

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECADO Y FORMULACIÓN DE BLASTOESPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus* (HYPHOMYCETES) PRODUCIDOS EN DOS MEDIOS LÍQUIDOS DIFERENTES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR
M C CARLOS FRANCISCO SANDOVAL CORONADO

TD
SB975
.S3
2001
c.1



1080124483

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECADO Y FORMULACIÓN DE BLASTOESPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus* (HYPHOMYCETES) PRODUCIDOS EN DOS MEDIOS LÍQUIDOS DIFERENTES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR
M C CARLOS FRANCISCO SANDOVAL CORONADO

CD. UNIVERSITARIA

MARZO DEL 2001



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Secado y formulación de blasto esporas de *Paecilomyces fumosoroseus*
(Hyphomycetes) producidos en dos medios líquidos diferentes

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA

POR

M. C. CARLOS FRANCISCO SANDOVAL CORONADO

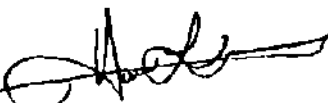
APROBADA:
COMISIÓN DE TESIS



DR. LUIS J. GALÁN WONG
PRESIDENTE



DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO
SECRETARIO



DR. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA
VOCAL



DRA. LILIA HORTENCIA MORALES RAMOS
VOCAL



DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO
VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por ayudarme a alcanzar esta meta, pero sobre todo por estar siempre conmigo en todo momento

A MI ESPOSA Ludivina Montemayor G. y mis hijas Nallely y Yadira por el gran amor y apoyo que siempre me han dado.

A MIS PADRES que si no fuera por ellos no habria alcanzado la meta lograda

A MI DIRECTOR DE TESIS Sr Rector Dr Luis J Galán Wong por la confianza brindada y el apoyo para continuar avanzando en mi carrera profesional. Gracias por en mi formación como investigador.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ DE TESIS Dra. Katuska Arévalo Niño, Dr. Hugo A. Luna Olvera, Dra. Licet Villarreal Treviño y Dra. Lilia H. Ramos Morales reciban mi agradecimiento por la revisión y las sugerencias para el mejoramiento de la tesis.

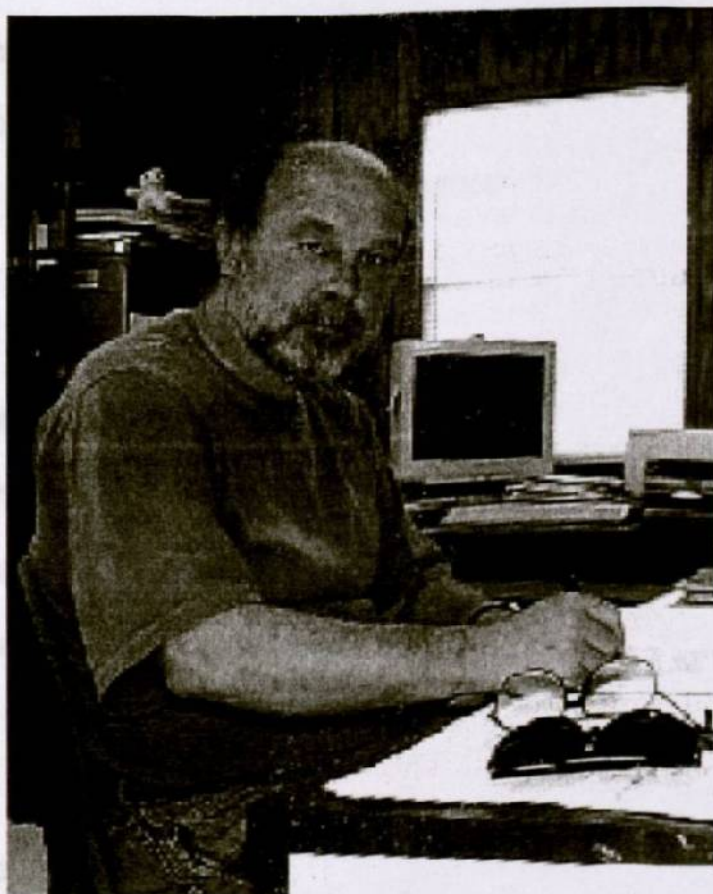
AL CONACYT por apoyo económico para la realización del trabajo y el otorgamiento de la beca de postgrado.

AI ASESOR EXTERNO Dr. Mark Jackson por darme su experiencia, la asesoría y consejos para la realización del proyecto de tesis, mil gracias.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y DEL SUELO a todos los integrantes mi agradecimiento por ser compañeros y amigos.

