

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**DESARROLLO DE FORMULADOS ASPERJABLES DE
BEAVERIA BASSIANA (BALSAMO VUILLEMIN)
UTILIZANDO DIVERSOS POLIMEROS**

TESIS

QUE PRESENTA LA

Q.B.P. NINFA MARIA ROSAS GARCIA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN

MICROBIOLOGIA

MONTERREY, N. L., MEXICO

ABRIL 1999

TM

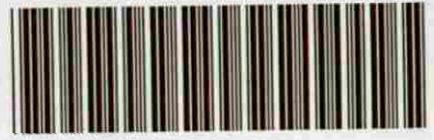
SB951

.3

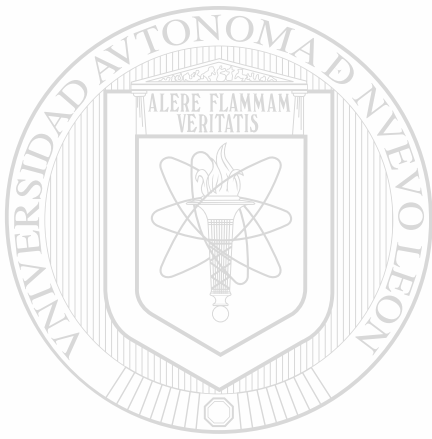
.R67

1999

c.1



1080087092



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

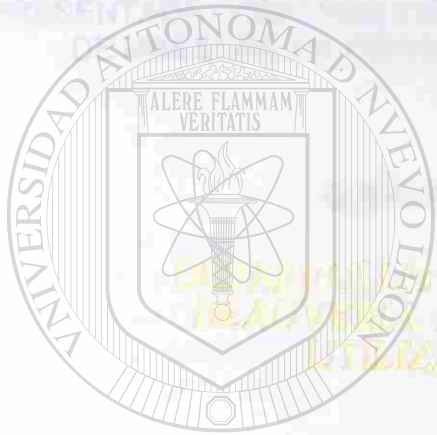


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9644

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DESARROLLO DE FORMULAS ASPERJABLES DE Scoparia basilaris
UTILIZANDO DIVERSOS POLIMEROS



PRESENTA NINEA ROSAS GARCIA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Q.B.P. NINEA MARIA ROSAS GARCIA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

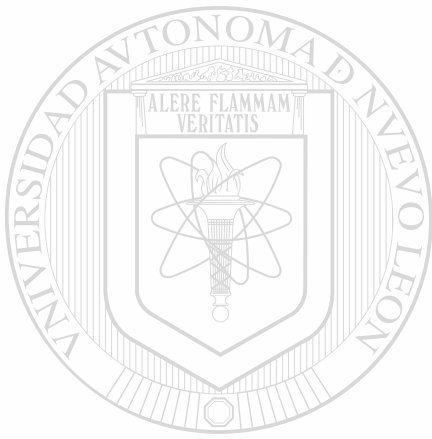


MONTENREY, N. L., MEXICO

ABRIL 1999

1

17



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BUR
UR
NOB
F
23
UANL
FONDO
TES MAESTRIA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DESARROLLO DE FORMULADOS ASPERJABLES DE *Beauveria bassiana*
(Balsamo Vuillemin) UTILIZANDO DIVERSOS POLÍMEROS**

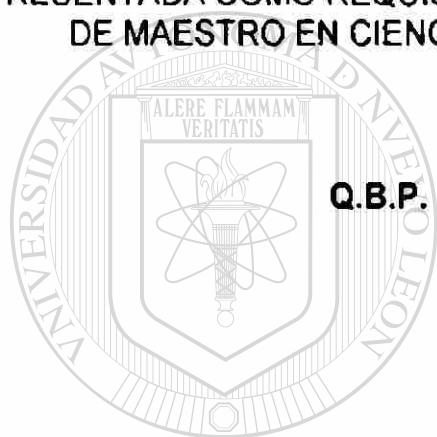
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA.

POR

Q.B.P. NINFA MARÍA ROSAS GARCÍA

APROBADA:
COMISIÓN DE TESIS




UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
DIRECTOR
PRESIDENTE


DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO
CODIRECTOR
SECRETARIO


DR. LUIS J. GALÁN WONG
VOCAL



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo "Dr. H.T. Dulmage", del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., así como en la Unidad de Planta Piloto del Instituto Tecnológico de Durango. Bajo la Dirección de la Dra. Lilia H. Morales Ramos y la Codirección de la Dra. Katiushka Arévalo Niño.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

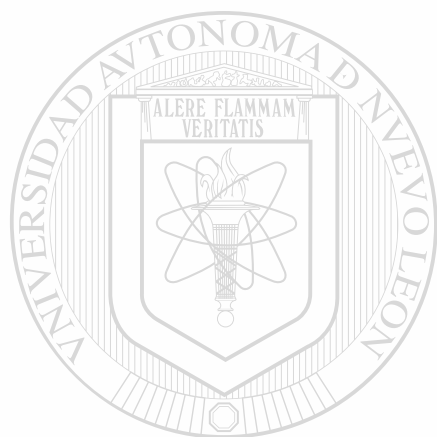


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
IMPORTANCIA	5
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN	5
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
OBJETIVOS PARTICULARES	6
ANTECEDENTES	7
Proceso Infeccioso	7
Producción de Metabolitos por Hongos	9
Cultivo	15
Formulación, Vida de Anaquel y Aplicación	16
Soportes Utilizados en las Formulaciones	21
Formulación de Conidias	22
Formulaciones con Blastosporas	24
Formulaciones con Micelio	24
Insecto Blanco	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Materiales	27
Selección de las Cepas	26
Bioensayo para Selección de la Cepa	28
Producción y Obtención de Conidias	28
Producción y Obtención de Micelio	29
Elaboración de los Formulados	29
Determinaciones Realizadas a los Formulados	32
Recuperación de los Formulados después del Secado por Aspersión	32
Contenido de Humedad	32
Concentración de Conidias Totales Iniciales en los Formulados	33
Viabilidad de las Conidias después del Secado por Aspersión	33

Porcentaje de Germinación	33
Mortalidad en Larvas de <i>T. ni</i> en Dieta Artificial	34
Mortalidad de Larvas de <i>T. ni</i> a Nivel de Invernadero	34
Microscopía Electrónica de Barrido	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	64



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Clasificación de Formulaciones	18
2	Clasificación de Adyuvantes	20
3	Procedimiento de Elaboración de los Formulados	30
4	Condiciones Establecidas en el Secador por Aspersión para el Secado de los Formulados	31
5	Condiciones Establecidas en el Secador por Aspersión para el secado de los Formulados Blanco	31
6	Características Morfológicas de Macro y Microcultivos de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	41
7	Bioensayo de Selección de la Cepa	41
8	Recuperación de los Formulados después del Secado por Aspersión	42
9	Porcentaje de Humedad Contenido en los Formulados	42
10	Concentración de Conidias en los Formulados	43
11	Efecto de las Diferentes Formulaciones de <i>B.</i> <i>bassiana</i> en la Mortalidad de Larvas de <i>T. ni</i> en Dieta Artificial	49
12	Efecto de las Diferentes Formulaciones de <i>B.</i> <i>bassiana</i> en la Mortalidad de Larvas de <i>T. ni</i> en Hojas de Frijol	50

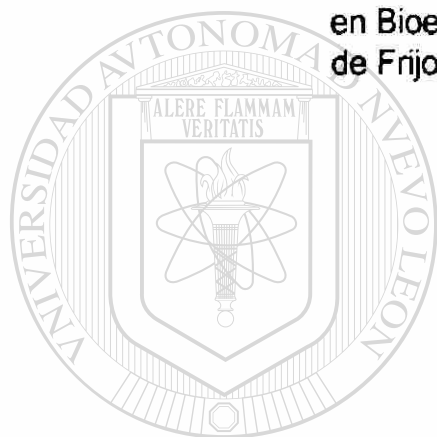
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica No.	Título	Página
1	Porcentaje de Germinación de los Formulados Recién Elaborados	44
2	Determinación del Porcentaje de Germinación a Formulados Almacenados en Refrigeración a 4°C	45
3	Determinación del Porcentaje de Germinación en Formulados Almacenados a Temperatura Ambiente (16-32°C)	46
4	Porcentaje de Mortalidad en Larvas de <i>T. ni</i> en Bioensayo en Dieta Artificial	47
5	Porcentaje de Mortalidad en Larvas de <i>T. ni</i> en Bioensayo a Nivel de Invernadero con Hojas de Frijol	48



UANL

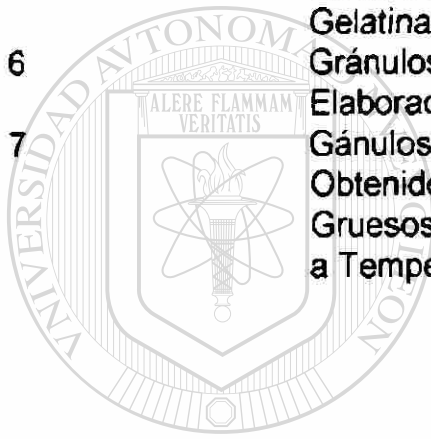
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Larva Sana y Larva Infectada de <i>T. ni</i>	51
2	Conidias de <i>Beauveria bassiana</i>	52
3	Gránulos del Blanco y del Formulado Elaborados a Base de Gelatina	53
4	Gránulos del Blanco y del Formulado Elaborados a Base de Pectina	54
5	Gránulos del Blanco y del Formulado Elaborados a Base de la Mezcla de Gelatina/Pectina	55
6	Gránulos del Blanco y del Formulado Elaborados a Base de Capsul	56
7	Gánulos Elaborados a Base de Capsul y Micelio Obtenidos por Secado por Aspersión y Fragmentos Gruesos de la Mezcla de Capsul y Micelio Secada a Temperatura Ambiente	57



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento:

A la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos por su magnífica dirección en el desarrollo de este trabajo así como también por sus valiosos comentarios, sugerencias y apoyo.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por los consejos brindados y sus excelentes comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por las observaciones realizadas a este trabajo y por el apoyo brindado.

A la Dra. María Julia Verde Star, Subdirectora de Postgrado, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., por todas las facilidades y apoyo brindados.

Al Dr. Hiram Medrano Roldán por todas sus atenciones y por las facilidades proporcionadas en la Unidad de Planta Piloto del Instituto Tecnológico de Durango, para la realización de una parte de este trabajo.

Al Dr. Rafael Castro por sus sugerencias y comentarios.

Al M.C. Jorge L. Hernández Piñero por su excelente apoyo fotográfico y todas las facilidades brindadas en la Unidad de Microscopía Electrónica de la F.C.B., U.A.N.L.

Al M.C. Carlos Francisco Sandoval Coronado por sus sugerencias y ayuda brindadas durante este trabajo.

Al Q.B.P. José Ruiz Ordóñez por el tiempo dedicado a la preparación de las muestras utilizadas en el Microscopio Electrónico.

A la Q.F.B. Enriqueta Martínez Rojas por su apoyo fotográfico, sus sugerencias y amistad.

Al Sr. Feliciano Molina por su colaboración y gran ayuda en la realización de los bioensayos.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, quiero expresarles mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la oportunidad de Vivir

A Mis Padres Víctor Manuel y Ninfa de quienes sólo recibí cuidados, cariño y amor

A Mis Hijos Fernanda Cecilia y Alejandro Alberto quienes me han enseñado con su amor a dar lo mejor de mí.

A mi Esposo Martín Alberto con quien comparto mis alegrías y tristezas y de quien sólo he recibido amor y apoyo incondicional

A Víctor Manuel por el amor fraternal que nos une.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Feliz el hombre que se dedica a la sabiduría y se hace preguntas hasta que tenga respuestas, que interioriza los caminos de la sabiduría y reflexiona en sus secretos, que la persigue como el cazador, acecha sus pasos, atisba por sus ventanas y escucha en sus puertas, acampa junto a su casa y fija sus estacadas junto a sus murallas.

(Sir 14, 20-24)

RESUMEN

Actualmente hay un gran interés en el uso de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, debido a los efectos negativos que tienen los insecticidas químicos. Hay alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos y *Beauveria bassiana* ha sido uno de los más extensamente estudiados. Este hongo tiene un amplio rango de hospederos (alrededor de 200 especies de insectos) e infecta a los insectos cuando las conidias se unen a las cutículas de éstos y las penetran, teniendo una variación en la virulencia debido a producciones enzimáticas y otras actividades. En este trabajo se seleccionó la cepa 139 de *Beauveria bassiana* por tener un rápido crecimiento (aproximadamente de 7 días) y buena toxicidad (mayor a 44%), esta cepa se formuló con polímeros de gelatina, pectina y Capsul utilizando conidias y micelio, sometiéndose a un proceso de secado por aspersión para obtener un polvo fino. El proceso de recuperación causó pérdida en todos los formulados, excepto con el Capsul, donde se recuperó el 100%. A estos formulados se les determinaron diversos parámetros como fueron rendimiento, humedad, estabilidad a temperatura ambiente y de refrigeración, porcentaje de germinación y mortalidad causada a larvas de *Trichoplusia ni* en bioensayos en laboratorio y a nivel de invernadero con hojas de frijol. Todos los formulados tuvieron una pérdida drástica en el número y la viabilidad de las conidias que quedaron encapsuladas quedando con un valor menor al 12% de viabilidad inicial, sólo el formulado de gelatina mostró una viabilidad cercana al 16%. Sólo el formulado de Capsul con conidias tuvo la humedad adecuada, mientras que los demás estuvieron por arriba de este valor. Ninguno de los formulados mostró tener estabilidad a temperatura ambiente al término de un mes, sin embargo, a temperaturas de refrigeración conservaron poca viabilidad al menos por espacio de 60 días, el formulado de gelatina mostró un comportamiento de recuperación en las conidias, ya que su viabilidad fue en aumento, el formulado de Capsul, sólo inicialmente mostró una ligera recuperación en la viabilidad de las conidias, pero esta decayó rápidamente hasta llegar a cero. Las conidias de todos los formulados tardaron un mínimo de 12 horas en empezar a germinar, lo cual indica que sufrieron daño durante el proceso de secado. En los bioensayos con dieta artificial y a nivel de invernadero se utilizó una temperatura entre los 22 y 26°C y una humedad relativa del 80%. En ambos tipos de bioensayo de mortalidad, hubo diferencia significativa de la mortalidad en el formulado de gelatina y en las suspensiones de conidias puras y de micelio puro utilizadas. Sin embargo, las suspensiones de conidias y micelio mostraron mayor mortalidad, ya que éstas no fueron sometidas a ningún proceso, por lo que conservaron su viabilidad. Los blancos de gelatina y pectina utilizados en ambos bioensayos también causaron mortalidad posiblemente debido a su composición y consistencia.

INTRODUCCION

El control biológico es el uso de enemigos naturales que ayuda a regular las poblaciones de las plagas, ya que involucra el uso de parásitos, depredadores o patógenos tales como hongos, bacterias, virus, protozoarios y nemátodos que atacan, lastiman o matan a las plagas blanco. Los plaguicidas microbianos están constituidos por organismos vivos, así como también de los metabolitos producidos por dichos microorganismos. El interés en los agentes de control biológico, está creciendo, porque ellos son seguros, (tienen un blanco específico), no contaminan y algunas veces son más efectivos que los químicos, además es difícil para el insecto blanco desarrollar resistencia. Aunque la gran mayoría de los insectos son benéficos o inofensivos al hombre, el control de algunas especies de plagas, ha sido un reto desde el comienzo de los tiempos. Actualmente, menos del 1% de las especies de insectos conocidos son considerados plagas (Davidson y Lyon, 1979). Estos insectos destruyen cosechas, dañan las viviendas, se alimentan de la comida y aún atacan a la gente. En respuesta a estas plagas, algunos de los productos químicos más letales conocidos han sido desarrollados y esparcidos a través de todo el ambiente. Aunque ellos son efectivos en un período de tiempo corto, los plaguicidas químicos son caros y dan solamente un remedio temporal, ya que las capacidades reproductoras y evolutivas de los insectos les permiten desarrollar mecanismos de resistencia a estas y otras estrategias de control.

Muchos hongos patógenos son importantes como agentes de control biológico natural de muchos insectos y de otros artrópodos, frecuentemente causan epizootias que reducen significativamente las poblaciones del hospedero. Los intentos por manipular a los hongos como agentes de control biológico empezaron a finales del siglo diecinueve, con poco o moderado éxito, pero fue hasta finales de la década de los sesenta, cuando el interés en el uso de los hongos como agentes de control biológico se incrementó debido a problemas con el control por agentes químicos (Roberts, 1979).

Hay alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenicos (Roberts, 1989). De éstos, *Beauveria bassiana* ha sido uno de los más ampliamente estudiados desde que fue primeramente reportado como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* L. por Agostino Bassi en 1834 (Feng, et al 1994).

Los hongos entomopatógenos infectan a los insectos, por medio de sus conidias, las cuales germinan en la cutícula del insecto y la penetran, interviniendo algunas enzimas y fuerzas mecánicas; algunas cepas de estos hongos producen suficientes toxinas como para causar la muerte del insecto, en otras cepas, que son productoras débiles de toxinas, el micelio se ramifica a través de los órganos internos causando así la muerte (Roberts y Yendol, 1971). Ellos son los principales patógenos entre los insectos chupadores (Hajek y St. Leger, 1994), de hecho, las micosis son comunes en ciertos grupos taxonómicos como Lepidoptera (palomillas, mariposas); Homoptera (particularmente áfidos); Hymenoptera (abejas); Coleoptera (escarabajos) y Diptera (moscas y mosquitos), (Roberts y Yendol, 1971).

El uso de hongos entomopatógenos para el control biológico en ecosistemas manipulados ha seguido cuatro estrategias básicas (Ignoffo, 1985):

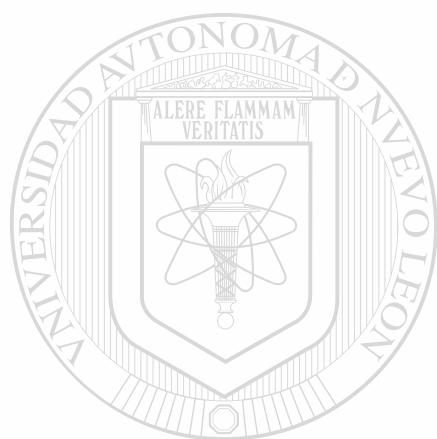
- 1) Conocimiento de los impactos del control biológico natural.
- 2) Incremento de enemigos naturales.
- 3) Aumento de los impactos a través de manipulaciones activas.
- 4) Introducción de enemigos naturales exóticos.

Los hongos entomopatógenos son importantes reguladores naturales de muchas poblaciones de artrópodos, incluyendo varias especies de plagas. Se han utilizado una gran variedad de estrategias para manipular a los hongos en programas de control biológico.

El uso inteligente de los hongos como agentes de control biológico, requiere el conocimiento detallado de su patobiología, epizootiología y de las interacciones con otros componentes de los ecosistemas en los cuales son utilizados. Las modificaciones genéticas tienen el potencial para mejorar su eficacia como agentes de control biológico. El desarrollo de cepas microbianas efectivas, es, de alguna manera un obstáculo menor comparado con el perfeccionamiento de los métodos de formulación y aplicación de bioinsecticidas.

Fundamentalmente, el papel de una formulación, es proveer un microambiente óptimo para el organismo durante el almacenamiento y después de su aplicación. Ciertos gránulos, pellets o briquetas que incorporan al organismo son ventajosas en este sentido, porque la estructura de su matriz es ideal para proteger al organismo y los

adyuvantes, tales como los nutrientes microbianos también pueden ser incorporados en este tipo de formulados. (Connick, 1990).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IMPORTANCIA

Los requerimientos para la formulación de agentes biológicos son idénticos a aquellos de los químicos, sin embargo, la naturaleza biológica del ingrediente activo posee algunos problemas únicos.

