



FICHA TÉCNICA **CB-09**

BIOENSAYOS CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

Dentro de los sistemas agrícolas, los hongos entomopatógenos (HE) representan una alternativa real para reducir el uso de insecticidas químicos (Lacey *et al.* 2015). Un paso importante para el desarrollo de bioinsecticidas formulados con HE, es determinar la patogenicidad y virulencia, por lo cual inicialmente deben establecerse bioensayos en condiciones de laboratorio (Spence *et al.* 2020). Según Shapiro Ilan *et al.* (2005) la patogenicidad es la cualidad o habilidad de ser patógeno, mientras que la virulencia, es definida como la capacidad de un organismo para causar enfermedad, es decir, el grado de patogenicidad de un organismo dentro de un grupo o especie.

Por otra parte, un bioensayo puede definirse como la evaluación de un estímulo con base en la respuesta que se obtiene de la interacción huésped - patógeno (Chan Cupul 2019). En este sentido, el estímulo es el HE y la respuesta es la muerte o efecto fisiológico del huésped, (e.g. reducción de la alimentación, actividad física y pérdida de habilidad de movimiento) (Tamayo Mejía & Guzmán Franco 2010). Con los bioensayos se determina la virulencia de uno o varios aislamientos o cepas, la capacidad epizootica y factores bióticos y abióticos que la impiden o favorecen (Butt & Goettel 2000). Los bioensayos también permiten determinar la amplitud de huéspedes del HE, lo cual es importante ya que en el control biológico, otro de los objetivos es que los agentes de control sean específicos de tal modo que no se afecten otros organismos del entorno. Fargues & Remaudiere (1977) definen la especificidad como la expresión de las adaptaciones y afinidades recíprocas entre un microorganismo patógeno y todas sus especies huésped.

Desde un punto de vista práctico, la comprensión de la especificidad de una cepa fúngica es esencial en la elección de un agente de control.

Los bioensayos deben ser reproducibles, lo cual se logra teniendo control de la dosis, los factores ambientales y el método de inoculación que se utilice (Goettel & Inglis 1997). Existe una amplia variedad de bioensayos establecidos con diversos organismos huésped, por lo tanto, no hay un método estandarizado. Los bioensayos son adaptados de acuerdo a su objetivo, huésped y patógeno (Chan Cupul 2019).

El mecanismo de acción de los HE, es principalmente por contacto, inicia con la unión del conidio a la cutícula del insecto, seguido por la penetración (Tanada & Kaya 1993), particularmente en las partes blandas de la cutícula del huésped (Pucheta Díaz *et al.* 2006) e.g. las membranas intersegmentales (Tanada & Kaya 1993) o áreas bajo los élitros (**Fig. 1**) (Butt *et al.* 1995). La infección también puede ocurrir mediante la ingestión del hongo a través de las piezas bucales (Altinok & Sami Koca 2019).

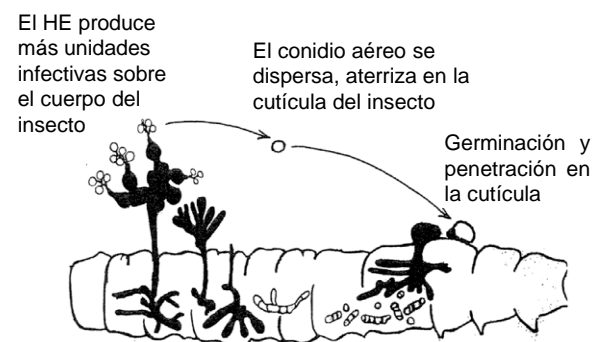


Figura 1. Mecanismo de infección de los HE (Tomado de Stefan T. Jaronski).

Este proceso de infección, hace necesaria la elección de uno o más métodos de inoculación que aseguren la infección del insecto plaga cuando se realizan los bioensayos. El método de inoculación que se elija está influenciado en gran parte por el estadio con mayor susceptibilidad del insecto, siendo este otro factor fundamental para lograr una infección exitosa del HE (Butt & Goettel 2000). Puesto que, la infección puede ser evitada si el insecto muda, las esporas del HE son removidas durante este proceso (Altinok & Sami Koca 2019). Por otro lado, se recomienda seleccionar un estado de desarrollo del insecto que sea fácilmente manipulable sin causarle daño (Butt & Goettel 2000), preferiblemente elegir estadios jóvenes que son más susceptibles a la infección (Abdul Qayyum *et al.* 2021). La elección de una metodología apropiada llevará a obtener resultados consistentes y reproducibles (Butt & Goettel 2000).

