2 Selección de las cepas entomopatógenas

Para realizar un primer tamizaje, a una cepa representativa de cada grupo se le hizo la prueba de patogenicidad, se consideraron como probables entomopatógenos aquellas cepas que ocasionaron una mortalidad corregida mayor al 50%. En este ensayo se utilizaron orugas de *Galleria melonella* provenientes de una tienda de mascotas de El Paso Texas EU. Las cepas denominadas 5K, 10K, 11K, 12K, 14K, 15K, 16K, 17K, 18K 19K y 20K no esporularon y por lo tanto no fueron utilizadas. Los resultados de este primer tamizaje se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Mortalidad en *Galleria melonella* ocasionada por las cepas de hongos aisladas.

CEPA / TRATAMIENTO	Concentración (esporas /mL)	Mortalidad (%)	Mortalidad Corregida (%)
1K	1.35×10^7	80	75
2K	1.3×10^7	90	88.24
3K	1.305×10^7	50	41.18
4K	9.9×10^6	80	75
6K	1.7×10^7	70	64.71
7K	6.05×10^6	50	41.18
8K	4.5×10^6	50	41.18
9K	1.06×10^7	10	0
13K	1.25×10^7	60	50
<i>Metarthizium anisopliae</i>	1.35×10^7	80	75
Tween 80 al 0.01%	-	20	0

Según Busvine, 1971 un bioensayo que presente una mortalidad en el blanco negativo mayor al 20% no se toma por válido.

Solo las cepas 1K, 2K, 4K, 6K y 13K (Fig. 3) ocasionaron una mortalidad corregida mayor al 50%, para confirmar si eran hongos entomopatógenos se repitieron los bioensayos dos veces más, con diferentes lotes de orugas de *Galleria melonella* y en distintas fechas.

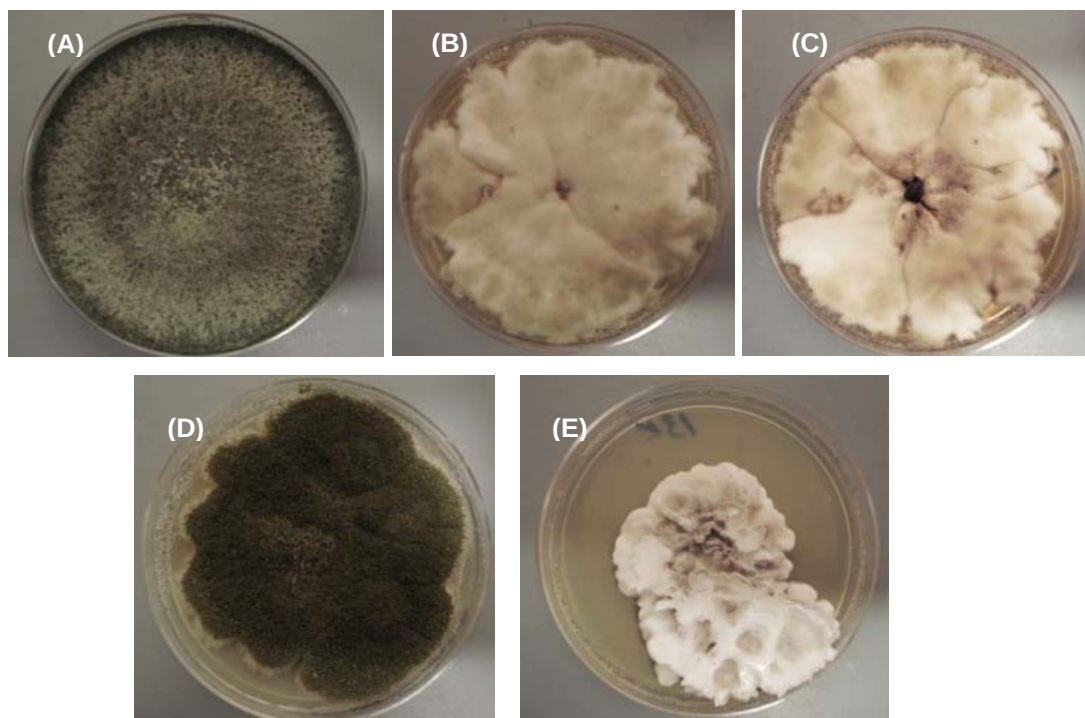


Figura 3. Cepas seleccionadas como posibles entomopatógenos (A) Ceba 1K aislada de pulgón en algodón, (B) Ceba 2K aislada de mosquita blanca en algodón, (C) Ceba 4K aislada de mosquita blanca en mora, (D) Ceba 6K aislada de mosquita blanca en papa, (E) Ceba 13K aislada de mosquita blanca en algodón.