En todos los casos, el agente de control biológico debe ser formulado y mantenido en una forma viable o activa, ya que el microorganismo puede ser fácilmente inactivado o muerto por condiciones ambientales desfavorables. Esto puede ocurrir durante el mismo proceso de formulación, si el organismo es expuesto al calor, tensión, compuestos tóxicos, desecación o germinación prematura en presencia de humedad. El proceso de formulación, debe, por lo tanto, ser cuidadosamente diseñado para los requerimientos particulares y limitaciones de cada organismo (Rhodes, 1993).

Por lo tanto, la importancia de este trabajo, se basa en la utilización de diversos polímeros tales como la gelatina bovina, la pectina de limón, y el almidón de maíz modificado (Capsul), para obtener un formulado adecuado de *Beauveria bassiana*, que permita utilizar a este micoinsecticida eficazmente ampliando de esta manera los recursos para el control biológico de plagas.

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

Entre las diversas estrategias utilizadas para el manejo de las plagas de insectos, el uso de agentes de control biológico es una de las opciones más prometedoras, en la necesidad de desarrollar herramientas alternativas no químicas para el control de las plagas. Actualmente los agentes de control biológico se han desarrollado más, gracias a la utilización de bacterias, sin embargo, otro tipo de organismos tales como depredadores, parasitoides, nemátodos, hongos, etc., se han utilizado en el desarrollo de agentes de control biológico, es por eso, que en este trabajo queremos diseñar una formulación adecuada para la utilización de *Beauveria bassiana* como agente de control biológico que permita tener más opciones para el combate de plagas.

HIPÓTESIS

Es posible obtener formulados de *Beauveria bassiana* con al menos uno de los polímeros de gelatina, pectina y almidón de maíz modificado (Capsul), sin afectar la viabilidad y toxicidad de este micoinsecticida.

OBJETIVOS

- I. Probar el uso potencial de la gelatina, pectina y el almidón de maíz modificado (Capsul) para desarrollar formulados asperjables de *Beauveria bassiana*.
- II. Medir la viabilidad y porcentaje de germinación de las conidias y de micelio, en los formulados, así como su actividad insecticida contra larvas de *Trichoplusia ni*.
- III. Medir la estabilidad de los formulados a temperatura de refrigeración y a temperatura ambiente.
- IV. Realizar una medición de la eficacia de los formulados a nivel de invernadero.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Seleccionar una cepa de *Beauveria bassiana* para la elaboración de los formulados.
- B. Establecer las condiciones de los bioensayos.

ANTECEDENTES

La preocupación acerca de los efectos negativos de los insecticidas químicos ha enfatizado estrategias alternativas para el control de plagas.

En todo el mundo está resurgiendo el interés en el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.

En los últimos años, *Beauveria bassiana* ha sido uno de los hongos entomopatógenos más estudiados y utilizados para el control de muchas plagas de insectos importantes alrededor del mundo (Feng y Johnson, 1990).

PROCESO INFECCIOSO:

Según el modo general de infección, hay evidencia de que *B. bassiana*, puede infectar insectos, particularmente aquellos con mandíbulas como *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Ignoffo, et al. 1983); *Solenopsis invicta*, *Dendrolimus punctata*, *Blattella germanica*, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) (McDowell, et al. 1990); *Trichoplusia ni* (Ignoffo y García, 1982); *Bombyx mori*, *Melanopus sanguinipes*, áfidos de cereales (Knudsen, et al. 1990); *Diabrotica undecimpunctata* (Pereira y Roberts, 1991); *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) (Gottwal y Tedders, 1984); *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Lewis, 1997); *Bemisia argentifolii* (Wraight, 1997); *Acanthocelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus*[®] (Coleoptera: Bruchidae) (Pérez y Pérez, 1997); *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) (Feng y Johnson, 1990); *Hypothenemus hampei* (Castillo, 1997); *Malacosoma americanum* (Lepidoptera: Lasiocampidae) (Leathers y Gupta, 1992); *Scotinophara coarctata* (Hemiptera: Pentatomidae) (Rombach, et al. 1986); *Pieris rapae*, *Plutella xilostella* (Ignoffo, et al. 1979). Asimismo se ha reportado que las larvas de algunas especies de *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* son susceptibles a conidias de *Beauveria bassiana* (Clark, et al. 1968).

B. bassiana no tiene ciclo sexual conocido, los insectos son infectados por las conidias las cuales se unen a la cutícula del hospedero. La conidia germina en un ambiente altamente húmedo. Los tubos germinativos se desarrollan de la conidia y penetran la cutícula del hospedero e invaden el hemocele. Una infección exitosa de *B.*

bassiana, es dependiente, primariamente, de varias actividades enzimáticas para la degradación de proteínas, quitina y lípidos en el integumento del insecto (Khachatourians, 1991). Los hongos entomopatógenos tienen la ventaja de actuar por contacto, sobre los virus o las bacterias entomopatógenas que requieren ser ingeridos para que su eficacia se lleve a cabo; aunque también existe otras rutas de infección para estos hongos, como son el tracto digestivo, las tráqueas y las heridas (Broome, et al. 1975).

La patogénesis se inicia por la adhesión de una conidia (espora), a la cutícula del insecto. La secreción de un moco adhesivo, así como el hinchamiento de la conidia durante el desarrollo de la pregerminación, refuerza las interacciones hidrofóbicas iniciales entre la conidia y la superficie de la cutícula, lo cual es un requisito para el proceso de infección. Esta unión no específica de las conidias a la cutícula del insecto está mediada por interacciones hidrofóbicas entre la epicutícula del insecto y las paredes celulares de la conidia (Jefferies y Khachatourians, 1997). La naturaleza de los grupos electrostáticos y sus puntos isoeléctricos específicos, juntos, contribuyen a las propiedades totales de la superficie de la espora en la unión inicial, y ciertamente pueden afectar los valores de hidrofobicidad. Esta estimación precisa de la hidrofobicidad de la superficie de la espora, usando una técnica de agregación de sal y sedimentación (SAS), tiene aplicaciones en el diseño y formulación de micoplaguicidas, (Jefferies y Khachatourians, 1997), ya que sirve para seleccionar aislados de hongos que produzcan esporas con hidrofobicidades de superficie deseables, que promuevan la unión inicial a los insectos blanco.

Una infección puede ser abortada en la epicutícula, si un factor esencial para la fase de adhesión, el desarrollo microbiano o la patogénesis, está ausente. Específicamente la infección puede prevenirse si hay baja humedad, o por una incapacidad para utilizar los nutrientes disponibles en la superficie de la cutícula, o la ausencia de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o el sitio de infección penetrable (Hajek y St. Leger, 1994).

Existen enzimas y fuerzas mecánicas que están involucradas. En la mayoría de los casos, pero no en todos, unos fragmentos de micelio parecidos a levaduras llamados cuerpos hifales se producen y se multiplican en el hemocele. Algunas cepas

producen suficientes toxinas en esta etapa para causar la muerte, para aquellas cepas que son productoras de toxinas débiles, el micelio se ramifica a través de los órganos internos. Cheung y Gula en 1981, demostraron en *Heliothis zea*, que después de una infección de *Beauveria bassiana*, los cambios en los componentes de la hemolinfa incluyen una rápida disminución de algunas proteínas, disminución total de aminoácidos, desaparición total de azúcares menores y posiblemente un pequeño incremento en la glucosa, además la larva deja de alimentarse, ya que el tracto alimentario es invadido en las primeras etapas de la infección. Esto continúa así hasta que el insecto está virtualmente lleno del hongo y bastante firme al tacto. Los conidióforos producidos son arrojados a través de la cutícula y produce esporas fuera del insecto.

En el caso de los vertebrados, la seguridad de este hongo entomopatógeno, no ha sido completamente resuelta. La mayoría de los estudios indican que *Beauveria bassiana* es relativamente no tóxico o no infeccioso para los vertebrados (Genthner y Middaugh, 1992). Sin embargo Roberts y Yendol en 1971, hacen referencia a un estudio realizado por Hall en 1954 donde se reportan reacciones alérgicas causadas al hombre después de cosechar esporas de *Beauveria bassiana*, sugiriendo que esta reacción resulta de la inhalación de las esporas, además se han reportado casos de beauperiosis en el cocodrilo cautivo y en la tortuga gigante de tierra, Genthner y Middaugh en 1992 demostraron los efectos adversos de *Beauveria bassiana* en embriones del pez *Menidia beryllina* que fueron expuestos a conidias de este hongo, causando ruptura y muerte del embrión, por lo que estos estudios sugieren que es necesario hacer pruebas adicionales de seguridad.

PRODUCCION DE METABOLITOS POR LOS HONGOS:

La producción de enzimas por hongos entomopatógenos que los capacitan a penetrar el cuerpo de los insectos ha sido estudiada desde hace tiempo (Leopold y Samsináková, 1969), (Gabriel, 1967), (Kucera y Samsináková, 1968).

Actualmente poco se sabe acerca de las bases genéticas y moleculares de la patogenicidad fúngica hacia los insectos, y esto ha impedido a la ingeniería genética de hongos, mejorar el potencial de control. Sin embargo numerosos estudios han ganado

ímpetu en años recientes con la aplicación de rigurosas técnicas microbiológicas y enzimáticas enfocadas a la significancia biológica de enzimas y toxinas bien caracterizadas en las interacciones insecto-patógeno (Hajek y St. Leger, 1994).

La variación en la virulencia de *B. bassiana* también está relacionada a la producción de enzimas y actividades durante el curso de la penetración a la cutícula del hospedero (Bidochka y Khachatourians, 1990)

Los hongos patógenos poseen un fascinante arreglo de mecanismos que les permite causar la muerte del hospedero y la asimilación de materiales, mientras vencen los mecanismos de resistencia del hospedero. Para la mayor parte, los metabolitos fúngicos ayudan al patógeno con los aspectos físicos de ingreso, por ejemplo a) enzimas degradadoras de la cutícula, que activamente destruyen o modifican la integridad estructural del hospedero, b) la inhibición de procesos selectivos o de enzimas del hospedero, c) la interferencia con los sistemas reguladores del hospedero. Tales daños asociados con los síntomas de la enfermedad pueden ser producidos tanto por las enzimas del patógeno como por sus metabolitos de bajo peso molecular (toxinas). (Hajek y St. Leger, 1991), (Lysenko y Kucera, 1971).

Sin embargo hay discrepancias entre autores, la beauvericina es un antibiótico ionóforo tóxico producido por *Beauveria bassiana*, sin embargo en un estudio realizado por Champlin y Gula en 1979, se determinó el papel de esta beauvericina en la entomopatogenicidad de este hongo y se observó que no estaba presente en una forma soluble, durante el tiempo en el que la mayoría de las larvas de *Heliothis zea* murieron por la infección fúngica, sin embargo, Hamill, *et al.* 1969 reportó que era tóxica a camarones y larvas de mosquitos. La cepa Nov. EO-1 de *Beauveria bassiana*, consistentemente sintetiza un pigmento rojo llamado oosporeína, esta cepa tiene una alta patogenicidad contra los insectos del suelo, así como en insectos de follaje, esto sugiere que la oosporeína puede jugar un papel en el proceso de infección de los insectos (Eyal, *et al.* 1994).

El papel preciso de cualquiera de estos componentes, al causar la muerte del insecto, no ha sido elucidado y es más dependiente de las interacciones específicas insecto-patógeno (Hegedus y Khachatourians, 1994).

La degradación enzimática de la cutícula del hospedero, puede resultar de enzimas extracelulares o de enzimas similares que permanecen unidas a las paredes celulares del patógeno. Las enzimas extracelulares correspondientes a los principales constituyentes químicos de la cutícula del insecto, tales como proteína, quitina y lípidos se han detectado en *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Entomophthora* spp y *Cordyceps militaris*.

La naturaleza y especificidad de adsorción de cualquier enzima a la cutícula, podría tener importantes implicaciones en la patogénesis, una enzima sin la habilidad para ser adsorbida puede carecer de actividad con independencia de su especificidad de unión (St. Leger, et al. 1986). Por el contrario, una fuerte adsorción a los componentes de la cutícula podrían inmovilizar la actividad enzimática completamente o limitar la degradación enzimática a la vecindad de las estructuras fúngicas.

Después de estudios realizados con enzimas extracelulares de *Metarhizium anisopliae* (Leger, Charnley y Cooper, 1986), se demuestra que las enzimas fúngicas degradadoras de la cutícula tienen una considerable afinidad por la cutícula del insecto y que la habilidad de la proteasa, para degradar la cutícula obviamente está gobernada por sus características de adsorción y su especificidad de unión, la degradación de las proteínas solubilizadas deberá ejecutarse por una variedad de exo y endopeptidasas, las cuales son producidas por aislados de *M. anisopliae* (St. Leger et al, 1986).

Indudablemente muchas enzimas patógenas son determinantes importantes de virulencia, porque ellas capacitan al patógeno a coexistir con los procesos metabólicos cambiantes asociados con el estado de enfermedad del hospedero.

La producción de enzimas quitinolíticas extracelulares, puede ser oportuna para el estado de penetración del hongo en la quitina del insecto (Havukkala, 1993).

Un estudio demuestra que la quitinasa, para la penetración de la cutícula de *Manduca sexta*, se produce a niveles muy bajos por las estructuras de infección en la superficie de la cutícula y durante la penetración inicial de la cutícula, pero grandes niveles de quitinasa se acumulan en zonas de degradación proteolítica; esto sugiere que la liberación de la quitinasa es dependiente de la accesibilidad del sustrato (St. Leger, et al. 1996).

La virulencia es la habilidad de un hongo entomopatógeno para causar la muerte y comúnmente se mide a una tasa a la cual ocurre la muerte. Un factor de virulencia puede ser definido funcionalmente como un proceso involucrado en la muerte del insecto durante la patogénesis. Si la función de un factor de virulencia es interrumpido, puede extenderse el tiempo de curso del proceso de la enfermedad que lleva al insecto a la muerte.

El funcionamiento de factores de virulencia puede ser dividido en unidades de tiempo de procesos interactivos o discretos durante el curso de la infección y la enfermedad y como tal puede ser medido cuantitativamente.

La posibilidad de que la virulencia pueda estar correlacionada con la producción de enzimas degradadoras de la cutícula, ha estimulado varios estudios en los cuales estos factores son comparados en aislados o en mutantes. Los resultados obtenidos habían sido contradictorios y no se había demostrado concluyentemente ninguna enzima entomopatógena como un factor de virulencia. Sin embargo Leger y cols. en 1988 probaron la enzima Pr1 (que es una proteasa básica producida por *M. anisopliae*) con especificidad de quimioelastasa, donde utilizaron anticuerpos IgG antiPr1. La incorporación de anticuerpos retrasó la penetración de la cutícula, lo que sugiere fuertemente que el inhibidor específico de Pr1 limita la entrada del hongo al insecto y por lo tanto se reduce la infección. Con esto se concluye que Pr1 sirve como un factor de virulencia causando la destrucción localizada de las proteínas de la cutícula, lo cual permite una rápida invasión del hospedero con la provisión concomitante de nutrientes.

Otro estudio que confirma que las enzimas actúan como factor de virulencia, fue realizado por Bidochka y Khachatourians en 1990, en donde una proteasa extracelular producida por *B. bassiana* juega un papel clave en la hidrólisis de la cutícula y la entrada del hongo al hemocele del saltamontes *Melanopus sanguinipes*. Ellos probaron cepas eficientes y deficientes en la producción de proteasa y concluyen que se extendió el tiempo de curso de la patogénesis hacia *M. sanguinipes* en las cepas de *B. bassiana* deficientes en proteasas.

Estos datos de mutantes deficientes de proteasas no establecen efectos fenotípicos (incluyendo virulencia) para ser relacionado a una mutación puntual.

Según un estudio realizado (St. Leger, *et al.* 1992), cada especie que fue estudiada, produjo una colección heterogénea de quitinasas, de las cuales, se puede concebir que juegan un papel importante en su habilidad para adaptarse a diferentes ambientes incluyendo aquellos provistos por el insecto.

En algunos casos, el fracaso del hongo para invadir la cutícula del insecto se ha atribuido a la presencia de compuestos inhibitorios, (fenoles, quinonas y lípidos), en la superficie de la cutícula. Sin embargo no hay evidencias circunstanciales que indiquen que cualquiera de estos compuestos estén involucrados en la resistencia a la enfermedad.

Las proteínas cuticulares parecen ser la principal barrera estructural para la penetración de *Beauveria bassiana*, pero también son la fuente nutricional más importante para el desarrollo de este hongo (Bidochka y Khachatourians, 1992).

El grado de resistencia depende de los efectos combinados del espesor de la cutícula, la resistencia de tensión impartida a la cutícula por el sistema lamelar de quitina y el grado de endurecimiento de la cutícula por esclerotización, además existe una respuesta celular por parte del insecto, ya que en un trabajo realizado por Hung *et al.*, en 1992 se demuestra que este hongo es rápidamente fagocitado por los hematocitos circulantes de larvas de *Spodoptera exigua*, sin embargo este patógeno es completamente resistente a la respuesta fagocítica, ya que es capaz de desarrollarse en los granulocitos, salir de ellos y reproducirse, por lo tanto, estos autores proponen que la respuesta de defensa celular es el blanco inicial de los metabolitos producidos durante el crecimiento *in vivo* de *Beauveria bassiana*, ya que las observaciones microscópicas, sugieren que estos metabolitos están atacando a la membrana celular de los hematocitos y/o a las funciones citoesqueléticas. Se cree que las células fúngicas fagocitadas funcionan como un foco de infección debido a que la producción de metabolitos fúngicos suprime la respuesta fagocítica general de los granulocitos circulantes, entonces *Beauveria bassiana* parece poseer capacidades multifacéticas, tanto para suprimir como para eludir la respuesta de defensa celular de *Spodoptera exigua* (Hung y Boucias, 1992).

La presencia de compuestos fenólicos y tirosinasas en el integumento del artrópodo, frecuentemente provoca una melanización (oscurecimiento de la cutícula)

localizada alrededor de la hifa penetrante del hongo patógeno. Dada la conocida susceptibilidad de los microorganismos y sus enzimas a los fenoles, se presume que las reacciones de melanización tienen efectos antifúngicos, aunque en relativamente pocos ejemplos estas reacciones son suficientes para prevenir la penetración. Hay 5 mecanismos para los cuales un efecto antifúngico puede ser ejercido:

- 1.- Los fenoles y los compuestos fenólicos oxidados, tales como quinonas y melanina pueden ser directamente tóxicos al hongo o pueden inactivar sus enzimas.
- 2.- La cutícula melanizada puede ser más resistente a la penetración mecánica.
- 3.- La cutícula melanizada puede ser resistente al ataque enzimático y a la degradación fúngica.
- 4.- La melanina puede restringir la difusión de enzimas o nutrientes.
- 5.- Las paredes apicales de las hifas pueden llegar a melanizarse y perder la plasticidad necesaria para el crecimiento.

La melanización de la cutícula inducida por daño físico o por los β -1,3 glucanos en la pared celular fúngica es común. La melanización frecuentemente ocurre, muy tarde, o en magnitud insuficiente, para detener el rápido crecimiento del patógeno, pero determinar el papel de la respuesta melánica en la resistencia de la enfermedad, es difícil debido al conocimiento insuficiente de las cantidades de melanina requerida para influir en la infección y la forma en las cuales la reacción melánica impediría el crecimiento fúngico (Leger, Cooper, Chamley, 1988).

En un estudio realizado por St. Leger, Durrans, Cooper y Chamely en 1988 donde trabajaron el efecto de la melanización de la cutícula de *Manduca sexta* en el crecimiento y la infección por *M. anisopliae*, determinaron que la melanina y sus precursores oxidados son tóxicos al crecimiento del hongo y reduce la producción de quimioelastasa degradadora de la cutícula. Sin embargo la melanina puede proporcionar protección adicional a los componentes biodegradables de la cutícula por traslapado o combinación con ellos, por lo tanto proporciona una barrera física a la enzimólisis. También la melanina y sus precursores pueden inhibir una o más de las hidrolasas.