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO A LA MEMORIA al quien fue mi asesor externo **Dr. Tadeus Popraswki** mi gran tristeza por ya no tenerlo con nosotros. Fue poco lo que convivimos pero a pesar de esto mi reconocimiento a un gran investigador y una gran persona **QUE DIOS LO TENGA EN SU GLORIA.**



Página

1

2

3

7

7

8

10

10

10

11

11

13

14

16

17

18

18

19

20

21

24

Modo de acción

Hongos entomopatógenos para el control de mosquitos blancos

INDICE

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	7
Mosquita blanca (<i>Bemisia spp</i>)	7
Biotipos	8
Ciclo biológico	10
Huevecillo	10
Desarrollo ninfal 1°, 2° y 3°	10
Pupa	11
Adulto	11
Hospederos	13
Daños causados por <i>Bemisia</i>	14
Impacto económico	16
Control químico	17
Enemigos naturales de mosquita blanca	18
Predadores	18
Parasitoides	19
Hongos como bioinsecticidas	20
Modo de acción	21
Hongos entomopatógenos para el control de mosquita blanca	24

Métodos de producción	27
Formulaciones	33
Formulaciones con hongos entomopatógenos	34
Formulaciones con pelet de alginato	35
Formulaciones en aceite	37
Formulaciones con blastoesporas	38
Objetivo del trabajo	41
Objetivos específicos	41
Material y método	42
Cepa utilizada	42
Obtención de conidias	42
Producción de blastoesporas en medios líquidos	43
Formulaciones en aceite	44
Formulaciones en polvo	44
Prueba de viabilidad de las blastoesporas	45
Bioensayos contra <i>Bemisia argentifolii</i>	46
Resultados	48
Evaluación de formulaciones líquidas	50
Evaluación de formulaciones secas	51
Discusión	67
Conclusiones	72
Literatura citada	73

RESUMEN

Las formulaciones pueden jugar un papel importante en la supervivencia al almacenaje y eficacia de biocontrol de los microorganismos utilizados para el control de insectos plaga. En este estudio, blastoesporas producidas en cultivo líquido del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* fueron formulados con diferentes materiales inertes y orgánicos antes de secarlos al aire. Blastoesporas de *P. fumosoroseus* fueron producidas en dos diferentes medios líquidos, un medio basado en sales suplementado con Casamino ácidos y glucosa (LM 1) y un medio que contuvo peptona de colágena y glucosa (LM 2). Blastoesporas producidas en los dos medios a probar fueron formulados con diferentes soportes. Los soportes para formulación fueron fécula de maíz, harina de arroz, talcos, una cal mexicana, una arcilla calcinada (Surround) y tierra de diatomeas, los cuales fueron probados en diferentes concentraciones. Se evaluó la supervivencia y cada tiempo de los formulados de blastoesporas secados al aire, después de almacenados a 4 y 28 °C. La viabilidad inicial de las blastoesporas fue afectada por el material de formulación y por el medio de producción. La composición del medio, secado del soporte y temperatura de almacenaje tuvieron impacto sobre la supervivencia a diferentes tiempos de las blastoesporas. Bajo las condiciones del estudio, el medio LM 1 produjo la más alta concentración de blastoesporas, además estas presentaron las mejores supervivencia al secado y mantuvieron la viabilidad por mucho más tiempo que las blastoesporas producidas en el medio LM 2. La naturaleza del soporte durante el secado mostró tener un efecto significativo sobre la estabilidad al almacenaje de todas las blastoesporas, particularmente aquellas producidas en el medio LM 1. Bajo las condiciones de producción, secado y almacenaje utilizados en este estudio, las esporas formuladas en arcilla calcinada (Surround) y almacenadas a 4 °C presentaron la mejor estabilidad al almacenamiento. En todas las formulaciones probadas, la supervivencia durante el almacenaje de las blastoesporas producidas tanto en el medio LM 1 y LM 2 se ve más afectado a 28 °C que a 4 °C.

ABSTRACT

Formulation matrices can play an important role in improving the storage survival and efficacy of microorganisms used for the control of pest insects. In this study, liquid culture-produced blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* were formulated with different inert and organic materials prior to air-drying. *P. fumosoroseus* blastospores were produced in two different liquid media, a basal salts medium supplemented with Casamino acids and glucose (LM 1) and a medium containing peptone of collagen and glucose (LM 2). Blastospores produced in the two test media were formulated with various supports. The formulation supports were cornstarch, rice flour, talc powders, Mexican lime, calcinated kaolin clay (Surround), and diatomaceous earth. The supports were tested at different concentrations. The initial and long-term (after storage at 4 and 28 °C) survival of the formulated, air-dried blastospores were evaluated. Initial blastospore viability was affected by the formulation material and by the blastospore production medium. Medium composition, drying support and storage temperature had an impact on the long-term survival of blastospores. Under the conditions of study, LM 1 produced higher concentrations of blastospores that not only survived drying better than blastospores produced in LM 2 but also maintained viability longer during storage in the formulation supports tested. The nature of the drying supports was shown to have a significance impact on the storage stability of all blastospores, particularly those produced in LM 1. Under the production, drying and storage conditions used in the study, calcined kaolin clay formulations stored at 4 °C had the best storage stability. In all formulations stored at 28 °C rather than 4 °C.