En la Tabla 4 se observa que solamente la cepa 13K ocasionó una mortalidad corregida mayor al 50% en ambas repeticiones. Además las larvas muertas presentaron síntomas de micosis y se logró reaislar al hongo de ellas, por lo que esta cepa es entomopatógena. Ahora bien las cepas 1K, 2K, 4K y 6K podrían ser patógenas oportunistas, ya que en los primeros bioensayos ocasionaron mortalidades elevadas, debido probablemente a que las orugas utilizadas que provenían de El Paso Texas hayan sufrido un estrés en el traslado y fueron más susceptibles al ataque de los hongos.

Tabla 4. Bioensayos con *Galleria melonella* y los aislados 1K, 2K, 4K, 6K, 13K.

	Viabilidad de las esporas (%)		Mortalidad (%)		Mortalidad Corregida (%)	
CEPA	1ra repetición	2da repetición	1ra repetición	2da repetición	2da repetición	2da repetición
1K	16.67	16.66	20	10	0	0
2K	53.77	35.71	20	10	11.11	0
4K	41.55	56.1	20	10	11.11	0
6K	81.82	81.81	20	10	11.11	0
13K	52	76.47	60	70	50	62.5
<i>Metharrizium anisoplae</i>	26.58	50	90	100	89	100
<i>Tween 80 0.01%</i>	-	-	20	20	0	0

4.3 Identificación del género del aislado entomopatógeno

En las Fig. 4 se muestran las estructuras reproductivas de la cepa 13K. Se observan conidióforos verticilados, con fiálides de las cuáles surgen los conidios en cadenas que son ovoides. Estas características coinciden con la descritas por

Barnett y Hunter, 1998 para *Paecilomyces macrosporus* (Fig. 5), por lo que se concluye que la cepa 13K pertenece al género *Paecilomyces*; sin embargo para determinar la especie del aislado es necesario un diagnóstico específico por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) como el que sugieren Kerry *et al.*, 2005.



Figura 4. Microcultivo de la cepa 13K

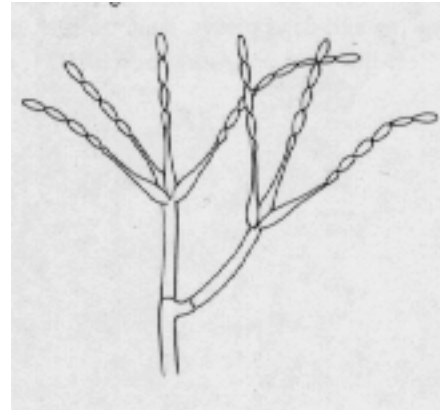


Figura 5. *P. macrosporus* (Barnett y Hunter, 1998)

4.4 Determinación de la velocidad de crecimiento radial de distintas cepas del género *Paecilomyces*

Se comparó la velocidad de crecimiento del aislado con la de otras cepas del género *Paecilomyces* a distintas temperaturas, los resultados se muestran en la Tabla 5. Las velocidades de cada experimento y sus repeticiones fueron analizadas mediante un ANOVA, el cuál mostró que al menos una de las medias era diferente ($\alpha = 0.0001$). A 27°C la cepa Pfrd tuvo una menor velocidad de crecimiento radial que las cepas PAE y 13K, sin embargo, a 30 y a 32°C todas las cepas crecieron a la misma velocidad.

Tabla 5. Comparación de las velocidades de crecimiento radial en μ /h de cepas pertenecientes al género *Paecilomyces*.

CEPA	27°C	30°C	32°C
PAE	81.8 $\pm$ 6.03 ^b	83.1 $\pm$ 4.47 ^b	16.2 $\pm$ 0.95 ^a
Pfrd	66 $\pm$ 3.53 ^c	79.2 $\pm$ 10.1 ^{bc}	22.1 $\pm$ 2.08 ^a
13K	88.3 $\pm$ 4.55 ^b	87.1 $\pm$ 4.9 ^b	24.1 $\pm$ 0.6 ^a

$\pm$ indica la desviación estándar de las medias. Medias con diferentes letras en la misma línea tienen diferencia significativa ($\alpha=0.0001$)

Los resultados obtenidos por Stephan y Al-Din (1987), indican que la temperatura óptima para el crecimiento radial *in vitro* de *Paecilomyces lilacinus* está en el rango de 20-25°C. A una temperatura de 34°C observaron poco crecimiento micelial sin producción de esporas, estos resultados coinciden con los obtenidos por Ayyasamy y Baskaran (2005) para el caso de *Paecilomyces farinosus*, donde se reporta que la temperatura óptima de crecimiento de esta cepa es de 25°C y en el rango de temperaturas de 30 a 35°C el crecimiento radial se ve severamente afectado. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este experimento se observa que la velocidad de crecimiento radial para el caso de PAE (*Paecilomyces spp.*), Pfrd (*P. fumosoroseus* pfrd) y 13K (*Paecilomyces spp.*) no se ve afectada en el rango de temperaturas de 27 a 30°C, lo que indica mayor resistencia de estas cepas a la temperatura.