CULTIVO:

B. bassiana es fácilmente cultivado en medios sólidos y líquidos como el Sabouraud o el de papa dextrosa. Las conidias aéreas son producidas en medios sólidos y en morfología e infectividad son indistinguibles de aquellas producidas en la superficie de los cadáveres de los insectos.

Actualmente la producción en masa de *B. bassiana* se basa generalmente en técnicas de fermentación difásica o sumergida. Como lo señalaron Soper y Ward 1981, la fermentación difásica combina las ventajas de ambos medios sólidos y líquidos.

En este sistema se permite que el hongo crezca hasta el final de la fase de crecimiento (fase log) para una producción máxima de biomasa de micelio, la cual es subsecuentemente transferida a sustratos inertes o nutritivos para la producción de conidias aéreas en forma de inóculo natural. Sin embargo, el método difásico es, aunque más simple, considerado más caro (Soper y Ward, 1981) y más trabajoso (Rombach 1989).

Las tecnologías de producción difásicas y sólidas se basan en un sistema de cultivo sólido en camas empacadas. Una fase líquida es absorbida en un sustrato a base de almidón. El hongo crece en las partículas del sustrato entre las cuales la fase gaseosa permanece disponible para la aereación. Este método rinde 10^{14} conidias que pueden obtenerse en volúmenes de fermentador de menos de 1 litro. Cepas de *Beauveria brongniartii* fueron cultivadas en granos enteros de cebada en bolsas de poliamida, dando un rendimiento máximo de 1×10^8 a 2×10^9 conidias/g. después de 24-42 días a 23°C (Aregger, 1992).

La fermentación sumergida es considerada la mejor tecnología que podría satisfacer los requerimientos de la producción comercial y aplicación práctica, (Belova, 1978). Samsináková y Hrabetova en 1968, señalan que la fructosa como fuente de carbono utilizada en cultivo sumergido, provoca un incremento del 25% en el peso seco de *Beauveria bassiana*.

Un producto comercial resultante de la fermentación sumergida es el Boverin, que está elaborado a base de *B. bassiana* y que fue desarrollado en la U.R.S.S. en 1970. La producción de Boverin está basada en una tecnología de fermentación de multinivel. Los dos primeros niveles de cultivo líquido en un agitador o en fermentadores

más pequeños, se diseñaron para proveer suficiente inóculo, para usarse en la inoculación de medios en fermentadores más grandes. La cosecha de esporas se hace por sedimentación de las conidias suspendidas en una solución de sulfato de aluminio o separando la pasta de esporas del cultivo líquido y posteriormente secando (Belova, 1978). El secado de la pasta de esporas requiere de la máxima preservación de la viabilidad e infectividad de la spora. Varias técnicas de secado han sido consideradas, incluyendo el secado al vacío, liofilización, secado por aspersion, secado mezclando la pasta con un relleno inerte y secado en lecho fluidizado. La liofilización que es superior a otras técnicas de secado y es recomendado para la producción de Boverin, es de uso más general (Feng, *et al.* 1994). Para conservar un alto contenido de esporas viables en el proceso de secado, se recomienda que la zona del contenido de humedad crítica de 30 a 40 % debe ser pasada tan rápido como sea posible

Existe otra técnica que fue desarrollada para el cultivo estacionario de microorganismos y que fue modificada para el cultivo de conidias de *B. bassiana*, que consiste en el uso de cojines de polietileno que requieren tubos de polietileno largos y de paredes delgadas. En el curso de la manufactura, los cojines son sellados en secciones los cuales están parcialmente llenos con un medio líquido e inflados con aire. La esterilización no es necesaria porque el proceso de manufactura de la tubería de polietileno hace el sistema estéril. El aire es introducido como se va necesitando durante el cultivo. En un medio simple conteniendo 0.8% de peptona y 1% de sorbitol, el hongo crece como una materia fúngica flotante y es cosechada por simple descarga del líquido. Se dice que este método es simple y barato. (Samsináková, *et al.* 1981).

FORMULACION, VIDA DE ANAQUEL Y APLICACIÓN:

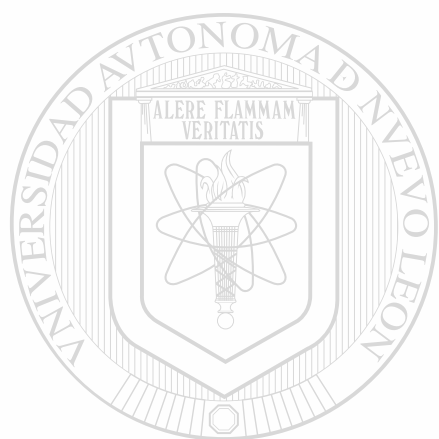
La formulación de agentes de control biológico, tiene el mismo propósito que la formulación de agentes químicos; es decir, una formulación se requiere para aplicar el ingrediente activo en una forma que sea económica, efectiva y conveniente.

Los micoinsecticidas comerciales deben ser formulados con dos objetivos en mente:

- 1.- Facilidad de aplicación en el campo a insectos blanco dentro de sus hábitats.

2.- Incremento de la vida de anaquel y persistencia en el ambiente después de la aplicación.

La apropiada formulación de un agente fúngico requiere el entendimiento del ciclo de vida y particularmente de los aspectos biológicos no sólo del hongo, sino también del insecto blanco. Los ingredientes de la formulación seleccionados deberán, al menos, no interferir con el proceso de infección y en las mejores circunstancias deberá aumentar la viabilidad fúngica, la virulencia, la transmisión de la enfermedad y la persistencia en el campo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 1 . Clasificación de formulaciones (Rhodes, D.J., 1993)

<i>Formulación</i>	<i>Código</i>	<i>Propiedades</i>
Formulaciones diluidas en agua		
Concentrado emulsificable	EC	Emulsion formada en tanques de aspersión
Emulsion agua en aceite	EO	Emulsion pre-formada
Emulsion aceite en agua	EW	Emulsion pre-formada
Concentrado en suspensión	SC	IA insoluble suspendido
Suspension de cápsulas	CS	IA suspendido en capsulas
Concentrado soluble	SL	Utilizado para IA solubles en agua
Polvo soluble en agua	SP	Polvo soluble, puede contener I inertes
Granulo soluble en agua	SG	Utilizado para IA solubles en agua
Tabletas	TB	
Briquetas	BR	Formulaciones de liberacion controlada
Polvo humectable	WP	Tiene IA, acarreador de arcilla y surfactantes
Granulo dispersable en agua	WG	IA disperso, pero no disuelto en agua
Formulaciones diluidas en solventes orgánicos		
Liquidos miscibles en aceite	OL	IA disuelto en solvente organico
Fluido miscible en aceite	OF	Suspension de liquido organico
Polvo dispersable en aceite	OP	Polvo para ser aplicado en aceite
Formulaciones aplicadas sin diluir		
Polvo para espolvorear	DP	IA acarreado en polvo libre
Granulo	GR	Aplicado a tierra y agua
Granulo encapsulado	CG	Granulo de liberacion controlada
Microgranulo	MG	Diametro abajo de 0.6 mm
Liquido electrocargable	DE	Usado con equipo de rocío electrostático
Aceite para esparcir	SO	Aplicado a superficie de agua
Liquido de ultra-bajo volumen	UL	Aplicado con rociadores de UBV
Suspension de ultra-bajo volumen	SU	Igual al anterior
Tratamiento para semillas		
Polvo para tratamiento seco de semilla	DS	
Fluido concentrado	FS	Suspension liquida
Solucion para tratamiento de semilla	LS	
Semilla cubierta	PS	
Polvo dispersable en agua	SS	
	WS	Aplicado como suspension
Misceláneo		
Concentrado de cebo	CB	Cebo diluido antes de la aplicación
Cebo	RB	
Generador de humo	FU	

I - Ingresante

A - Activo

Además del ingrediente activo y del solvente o acarreador, las formulaciones pueden contener un cierto número de adyuvantes, que se definen como compuestos los cuales ayudan o modifican la acción del ingrediente activo. Estos son necesarios, para dar al agente de control una gran ventaja competitiva, que sirva para aumentar su patogenicidad bajo un amplio rango de condiciones climáticas. Hay varias maneras en las cuales los adyuvantes pueden ayudar al patógeno, clasificándose en 4 categorías (Womack y Burge, 1993):

- 1.- Mejoramiento de la adhesión de la espora y distribución de las superficies de los hospederos.
- 2.- Aumento de la germinación de las esporas, crecimiento del tubo germinativo y formación de apresorios.
- 3.- Vencer los factores de resistencia del hospedero.
- 4.- Protección de las esporas y tubos germinativos de las influencias ambientales adversas.

Los más importantes de éstos son los surfactantes, que son compuestos que alteran la humedad y las propiedades de esparcimiento del formulado, pero algunos se requieren para optimizar la formulación (Rhodes, 1993).

En la siguiente tabla, se muestra una clasificación de adyuvantes:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2. Clasificación de adyuvantes (Rhodes, 1993)

<i>Adyuvante</i>	<i>Tipo</i>	<i>Propósito</i>
Aceites	Aceites minerales Aceites de cosecha	Mejorar el consumo Fotoestabilidad
Surfactantes	Agentes humectables Esparcidores Penetrantes	Mejorar el esparcimiento humectación, dispersión.
Agentes estabilizantes	Emulsificadores Dispersantes Agentes antifloculantes Agentes de compatibilidad	Mantener estabilidad durante la aplicación
Solventes	Cosolventes Agentes acoplantes	Mantiene al IA en solución.
Agentes higroscópicos	Humectantes	Previenen el secado prematureo de depósito
Constructores de depósitos	Adhesivos Formadores de película	Mejoran la adhesión
Modificadores de espuma	Espuma Agentes antiespumantes	Control de la espuma durante la aplicación
Agentes reguladores		Estabilizan el pH.

I.-Ingrediente
A.- Activo

Quizá la distinción más importante entre los agentes biológicos y los químicos, es que los agentes de control biológico consisten de partículas discretas, ya sean esporas, células, partículas virales o estructuras multicelulares. En general, la integridad de estas estructuras no puede ser destruida sin inactivar al agente. Los agentes biológicos pueden ser suspendidos en fluidos, pero raramente pueden ser disueltos sin pérdida de la actividad (Rhodes, 1993), ya que los patógenos de insectos son entidades vivientes insolubles, no pueden ser formulados como polvos solubles (Couch e Ignoffo, 1980).

Las tres etapas de desarrollo de *Beauveria bassiana*, conidias, blastosporas y micelio, han sido formuladas exitosamente para pruebas de campo en pequeña escala o para aplicación en gran escala.

Una formulación a base de conidias, exitosa, fue la desarrollada por Wraight y Chandler en 1992 contra *Antonomus grandis grandis* Boheman, dicha formulación está elaborada a base de productos de algodón, una feromona del gorgojo del algodón, un adhesivo, un protector de luz ultravioleta y *Beauveria bassiana*. Obtuvieron una mortalidad significativa en todas las evaluaciones.

SOPORTES UTILIZADOS EN LAS FORMULACIONES

Para las formulaciones se utilizan polímeros biodegradables, que son macromoléculas que muestran apreciable descomposición en un medio biológicamente activo.

La ventaja de utilizarlos como agentes de formulación, es que sus residuos no permanecen en el ambiente por mucho tiempo y se asegura la liberación del bioinsecticida al ambiente.

Los principales tipos de polímeros utilizados para elaborar formulaciones biodegradables incluyen: almidón y amilosa, derivados de celulosa, quitina, quitosán, ácido algínico, carragenanos, gomas, dextrán, agar, agarosa, proteínas como caseína, albúmina, queratina, gelatina, colágeno, fibrinógeno, desechos de cuero, ligninas y lignocelulosa, ácidos húmicos, poliacrilamida, alcohol polivinílico, polilactato (Wilkins, 1990).

La gelatina es un producto de la disociación térmica de las moléculas de colágeno, el cual posee una composición particular de aminoácidos con un contenido

elevado de prolina, hidroxiprolina y glicina. Posee pesos moleculares del orden de 100,000 daltons. Al enfriarse, las soluciones acuosas de gelatina, solidifican, el gel es termorreversible. La naturaleza exacta de las uniones entre cadenas, responsables de la formación de la red es aún motivo de controversia. (Berk, 1980).

La pectina es un coloide hidrofílico reversible y consiste de cadenas largas y no ramificadas de ácido poligalacturónico, con los grupos carboxilo parcialmente esterificados con alcohol metílico. Su peso molecular varía entre 20,000 y más de 400,000 daltons. Las pectinas derivadas de distintas fuentes varían ampliamente en sus propiedades gelificantes, debido a las diferentes longitudes de sus cadenas de ácido poligalacturónico y al distinto grado de esterificación con metanol de su carboxilo (Berk, 1980).

El almidón es un compuesto de poliglucosa que puede tener tamaño y formas variadas. El almidón es homogéneo y contiene sólo residuos de D-glucosa. El almidón no es una molécula simple sino mezclas de dos polisacáridos estructuralmente distintos, uno es la amilosa y el otro la amilopectina. Ambos son moléculas de poli- α -D-glucosa. La amilosa es lineal, mientras que la amilopectina es ramificada (Bohinski, 1978).

El almidón es insoluble en agua por lo que se modifica, para que pueda solubilizarse en agua. El Capsul (marca comercial) es un almidón de maíz híbrido modificado especialmente para la encapsulación principalmente de sabores y enturbiantes (Aranal Comercial, S.A. de C. V.)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FORMULACION DE CONIDIAS:

Las conidias de *B. bassiana* son de paredes lisas, globosas y tienen un diámetro de 2-3 μ m. Las conidias pueden ser suspendidas en un líquido o mezcladas con un polvo acarreador y rociadas como niebla o polvo con un equipo convencional utilizado para la aplicación de insecticidas químicos sintéticos (Feng *et al.*, 1994).

El polvo de conidias puro, cosechado mecánicamente, puede ser almacenado sin formular en contenedores herméticamente cerrados a 4^o C y aún retener una viabilidad del 71% después de 21 meses si el contenido de agua está por debajo del 10%. (Chen *et al.*, 1990). Las conidias de *M. flavoviridae* frescas cosechadas pueden almacenarse en queroseno, aceite de soya y de cacahuete con una viabilidad de las conidias arriba

del 30%, después de 6 semanas de almacenamiento a 25°C, pero a 5°C y 15°C, la viabilidad de las conidias aumenta a 71.9% con queroseno y 92.1% con soya después de 14 semanas (Stathers, *et al.* 1993).

Studdert, *et al.* en 1990 cubrieron con arcilla las conidias de *Beauveria bassiana* y éstas mostraron una supervivencia mayor en suelo con bajo contenido orgánico, que con alto contenido orgánico, lo que demuestra que la sobrevivencia de las conidias se ve influida por el efecto directo de factores físicos y poblaciones microbianas en el suelo. El recubrimiento de arcilla de las conidias para incrementar la longevidad, no tuvo influencia en la mortalidad causada en larvas de *S. exigua* (Studdert y Kaya, 1990). Algunos productos han sido preparados a base de conidias, tales como el Boverol desarrollado de Checoslovaquia a mediados de 1980, cuya formulación es un polvo insoluble en agua, se aplica como una suspensión en agua solo o en combinación con plaguicidas seleccionados o agentes humectantes. Otro es el Boverin, mencionado anteriormente, elaborado en la antigua U.R.S.S.

Debido al período de incubación de la enfermedad, el control de insectos con formulaciones de conidias de *B. bassiana* es frecuentemente más lento que con insecticidas químicos. Se espera con frecuencia que el control dependa de las combinaciones, tanto de preparaciones de *B. bassiana* como de plaguicidas. Algunos estudios han mostrado la variación en la compatibilidad de preparaciones de *B. bassiana* con diversos insecticidas, herbicidas y fungicidas químicos, tal es el caso de la formulación de conidias de *Beauveria bassiana* que se combina con insecticidas químicos. Ésta se probó contra *Leptinotarsa decemlineata*, siendo compatible y dando buenos resultados (Anderson, *et al.* 1989).

En un estudio realizado con *Colletotrichum truncatum* se observa que las esporas de este micoherbicida que son producidas en medio líquido, sólido con vermiculita y sólido con perlita y agar y secadas a temperatura ambiente, retienen altamente la viabilidad y que las esporas cultivadas en medios sólidos causan la enfermedad más severa, que aquellas obtenidas de cultivo líquido. (Silman, *et al.* 1993).

El método de aplicación de las conidias depende en gran medida del insecto, Siebeneicher, *et al.* en 1992 reportaron que para los adultos de *Solenopsis invicta*, la inmersión en la suspensión de conidias fue más efectiva y práctica que la aspersión,

además encontraron otra ruta de infección (oral) a través del uso de conidias formuladas en cebos sólidos y líquidos elaborados a base de proteína, grasa y agua.

FORMULACIONES CON BLASTOSPORAS:

Las blastosporas de *B. bassiana* producidas en medios líquidos son caracterizadas por sus paredes lisas y su forma elipsoidal (6.5x2.5 µm). Esta morfología y su inestabilidad en el proceso de secado determina que las blastosporas sólo puedan ser formuladas y aplicadas en forma limitada ya que puede ocurrir un amontonamiento, si las blastosporas son formuladas para rociarse con equipo convencional. La producción de blastosporas tiene un bajo costo de producción y buen rendimiento, sin embargo, la formulación de éstas tiene serios problemas de almacenamiento. En un estudio realizado, se observó que la máxima vida de anaquel fue de 5 a 8 meses bajo condiciones frías, secas y oscuras (Yin, *et al.* 1988).

FORMULACIONES CON MICELIO:

La incorporación de micelio dentro de pellets de alginato con o sin fuentes de nutrientes adicionales, fue originalmente desarrollada para formular agentes de biocontrol fúngico de malezas (Walker y Connick, 1983), para patógenos de suelo de plantas (Knudsen, *et al.* 1990) y ha sido recientemente aplicada para formulados de *B. bassiana* (Knudsen, *et al.* 1990), (Pereira y Roberts, 1991).

Una ventaja en la formulación de los pellets de alginato, es el aumento en la vida de anaquel y la estabilidad ambiental después de la aplicación.

Adicionalmente otros métodos han sido desarrollados para hacer formulaciones con almidón y aceite de maíz, de micelio de *B. bassiana* así como preparaciones de micelio seco puro (Pereira y Roberts, 1991).

Las preparaciones peletizadas de micelio de *B. bassiana* con alginato y formuladas con almidón aceite de maíz, no son solamente estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente, sino que tienen un potencial aumentado de producción de conidias después de varios meses de almacenamiento. Esta ventaja no existe en ninguna otra formulación de *B. bassiana* conocida hasta la fecha (Feng, *et al.* 1994).

El micelio en pellets de alginato esporula muy bien después de una rehidratación, después de estar almacenado a diferentes temperaturas. Un estudio realizado por Knudsen, *et al.* en 1990, reporta que después de 5 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, el hongo esporula profusamente a partir de los pellets con salvado produciendo $2.54 \pm 0.17 \times 10^8$ conidias, mientras que los pellets sin salvado dieron $1.77 \pm 0.1 \times 10^8$ conidias. La inclusión del salvado de trigo en los pellets de alginato parece incrementar el tamaño y la producción de las conidias en los pellets individuales, pero no aumenta el número total de conidias producidos por todos los pellets en una cantidad dada de cultivo líquido. Se ha visto que el trigo y la harina de arroz se consideran nutricionalmente benéficas en las mezclas de alginato para formulaciones de micelio de *Alternaria cassiae*, que se utilizan para producir esporas para aplicaciones micoherbidas en campo, pero se ha visto que las mezclas de alginatos que utilizan estos rellenos son muy viscosos después de someterse a la autoclave y no son adecuadas para formar los pellets. Además los productos hechos con estos materiales a una concentración del 5% no dan altos rendimientos de esporas (Daigle y Cotty, 1992).