CONCEPTOS

Dosis. Se usará dosis cuando se conozca el número de unidades infectivas que se aplica sobre el insecto, y se expresará como conidios/insecto (Butt & Goettel 2000). La dosis que causa mortalidad en el 50% de la población se denominará dosis letal 50 (DL₅₀).

Concentración. Un grupo de insectos es expuesto a un ambiente contaminado por el HE, se empleará concentración y se expresará como conidios/mL o conidios/mm². La concentración causante del 50% de la mortalidad será concentración letal (CL₅₀) (Tamayo Mejía & Guzmán Franco 2010). Se recomienda realizar una primera prueba a una concentración de 1×10^7 conidios/mL en caso de evaluar varias cepas, y posteriormente emplear diferentes concentraciones para estimar los parámetros de virulencia (CL₅₀).

Controles o testigos. Estos tratamientos deberán incluirse invariablemente en cada repetición, y consistirán en someter los insectos a las mismas condiciones, pero sin el HE (Butt & Goettel 2000). La selección de los individuos del grupo control deberá hacerse bajo el mismo criterio usado para la selección de los individuos en los tratamientos con HE.

Repeticiones. Una repetición real de un bioensayo es aquella que se realiza en otra ocasión bajo las mismas circunstancias. Con esto se pretende aleatorizar los efectos de las condiciones no controlables, tales como el investigador, tiempo o temperatura (condiciones de campo), así como posibles errores en la elaboración de las diluciones (Tamayo Mejía & Guzmán Franco 2010). En este último caso las suspensiones utilizadas en cada bioensayo deben ser nuevas y recién preparadas.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Colonia de insectos y selección de individuos

Los insectos pueden ser colectados en campo o en colonias establecidas en laboratorio, en condiciones controladas (**Fig. 2**). Se debe asegurar la identidad del insecto plaga por taxonomía clásica y molecular. Para el desarrollo de bioensayos, los individuos deben seleccionarse de forma aleatoria.



Figura 2. Crías de insectos utilizadas para los bioensayos *T. molitor* (a), y *S. frugiperda* (b, c).

Cepas de hongos entomopatógenos

Iniciar la evaluación con cepas de HE que previamente hayan sido aisladas infectando a la plaga objetivo o que taxonómicamente sean cercanos. En caso de no disponer de material biológico de estas características, como alternativa se puede considerar el catálogo de la colección de HE del Departamento de Control Biológico (<https://www.gob.mx/senasica/documentos/coleccion-de-hongos-entomopatogenos>) que cuenta con más de 1000 aislamientos de diferentes estados de la Republica Mexicana, pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* (\equiv *Isaria*), *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Simplicillium*, *Aschersonia*, *Purpureocillium*, *Entomophthora*, *Acanthomyces* y *Gibellulla*. Cada especie de HE de esta colección está conservado en diferentes métodos, entre ellos la crioconservación a -70 y -196°C , liofilización o gel de sílice (Ayala-Zermeño *et al.* 2023). Para realizar la activación de los HE a partir de los métodos de conservación, se recomienda utilizar los medios de cultivo apropiados que aseguren su óptimo desarrollo y esporulación (Montesinos-Matías *et al.* 2021) (**Fig. 3**).

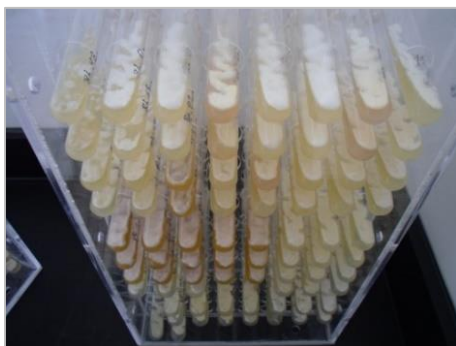


Figura 3. Cepas de HE desarrollados en tubos de ensayo.

En cada ciclo de cultivo de los HE a ensayar, se debe verificar la viabilidad, ausencia de contaminantes, buena esporulación y las características fenotípicas propias del aislado de acuerdo a su género y especie (Montesinos-Matías *et al.* 2015).

Producción del inóculo y preparación de las suspensiones

La producción de conidios del HE se realizará en tubos de ensayo sobre medios específicos según la especie (Montesinos-Matías *et al.* 2021), y serán incubados durante 14 días a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 12:12 h (L:O). Transcurrido este tiempo, se procederá a la obtención de la suspensión de conidios para lo cual se deben agregar 10 mL de Tween 80 0.05% (v/v), entonces los conidios se remueven con un asa micológica y la suspensión es filtrada usando una gasa estéril (**Fig. 4**).