Tomando en cuenta que la cepa 13K fue aislada del Valle del Yaqui se esperaría que fuese más resistente a la temperatura, pero hace falta considerar su crecimiento en un rango más alto de temperatura para saberlo. Es importante tomar en cuenta que en la época cuando se realizó el aislamiento de esta cepa la temperatura oscilaba entre 24 y 29°C.

V CONCLUSIONES

La cepa 13K, aislada del Valle del Yaqui, Sonora e identificada como *Paecilomyces spp.* es entomopatógena, porque además ocasionar muerte en *Galleria melonella*, los insectos muertos presentaron síntomas de micosis y se logró reaislar al hongo de ellos. Por lo tanto, se comprueba la hipótesis planteada de que en el Valle del Yaqui existen hongos entomopatógenos, pero hace falta realizar más experimentos para saber si esta cepa es capaz de controlar a las plagas agrícolas de la región. Con respecto a la velocidad de crecimiento radial a distintas temperaturas se observó que no existe diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de las cepas del género *Paecilomyces* analizadas; sin embargo, estas cepas presentan una mayor resistencia a la temperatura que las cepas estudiadas por otros autores, como el caso de *P. lilacinus* y *P. farinosus*, lo cuál sugiere que las cepas utilizadas y la aislada en este trabajo están mejor adaptadas a temperaturas altas.

VI BIBLIOGRAFÍA

- Alean, C. 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 Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia.
- Alves, S.B. and Pereira, R.M. 1989. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok and *Beauveria Basiana* (Bals.) Vuill (Moniliales: Deuteromycetes) in plastic trays. *Ecossistema*. 14;188-192.
- Asaff, A., Reyes, Y., López y López, E., de la Torre, M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva* vol. 21 pg 291-295.
- Ayyasamy, R. and Baskaran, P. 2005. Effect of temperature and relative humidity on radial growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus*. *J Food, Agr Envi* Vol.3 (1) : 137-138.
- Barnett, H.L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS PRESS, Minnesota. pg 94-95.
- Busvine, J. R. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. 2nd ed. Commonwealth agricultural bureaux. England. pg 345

- Carmona, A.L. 2002. Resistencia a Temperaturas de Propágulos de *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Cortinas de Nava, C. 1995. Bases para una estrategia ambiental para la industria en México: evaluación ambiental de 5 ramas industriales. México, D.F. Instituto Nacional de Ecología, SEDESOL. (Serie Monografías No. 6).
- Cortinas de Nava, C. 2000. Manejo racional de plaguicidas químicos. (<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/154/cortinas.html>)
- CropLife Internacional, 1998. (<http://casafe.org/librouvc/mip.pdf>)
- Fargues, J. and Remaudiere, G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, 62:31-37.
- Fernández-Larrea O. 1999. A review of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production and use in Cuba. *Biocontrol/News and Information* 1999 Vol. 20 No. 1 47N – 48N
- Hegedus, D.D. and Khachatourians, G.G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol Advances*, 13:445-490.
- Kerry, R.B., Atkins, S.D., Clark, I.M., Pande, S., Hirsch, R.P. 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiol Ecol.* 1;51:257-64
- Lamas, M.A. 2003. AGRICULTURA ORGÁNICA: Una oportunidad sustentable de negocios para el sector agroalimentario mexicano. FIRA boletín informativo Núm. 322 Volumen XXXV pg 77-82.

- Lares, F. 2002. Estudios Relacionados con Plaguicidas en el Valle del Yaqui. Primer Taller Nacional Sobre la Salud del Niño y el Ambiente. (<http://www.ssa.gob.mx/unidades/dirgsa/downloads/saludinf/Cap07.pdf>)
- Rizo, C.M., Narváez, C. 2001 Uso y producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 61 pg 90 – 96.
- Roberts, D.W., Fuxa, J.R., Gaugler, R., Goettel, M., Jaques R. and Maddox, J. 1991. Use of pathogens in insect control. In Handbook of Pest Management in Agriculture 2nd ed., D. Pimentel, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2:243-278.
- Romero, F. 2004. Manejo Integrado de Plagas; Las Bases, Los Conceptos y su Mercantilización. Romero F (Editor). Universidad Autónoma de Chapingo, Tezcoco México, pg 13-19.
- Shaner, G. Stromberg, E.L. Lacy, G.H., Pirone, T.P. 1992. Nomenclatura and concepts of pathogenicity and virulence. Annu. Rev. Phytopathol 30:47-66.
- Stephan, Z. and A. Al-Din, S. S. 1987. Influence of temperature and culture media on the growth of the fungus *Paecilomyces lilacinus*. Revue Neimatol. 10 (4): 494
- Vargas, M.E. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Sacardo) petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Simmetrischema tangolias* (Gyen). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de ciencias biológicas. Lima, Perú.