Los pellets de micelio de *Beauveria bassiana* tratados con polietilenglicol 8000 producen conidias mucho más rápido, en comparación con los pellets no tratados, por lo que este tratamiento puede mejorar la eficacia de estos agentes de biocontrol (Knudsen, *et al.* 1991).

Pereira y Roberts en 1991 compararon la recuperación y estabilidad de 4 preparaciones miceliales de *B. bassiana*, después de estar en almacenamiento a 4 y 22°C y no hubo diferencia significativa entre el almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C.

Las preparaciones miceliales de *B. bassiana* necesitan más estudio para evaluar su eficacia en el campo antes de considerar su uso práctico. Un método desarrollado para aumentar el crecimiento y la esporulación de biomasa micelial en pellets de alginato con trigo de *B. bassiana*, consistió en colocar estos pellets en una solución acuosa de polietilenglicol de 4 a 24 horas y después dejar secar, después de esto, en los pellets tratados, la producción de conidias fue mucho más rápida (Knudsen, *et al.*

1991). Los pellets de alginato de *B.bassiana* pueden ser más prometedores contra plagas del suelo y aquellos insectos que pasan por los menos una etapa del ciclo de su vida en el suelo.

En general, se requiere por lo menos de una estabilidad de 18 meses bajo condiciones de almacenamiento ambiental para dar servicio a los mercados agrícolas (Couch e Ignoffo, 1980), sin embargo es un problema bastante difícil, la necesidad de mantener la viabilidad o la actividad durante la distribución y el almacenamiento, ya que estos productos pueden ser almacenados por períodos de 2 a 4 años (Rhodes, 1993). Sin embargo, debido a estudios realizados, se ha visto que las formulaciones a base de almidón duran mayor tiempo en almacenamiento y aumentan la esporulación, comparada con el micelio no formulado o el micelio formulado en gránulos de alginato de calcio. (McGuire y Shasha, 1995).

INSECTO BLANCO

Trichoplusia ni es un insecto lepidóptero, de gran importancia, ya que es una de las plagas más devastadoras, que ataca a una gran cantidad de cultivos, está distribuido desde Canadá hasta México, y su nombre común es "Gusano falso medidor de la col". Las larvas son delgadas hacia la cabeza, de color verde claro, con bandas longitudinales blancas, cerca de la cabeza presenta tres pares de patas y después de la mitad del cuerpo tiene 3 pares de falsas patas más anchas, la parte media del cuerpo carece de ellas y generalmente esta región se encuentra jorobada cuando descansa o se mueve. Las larvas son voraces y perforan las hojas devorando el follaje, excepto las nervaduras. Al alcanzar su máximo desarrollo (3.5 cm) pupan en un cocón color caoba envuelto con hilos blancos entretnejidos. Los adultos son palomillas nocturnas de color café jaspeado, con una mancha blanco-plateada en forma de gama en las alas anteriores, depositan de 275 a 350 huevecillos redondos de color blanco verdoso en forma aislada en el envés de las hojas. Entre los cultivos que ataca se encuentran la col, lechuga, espinaca, betabel, chícharo, apio, perejil, frijol, papa, tomate, algodón, así como también el cártamo, chile, ajonjolí, clavel, fresa, melón, soya, tabaco, berro, pepino, brócoli y sandía (Galán 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES: Gelatina bovina, pectina de limón, Almidón de maíz modificado (Capsul), Larvas de *Trichoplusia ni* neonatas, *Beauveria bassiana*.

SELECCIÓN DE LA CEPAS:

A partir de 5 cepas existentes de *Beauveria bassiana*, GHA, 137, 139, 141 y 142, del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo se realizaron varios aislamientos tomando una asada de cada cepa y colocándola en matraces conteniendo Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD) y Extracto de Levadura al 1% (Ext. Lev.) con la finalidad de obtener cultivos puros de cada una de ellas.

Una vez obtenidas las cepas puras, se procedió a sembrar en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) y Ext. Lev. al 1% para hacer una observación macroscópica de las colonias (forma, color, aspecto) y otra microscópica de las conidias y micelio. Para hacer una selección de la cepa con la cual se va a trabajar, es necesario tomar en cuenta la velocidad del crecimiento, es decir, aquella que produzca en menor tiempo los cuerpos fructíferos, las conidias y el micelio, para lo cual se realizó un microcultivo con cada una de las cepas para observar la velocidad de crecimiento y la formación de cuerpos fructíferos. Se colocaron en cajas de Petri, un portaobjetos, un cubreobjetos y un círculo de papel filtro, esto se esterilizó. Posteriormente se colocó un cuadro de 1 cm² de ASD más Ext. Lev. al 1%, en el portaobjetos, a este cuadro se le hicieron 4 punciones con una muestra de *B. bassiana*, se colocó el cubreobjetos y se humedeció el papel filtro con agua destilada estéril, se cerró la caja y durante 7 días se hicieron observaciones al microscopio para ver el desarrollo del hongo, principalmente la formación del cuerpo fructífero, se preparó un microcultivo para la observación de cada día y así llevar una secuencia del desarrollo.

Una vez pre-seleccionadas las cepas, en base a los microcultivos, se procedió a realizar un bioensayo de toxicidad contra larvas de *Trichoplusia ni* para determinar y seleccionar la(s) cepa(s) para la elaboración de los formulados.

BIOENSAYO PARA SELECCIÓN DE LA CEPA:

Con las cepas pre-seleccionadas se realizó un bioensayo de la siguiente manera:

Se preparó una dieta artificial, sin fungicida, la cual se colocó en copas, esta dieta se roció con 100µl de unas suspensiones de conidias con las siguientes concentraciones: 1.0×10^8 conidias/ml de la cepa 137; 1.42×10^8 conidias/ml de la cepa 139 y 9.4×10^7 conidias/ml de la cepa GHA y se dejaron secar, en cada copa se colocó una larva neonata de *Trichoplusia ni*, las cuales también fueron previamente rociadas con las mismas suspensiones de conidias. Las copas se taparon y se colocaron 25 de éstas en una bolsa de plástico que contenía papel filtro húmedo, para conservar la humedad, esto se hizo por triplicado, para tener un total de 75 larvas para cada suspensión de conidias a probar. El bioensayo tuvo una duración de 7 días y se determinó la mortalidad de cada cepa, para elegir aquella que causara la mortalidad más alta. Este mismo procedimiento se realizó con larvas de *Spodoptera exigua* para observar la mortalidad y comparar las susceptibilidades de ambos insectos.

La cepa elegida se aisló nuevamente de alguna de las larvas que presentó micosis, para asegurar que la cepa utilizada en los formulados fuera realmente infectiva.

Las larvas muertas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5% por 3 minutos y después se lavaron repetidamente con agua destilada estéril, posterior a este tratamiento los insectos se transfirieron a cajas de Petri que contenían un papel filtro humedecido con agua destilada estéril y se incubaron por 7 días para obtener las conidias (Silva y Messias, 1986).

PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE CONIDIAS:

La cepas se sembraron en matraces con 50 ml de CSD más Ext. Lev. al 1%, estos matraces se colocaron en agitación a 300 rpm a una temperatura entre 20 y 25°C por 24 a 48 horas. De este cultivo se tomó 1ml. con una pipeta y se colocó en una caja de Petri, posteriormente se vertieron sobre ella 25 ml de ASD + Ext. Lev. al 1% y la muestra se distribuyó por difusión, al enfriar el agar, se voltearon las cajas y se dejaron incubar de 15 a 21 días para obtener la máxima cantidad de conidias.

Posteriormente en un frasco de 250 ml con tapón de rosca se colocaron 50 ml de agua destilada y Tween 80 al 0.05%, todo esto se esterilizó. De aquí se vertieron unos

30 ml a la caja de Petri, se agitó ligeramente la superficie de ésta con una asa de Driglaski y todo el contenido se vació nuevamente al frasco, el cual se colocó en un vórtex para obtener una agitación máxima y dispersar completamente las conidias.

De esta suspensión de conidias se hizo el conteo en una Cámara de Neubauer para conocer la concentración de conidias obtenida.

PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE MICELIO:

La producción de micelio se realizó obteniendo a partir de una caja de Petri, una suspensión de conidias cuya concentración fue previamente determinada. De esta suspensión se tomó 1 ml y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio CSD más Ext. Lev. al 1%. El matraz se coloca en agitación a 250 rpm por 3 días. Si se considera necesario puede agregarse al medio, estreptomycin a una dosis de 25µg/ml, para evitar una posible contaminación bacteriana.

El micelio obtenido, es recuperado mediante filtración, en un papel filtro, posteriormente el micelio se levanta del papel filtro con una espátula y se coloca en un papel encerado, se determina el peso húmedo del micelio y se deja secar para volver a pesarse y posteriormente almacenarse.

ELABORACIÓN DE LOS FORMULADOS:

Para elaborar los formulados a base de conidias fue necesario sembrar por difusión 80 cajas Petri con ASD+ Ext. Lev. al 1%, éstas se dejaron incubar por 21 días para obtener la máxima cantidad de conidias posible. La cosecha de conidias se realizó de la manera antes mencionada, para obtener 4 suspensiones de conidias de 900 ml cada una, (una para cada formulado). Para conocer la concentración de cada suspensión se hizo un conteo en la cámara de Neubauer.

El proceso a seguir en la formulación fue el siguiente:

Los polímeros de gelatina y pectina se formularon al 2%, la mezcla de gelatina-pectina, en proporción 1:1 (Luna, 1998) y el Capsul, al 20%. La gelatina, pectina y la mezcla de gelatina-pectina se disolvieron en 250 ml de agua destilada, caliente a 60°C, las mezclas se dejaron enfriar y posteriormente se agregaron 750 ml de la suspensión de conidias para obtener 1 litro de cada formulado. El Capsul, se disolvió

directamente en 354 ml de la suspensión de conidias, sin necesidad de calentar (Tabla 3).

Tabla 3 . Procedimiento de Elaboración de los Formulados

<i>Tipo de Polímero</i>	<i>Concentración del Polímero</i>	<i>Cantidad y Temperatura del agua</i>	<i>Cantidad de Suspensión de conidias</i>	<i>Concentración de la Suspensión de Conidias (conidias/ml)</i>
Gelatina	20 g/l	250 ml a 60°C	750 ml	1.9x10 ⁹
Pectina	20 g/l	250 ml a 60°C	750 ml	2.0x10 ⁹
Gelatina-Pectina	10g/l-10g/l	250 ml a 60°C	750 ml	2.66x10 ⁹
Capsul	70.8g	—	354 ml	1.61x10 ⁹

Se elaboró un formulado de micelio con Capsul, agregando 50 g de Capsul en 250 ml de agua destilada, sin necesidad de calentamiento, y 1.3 g de micelio seco, con agitación.

Se realizó un formulado adicional de Capsul y micelio, agregando 5 g de Capsul y 6 g de micelio húmedo, ambos se incorporaron muy bien y se dejó secar esta mezcla a temperatura ambiente. Una vez seca, se procedió a moler con un mortero y se guardó en un frasco para su posterior utilización.

También se elaboraron blancos con cada uno de los polímeros, preparando 500 ml de cada uno de ellos, según el procedimiento anterior, pero sin agregar la suspensión de conidias o micelio.

Cada uno de los formulados y los blancos en forma líquida fueron introducidos a un secador por aspersion Apex Tipo SSE 68, Serie A 39854/16.1 de Apex Construction LTD mediante una bomba Watson-Marlow 502 S para obtenerlos en forma de polvo. Las condiciones que se establecieron durante el secado se muestran en las siguientes tablas tanto para los blancos como para los formulados:

Tabla 4. Condiciones Establecidas en el Secador por Aspersión para el Secado de los Formulados.

Tipo de Polímero	Gelatina con Conidias	Pectina con Conidias	Gel/Pect con Conidias	Capsul con Conidias	Capsul con Micelio
Velocidad de Alimentación	11 ml/min	11 ml/min	11 ml/min	11 ml/min	11 ml/min
Temperatura de Entrada	130°C	130-145°C	130°C	140°C	140°C
Temperatura de Salida	75°C	75-85°C	75-80°C	75-85°C	85°C
Resistencias	6	6-7	6	6-7	6
Presión kp/cm²	4	5	48	42	4

Tabla 5. Condiciones Establecidas en el Secador por Aspersión para el Secado de los Formulados Blanco.

Tipo de Polímero	Gelatina	Pectina	Mezcla de Gel/Pect	Capsul
Velocidad de Alimentación	11 ml/min	11 ml/min	11 ml/min	11 ml/min
Temperatura de Entrada	150°C	150°C	150°C	150°C
Temperatura de Salida	85°C	75°C	90°C	85°C
Resistencias	6-7	5-6	6-7	7
Presión kp/cm²	3-4	5	4	4-5

DETERMINACIONES REALIZADAS A LOS FORMULADOS:

Una vez ya obtenidos los formulados se les hicieron las siguientes determinaciones:

- Recuperación de los formulados después del secado por aspersión
- Contenido de Humedad
- Concentración de conidias totales
- Viabilidad de las conidias
- Porcentaje de germinación al inicio y después del almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración.
- Mortalidad en larvas de *T. ni* en dieta artificial y a nivel de invernadero
- Observación de los gránulos de los formulados y blancos al Microscopio Electrónico de Barrido

RECUPERACIÓN DE LOS FORMULADOS DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN:

Para determinar el peso del formulado obtenido, se realizó una diferencia de pesos entre el frasco y el formulado de la siguiente manera:

Primeramente se obtuvo el peso promedio de los frascos, después se determinó el peso total (frasco + formulado) y después se obtuvo el peso del formulado, restando el peso promedio del frasco al peso total.

Posteriormente con los resultados obtenidos de la determinación de sólidos totales, se hizo una relación a 1000 ml para obtener la cantidad de sólidos totales presentes en este volumen. Después se obtuvo el porcentaje del formulado haciendo una relación de estos sólidos totales y la cantidad de formulado obtenido

CONTENIDO DE HUMEDAD:

A cada formulado se le determinó la humedad contenida de la siguiente manera:

Se utilizaron vidrios de reloj previamente tarados, a los cuales se les agregó 0.1 g del formulado. Los vidrios de reloj con la muestra se colocaron en una estufa a 95 °C

por 24 horas, para después obtener la diferencia del peso, correspondiente a la humedad, la cual se determinó en porcentaje

CONCENTRACIÓN DE CONIDIAS TOTALES INICIALES EN LOS FORMULADOS

Se disolvió 0.01 g de cada formulado en 1 ml de agua destilada estéril, se hicieron las diluciones necesarias y se procedió al conteo de conidias en una Cámara de Neubauer.

VIABILIDAD DE LAS CONIDIAS DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN

En matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de CSD + 1% de Ext. Lev. estéril y 0.025 mg de estreptomycin, se agregó 0.05 g de cada uno de los formulados a base de conidias, y se sometieron a una agitación de 200 rpm por 24 horas, para determinar el porcentaje de germinación.

Una vez obtenido el porcentaje de germinación, se calculó el número de conidias viables, haciendo una relación entre el porcentaje de germinación y el número de conidias iniciales del formulado, el cual representa el 100% de viabilidad. El resultado se expresó en forma exponencial.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN:

®

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo cada uno 50 ml de CSD + Ext. Lev al 1% y se agregó 0.05 g de cada formulado a probar. Se colocaron los matraces en un agitador a 250 rpm y las determinaciones se realizaron en un intervalo de 24 horas. Se tomó una muestra que se colocó en un portaobjetos con un cubreobjetos y se observó al microscopio. Se contaron 100 conidias en total y de aquí se determinaron como Germinadas y No Germinadas, se consideran germinadas aquellas conidias cuyo tubo germinativo sea de la mitad del diámetro de la conidia. Esta cuenta se hizo por triplicado para cada formulado hecho a base de conidias.

MORTALIDAD EN LARVAS DE *T.ni* EN DIETA ARTIFICIAL

La determinación de la mortalidad se hizo por medio de bioensayos, los cuales se realizaron de la siguiente manera:

Se utilizaron copas del No. 0, las cuales contenían dieta artificial Shorey sin fungicida, ésta se roció con 100 μ l de una suspensión del formulado resuspendido en agua, según la cantidad de sólidos totales obtenida, para obtener una concentración de 10⁸ conidias/ml aproximadamente, el blanco correspondiente se resuspendió en base a los sólidos totales

Para cada formulado y su blanco se utilizaron 25 copas por triplicado, para dar un total de 75 copas. En cada una se colocó una larva neonata de *T. ni*. Cada copa se tapó y se colocaron 25 copas en cada bolsa de plástico con papel filtro humedecido, éstas se cerraron y se etiquetaron.

A los 7 días se determinó la mortalidad. Los resultados obtenidos de este bioensayo se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de LSD con una $P < 0.05$.

MORTALIDAD DE LARVAS DE *T. ni* A NIVEL DE INVERNADERO

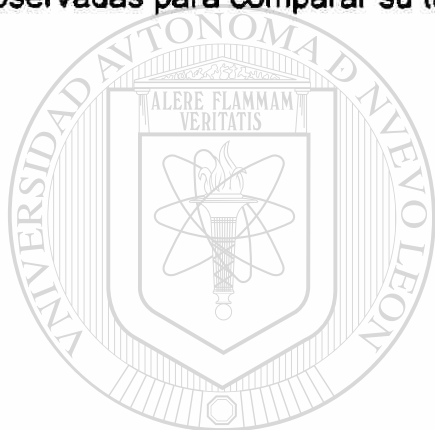
Se utilizaron cajas de Petri desechables de 45 mm, a cada una de las cuales se les colocó un disco de hoja de frijol de 12.56 cm² de área, previamente sumergido en la suspensión del formulado o del blanco reconstituídos de la misma manera que en el bioensayo con dieta artificial y se dejó secar, también se colocó un disco de papel filtro en la base de la caja para absorber el exceso de humedad.

Para cada formulado y su blanco, se hicieron 8 repeticiones cada una con 10 larvas neonatas de *T. ni*.

A las larvas se les permitió alimentarse de la hoja por 24 horas, para que tuvieran suficiente contacto con las esporas o el micelio de los formulados, posteriormente las larvas sobrevivientes se transfirieron a copas con dieta artificial, para determinar la mortalidad a los 7 días. Los resultados obtenidos de este bioensayo se sometieron a un Análisis de Varianza y Prueba de Tukey para comparación de medias con una $P < 0.05$.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para las fotografías de las conidias y de los gránulos de los formulados, las muestras se tomaron directamente y se colocaron cada una en una base cilíndrica de aluminio, con cinta adherible para mantener fija la muestra, la suspensión de conidias se dejó secar en la base cilíndrica de aluminio con cinta adherible por 2 horas. Posteriormente las muestras se cubrieron con oro en un recubridor iónico de capa fina Pelco SC y se procedió a la observación en un Microscopio Electrónico de Barrido 151 Mini-SEM-5 a 15 KV de energía de aceleración, utilizando para las fotografías un rollo Polapan PRO 150 100/21°. Los gránulos fueron observados por microscopía electrónica de barrido para ver la forma, el tamaño y la textura de la superficie, las conidias fueron observadas para comparar su tamaño con el de los gránulos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

Las características morfológicas que se observaron en las cepas, se presentan en la Tabla 6, de estos resultados obtenidos se seleccionaron las cepas 137 y 139, la GHA se utilizó como una referencia pues es una cepa comercial. En la Tabla 7 pueden observarse los resultados obtenidos del bioensayo con las cepas seleccionadas. La cepa 139 causó una mortalidad de 44% en larvas de *T. ni*, las cepas 137 y GHA causaron una mortalidad menor a este valor. En las larvas de *S. exigua* la cepa 139 causó una mortalidad del 10.66%, mientras que las cepas 137 y GHA causaron una mortalidad menor a este valor. Se observa que las larvas de *T. ni* son más sensibles a *Beauveria bassiana*.