Figura 4. Preparación de suspensión de conidios de una cepa de HE.

Es necesario realizar el conteo de conidios y prueba de germinación de todos los HE en estudio, incluso si se trata de productos ya formulados.

Para calcular la concentración de conidios de la suspensión obtenida, es recomendable preparar una dilución 1:10 y realizar el conteo de conidios con un hemocitómetro en esta nueva suspensión (**Fig. 5**).

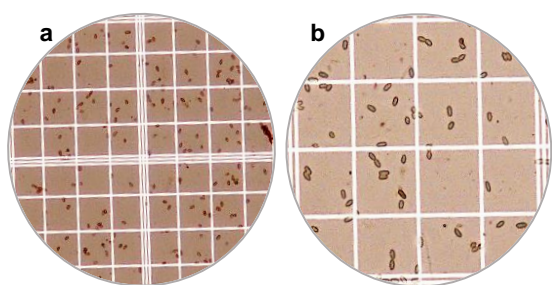


Figura 5. Conteo de conidios de una cepa de *Metarhizium* sp. en hemocitómetro (cámara de Neubauer) (a: objetivo 10x, b: objetivo 40x).

Para la prueba de germinación, se sembrarán 100 uL de la suspensión de conidios por extensión en placa. Posteriormente, las placas deben ser incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un periodo de entre 15 y 24 h. Transcurrido este tiempo, se revisarán al menos 300 conidios. Se contabilizarán los conidios germinados y no germinados para determinar el porcentaje de germinación. Se considera a un conidio germinado, a aquel cuyo tubo germinativo es igual o mayor que el tamaño del conidio (Ansari *et al.* 2011) (**Fig. 6**).

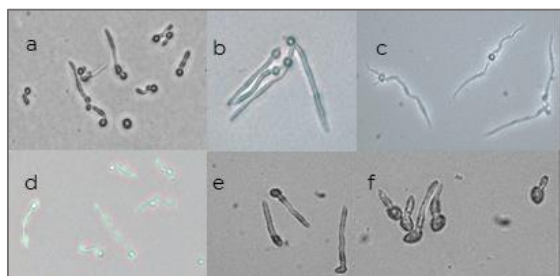


Figura 6. Aspecto de conidios germinados de diferentes HE después de 16 h de incubación.

Se recomienda que la germinación de conidios utilizados para los bioensayos sea $>85\%$. En caso contrario, se debe realizar reactivación *in vivo* o *in vitro* para mejorar la germinación y sea apto para los bioensayos (Jenkins & Grzywacz 2000).

PROCEDIMIENTO DEL BIOENSAYO

Desinfección superficial del insecto

Cuando el método de inoculación se realiza de manera directa en el insecto, los individuos deben ser desinfectados, para esto, los insectos a utilizar serán colectados y sometidos a un ciclo de lavado como se describe a continuación: (Castrejón-Antonio 2020):

- Realizar un lavado con agua estéril por 10 s.
- Realizar un lavado con hipoclorito de sodio al 0.1% (v/v) durante 10 s.
- Realizar dos enjuagues con agua estéril durante 10 s.
- A continuación, secar los insectos en toallas de papel o papel filtro estéril.

La manipulación de los insectos puede realizarse con pinceles o pinzas, dependiendo de la fragilidad del insecto, en cualquier caso, se debe realizar la desinfección del material con alcohol al 70% (v/v).

Método de inoculación

Como se menciona previamente, el método de inoculación influye directamente en el éxito de la infección. Este se definirá por el objetivo del ensayo, el tipo de inóculo y el tamaño y fragilidad del insecto. Con cualquier método de inoculación que se utilice es importante determinar la viabilidad del ingrediente activo lo más cerca posible del momento de la aplicación del HE (Butt & Goettel 2000).

Algunos métodos de inoculación son descritos a continuación:

1. **Inóculo por aspersión**, es utilizada especialmente en insectos pequeños que son difíciles de manipular de otra manera. En este caso se debe de asegurar que el equipo de aspersión forme gotas de tamaño adecuado al tipo de insecto a tratar y que la distribución de las mismas sea homogénea (Tamayo Mejía & Guzmán Franco 2010). Se puede utilizar la Torre de aspersión de Potter para este método de inoculación (Fig. 7). Los insectos pueden colocarse en grupos en una caja de Petri con papel filtro para absorber el exceso de suspensión después que han sido asperjados.