INTRODUCCIÓN

Aunque la vasta mayoría de insectos pueden ser benéficos o dañinos al humano, el control de unas pocas especies de plagas ha sido un desafío desde los inicios de la agricultura. Actualmente, poco más del 1% de las especies de insectos conocidas son consideradas plagas. Estos insectos destruyen cultivos, y viviendas, comen alimentos de la mesa y atacan a las personas. En respuesta a estas plagas y a los problemas que estos causan, algunas de las toxinas más letales se han desarrollado y esparcido en todos los ambientes. Aunque estas son efectivas en un tiempo corto, los plaguicidas químicos son costosos y típicamente proveen alivio temporal, hasta que la reproducción explosiva y capacidad evolutiva de los insectos permitan que éstos desarrollen mecanismos de resistencia a estos y otras estrategias de control (Miller, *et al.*, 1983; Hoelmer, *et al.*, 1994).

Efectos secundarios (daños a la salud humana, a organismos no blancos y contaminación ambiental) producidos por la aplicación de pesticidas a tierras agrícolas y residenciales para el control de insectos, enfermedades de plantas y malezas, sugiere que estas estrategias de control pueden convertirse en una misma derrota. Sin embargo, los pesticidas químicos son herramientas que pueden ser usadas acertadamente en el combate de insectos plagas. El desafío entonces, es utilizarlos solamente cuando sea necesario y en asociación con otros métodos ecológicos de control de plagas. Múltiples tácticas, que incluyen métodos químicos, culturales y biológicos se utilizan para mantener las poblaciones de plaga por debajo de los niveles económicamente significativos (Osborne y Landa, 1992; Osborne y Landa 1994).

Bemisia tabaci (Gennadius), la mosquita blanca de la remolacha, también es conocida como la mosquita blanca del tabaco y el algodón, es reconocida como una de las principales plagas en cultivos de importancia económica en el mundo. Se distribuye por todo el mundo principalmente en zonas tropicales y subtropicales (De Quattro, *et al.*, 1997). Este insecto (*Bemisia tabaci*) fue primeramente reportado en 1889 como plaga en cultivos de tabaco en Grecia, aunque su origen es incierto, aunque fue reportada en los Estados Unidos en 1897 sobre remolacha y hasta la fecha se le conoce como mosquita blanca de la remolacha dulce. Esta especie, junto con otras 18 especies previamente descritas de mosquita blanca fueron colectivamente llamadas *B. tabaci* (hasta ahora, *B. tabaci* es también conocida como la mosquita blanca del tabaco, algodón). Fue considerada solamente como una plaga esporádica hasta los años ochentas. Sin embargo, posiblemente debido a las prácticas de la agricultura moderna, hoy esta plaga es extremadamente destructiva en cultivos agrícolas, plantas ornamentales y cultivos de invernadero a través del mundo (Landa *et al.*, 1994; Salas y Mendoza, 1995).

Esta plaga ataca aproximadamente 500 especies de plantas en las que se incluyen 70 diferentes familias. También sirve como un vector para muchos virus de plantas, transmitiendo cerca de 20 de estos, los cuales causan enfermedades en diferentes cultivos; además, producen exudados en forma de mielecilla que promueve el crecimiento de moho negro, el cual interfiere con el crecimiento de la planta y calidad del producto en diferentes cultivos. Recientemente científicos de California han propuesto el nombre de *Bemisia argentifolii* (mosquita blanca de la hoja plateada) para ser utilizado para la mosquita blanca que ataca a los cultivos en el sur de los Estados

Unidos, debido a que se cree que es un biotipo diferente de *B. tabaci* (Tsai y Wang, 1996; Liu y Stansly, 1998).

Pérdidas en las cosechas debido a esta plaga son variables, pero frecuentemente están en el rango de 500 millones a un billón de dólares anualmente. La mosquita blanca ha incrementado la capacidad de ser controlada a través de insecticidas químicos, debido a su rápido desarrollo de resistencia y al hecho de que habita en la parte inferior de las hojas, las cuales son difíciles de asperjar (Olson y Oetting, 1999). Debido a los problemas asociados con control químico convencional de la mosquita blanca, los esfuerzos de los investigadores están incrementándose a ser dirigidos hacia estrategias de control biológico (De Quattro *et al.*, 1997; James y Jaronski, 2000).

El control biológico el cual implica el uso de enemigos naturales que ayudan a regular poblaciones de plagas, ha sido soporte en muchos programas de manejo integrado de plagas. En la mayoría de los casos, el control biológico involucra el uso de parásitos, predadores, o patógenos que atacan, dañan o matan al insecto blanco. (Soper y Ward, 1981; Miller *et al.*, 1983; Bartlett y Jaronski, 1988; Hoelmer *et al.*, 1994; Stansly *et al.*, 1997; James y Jaronski, 2000).