Debido a la mortalidad causada por la cepa 139, se eligió esta cepa para el desarrollo de los formulados.

En la Figura 1 se muestra una larva de *T. ni* sana (1a) y una larva de *T. ni* infectada (1b) por la cepa 139 de *Beauveria bassiana*, esta larva presenta una micosis generalizada, que se observa en la superficie del insecto con una coloración blanca característica.

DETERMINACIONES REALIZADAS A LOS FORMULADOS

Una vez que los formulados se obtuvieron después del secado por aspersion, se procedió a determinar el peso en gramos de cada uno de ellos, en la Tabla 8 se puede observar que del formulado de Capsul a base de conidias se obtuvo una mayor cantidad 61.54 g, presentándose una disminución en las cantidades obtenidas de los demás formulados, siguiendo en orden descendente, la mezcla de gel/pect con 15.35 g, pectina 11.14 g, y gelatina 7.54 g. Por otro lado, del formulado a base de micelio se obtuvieron 44.04g.

En esta misma tabla se representa el rendimiento de los formulados, determinado en base a los sólidos totales y el peso obtenido, el mayor rendimiento obtenido fue para el formulado de Capsul (100%), seguido de la mezcla de gel/pect (96.78%), pectina (66.50%) y gelatina (36.69%).

Cabe mencionar que la gelatina y la pectina parecen tener un efecto combinado que puede observarse en la mezcla gel/pect, se observa que estos polímeros por separado dan un bajo rendimiento, pero al ser mezclados el rendimiento mejora sustancialmente.

Otra de las determinaciones realizadas a dichos formulados es el porcentaje de humedad contenido. En la Tabla 9, el Capsul demuestra tener un contenido de humedad de 3.83%, lo que es ideal en el caso de materiales sometidos al secador por aspersión. De hecho, este contenido de humedad debe ser menor o igual a 4%, para considerar que el producto fue secado adecuadamente.

Los formulados a base de gelatina y de Cap-Mic1, tienen un porcentaje de humedad similar (6.53% y 6.36%, respectivamente). El formulado a base de pectina retuvo más del 10% de humedad al igual que la mezcla de gel/pect. El único formulado que fue secado adecuadamente fue el Capsul, ya que el de gelatina y Cap-Mic1 quedan por encima del nivel ideal y el resto de los formulados sobrepasan este nivel.

En la misma Tabla 9 se encuentra incluido el porcentaje de humedad del formulado de Cap-Mic 2, el cual fue secado a temperatura ambiente, mostrando un elevado porcentaje de humedad, 14.13%, lo cual es lógico desde el momento en que no fue sometido a un proceso de secado con altas temperaturas como los demás formulados.

Respecto a la concentración de conidias en los formulados, cuando éstos se elaboraron, se utilizaron suspensiones con una concentración de 10^9 conidias/ml para cada uno de ellos, posteriormente se determinó el número de conidias que permanecieron encapsuladas en los formulados y se observó una fuerte disminución de ellas en los formulados, quedando la gelatina con 1.45×10^8 , pectina con 1.02×10^8 , mezcla de gel/pect con 3.77×10^8 y el Capsul con 1.66×10^7 conidias/ml. A estas conidias que quedaron encapsuladas en los formulados, se les determinó su viabilidad, siendo para la gelatina de 1.51×10^7 , para la pectina de 9.64×10^6 , para la mezcla de gel/pect de 4.3×10^7 conidias/ml y un valor de cero para la viabilidad del Capsul (Tabla 10).

Estos resultados indican que el número de conidias viables en los formulados disminuyó drásticamente si se toma en cuenta el número inicial de conidias, donde todas las conidias eran viables hasta después del secado por aspersión.

El porcentaje de germinación de los formulados recién elaborados se determinó en un lapso máximo de 24 horas, con intervalos de 12, 15, 21 y 24 horas. En la gráfica 1 se observa una germinación muy lenta de las conidias de los formulados, a las 12 horas no hay germinación de ningún formulado, a las 15 horas hay un ligero incremento en la germinación de la gelatina y pectina, a las 21 horas hay una elevación mayor de la germinación en la gelatina, pectina y mezcla de gel/pect, alcanzándose la máxima germinación a las 24 horas para estos tres anteriores, en el Capsul no hay germinación a las 24 horas.

Las condiciones de refrigeración ayudaron a mantener la viabilidad existente en los formulados, en la Gráfica 2 puede observarse que a los 30 días de estar en almacenamiento, los formulados de pectina y la mezcla de gel/pect disminuyen a menos de 5% su germinación, pero a los 60 días este porcentaje permanece casi constante, para el formulado a base de gelatina, se observa un aumento en el porcentaje de germinación a los 30 días y 60 días con respecto al inicial, lo que sugiere una lenta recuperación de las conidias, que fueron sometidas al secado por aspersion, para el Capsul, el porcentaje de germinación permaneció en cero hasta los 60 días.

En cuanto al almacenamiento a temperatura ambiente, en todos los formulados se observó una mortalidad completa de las conidias a los 30 días, esto nos sugiere que el almacenamiento a temperatura ambiente, afecta de tal manera las conidias que no son capaces de sobrevivir. (Gráfica 3).

Los resultados de la mortalidad causada por estos formulados en larvas de *T. ni* en dieta artificial, están esquematizados en la gráfica 4 y en la Tabla 11 aquí se probaron cada uno de los formulados, una suspensión de conidias puras y otra de micelio puro.

En este bioensayo en dieta artificial, se observa una alta diferencia significativa ($F=15.0817$, $gl=13$, $P<0.001$) en la mortalidad de larvas de *T. ni*, causada por el formulado de gelatina, que fue de 21.12%, respecto al resto de los formulados. También hay una alta diferencia significativa en la mortalidad causada por la suspensión de conidias y micelio de un 44% y 23.61% respectivamente.

La mortalidad reportada para el resto de los formulados es, para la mezcla de gel/pect de 12.32%, la pectina de 16.43%, para el Cap-Mic 1 de 8.45% y para el de

Cap-Mic 2 de 4.28%, el formulado de Capsul causó una mortalidad de 13.51% (contrario a lo que se esperaba, ya que a las 24 horas no se presentó germinación), este resultado se atribuye a una germinación muy retardada (de más de 72 horas) y debido a la duración del bioensayo, fue posible que algunas conidias germinaran en el formulado de Capsul provocando esta mortalidad.

Respecto a los blancos utilizados en este mismo bioensayo, se observa una diferencia significativa ($F=8.8000$, $gl=5$, $P<0.001$) del blanco de la gelatina con respecto al resto de los blancos.

En cuanto a la eficacia de los formulados en la mortalidad de *T. ni*, hay una alta diferencia significativa ($F=8.4982$, $gl=7$, $P<0.002$) para la suspensión de conidias puras, que en general causó la mayor mortalidad registrada (Gráfica 4).

En los resultados a nivel de invernadero, donde se utilizaron hojas de frijol, con larvas neonatas de *T. ni*, el formulado de gelatina causó una mortalidad del 27.5%, el resto de los formulados estuvieron por debajo de este valor siendo los valores para pectina de 12.5%, mezcla de gel/pect 6.25%, Capsul 3.79%, para los formulados de micelio fueron para el Cap-Mic 1 de 10.25% y para el Cap-Mic 2 de 3.84%, la suspensión de conidias causó una mortalidad del 68.25% y la suspensión de micelio de 70.0%; el análisis de varianza reportó una alta diferencia significativa en la mortalidad ($F=30.2683$, $gl=12$, $P<0.001$), causada por los diferentes tipos de formulaciones (Tabla 12), encontrándose una alta diferencia significativa en el formulado de gelatina y en las conidias puras y el micelio puro.

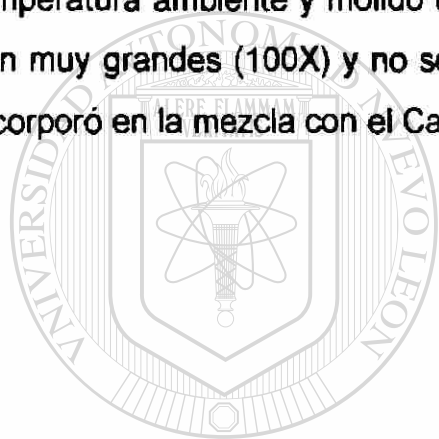
En los blancos utilizados también se obtuvo una diferencia significativa en la mortalidad causada por el blanco de gelatina y el de pectina ($F=6.2267$, $gl=4$, $P<0.007$) con respecto a los demás blancos.

El efecto que causaron los diferentes formulados en la mortalidad de *T. ni* en hojas de frijol presentó una diferencia significativa para las conidias puras y el micelio puro ($F=29.3951$, $gl=7$, $P<0.001$).

La Figura 2 muestra conidias en suspensión acuosa (a) y conidias obtenidas de la superficie de una caja petri (b), aquí pueden observarse algunos fragmentos de micelio. La suspensión de conidias puras utilizada en los bioensayos se obtuvo de la manera antes mencionada.

Las Figuras 3, 4, 5, 6 y 7a muestran los gránulos formados después de someter el formulado y los blancos en forma líquida al secador por aspersion. Estas fotografías tomadas al Microscopio Electrónico de Barrido (1000X), dejan ver unos gránulos de tamaño muy variado que van aproximadamente de 3μ a 500μ . En general los gránulos de estos formulados se observan colapsados. En las fotografías de los formulados no se observan conidias libres, algunos gránulos grandes se encuentran, a su vez, encapsulando a otros gránulos más pequeños como se aprecia en la Figura 3a, o bien podrían estar atrapando grandes aglomerados de conidias (los que las contienen). La textura de estos gránulos es lisa, no presentan poros en la superficie.

La Figura 7b muestra el formulado a base de Capsul y micelio, secado a temperatura ambiente y molido en un mortero, como puede apreciarse, los fragmentos son muy grandes (100X) y no se observan fragmentos de micelio libre, ya que todo se incorporó en la mezcla con el Capsul.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 6. Características Morfológicas de Macro y Microcultivos de las Cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa	Características del cultivo en placa			Características del microcultivo	
	Colonia	Color	Textura	Formación de cuerpo fructífero	Forma de conidias
141	Elevada	Blanca	Algodonosa	Lenta	Ovaladas, alargadas
142	Elevada	Blanca	Algodonosa	Lenta	Ovaladas,
137	Plana	Crema	Pulvorienta	Moderada	Ovaladas
139	Plana	Crema	Pulvorienta	Rápida	Ovaladas
GHA	Plana	Crema	Pulvorienta	Rápida	Ovaladas

Lenta: Más de 10 días, Moderada: menos de 8 días, Rápida: de 3 a 5 días.

Tabla 7. Bioensayo de Selección de la Cepa

Porcentaje de Mortalidad de <i>T.ni</i>		
CEPA	No. DE LARVAS MUERTAS	% DE MORTALIDAD
139	33	44
137	23	30.66
GHA	21	28
Porcentaje de Mortalidad con <i>S. exigua</i>		
CEPA	No. DE LARVAS MUERTAS	% DE MORTALIDAD
139	8	10.66
137	4	5.33
GHA	7	9.33

Tabla 8. Recuperación de los Formulados después del Secado por Aspersión.

<i>Formulado</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sólidos Totales</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
Gelatina	7,54	0,0411	36,69
Pectina	11,14	0,0335	66,50
Gel/Pect	15,34	0,0317	96,78
Capsul	61,54	0,0483	100,00
Cap-Mic 1	44,04	ND	ND

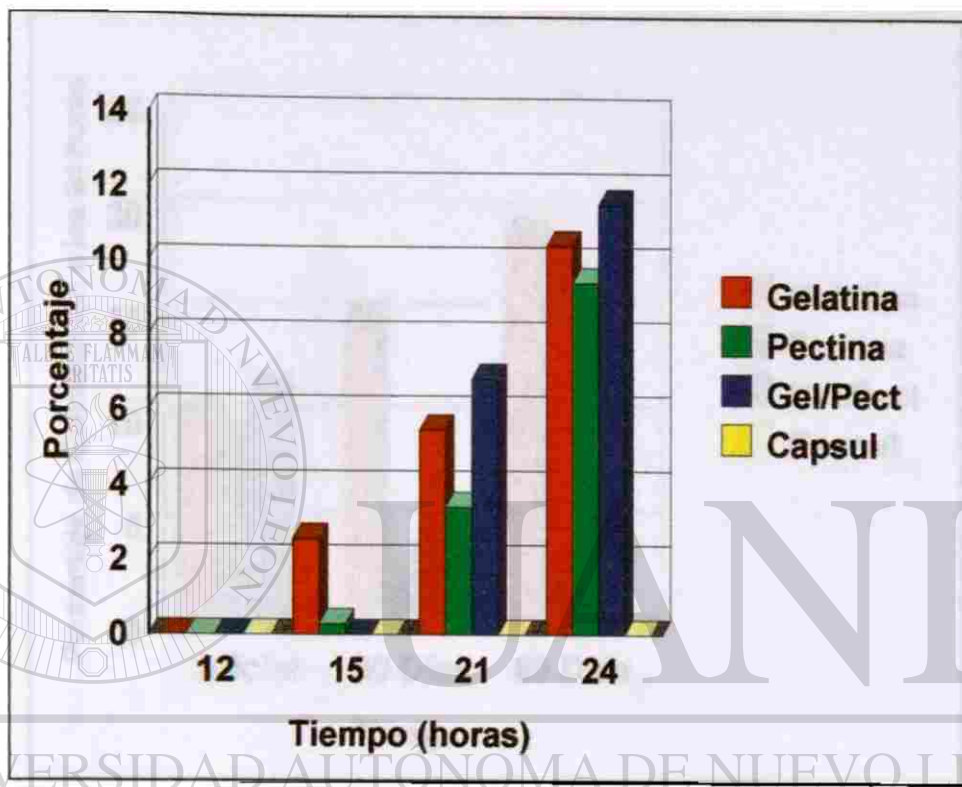
ND: No Determinado

Tabla 9. Porcentaje de Humedad Contenido en los Formulados

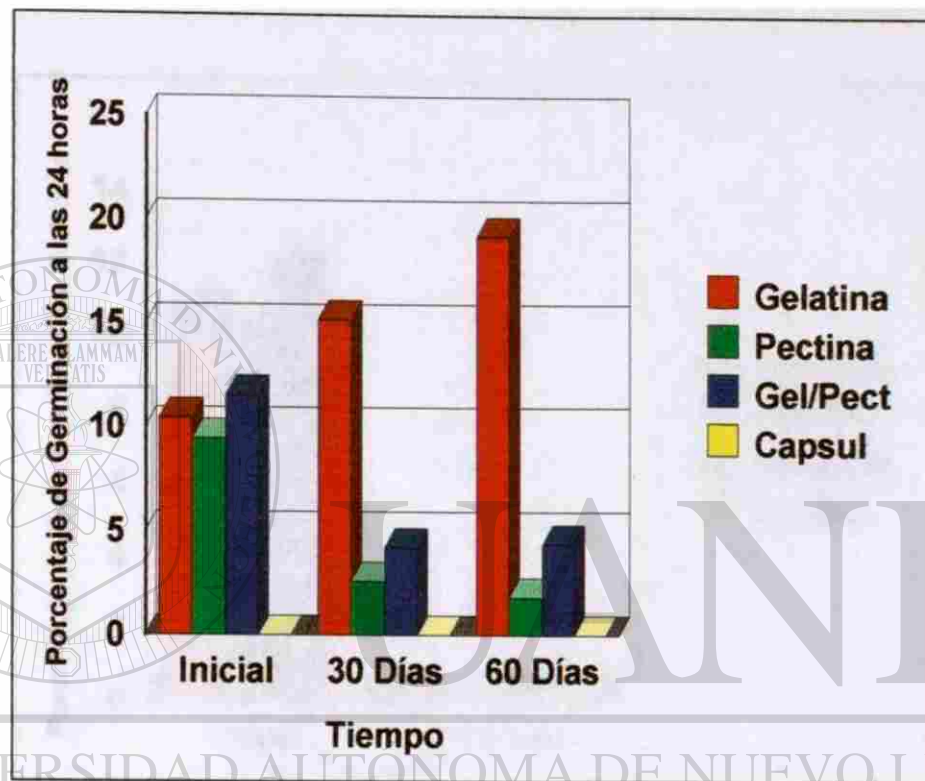
<i>Formulado</i>	<i>Humedad (%)</i>
Gelatina	6,53
Pectina	10,93
Gel/Pect	12,6
Capsul	3,83
Cap-Mic 1	6,36
Cap-Mic 2	14,13

Tabla 10. Concentración de Conidias en los Formulados

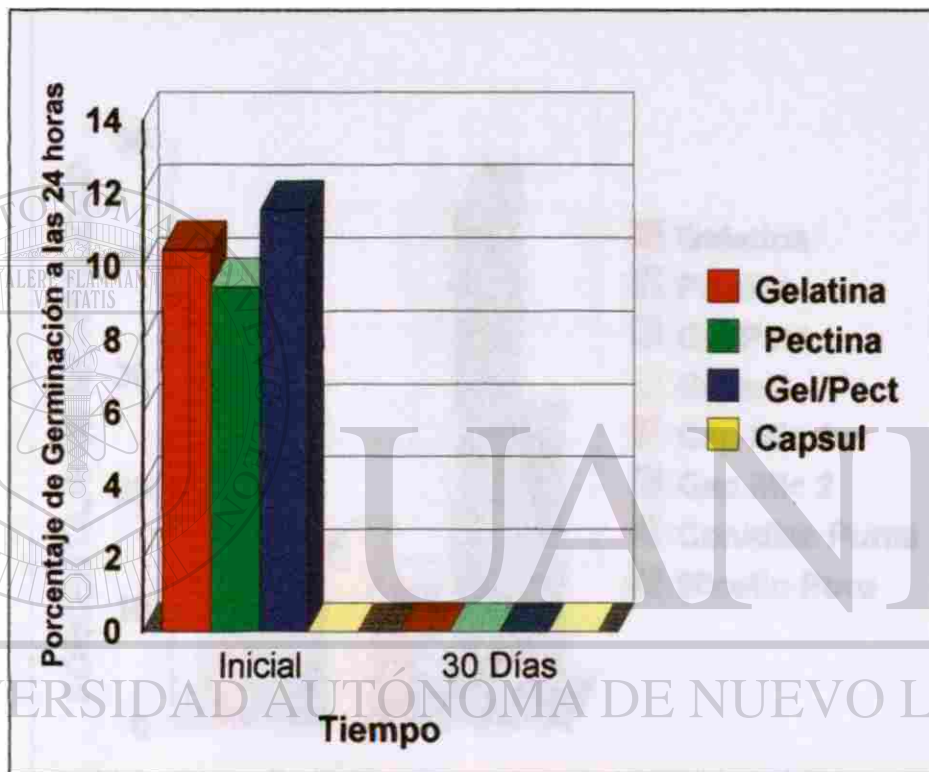
Formulado	Número Inicial de Conidias	Número de conidias Totales después del Secado por Aspersión	Número de Conidias Viabiles después del Secado por Aspersión
Gelatina	1.9×10^9	1.45×10^8	1.51×10^7
Pectina	2.0×10^9	1.02×10^8	9.64×10^6
Gel/Pect	2.66×10^9	3.77×10^8	4.36×10^7
Capsul	1.61×10^9	1.66×10^7	0



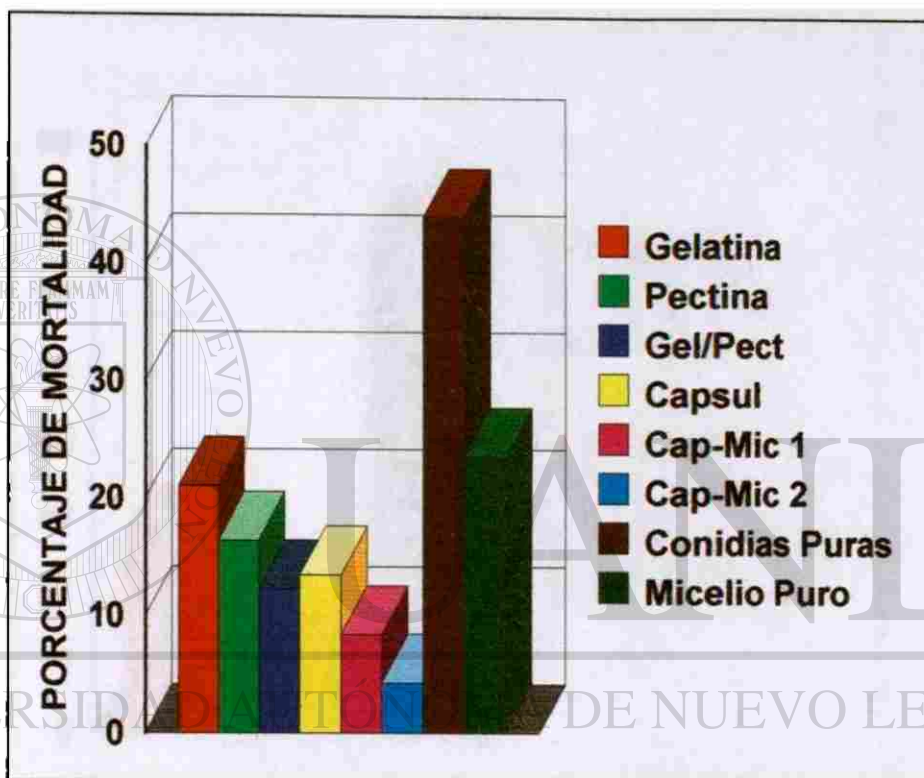
Gráfica 1. Porcentaje de Germinación de los Formulados Recién Elaborados.