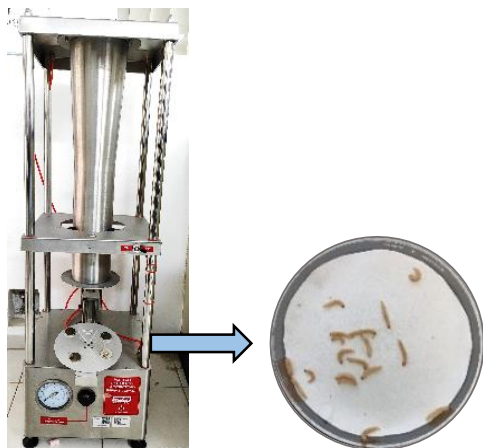


Figura 7. Torre de aspersión de Potter.

2. **Método de inmersión**, los insectos son introducidos a una suspensión de conidios entre 5 a 30 s dependiendo del tipo de plaga.

Se debe asegurar que cada insecto o grupo reciba una dosis similar de inóculo, asegurar que todos estén completamente sumergidos (Butt & Goettel 2000) (Fig. 8).



Figura 8. Inoculación por el método de inmersión.

3. **Inoculación en la superficie**, el sustrato o alimento es inoculado con el HE y luego los insectos son transferidos sobre este; el inóculo se adquiere por contacto a medida que se alimentan o se desplazan a través de él (Inglis *et al.* 2012). Se debe realizar previamente la desinfección de las hojas frescas con hipoclorito de sodio al 0.1% (v/v) o bien, esterilizar la dieta artificial previo a la inoculación (Fig. 9).

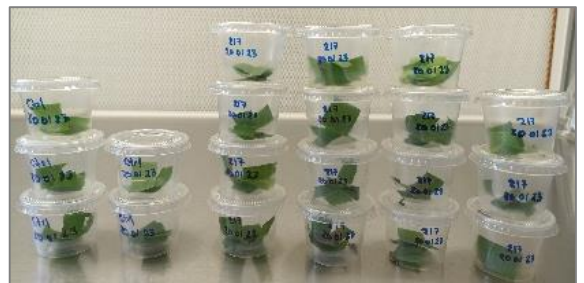


Figura 9. Inoculación del alimento, hojas frescas de maíz para alimentar al gusano cogollero *S. frugiperda*.

Orden de aplicación y evaluación

La aplicación de las dosis o concentraciones deberá realizarse partiendo del control, es decir, el control debe establecerse antes de manejar los tratamientos con HE. Los tratamientos deberán aplicarse de la menor dosis o concentración y terminar en la mayor (Tamayo Mejía & Guzmán Franco 2010). Cuando se evalúen diferentes cepas, el orden de aplicación de los tratamientos deberá realizarse de manera aleatoria en las repeticiones posteriores.

Los bioensayos serán evaluados diariamente, deberá realizarse el cambio o suministro de alimento según el insecto que se esté evaluando y se contabilizarán el total de vivos y cadáveres cada 24 h. Para confirmar la muerte por acción del HE, es recomendable colocar los insectos muertos en cámara húmeda para promover la micosis utilizando una solución de sulfato de potasio (K_2SO_4) al 11% para alcanzar una humedad relativa de 97% (Goettel & Inglis 1997) e incubar a 25°C, hasta observar esporulación y las características fenotípicas del HE (**Fig. 10**). Como alternativa, se puede utilizar agua estéril, en este caso, agregar periódicamente, puesto que se evapora más rápidamente que el K_2SO_4 .

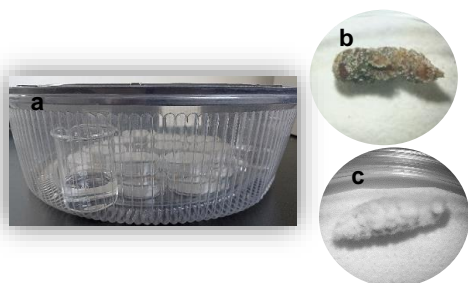


Figura 10. a: Cámara húmeda para promover micosis de los HE; b: pupa con *Metarhizium* sp. y c: pupa con *Beauveria* sp.