Desde 1880 se conoce a los hongos como causantes de infecciones hacia insectos de importancia económica, esta cualidad ha representado que los hongos entomopatógenos sean estudiados como potencial para el control de plagas agrícolas. Las enfermedades fúngicas en insectos son comunes, ampliamente dispersas y frecuentemente diezman las poblaciones de insectos debido a que causan epizootias (Vidal *et al.*, 1997; Luz y Fargues 1999). Virtualmente todas las órdenes de insectos son susceptibles a los hongos. Contrario a los microorganismos patógenos de insectos, los

cuales deben ser ingeridos para iniciar la enfermedad (virus, bacterias y protozoarios); los hongos entomopatógenos normalmente invaden a través de la cutícula del huésped. Más de 700 especies de hongos de aproximadamente 90 géneros son patógenos a insectos (Feng *et al.*, 1994). No obstante algunos hongos están bajo desarrollo para el control de plagas como por ejemplo, *Entomophaga*, *Neozygites*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Metharizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*. Los principales insectos blanco son Culicidae (mosquitos), Aphidae (afidos) Delphacidae (planthoppers), Cicadellide (leafhoppers), Cercopidae (spittle bugs), Aleyrodidae (mosquita blanca), Coccoidae (escamas), Thysanóptera (trips), Coleóptera (escarabajos) y Leptidóptera (orugas) Dípteros (moscas) y muchos otras órdenes de insectos son infectados por diversos hongos entomopatógenos (Wraight y Roberts, 1987; Osborne y Landa, 1992; Smith, 1993; Barson *et al.*, 1994; Hajek y St. Leger, 1994; Hoelmer *et al.*, 1994; Geden *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Altre *et al.*, 1999; Brownbridge *et al.*, 1999).

Debido a la gran importancia que tienen los hongos entomopatógenos en controlar diversas plagas agrícolas, es de gran interés evaluar medios de producción rápidos y materiales para formular blastoesporas, para lograr mejorar la estabilidad al almacenaje y facilidad de aplicación en campo.

ANTECEDENTES

Mosquita blanca (*Bemisia spp.*).

Se conocen aproximadamente 1200 especies de mosquita blanca (Homóptera: Aleyrodidae). Son pequeños insectos que se alimentan de plantas con partes bucales penetrantes y succionantes. Estas son plagas en muchos cultivos importantes en agricultura y horticultura, tanto dentro y fuera de ambientes de invernaderos (Drost *et al.*, 1998).

La mosquita blanca del tabaco, *Bemisia tabaci*, también es conocida como mosquita blanca del camote o algodón, fue primeramente encontrada en Grecia en 1889 sobre plantas de tabaco y posteriormente fue descubierto en Florida en 1900. Es una plaga predominante sobre plantas de algodón en los Estados Unidos, debido al incremento de su resistencia a los insecticidas por parte del insecto. Se ha reportado en la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo (Liu y Stansly, 1998). Sin embargo hasta hace 15 años, este insecto fue considerado solamente de interés distribución taxonómica, describiéndose diferentes especies de mosquita blanca con gran importancia en plantas de invernadero y agrícolas (Tabla 1). Desde entonces y hasta la fecha *B. tabaci* se ha considerado una plaga en muchas partes del mundo como: Africa, El Mediterráneo, El Medio Este, India, Australia, Islas del Pacífico, Sur Oeste de los Estados Unidos, El Caribe y América del Sur no ecuatorial (Castineiras, 1995; Bográn *et al.*, 1998). Dentro de los últimos 8 años, *B. tabaci* se ha encontrado como una plaga en invernaderos en el norte de Europa y Canadá (Smith P., 1993; De Quattro *et al.* 1997).

Tabla 1. Diferentes géneros y especies de mosquita blanca de mayor importancia.

Nombre científico	Nombre común
<i>Aleurotulus anthuricola</i>	Anthurium whitefly
<i>Aleurodicus disperses</i>	Spiraling whitefly
<i>Aleurothrixus floccosus</i>	Woolly whitefly
<i>Aleurocantus spiniferus</i>	Orange spiny whitefly
<i>Bemisia argentifolii</i>	Silverleaf whitefly
<i>Bemisa tabaci</i>	Sweetpotato whitefly
<i>Orchamoplatus mammaeferus</i>	Croton whitefly
<i>Paraleyrodes perseae</i>	Plumeria whitefly
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Greenhouse whitefly

Biotipos

Nuevas evidencias sugieren que *B. tabaci* puede ser una especie compleja que sufrió cambios evolutivos. Como resultado, la relevancia de terminología, cepa, biotipo, especies y especies complejas está bajo consideración. Basados en investigaciones de aloenzimas en poblaciones de diferentes poblaciones geográficas, ahora se sugiere que el biotipo B pertenece al grupo del Viejo Mundo y el biotipo A al grupo del Nuevo Mundo. En muchos estudios, el biotipo de la mosquita blanca no se menciona, pero si se incluyen la planta huésped y el origen, lo que hace posible en la mayoría de los casos, caracterizar poblaciones como biotipo A, biotipo B, grupo del Viejo Mundo y grupo de la India (Gill, 1990; Drost, *et al.*, 1998).