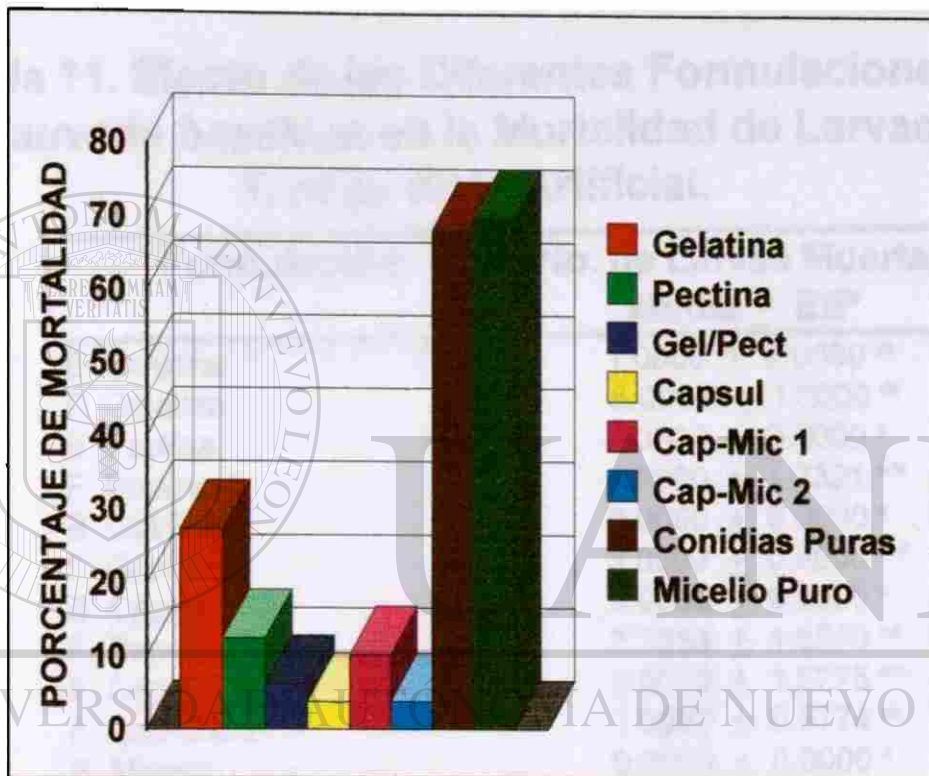
Gráfica 2. Determinación del Porcentaje de Germinación a Formulados Almacenados en Refrigeración a 4°C.



Gráfica 3. Determinación del Porcentaje de Germinación en Formulados Almacenados a Temperatura Ambiente (16-32°C).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Gráfica 4. Porcentaje de Mortalidad en larvas de *T. ni* en Bioensayo en Dieta Artificial.



Gráfica 5. Porcentaje de Mortalidad en Larvas de *T. ni* en Bioensayo a Nivel de Invernadero con Hojas de Frijol.

Tabla 11. Efecto de las Diferentes Formulaciones de *Beauveria bassiana* en la Mortalidad de Larvas de *T. ni* en dieta Artificial.

Formulación	No. de Larvas Muertas Media \pm EE ^a
B. Gelatina	1.0000 \pm 0.0000 ^{ab}
F. Gelatina	5.0000 \pm 1.0000 ^{de}
B. Pectina	0.0000 \pm 0.0000 ^a
F. Pectina	4.0000 \pm 1.7321 ^{cde}
B. Gel/Pect	0.0000 \pm 0.0000 ^a
F. Gel/Pect	3.0000 \pm 0.0000 ^{bcd}
B. Capsul	0.0000 \pm 0.0000 ^a
F. Capsul	3.3333 \pm 1.8559 ^{cd}
F. Cap-Mic 1	2.0000 \pm 1.5275 ^{abc}
F. Cap-Mic 2	1.0000 \pm 0.5774 ^{ab}
B. Micelio	0.0000 \pm 0.0000 ^a
Micelio Puro	5.6667 \pm 0.6667 ^e
B. Conidias	0.3333 \pm 0.3333 ^a
Conidias Puras	11.0000 \pm 1.0000 ^f

^a n=42, valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente. LSD, P<0.05
B: Blanco; F: Formulado.

Tabla 12. Efecto de las Diferentes Formulaciones de *Beauveria bassiana* en la Mortalidad de Larvas de *T. ni* en Hojas de Frijol.

Formulación	No. de Larvas Muertas Media + EE ^a
B. Gelatina	1.3750 ± 0.1830 ^{ab}
F. Gelatina	2.7500 ± 0.5590 ^b
B. Pectina	1.2500 ± 0.2500 ^{ab}
F. Pectina	1.2500 ± 0.4910 ^{ab}
B. Gel/Pect	0.6250 ± 0.1830 ^a
F. Gel/Pect	0.6250 ± 0.2631 ^a
B. Capsul	0.2500 ± 0.1637 ^a
F. Capsul	0.3750 ± 0.1830 ^a
F. Cap-Mic 1	1.0000 ± 0.2673 ^{ab}
F. Cap-Mic 2	0.3750 ± 0.1830 ^a
B. Mic/Con	0.5000 ± 0.1890 ^a
Micelio Puro	7.0000 ± 0.8238 ^c
Conidias Puras	6.8750 ± 0.8543 ^c

^a n=104, valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente. Tukey, P<0.05.
B: Blanco; F: Formulado.

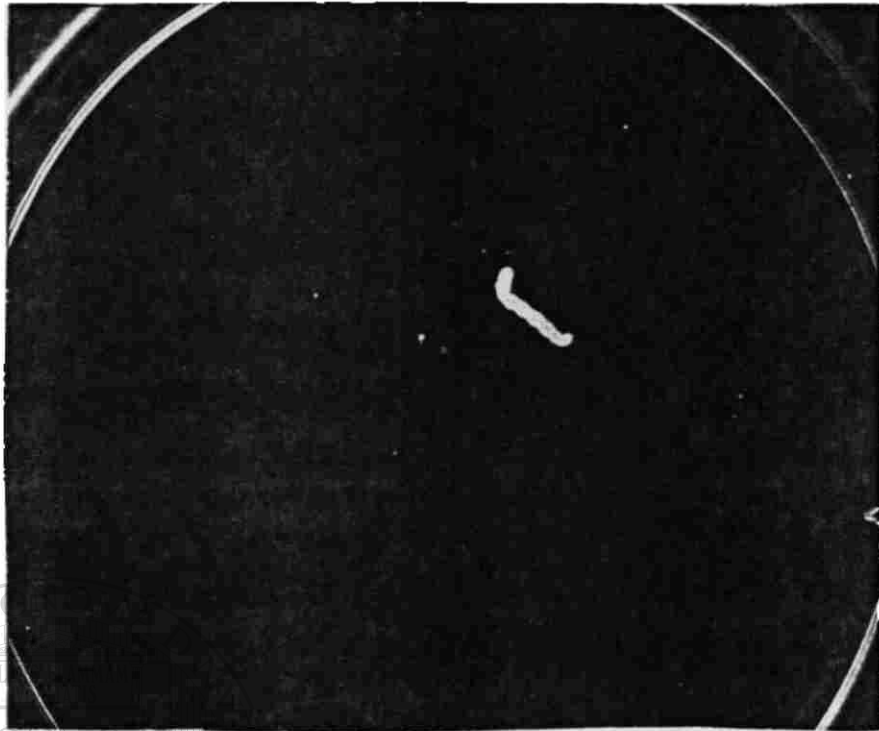


Fig. 1a.

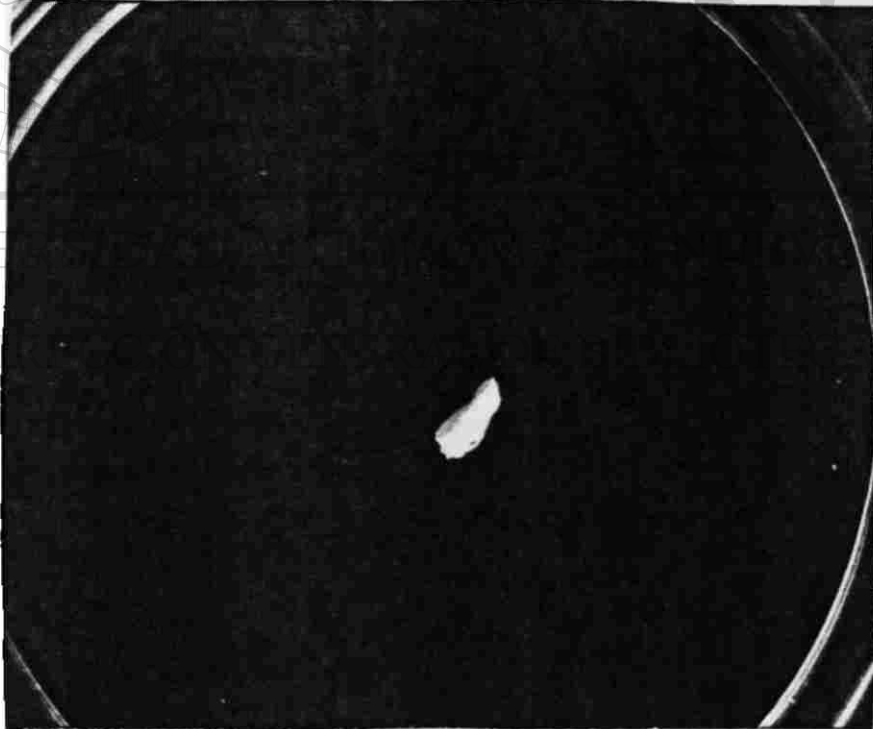


Fig. 1b.

Figura 1. Larva sana de *T. ni* (a), larva infectada de *T. ni* mostrando una micosis generalizada que se observa en la superficie de color blanco característico (b).

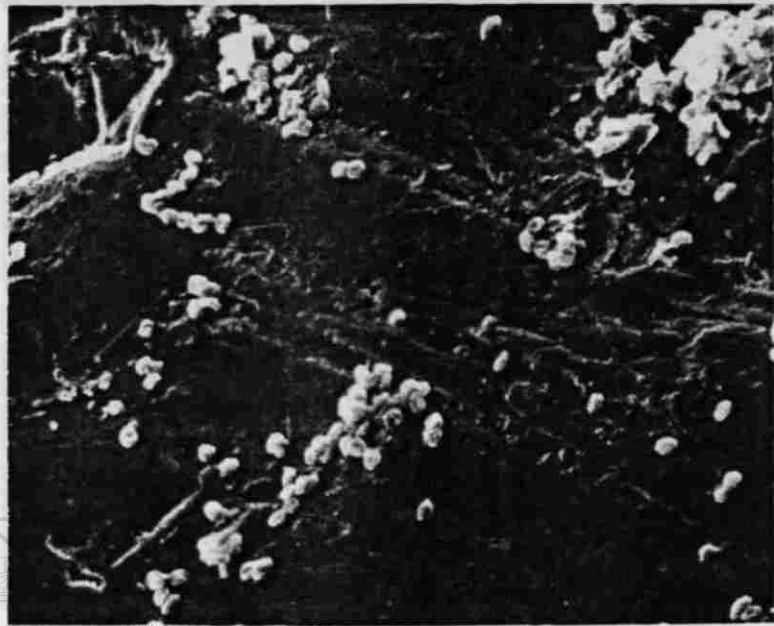


Fig. 2a. (1000X)



Fig. 2b. (1000X)

Figura 2. Conidias de *Beauveria bassiana*, en suspensión acuosa (a),
y obtenida de la superficie de un cultivo en caja de petri (b).

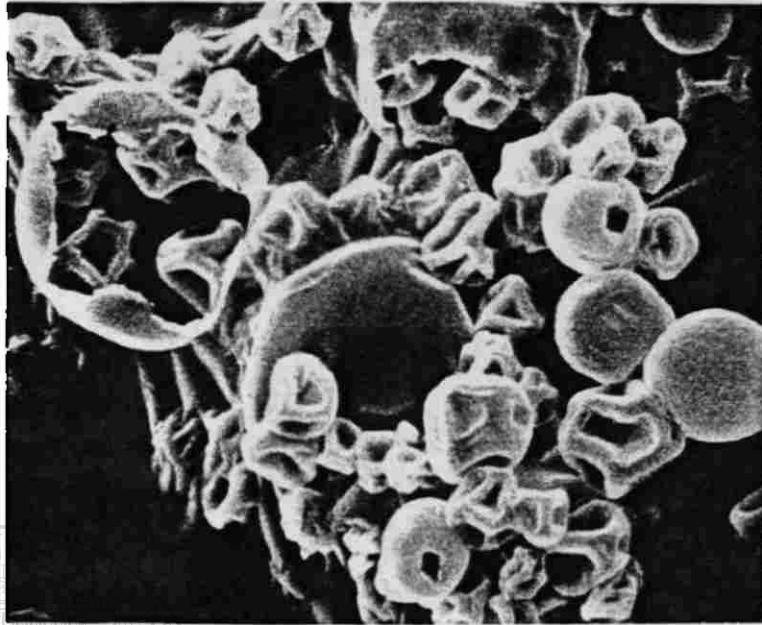


Fig. 3a. (1000X)

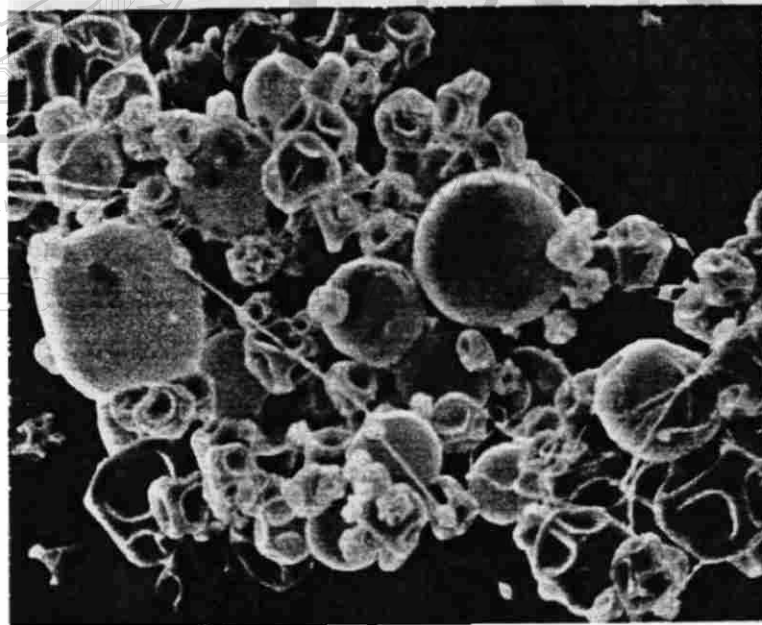


Fig. 3b. (1000X)

Figura 3. Gránulos del blanco (a) y del formulado (b) elaborados a base de gelatina.

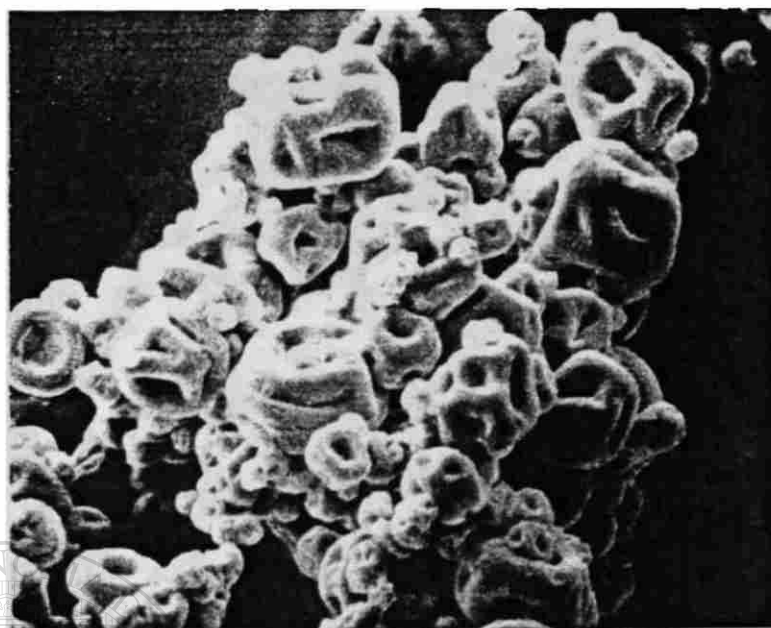


Fig. 4a. (1000X)

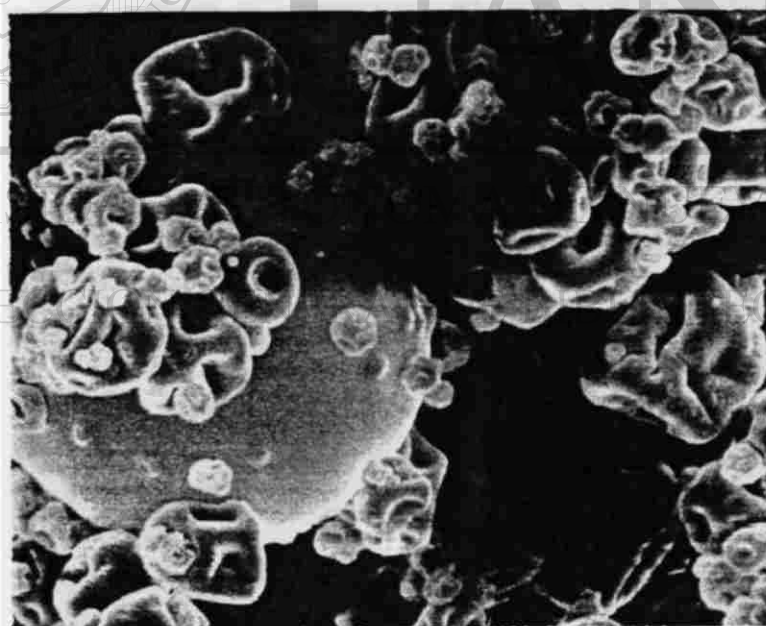


Fig. 4b. (1000X)

Figura 4. Gránulos del blanco (a) y del formulado (b) elaborados a base de pectina.