Instalaciones para realizar los bioensayos

Es necesario establecer un lugar adecuado para el desarrollo de bioensayos, en el que sea posible mantener condiciones ambientales controladas o semi-controladas y una vez establecidos, se debe asegurar que los insectos utilizados no escapen de las unidades experimentales y priorizar si se trata de una plaga cuarentenaria (Butt & Goettel 2000).

Variables evaluadas y análisis de datos

En los bioensayos que se realizan para determinar si una cepa de HE es ideal como agente de control, se toman en cuenta variables que determinen su aptitud, esto es, germinación de conidios, patogenicidad y virulencia en el huésped (mortalidad del huésped).

Los datos obtenidos de la germinación pueden ser sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para comparar las medias obtenidas de cada cepa evaluada, las cuales deben provenir de al menos cuatro repeticiones por cepa.

Los bioensayos deben realizarse con grupos de al menos 20 individuos por repetición, estos serán evaluados durante un tiempo de entre 8 y 14 días, tomando lecturas de mortalidad cada 24h, la micosis de los individuos evaluados asegurará mortalidad por efecto del HE. Por otro lado, es importante que cuando exista una mortalidad >5% en el grupo control se utilice la fórmula de Abbott, también conocida como porcentaje de mortalidad corregida (%MC). La fórmula es la siguiente:

$$\% MC = \frac{\%MOT - \%MOC}{100 - \%MOC} \times 100$$

Donde; %MOT es el porcentaje de mortalidad de los tratamientos considerando aquellos individuos con presencia de micosis y %MOC es el porcentaje de mortalidad del tratamiento control (Abbott 1925). La mortalidad del control no debe superar el 20%, si esto sucede, es necesario descartar y repetir el bioensayo.

Después de obtener la mortalidad corregida de los tratamientos, se puede realizar un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para la separación de las medias (Idrees *et al.* 2022). Para los análisis estadísticos se deben tener al menos cuatro repeticiones por tratamiento.

Es importante recordar que previamente al análisis de varianza, se debe cumplir con la normalidad y homocedasticidad de los datos. Las prueba de Shapiro-Wilk es una de las más comunes para determinar la normalidad de los datos (Shapiro & Wilk 1965). Para la homocedasticidad la prueba de Bartlett es la recomendada en estos casos. Para determinar la concentración o dosis (CL_{50} o DL_{50}) y tiempo letal medio (TL_{50}) de las cepas evaluadas, se trabajará con la mortalidad diaria que será considerada como frecuencia de muerte, en estadística puede ser llamada número de eventos o de fallas. Para esto, se puede usar la prueba Probit, dicha prueba es un procedimiento que mide la relación entre la intensidad de un estímulo (concentraciones) y la respuesta que se obtiene de ese estímulo (frecuencia de muerte o mortalidad diaria). Con esta prueba se estimará la concentración necesaria para el control efectivo de la plaga (CL_{50}), además de estimar, el tiempo necesario para llegar a ese nivel de control (TL_{50}) (Tarekegn *et al.* 2019).

Algunos de los programas estadísticos más empleados para análisis de datos son R, Minitab, SAS, SPSS y JMP. La elección de la herramienta estadística dependerá del costo y experiencia en el uso de cada uno.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265–267.
- Abdul Qayyum, M., H. Bilal, U. Naeem Ullah, H. Ali, H. Raza & M. Wajid. 2021.** Factors Affecting the Epizootics of Entomopathogenic Fungi-A Review. *Journal of Bioresource Management* 8: 4.
- Altinok, H. & A. Sami Koca. 2019.** Modes of Action of Entomopathogenic Fungi. *Current Trends in Natural Sciences* 8: 117-124.
- Ansari, M.A., E.C. Pope, S. Carpenter, E.J. Scholte & T.M. Butt. 2011.** Entomopathogenic Fungus as a Biological Control for an Important Vector of Livestock Disease: The Culicoides Biting Midge. *PLoS ONE* 6(1): e16108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016108>
- Ayala-Zermeño, M.A., A.M. Berlanga-Padilla, C.F. Regla-Márquez, G.J. Lino-López, F. Muñiz-Paredes, R. Montesinos-Matías & J.A. Sánchez-González. 2023.** Long-term preservation and genetic stability of entomopathogenic fungal species. *Journal of Microbiological Methods* 208 106711. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106711>
- Butt, T.M. & M.S. Goettel. 2000.** Bioassays of Entomogenous Fungi, p. 141-195. *In:* Navon, A. & K.R.S. Ascher (eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, CAB International, Wallingford UK <http://dx.doi.org/10.1079/9780851994222.0141>
- Butt, T.M., L. Ibrahim, S.J. Clark & A. Beckett. 1995.** The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research* 99: 945-950. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80754-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80754-5)