Tabla 2. Identificación de biotipos de diferentes poblaciones de *Bemisia tabaci*

Planta huésped	Población origen	Biotipo	Identificación
Algodón	Algodón, Sudán	Viejo	Biotipo Viejo Mundo
Sweet potato Noche buena	Lantana camara Invernaderos de noche buena, FL, EUA	Viejo B	Costa & Brown (1991)
Algodón	Algodón, Valle Imperial (1981), CA, EUA	A?	California antes de la introducción del biotipo B
Varios Algodón	PA, EUA Algodón, AZ, EUA	A y B A	Perring <i>et al.</i> (1992) Costa & Brown (1991)
Lechuga/Algodón	Calabaza, AZ, EUA	A	Costa & Brown (1991)
Algodón	Calabaza, AZ, EUA	A	Costa & Brown (1991)
Calabaza	Calabaza, AZ, EUA	A	Costa & Brown (1991)
Noche buena	Invernaderos de noche buena, AZ, EUA	B	Costa & Brown (1991)
Varios	Calabaza, AZ, EUA	A	Costa & Brown (1991)
Varios	Algodón, Valle Imperial (1985), CA, EUA	A?	California antes de la introducción del biotipo B
Vegetales Noche buena	Sembradíos, Egipto Alemania	Viejo B	Rothamsted Exp. St.
Algodón	Algodón, Sudan	Viejo	
Tomate	Algodón, Sudan	Viejo	
Varios	Noche buena, GA, EUA	B	Identificado, persona no mencionada
Algodón	Algodón, Israel	Viejo	
Algodón	Algodón, Israel	Viejo	
Vegetales	Sembradíos, Jordania	Viejo	
Algodón/Pepino	Algodón, Valle Imperial (1980's), CA, EUA	A?	California antes de la introducción del biotipo B
Varios	Valle de Jordania, Jordania	Viejo	
Vegetales	Sembradíos, SC (1991), EUA	?	
Varios	Berenjena, FL, EUA	B	T.M. Perring, Universidad de California Riverside, EUA
Algodón	Algodón, India	India	
Algodón	Campos de algodón, MS, EUA, 1991	B	USDA, Phoenix, AZ, EUA
Varios	Berenjena, FL, EUA	B	T.M. Perring, UCR, EUA
Varios	Brocoli, Valle Imperial, CA (1991), EUA	B	No mencionado, pero UCR lo llama <i>B. argentifolii</i>

Tomado de Drost *et al.*, 1998

Ciclo biológico

Huevecillo

La hembra coloca huevecillos sobre el envés de las hojas nuevas, su tamaño es pequeño (0.25 mm de diámetro), de forma oval o piramidal. Después de 1 ó 2 días, los huevecillos cambian de color café a negros (*Trialeurodes vaporariorum*) o verde amarillento a café (*B. tabaci*) y la larva emerge después de 7 a 10 días. Los huevos tienen un pedicelo parecido a clavija que se inserta dentro de una hendidura hecha por el ovipositor de la hembra en la superficie de la hoja; alternativamente, los huevecillos pueden ser depositados directamente dentro de aperturas estomáticas. Una sustancia parecida a goma es depositada en la base del pedicelo, pegando los huevecillos en el lugar. El pedicelo vierte agua dentro del huevecillo, evitando así la desecación después de la oviposición (Tsai y Wang, 1996; Liu y Standly, 1998).

Desarrollo ninfal 1°, 2° y 3° instar

Las ninfas son transparentes de 0.3 - 0.7 mm en tamaño, móvil al inicio, pero volviéndose inmóvil después de las primeras horas, tiempo en el cual éstas comienzan a alimentarse. Las ninfas son de forma oval y depositan demasiada cera en esta etapa. Comprende tres etapas ninfales y cada uno tiene una duración de 2 a 4 días. La primera etapa ninfal, es la que sale del huevo y se arrastra una distancia corta sobre la superficie de la hoja hasta encontrar un sitio adecuado donde se fija y comienza a alimentarse. Esta etapa es oval con patas bien desarrolladas y antenas, con un color verde pálido. La segunda y tercera etapa ninfal es aplanada de forma parecido a escamas y generalmente transparentes con patas y antenas no funcionales. Del

segundo hasta el cuarto estado ninfal son sedentarios durante todo el periodo de desarrollo (Salas y Mendoza, 1995; Tsai y Wang, 1996; Pacheco y Pacheco, 1998).

Pupa

La cuarta etapa ninfal es considerada como la pupa, los ojos del adulto en crecimiento son visibles. La pupa es gris y rodeada por mucha cera y mielecilla. Es subdividido en tres subetapas: La cuarta etapa temprana es aplanada y translúcida a blanco opaco; cuarta etapa transitoria, es gruesa, opaca y envainado con cera; la fase de adulto es similar a la etapa transitoria, excepto que los ojos rojos del adulto en desarrollo son claramente visibles y el cuerpo llega a ser amarillo semejante al adulto (Tsai y Wang, 1996; Pacheco y Pacheco, 1998.)

Adulto

La mayoría de los adultos emergen de una hendidura en el exoesqueleto de la pupa en las primeras horas de la mañana. Este proceso comienza primero a temperaturas altas y se detiene completamente debajo de 17 °C. Esto toma cerca de 4 horas a 27 °C en la mosquita blanca de la remolacha para estar preparada a volar, aunque en la mosquita de la col, este período es mucho más largo (16-56 h a 10-25 °C) (Pacheco y Pacheco, 1998; Liu y Standly, 1998).

En general, las mosquitas blancas se alimentan de la savia del floema, que es el principal fluido nutricio transportado por las plantas. Esto lo hacen insertando su parte bucal delgado dentro del tejido de la planta y succionando el tejido vascular. Perforando la pared de un vaso del floema, éstas obtienen el acceso a una fuente de alimento rica en carbohidratos y aminoácidos. Una bomba muscular en la cabeza de la ninfa y adulto,

y en conjunto con la presión turgente de la planta se usa para ingerir el alimento (Osborne y Landa, 1992).