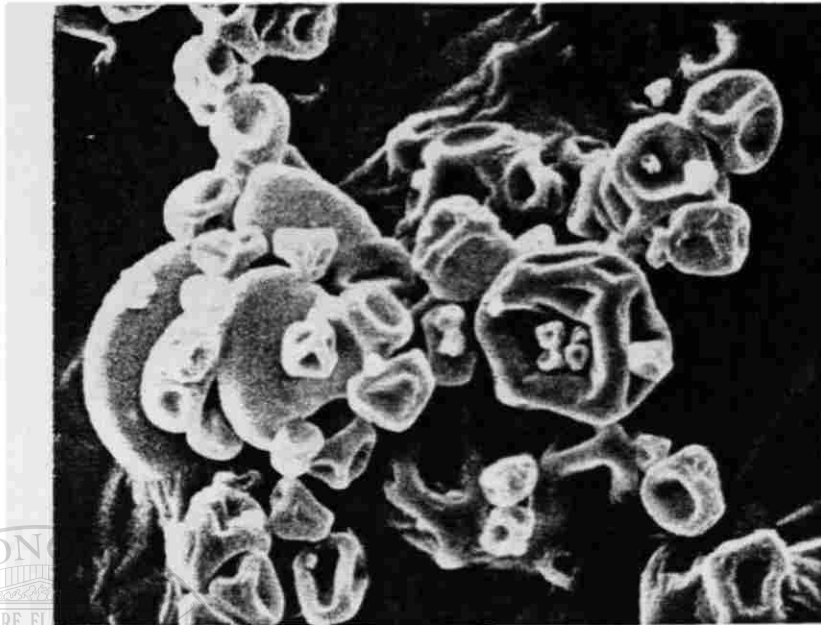


Fig. 5a. (1000X)

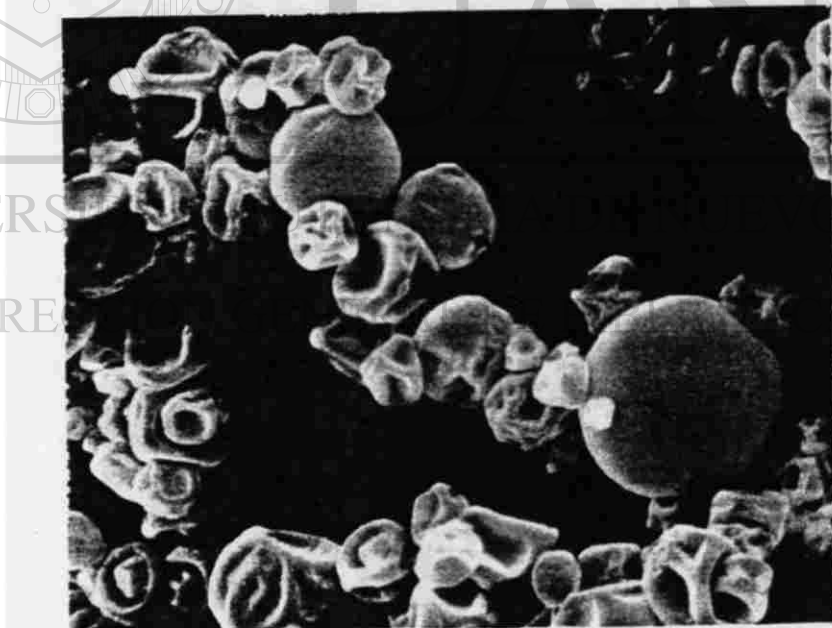


Fig. 5b. (1000X)

Figura 5. Gránulos del blanco (a) y del formulado (b) elaborados a base de la mezcla de gelatina/pectina.

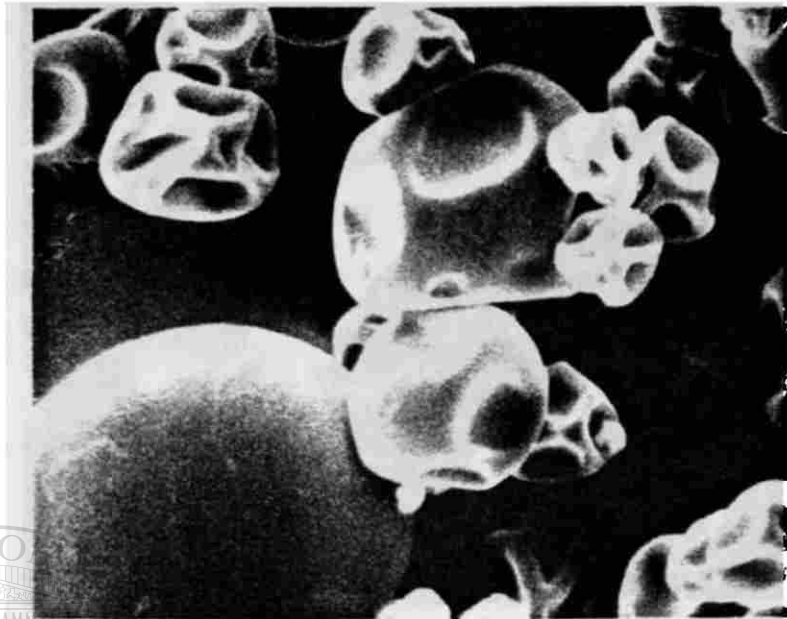


Fig. 6a. (1000X)

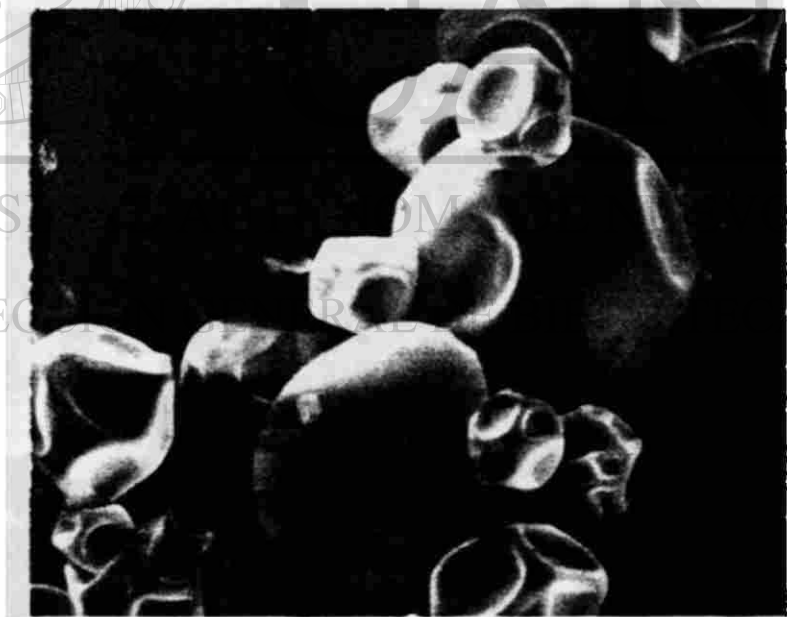


Fig. 6b. (1000X)

Figura 6. Gránulos del blanco (a) y del formulado (b) elaborados a base de Capsul.

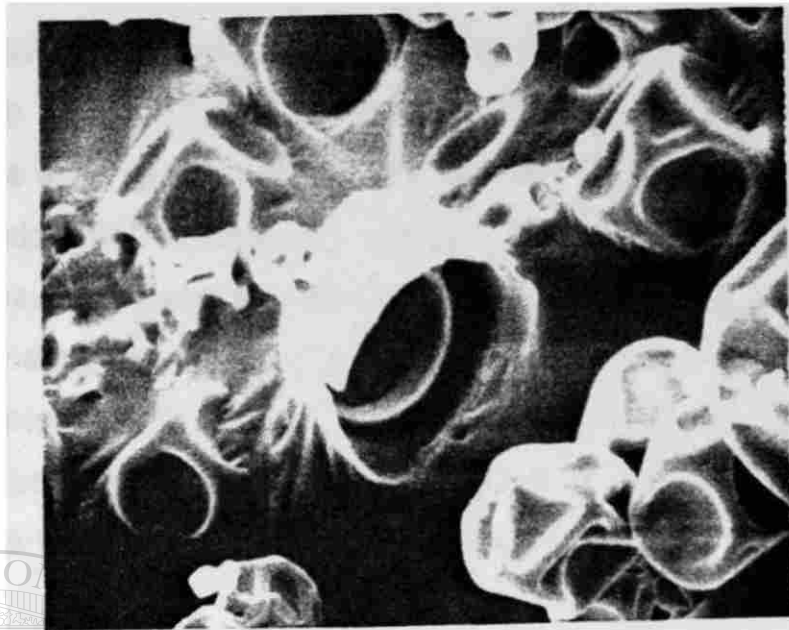


Fig. 7a. (1000X)

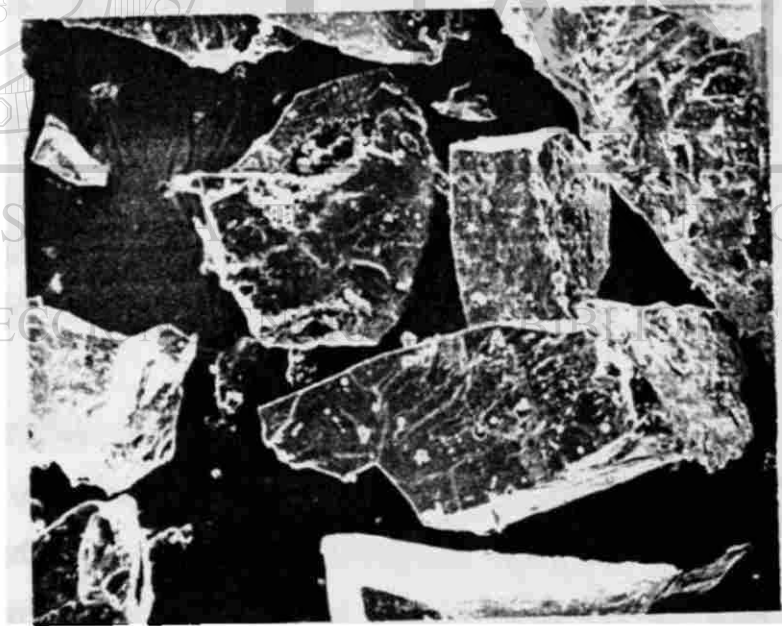


Fig. 7b. (100X)

Figura 7. Gránulos elaborados a base de Capsul y micelio obtenidos por secado por aspersión (a) y fragmentos gruesos de la mezcla de Capsul y micelio secada a temperatura ambiente (b)

DISCUSIÓN

La actividad entomopatogena de *Beauveria bassiana* ha sido reportada en muchos estudios contra diferentes plagas de insectos, en el caso específico de *Trichoplusia ni* ha sido reportado por Ignoffo, *et al.* en 1982 obteniendo una mortalidad del 95% utilizando 5,000 conidias/mm². Ignoffo, *et al.* en 1979 probó un formulado comercial de *Beauveria bassiana* (Boverin) a diferentes concentraciones, obteniendo una mortalidad hasta del 88.2%, esto indica que *T. ni* es un insecto susceptible a *Beauveria bassiana*, lo cual podemos corroborar en los resultados obtenidos. Si bien es cierto, no todas las cepas de *Beauveria bassiana* presentan la misma toxicidad, por lo que es necesario seleccionar la más adecuada al momento de realizar algún tipo de formulación.

En este trabajo realizado, vemos que la cepa 139, es una cepa que tiene un crecimiento muy rápido (produce gran cantidad de conidias en corto tiempo), por lo cual creemos que tiene bastante actividad tóxica, además de producir un pigmento rojo, tanto en medio sólido como líquido, Eyal, *et al.* 1994, reporta la presencia de un pigmento rojo en una cepa muy tóxica de *Beauveria bassiana*, por lo que en la cepa 139 este pigmento pudiera también contribuir a su toxicidad.

El secado por aspersión es una técnica reportada por Feng, *et al.*, 1990, para el secado de las conidias, en este reporte comenta que si las conidias tienen un agente protector tendrán una supervivencia mayor después de ser sometidas a este procedimiento.

En este trabajo, se utilizaron 3 tipos de polímeros de diferente composición: gelatina, que es una proteína; pectina, que es un coloide hidrofílico; Capsul, que es un almidón modificado, para observar la protección que podían brindar a las conidias o al micelio para la elaboración de los formulados, cada uno de ellos mostró diferentes características al proceso de secado; del formulado de gelatina, se perdió una buena cantidad, ya que con el incremento de la temperatura la gelatina se funde, por lo que se recupera muy poca cantidad del formulado, sin embargo, a pesar de esta pequeña cantidad obtenida, fue el polímero que conservó mejor, con respecto a los demás

formulados, la viabilidad de las conidias, lo que da como resultado una mortalidad mayor, observable en los bioensayos en dieta artificial y a nivel de invernadero.

El Capsul es un polímero especialmente diseñado para el secado por aspersion, utilizado para la encapsulacion de sabores y enturbiantes, por lo que se pensó que podría ser utilizado para atrapar a las conidias o el micelio para la elaboracion de los formulados, sin embargo, este polímero no fue capaz de conservar la viabilidad de las conidias, creemos que esto se debe a que se forma una matriz muy cerrada lo que evita el paso del oxígeno a las conidias y éstas mueren, o bien podría tratarse de un polímero que no protege del calor a las conidias, causando una mortalidad casi total.

La elaboracion del formulado utilizando este mismo polímero con micelio, secado por aspersion, provocó otro tipo de problemas, ya que al ser de mayor tamaño el micelio, no fue posible encapsularlo con la misma facilidad que las conidias, quedando de esta manera un formulado con muy baja concentracion del hongo.

Respecto al formulado de pectina, se obtuvo un rendimiento del 66.50%, pero retuvo un número más reducido de conidias viables. La mezcla de gel/pect parece combinar las características de ambos polímeros, dando un buen rendimiento de 96.78% y un número mayor de conidias viables, que el promedio de ambos polímeros, por lo que las características de esta mezcla son buenas, sin embargo, las conidias de este formulado perdieron rápidamente su viabilidad, no obstante a estar en condiciones de refrigeracion, y esto se ve reflejado principalmente en el bioensayo a nivel de invernadero con hojas de frijol, donde la mortalidad de las larvas fue inferior al 10%.

En los bioensayos con dieta artificial y a nivel de invernadero se observa una diferencia significativa en la mortalidad, del formulado de gelatina, micelio puro y conidias puras, respecto al resto de los formulados y blancos, sin embargo, entre los blancos, hay diferencia significativa en la mortalidad del blanco de gelatina, respecto a los demás blancos, esto indica que posiblemente la gelatina, por ser una proteína, al ser ingerida por las larvas, las esté afectando de alguna manera causándoles la muerte, o que las larvas se queden adheridas en el polímero o quizá éste retenga más humedad ahogando a las larvas.

Entre los blancos utilizados en el bioensayo a nivel de invernadero, también hubo diferencia significativa en la mortalidad siendo los blancos de gelatina y pectina, los que causaron mayor mortalidad entre las larvas, atribuimos el resultado de la gelatina al mismo obtenido en el bioensayo con dieta artificial, en el caso del blanco de pectina, al secarse la hoja de frijol impregnada con el formulado y colocar las larvas, se impedía el deslizamiento de éstas quedando inmovilizadas, incapaces de alimentarse por lo que morían rápidamente; entonces la pectina debido a su consistencia gomosa causa mortalidad en las larvas.

Según lo reportado por Feng, *et al.*, 1994, el porcentaje de humedad en polvo de conidias sin formular debe ser inferior a 10%, el contenido de humedad ideal para un formulado secado por aspersión debe ser no mayor al 4%, sólo el formulado de Capsul cumple este requisito, mientras que los demás están alrededor del 10%.

Ignoffo *et al.*, 1979, reporta que un formulado comercial de *Beauveria bassiana* (Boverin), tienen un contenido de humedad del 6.9%, y Sánchez *et al.*, 1992, reportan la obtención de un producto seco en polvo de *Beauveria bassiana* con una humedad del 8%, lo que le da una buena estabilidad por un año. En nuestros resultados, quedan alejados de este valor, el formulado de pectina, la mezcla de gel/pect y el Cap-Mic 2.

Estos resultados son lógicos, sin consideramos que la pectina es un coloide hidrofílico y como tal tiende a hidratarse, el en caso del Cap-Mic 2, el valor de humedad obtenido es comprensible debido a que fue secado a temperatura ambiente.

El calor del secado por aspersión (140°C), definitivamente afectó la viabilidad de las conidias, ya que la disminuyó en 2 exponentes para la gelatina, la mezcla de gel/pect y 3 exponentes para la pectina.

En las fotografías 3b, 4b, 5b, 6b, no se observan conidias libres, por lo que pensamos que los polímeros sí atraparon a todas las conidias, pero éstos no fueron lo suficientemente adecuados para conservar la viabilidad bajo este proceso

En este resultado, así como en el resultado de humedad y en el de rendimiento, se observa que hay un efecto combinado de la gelatina y la pectina, lo que indica que las características de la mezcla para ciertas condiciones son buenas, sin embargo, un exceso de humedad podría repercutir en la estabilidad de las conidias en los formulados haciéndolos susceptibles a la contaminación por bacterias, levaduras y hongos.

La germinación de las conidias en los 4 tipos de formulados recién elaborados, se observó bastante retardada, quizá las conidias necesitan un período de recuperación después del secado por aspersión.

Khachatourians en 1992, reporta que las suspensiones de esporas de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* y *Verticillium lecanii* almacenadas a 4°C por 3 días, pierden una poca de viabilidad, pero no excede de 12 a 15%, nuestros formulados no obstante de tener un polímero protector, tuvieron una viabilidad menor al 12% a las 24 horas, lo que atribuimos al calor proporcionado por la técnica de secado.

Los formulados de pectina y la mezcla de gel/pect almacenados en refrigeración a una temperatura de 4°C mostraron una disminución en la viabilidad, quedando la viabilidad menor al 5% a los 30 y 60 días, la gelatina, sin embargo mostró un incremento en la viabilidad, adquiriendo un valor cercano al 20% a los 60 días de almacenamiento, aquí las conidias muestran una recuperación en la viabilidad, lo que concuerda con la mortalidad obtenida en los bioensayos.

Por el contrario, los formulados almacenados a temperatura ambiente, perdieron completamente su viabilidad a los 30 días. Sánchez *et al.*, 1993, reportan un biopreparado de *Beauveria bassiana* mantenido a temperatura ambiente, el cual presenta una pérdida de la viabilidad del 64.3% al cabo del primer mes, llegando a valores de 10⁶ UFC/g al cabo de 3 meses, lo que invalida su utilización a nivel de campo, sin embargo los mantenidos a temperatura de refrigeración conservaron su viabilidad por 19 meses. Los resultados que obtuvimos nos indican que los polímeros utilizados no conservan adecuadamente la viabilidad de las conidias a temperatura ambiente, por lo que es necesario mantenerlos en refrigeración.

Hall, en 1984 discute que la velocidad de germinación conidial para *Verticillium lecanii* es un factor importante en la iniciación de la enfermedad y la transmisión y por lo tanto un potencial epizootico.

En nuestro trabajo podemos apreciar que al estar disminuída la velocidad de germinación, las conidias tardan más tiempo en infectar a las larvas, dando tiempo a que la larva crezca y pueda resistir mejor al ataque de las conidias, además de encontrarse éstas en baja concentración, por lo que se observa una baja mortalidad en los bioensayos.