- Castrejón Antonio, J.E. 2020.** Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Xyleborus affinis* vector del hongo *Raffaelea lauricola* plagas potencialmente riesgosas para el cultivo de aguacate *Persea americana* en México. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, 77p.
- Chan Cupul, W. 2019.** Diseño De Bioensayos Para La Evaluación De Hongos Entomopatógenos. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima.
- Fargues, J. & G. Remaudiere. 1977.** Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia* 62: 31-37.
- Goettel, M. & G.D. Inglis. 1997.** Fungi Hyphomycetes. In: Lawrence, L. (ed.). p. 213-249. Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS. Academic Press, Great Britain.
- Idrees, A., A. Afzal, Z.A. Qadir & J. Li. 2022.** Bioassays of *Beauveria bassiana* Isolates against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Fungi* 8: 717.
- Inglis, G.D., J. Enkerli & M.S. Goettel. 2012.** Laboratory Techniques Used for Entomopathogenic Fungi: Hypocreales, Chapter 7. In: Lacey, L. (Ed.). A Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press,.
- Jenkins, N.E. & D. Grzywacz. 2000.** Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Science and Technology* 10: 53-777.
- Lacey, L.A., D. Grzywacz, D.I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge & M.S. Goettel. 2015.** Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132:1-41.
- Montesinos-Matías, R., M.A. Ayala-Zermeño & A.M. Berlanga-Padilla. 2015.** Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA. Tecomán, Colima, México. 59 p.
- Montesinos-Matías, R., A. Ordaz-Hernández, A. Ángel-Cuapio, Y. Colin-Bonifacio, R.E. García-García, C.A. Ángel-Sahagún & H.C. Arredondo-Bernal. 2021.** Principal component analysis of the biological characteristics of entomopathogenic fungi in nutrient-limited and cuticle-based media. *Journal of Basic Microbiology* 61: 147-156.
- Pucheta Díaz, M., A. Flores Macías, S. Rodríguez Navarro & M. de la Torre. 2006.** Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856-860.
- Shapiro-Ilan, D.I., J. Fuxa, L. Lacey, D. Onstad & H.K. Kaya. 2005.** Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1-7.
- Shapiro, S.S. & M.B. Wilk. 1965.** An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Spence, E.L., D. Chandler, S. Edgington, S.D. Berry, G. Martin, C. O'Sullivan, C. Svendsen & H. Hesketh. 2020.** A standardised bioassay method using a bench-top spray tower to evaluate entomopathogenic fungi for control of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Management Science* 76: 2513-2524. <https://doi.org/10.1002/ps.5794>
- Tamayo Mejía, F. & A. Guzmán Franco. 2010.** Bioensayos con hongos entomopatógenos. XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico, Curso-taller "Control de calidad de insecticidas microbianos: Hongos y nemátodos entomopatógenos" 8-10 de noviembre de 2010, Uruapan, Michoacán, México. 115 p.
- Tanada, Y. & H.K. Kaya. 1993.** Fungal Infections, p. 318-387. In: Tanada, Y. & H.K. Kaya (eds.). *Insect Pathology*. Academic Press, Inc., San Diego, USA (ISBN: 9780126832556).
- Tarekegn, F. T., N. Tadele, D. Mulugeta, D. Tebekew & S. Waktole. 2019.** Evaluation of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Bacillus thuringiensis* for the management of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*. DOI: 10.1080/09583157.2019.1707481

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Angel Ayala Zermeño y al M. en C. Marco Antonio Mellín
Rosas por la revisión previa a esta publicación.

Dr. Victor M. Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
Ing. Francisco Javier Calderón Elizalde
**DIRECTOR EN JEFE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA**
M. en B. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
M. en C. Guillermo Santiago Martínez
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA
M. en C. Jorge Antonio Sánchez González
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

Elaboraron:

IBT. Olivia Rincón Betancurt
Dr. Roberto Montesinos Matías

DEPARTAMENTO DE CONTROL BIOLÓGICO

KM 1.5 CARRETERA TECOMÁN-ESTACIÓN FFCC. C.P.
28110 TECOMÁN, COLIMA.
TEL. (313) 32 4 07 41 y 45
<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>

Sugerencia de como citar esta ficha:

Rincón-Betancurt O. y R. Montesinos-Matías. 2023. Bioensayos con Hongos Entomopatógenos. Departamento de Control Biológico, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-09, 8p.