Cuando la excreta de la mosquita blanca (mielecilla) es analizada para determinar su composición química, se puede observar que los aminoácidos y azúcares presentes en el alimento se metabolizan dentro del insecto. Sin embargo, el papel relativo de los insectos y las bacterias que viven dentro, está todavía bajo investigación (Tsai y Wang, 1996; Pacheco y Pacheco, 1998).

Los machos y hembras frecuentemente emergen cerca uno de otro sobre la misma hoja y en la mosquita blanca de la remolacha el apareamiento se presenta en los primeros días de la vida adulta. El apareamiento es precedido por un cortejo complejo, él cual si es exitoso, conduce a una copulación de entre 2 y 4 minutos. Múltiples acoplamientos se presentan tanto en mosquita blanca del camote y la mosquita blanca del invernadero. Las hembras apareadas producen tanto hembras y machos, mientras que las hembras sin aparearse producen únicamente hembras (Liu y Standly, 1998).

La oviposición varía entre las especies de mosquitas y puede también diferir cuando la misma especie deposita huevecillos sobre hojas con diferentes características superficiales. Esta se presenta de 1 a 8 días después de la época de celo. La hembra deposita huevos dentro de 1 ó 2 días de manera individual, espiral o circular sobre la parte inferior de la hoja y puede depositar por arriba de 500 huevos en un ciclo vital (Gill, 1990; McAuslane, 1996; Liu y Standly, 1998).

La longitud del ciclo de vida depende de la temperatura, la cual se encuentra en el rango de 4 semanas a 27 °C o de 8 semanas a 14 °C. Los daños son causados por succión de la savia de las hojas por los adultos y larvas, los cuales pueden causar

atrofias, caída de hojas y reducción en la producción. El depósito de mielecilla sobre fruta la hacen pegajosa y con el crecimiento de moho negro (*Capnodium spp*) que hace a la fruta no comerciable. También las mosquitas son responsables de transmitir diferentes patógenos virales que causan numerosas pérdidas en las cosechas (Drost et al., 1998)

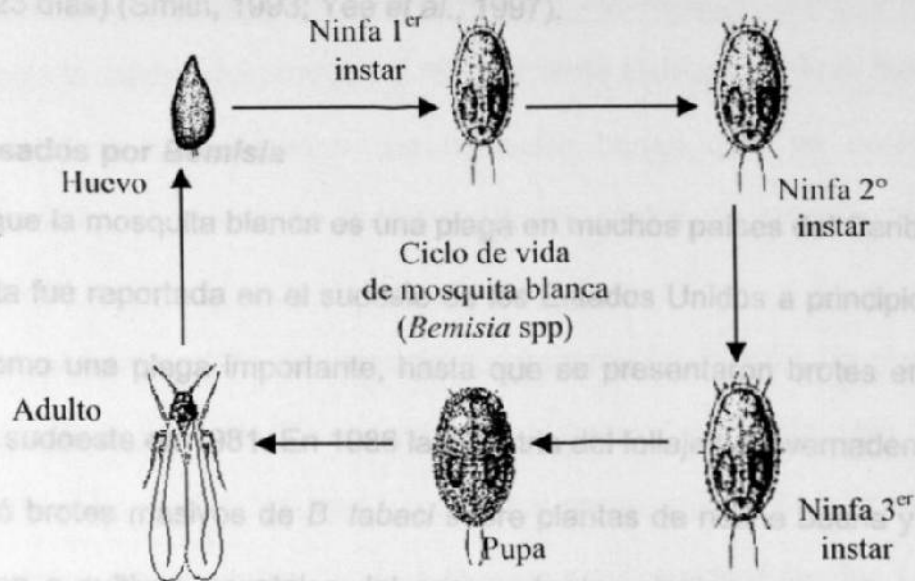


Figura 1. Ciclo de vida de *Bemisia spp*

Hospederos

La mosquita blanca tiene un amplio rango de huésped, ésta ataca a más de 500 especies de plantas, pertenecientes a 63 familias diferentes. Los cultivos huésped que soportan altas poblaciones incluyen, alfalfa, brócoli, lechuga, coliflor, algodón, pepino, tomate, calabaza, cacahuete, sandía, frijol y melón. Las plantas ornamentales huésped que soportan altas poblaciones incluyen, noche buena, tulipán, lantana, margarita, verbena, azucena, flor de lis, mirto, petunia y rosas. Frecuentemente, las malezas sirven como huésped alternante de otras plantas ornamentales o cultivables (Liu y Stansly, 1998).

Diferentes especies de plantas huésped pueden afectar significativamente la supervivencia y tasa de reproducción de la mosquita blanca, por ejemplo a 25 °C, el desarrollo del huevo a adulto para *B. tabaci* cepa B es más rápida sobre begonia (20 días), es más lenta sobre gerbera (29 días) y es intermedia sobre hibiscus (25 días) y poinsettia (23 días) (Smith, 1993; Yee *et al.*, 1997).