Comparando la mortalidad con la obtenida en el bioensayo en dieta artificial y a nivel de invernadero con hojas de frijol, las conidias puras y el micelio puro, registraron la mayor mortalidad en las larvas, hecho que se atribuye a que tanto las conidias puras como el micelio puro no fueron sometidos a ningún proceso o tratamiento y mantuvieron toda su viabilidad.

Beauveria bassiana es un hongo que necesita una humedad relativa muy alta, del 100% o cercano a este valor, es posible que la mortalidad obtenida en las larvas de *T. ni* está relacionada a la humedad relativa durante la incubación del bioensayo. Dobersky en 1979, reporta para una cepa de *Beauveria bassiana* una mortalidad alta en *Scolytus scolytus* a humedad relativa de 97.5 a 100%. Posiblemente al aumentar la humedad relativa del bioensayo, se podría tener una mortalidad mayor, ya que en este trabajo se manejó una humedad relativa del 80%.

Respecto a la temperatura, *Beauveria bassiana* soporta un amplio rango de temperatura (de 5-30°C con una óptima de 21.6°C) sin perder su patogenicidad (Dobersky, 1979), en nuestros bioensayos la temperatura se mantuvo cercana a la óptima, por lo que pensamos que uno de los factores que más influyó, junto con la poca viabilidad, en la efectividad de los formulados durante los bioensayos, fue la humedad relativa. Las condiciones variables de temperatura y humedad pueden determinar el éxito o el fracaso de un hongo patógeno (Barson, G, 1977).

Muchos estudios indican que el potencial de los hongos patógenos como agentes de control biológico, puede verse afectado por muchos factores ambientales, tales como la humedad, temperatura, exposición a la luz solar o a la fungistasis por otros hongos del suelo, sin embargo se espera que las formulaciones innovadoras de *Beauveria bassiana* puedan reducir la magnitud de estos problemas.

CONCLUSIONES

- ◆ El proceso de secado afecta la viabilidad y toxicidad de este micoinsecticida.
- ◆ La viabilidad se ve mayormente disminuída en los formulados almacenados a temperatura ambiente, que en los almacenados a temperatura de refrigeración.
- ◆ El Capsul, no obstante, que es un polímero especialmente diseñado para utilizarse en el secador por aspersion, no fue capaz de conservar la viabilidad de la conidias.
- ◆ El formulado a base de gelatina conservó mejor que los otros formulados, la viabilidad de la conidias, a pesar de haberse obtenido un rendimiento menor.
- ◆ Las conidias puras mostraron el mayor porcentaje de mortalidad en las larvas de *T ni.*
- ◆ El formulado a base de gelatina mostró la mayor mortalidad en los dos tipos de bioensayo, comparado con el resto de los formulados.
- ◆ El secado por aspersion es una técnica que elimina una gran cantidad de conidias, quedando así, el formulado con una concentración menor.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LITERATURA CITADA

- Anderson, T.E., Hajek, A.E., Roberts, D.W., Preisler, H.K., Robertson, J.L. 1989. Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects of Combinations of *Beauveria bassiana* with Insecticides. *J. Econ. Entomol.* **82**:1, 83-89.
- Aregger, E. 1992. Conidia Production of the Fungus *Beauveria brongniartii* on Barley and Quality Evaluation during Storage at 2°C. *J. Invertebr. Pathol.* **59**, 2-10.
- Barson, G. 1977. Laboratory Evaluation of *Beauveria bassiana* as a Pathogen of the Larval Stage of the Large Elm Bark Beetle, *Scolytus scolytus*. *J. Invertebr. Pathol.* **29**,361-366.
- Belova, R.N. 1978. Development of the Technology of Boverin Production by the Submersion Method en *Proceedings of the First Joint US/USSR Conference on the Production, Selection and Standardization on Entomopathogenic Fungi of the US/USSR Joint Working Group on the Production of Substances by Microbiological Means* (Ignoffo, C.M., Ed). National Science Foundation (USA). pp.102-119.
- Berk, Z. 1980. Bioquímica de los Alimentos. J.B.S. Braverman. Ed. El Manual Moderno. México D.F. pp. 70-71, 148-149.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* Extracellular Protease as a Virulence Factor in Pathogenicity toward the Migratory Grasshopper, *Melanopus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* **56**, 362-370.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on Cuticular Components from the Migratory Grasshopper, *Melanopus*. *J. Invertebr. Pathol.* **59**,165-173.
- Bohinski, R.C. 1978. Bioquímica. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México. pp. 256.
- Broome, J.R., Sikorowski, P.P., Norment, B.R. 1976. A Mechanism of Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on Larvae of the Imported Fire Ant, *Solenopsis richteri*. *J. Invertebr. Pathol.* **28**, 87-91.
- Carruthers, R.I., Feng, Z., Robson, D.S., Roberts, D.W. 1985. In Vivo Temperature-Dependent Development of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Mycosis of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* **46**, 305-311.

- Champlin F.R., Gula, E.A. 1979. Noninvolment of Beauvericin in the Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37:6**, 1122-1125.
- Chen, C.J., Wu, J.W., Li, Z.Z., Wang, Z.X., Li, Y.W., Chang, S.H., Yin, F.M., Wang, X.P., Dai, L.Y., Tao, L., Zhang, Y.A. Tang, J., Ding, S., Ding, G.G., Gao, Z.H. & Tan, Y.C. 1990. Application of Microbial Pesticides in IPM, en *Integrated Management of Pine Caterpillars in China* (Chen, C.J., Ed) China Forestry Publishing House. Beijing. pp. 214-318.
- Cheung P.Y.K., Gula, E.A. 1982. In Vivo Events Associated with Entomopathology of *Beauveria bassiana* for the Corn Earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 303-313.
- Clark, T. B. , Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren J.E. 1968. Field and Laboratory Studies on the Pathogenicity of the Fungus *Beauveria bassiana* to Three Genera of Mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* **11**, 1-7.
- Connick, W.J. 1990. Microbial Pesticide Controlled-Release Formulations. Capítulo 12 en *Controlled Delivery of Crop-Protection Agent*. (Wilkins R.M. Ed.) Taylor y Francis. London, New York, Philadelphia. pp. 233-241.
- Couch, T.L., Ignoffo, C.M. 1981. Formulation of Insect Pathogens. Capítulo 14 en *Microbial Control of Pest and Plant Diseases*. 1970-1980. Academic Press. London. pp. 621-634.
- Daigle, D.J., Cotty, P.J. 1992. Production of Conidia of *Alternaria cassiae* with Alginate Pellets. *Biological Control.* **2**, 278-281.
- Davidson, R.H., Lyon W.F. 1979. *Insect Pests of Farm, Garden and Orchard*. 7ª Edición. New York. John Wiley and Sons.
- Doberski, J.W. 1981. Comparative Laboratory Studies on Three Fungal Pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus scolytus*: Effect of Temperature and Humidity on Infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* **37**, 195-200.
- Eyal, J., Mabud, M.D.A., Fischbein, K.L., Walter, J.F., Osborne, L.S., Landa, Z. 1993. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain Which Produces a Red Pigment for Microbial Control. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **44**, 65-80.
- Feng, M.G., Johnson, J.B., Kish, L.P. 1990. Virulence of *Verticillium lecani* and Aphid-Derived Isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for Six Species of Cereal-Infesting Aphids. *Environ. Entomol.* **19:3**, 815-820.

- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. 1994. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*. **4**, 3-34.
- Gabriel, B.P. 1968. Enzymatic Activities of some Entomopathogenic Fungi. *J. Invertebr. Pathol.* **11**, 70-81.
- Galán Wong, L.J. 1993. Selección de Cepas Nativas y de Extractos de Fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hubne), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera: Noctuidae). Tesis de Doctorado en Ciencias, Especialidad en Microbiología. Fac. de Ciencias Biológicas. División de Estudios de Postgrado. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- Genthner, F.J., Middaugh, D.P. 1992. Effects of *Beauveria bassiana* on Embryos of the Inland Silverside Fish (*Menidia beryllina*). *Appl. Environ. Microbiol.* **58:9**, 2849-2845.
- Gottwald, T.R., Tedders, W.L. 1984. Colonization, Transmission, and Longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Pecan Weevil Larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the Soil. *Environ. Entomol.* **13**, 557-560.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J. 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- Hall, R.A., Peterkin, D.D., Ali, B., Lopez, V F. 1994. Influence of Culture Age on Rate of Conidiospore Germination in Four Deuteromycetous Entomogenous Fungi. *Mycol. Res.* **98**, 763-768.
- Hammil, R.L. Higgins, C.E., Gorman, M. 1969. Eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New York. 1968, pp. 18-19.
- Havukkala, y., Mitamura, C. Hara, S., Hirayae, K., Nishizawa, Y., Hibi, T. 1993. Induction and Purification of *Beauveria bassiana* Chitinolytic Enzymes. *J. Invertebr. Pathol.* **61**, 97-102.
- Hegedus, D.D., Khachatourians, G.G. 1993. Identification of Molecular Variants in Mitochondrial DNAs of Members of the Genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:12**, 4283-4288.
- Hegedus, D.D., Khachatourians, G.G. 1994. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* **40**, 766-776.

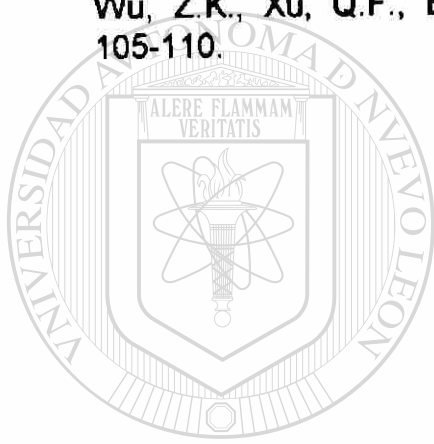
- Hung, Shi-Yin, Boucias, D.G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the Cellular defense Response of the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. **60**, 152-158.
- Hung, Shi-Yin, Boucias, D.G., Vey, A.J. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the Cellur Defense Response of *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. **61**, 179-187.
- Ignoffo, C.M., García, C., Alyoshina, A., Lappa, N.V. 1979. Laboratory and Field Studies with Boverin: a Mycoinsecticidal Preparation of *Beauveria bassiana* Produced in the Soviet Union. J. Econ. Entomol. **72**, 562-565.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., Kroha, M., Couch, T.L. 1982. Use of Larvae of *Trichoplusia ni* to Bioassay Conidia of *Beauveria bassiana*. J. Econ. Entomol. **75**, 275-276.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., Kroha, M., Samsináková, A., Kálalová, S. 1983. A Leaf Surface Treatment Bioassay for Determining the Activity of Conidia of *Beauveria bassiana* against *Leptinotarsa decemlineata*. J. Invertebr. Pathol. **41**, 385-386.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C. 1992. Influence of Conidial Color on Inactivation of Several Entomogenous Fungi (Hyphomycetes) by Simulated Sunlight. Environ. Entomol. **24:4**, 913-917.
- Khachatourians, G.G. 1991. Physiology and Genetics of Entomopathogenic Fungi, en *Handbook of Applied Mycology*. Vol 2. (Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G., Eds). Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 212-214.
- Khachatourians, G.G. 1992. Virulence of Five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii* against the Migratory Grasshopper, *Melanopus sanguinipes*. J. Invertebr. Pathol. **59**, 212-214.
- Knudsen, G.R., Johnson, B., Eschen, D, J. 1990. Alginate Pellet Formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) Isolate Pathogenic to Cereal Aphids. J. Econ. Entomol. **83:6**, 2225-2228.
- Knudsen, G.R., Eschen, D.J., Dandurand, L.M., Wang, Z.G. 1991. Method To Enhance Growth and Sporulation of Pelletized Biocontrol Fungi. Appl. Environ. Microbiol. **57:10**, 2864-2867.
- Kucera, M., Samsináková, A. 1968. Toxins of the Entomophagous Fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. **12**, 316-320.
- Leathers, T.D., Gupta, S.C., Alexander, N.J. 1993. Mycopesticides: Status, Challenges and Potential. J. Industrial Microbiology. **12**, 69-75

- Leopold, J., Samsináková, A. 1970. Quantitative Estimation of Chitinase and Several other Enzymes in the Fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**, 34-42.
- Luna Santillana, E.J. 1998. Formulaciones Asperjables de *Bacillus thuringiensis* a Base de Pectina y Gelatina, y Evaluación Tóxica contra *T. ni*. Tesis de Licenciatura, Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- Lysenko, O., Kucera, M. 1971. Micro-organisms as Sources of New Insecticidal Chemicals: Toxins. Capítulo 9 en *Microbial Control Insects and Mites*. H.D. Burges, N.W. Husey. Academic Press London.
- McClatchie, G.V., Moore, D., Bateman, R.P., Prior, C. 1994. Effects on Temperature on the Viability of the Conidia of *Metarhizium flavoviridae* in Oil Formulations. *Mycol. Res.* **98:7**, 749-756.
- McDowell, J.M., Funderburk, J.E., Boucias, D.G., Gilreath, M.E., Lynch, R.E. 1990. Biological Activity of *Beauveria bassiana* Against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on Leaf Substrates and Soil. *Environ. Entomol.* **19:1**, 137-141.
- McGuire, M.R., Shasha, B.S. 1992. Adherent Starch Granules for Encapsulation of Insect Control Agents. *J. Econ. Entomol.* **85:4**, 1425-1433.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., Riba, G. 1994. Comparative Analysis of Molecular and Biological Characteristics of Strains of *Beauveria brongniartii* isolated from Insects. *Mycol. Rev.* **98:1**, 322-328.
- Pereira, R.M., Alves, S.B., Stimac, J.L. 1993. Growth of *Beauveria bassiana* in Fire Ant Nest Soil with Amendments. *J. Invertebr. Pathol.* **62**, 9-14.
- Pereira, R.M., Roberts, D.W. 1991. Alginate and Cornstarch Mycelial Formulations of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.* **84:6**, 1657-1661.
- Pérez, P.R., Pérez, V.A. 1997. Evaluación de la Eficacia del Bioinsecticida a base de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el Control de *Acanthocelides obtectus* (Say) en condiciones de Laboratorio en Chapingo, México. XX Congreso Nacional de Control Biológico. Universidad de Guadalajara. México. pp. 31-33.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of Biological Control Agents. Capítulo 16 en *Exploitation of Microorganisms*. Edited by D.G. Jones. Published by Chapman and Hall. London.

- Roberts, D.W. 1979. Past history and current status of the development of entomopathogenic fungi in the United States, en *Proceedings of Project V: Microbial Control of Insect Pests*. (Ignoffo, C.M., Ed). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Roberts, D.W. 1989. World Picture of Biological Control of Insects by Fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro*. **84**, 89-100.
- Roberts, D. W. and Yendol, W.G. 1971. Use of Fungi for Microbial Control of Insects. Capítulo 5 en *Microbial Control of Insects and Mites*. H.D. Burges, N.W. Husey. Academic Press London. pp. 125-149.
- Rombach, M.C., Aguda, R.M., Shepard, B.M., Roberts, D.W. 1986. Entomopathogenic Fungi (Deuteromycotina) in the Control of the Black Bug of Rice, *Scotinophara coarctata* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Invertebr. Pathol.* **48**, 174-179.
- St. Leger, R.J., Chamley, A.K., Cooper, R.M. 1986. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Mechanisms of Interaction between Pathogen Enzymes and Insect Cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 295-302.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1986. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **48**, 85-95.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. 1988. The Effect of Melanization of *Manduca sexta* Cuticle on Growth and Infection by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 459-470.
-
- St. Leger, R.J., Durrands, P.K., Charnley, A.K., Cooper, R.M. 1988. Role of Extracellular Chymoelastase in the Virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 285-293.
- St. Leger, R.J., May, B., Allee, L.L., Frank, D.C., Staples, R.C., Roberts, D.W. 1992. Genetic Differences in Allozymes and in Formation of Infection Structures among Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 89-101.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bodochka, M.J., Rizzo, N.W., Roberts, D.W. 1996. Characterization and Ultrstructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3, 907-912.
- Samsinákova, A., Hrabetová, E. 1969. Respiration of Blastospores of the fungus *Beauveria bassiana* during Submersed Cultivation in the Presence of Certain Sugars. *J. Invertebr. Pathol.* **13**, 382-385.

- Samsináková, A., Kálalová, S., Vlcek, V., Kybal, J. 1981. Mass Production of *Beauveria bassiana* for Regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J. Invertebr. Pathol.* **13**, 383-385.
- Sánchez, M., Méndez, T.E., Almazán, O. 1992. Obtención de un Biopreparado en Polvo del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* **34**, 319-323.
- Sánchez, M., Méndez, T.E., Almazán, O. 1993. Comportamiento de un Biopreparado en Polvo de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Durante el Almacenamiento. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* **35**, 59-63.
- Siebeneicher, S.R., Vinson, S.B., Kenerley, C.M. 1992. Infection of the Red Imported Fire Ant by *Beauveria bassiana* through Various Routes of Exposure. *J. Invertebr. Pathol.* **59**, 280-285.
- Silva, J.C., Messias, C.L. 1986. Virulence of Mutants and Revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* **48**, 368-374.
- Silman, R.W., Bothast, R.J., Schisler, D.A., 1993. Production of *Colletotrichum truncatum* for Use as a Mycoherbicide: Effects of Culture, Drying and Storage on Recovery and Efficacy. *Biotech Adv. Vol II.* pp. 561-575.
- Soper, R.S., Ward, M.G. 1981. Production, Formulation and Application of Fungi for Insect Control en *Biological Control in Crop Production*. BARC Symposium No. 5 (Papavizas, G.C., De.). Allanheld, Osmum Totowa. pp. 161-180.
- Stathers, T.E., Moore, D., Prior, C. 1993. The Effect of Different Temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviridae* Conidia Stores in Vegetable and Mineral Oils. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 111-115.
- Studdert, J.P., Kaya, H.K. 1990. Effect of Water Potential, Temperature and Clay-Coating on Survival of *Beauveria bassiana* Conidia in a Loam and Peat Soil. *J. Invertebr. Pathol.* **55**, 417-427.
- Studdert, J.P., Kaya, H.K. 1990. Water Potential, Temperature, and Clay-Coating of *Beauveria bassiana* Conidia: Effect on *Spodoptera exigua* Pupal Mortality in Two Soil Types. *J. Invertebr. Pathol.* **56**, 327-336.
- Walker, H.L., Connick, W.J., Jr. 1983. Sodium Alginate for Production and Formulation of Mycoherbicides. *Weed Science.* **31**, 333-338.
- Wilkins, R.M. 1990. Biodegradable Polymer Methods. Capítulo 8 en *Controlled Delivery of Crop-Protection Agents*. (Wilkins, R.M. Ed). Taylor & Francis. London, New York, Philadelphia. pp. 149-165.

- Wraight, S.P. 1997. Evaluation of Entomopathogenic Fungi in field Crops: Methods for Research and Development. XX Congreso Nacional de Control Biológico. Universidad de Guadalajara. México. pp. 241-243.
- Wright, J.E., Chandler, L.D. 1992. Development of a Biorational Mycoinsecticide: *Beauveria bassiana* Conidial Formulation and its Application Against Boll Weevil Populations (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. **85:4**, 1130-1135.
- Womack, J.G., Burge, M.N. 1993. Mycoherbicide Formulation and the Potential for Bracken Control. Pestic. Sci. **37**, 337-341.
- Yin, F.M., Chen, Q.C., Chen, Y.G., Guo, G.I., Li, Z.W. 1988. Studies of Submerged Culture of *Beauveria bassiana* Conidia, en *Study and Application of Entomogenous Fungi in China*. Vol 1. (Li, Y.W., Li,Z.Z., Liang, Z.Q., Wu, J.W., Wu, Z.K., Xu, Q.F., Editorial Board) Academic Periodical Press Beijing. pp. 105-110.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