Daños causados por *Bemisia*

Aunque la mosquita blanca es una plaga en muchos países del Caribe y América Central, ésta fue reportada en el sudeste de los Estados Unidos a principio de 1894, y apareció como una plaga importante, hasta que se presentaron brotes en el desierto irrigado del sudoeste en 1981. En 1986 la industria del follaje de invernadero de Florida, experimentó brotes masivos de *B. tabaci* sobre plantas de noche buena y en 1987-88 se ampliaron a cultivos vegetales del campo, brotes similares se extendieron hasta Arizona, California y Texas (Osborne y Landa, 1992; Smith, 1993; De Quattro *et al.*, 1997).

La mosquita blanca es una plaga importante en muchos cultivos. Cuatro tipos de daños pueden ser causados: 1) daño directo, 2) daño indirecto, 3) transmisión de virus, e/4) inyección de toxinas (De Quattro *et al.*, 1997; Pacheco y Pacheco, 1998).

Daño directo por alimentación es causado por penetración y succión de la savia del follaje de las plantas, lo que causa debilitamiento y marchitamiento prematuro de la planta y reduce la velocidad de crecimiento y rendimiento de la planta. También puede causar clorosis, debilitamiento, caída prematura de las hojas y muerte de la planta. Infestaciones de ninfas de mosquita blanca están asociadas con la aparición de maduración irregular del tomate y calabaza (De Quattro *et al.*, 1997).

Daño indirecto resulta de la acumulación de mielecilla producida por las mosquitas, sobre la cual se desarrollan hongos de color negro conocidos comúnmente como fumagina sobre la hoja y frutos. El hongo reduce la fotosíntesis y pérdida del valor comercial de la planta y/o rendimientos sin valor comercial. En las plantas de algodón, la mielecilla contamina la fibra volviéndola pegajosa, lo cual dificulta el proceso de hilado, baja la calidad del producto final y aumenta el desgaste de la maquinaria. Los frutos y hortalizas contaminados con mielecilla tienen que ser lavados para su comercialización, por lo que se incrementan los costos de producción (Pacheco y Pacheco, 1998)

El tercer tipo de daño es causado por transmisión de virus de plantas por este insecto. Una pequeña población de mosquita blanca es suficiente para causar daños considerables. Los virus de plantas transmitidos por mosquita blanca causan cerca de 40 enfermedades en vegetales y plantas fibrosas en el mundo. Entre las 1,100 especies reconocidas de mosquitas en el mundo, solamente tres son reconocidas como vectores de virus de plantas. Partículas virales son transportadas en la saliva de la mosquita, si ésta se alimenta sobre una planta infectada, y cuando el insecto se mueve a plantas sanas en el mismo cultivo o se transporta a varios kilómetros de distancia es cuando comienza a los problemas de transmisión de virus (Damstteegt, 1999).

La mosquita blanca del carnote (*B. tabaci*) y la mosquita blanca de la hoja plateada (*B. argentifolii*) transmiten más de 30 diferentes agentes causales de enfermedades virales, tales como geminivirus y closterovirus en el ámbito mundial. En México, los geminivirus se encuentran en todas las regiones horticolas, afectando a los cultivos de chile, tomate, tabaco, calabaza y tomatillo (Pacheco y Pacheco, 1998; Stevens III *et al.*, 2000).

Devastaciones en la última década por virus fitopatógenos transmitidos por la mosquita blanca causaron pérdidas en la producción entre el 20 al 100 por ciento, dependiendo del cultivo, estación y predominio de la mosquita blanca. Algunas de las enfermedades asociadas con *B. tabaci* incluyen, marchitamiento de la lechuga, maduración irregular del tomate, calabaza, rizado de la hoja del algodón, tabaco y cazabe. Desórdenes en el crecimiento de las plantas fueron enlazados a *B. tabaci* y brotes extensos de un geminivirus transmitido por *B. tabaci* fueron reportados en tomate en 1989 (Darnstteegt, 1999).

Tabla 3. Enfermedades y virus de plantas transmitidos por *Bemisia* spp.

Enfermedad	Categoría	Huésped principal	Vector	Distribución geográfica	Pérdida potencial
Infección amarillenta de la lechuga por Crinivirus	Emergente	Lechuga	<i>Bemisia tabaci</i>	Sudoeste de EUA	Serías pérdidas económicas en epidemias
Infección amarillenta del tomate por Crinivirus	Nueva/emergente	Tomate	<i>T. vaporariorum</i>	EUA, Europa, Medio - Este	
Clorosis del tomate por Crinivirus	Nueva/emergente	Tomate	<i>T. vaporariorum</i>	EUA	
Clorosis de la lechuga por crinivirus	Nueva/emergente	Lechuga	<i>Bemisia argentifolii</i>	Sudoeste de EUA	
Trastorno del crecimiento amarillento del pepino por crinivirus	Amenazadora	Pepino	<i>Bemisia argentifolii</i>	Europa, Medio - Este	Alta
Trastorno clorótica de la remolacha del crinivirus		Remolacha	<i>Bemisia tabaci</i>	Distribución mundial	
Rizado amarillento de la hoja del tomate, por geminivirus	Emergente	Tomate	<i>Bemisia</i> spp.	Distribución mundial	Severa
Amugamiento de la hoja del algodón	Nueva	Algodón	<i>Bemisia</i> spp.	Distribución mundial	Severa

Modificado de Darnstteegt, 1999.

Además de los geminivirus, también se han implicado a las mosquitas blancas como vectores de un nuevo grupo de virus, los crinivirus, los cuales fueron previamente agrupados como closterovirus. Con la repentina explosión de la mosquita blanca dentro de regiones más templadas en los últimos 10 ó 20 años, diversas enfermedades

nuevas, han tenido impactos importantes en las producciones de diversas plantas (Damstteegt, 1999).

El cuarto tipo de daño, es causado principalmente por *B. argentifolii* mediante inyección de toxinas durante el proceso de alimentación de las ninfas, causando el síndrome de la hoja plateada en calabaza, la maduración irregular del tomate, la palidez del tallo en brócoli y el amarillento del follaje de la lechuga (Pacheco y Pacheco, 1998).

Impacto económico

B. tabaci se conoce que es una plaga de poca importancia en algodón y otros cultivos tropicales y semi-tropicales con climas cálidos en el mundo, y recientemente se ha controlado con facilidad por insecticidas. En California en 1981, sin embargo, se estimó que causó pérdidas estimadas de aproximadamente 100 millones de dólares en tomate, lechuga y algodón. También se ha observado como una seria plaga en invernaderos en Norte América y Europa (De Quattro *et al.*, 1997).

La alimentación del adulto y ninfa causan manchas cloróticas que aparecen en la superficie de la hoja. Dependiendo del nivel de infestación, estas manchas pueden unirse hasta que la hoja se toma completamente amarilla, aparte del área inmediatamente alrededor de la vena. La mielecilla producida por la alimentación de la ninfa cubre la superficie de la hoja y puede causar reducción en el potencial fotosintético cuando es colonizado por moho. La mielecilla también puede desfigurar flores y en el caso del algodón, puede causar problemas en el procesamiento de la borra de algodón. Con infestaciones pesadas, la altura de la planta, número de internodos, calidad y cantidad de rendimientos pueden ser afectados.

Control químico

El control químico convencional de la mosquita blanca es difícil de llevar a cabo primeramente debido a la distribución de formas inmaduras sobre el lado inferior de las hojas, con larvas y pupas más viejas localizadas por debajo del dosel de la planta. La diversidad de las plantas huésped de cultivos y malezas afectadas contribuyen la fuente de infestación. Un gran número de insecticidas ha controlado efectivamente esta plaga en el pasado, pero resistencia a la mayoría de los insecticidas se desarrollan rápidamente. Diversos materiales nuevos, incluyen sistémicos, reguladores del crecimiento y nuevos insecticidas piretroides parecen prometedores, sin embargo, el fenómeno de resistencia sugiere que su eficacia podría ser de una duración limitada. La confianza actual sobre el control químico deberá considerar ser una medida temporal hasta que un programa satisfactorio de manejo integrado de plagas se pueda desarrollar. Mosquita blanca representa un grupo de insectos con gran capacidad de desarrollar poblaciones que son altamente resistentes a los pesticidas. Predadores, parasitoides y microorganismos entomopatógenos, se han estudiado intensamente para el control biológico de mosquita blanca con gran éxito.

ENEMIGOS NATURALES DE MOSQUITA BLANCA

Depredadores

Los depredadores son organismos que obtienen energía del alimento por el consumo de más de una presa individual durante el curso de su vida, frecuentemente los estados inmaduros y adultos pueden ser depredados.

B. tabaci cepa B es atacada por especies predadoras que representan a 8 órdenes de artrópodos. Al menos 4 especies de predadores que están comercialmente

disponibles se han evaluado por su capacidad de controlar *B. tabaci* cepa B, en cultivos creciendo en invernaderos: *Delphastus pusillus* (Coleóptera: Coccinellidae), *Macrolophus caliginosus* (Hemiptera: Miridae), *Chrysoperla carnea* y *C. rufilabris* (Neuróptera: Chrysopidae) (De Quattro *et al.*, 1997).

Escarabajos adultos e inmaduros de *D. pusillus*, se alimentan penetrando el integumento de la mosquita blanca y extrayendo el contenido resultando en una cutícula aplanada y vacía. También pueden alimentarse sobre huevecillos, ninfas y adultos. Larvas y adultos evitan alimentarse sobre mosquita blanca con etapa de desarrollo avanzado con parásitos y preferentemente atacan presas no parasitadas (De Quattro *et al.*, 1997; Poprawski *et al.*, 1998).

Parasitoides

Los parasitoides se distinguen por el hecho de que los estados inmaduros se desarrollan a la expensa de un individuo, al cual se refiere como huésped. Los parasitoides difieren de los parásitos en el que estos matan a su huésped para completar su desarrollo. Los parasitoides de la mosquita blanca más estudiados son *Encarsia formosa* y *Eretmocerus eremicus*, los cuales están comercialmente disponibles. En *Encarsia*, las hembras preferentemente depositan huevos individuales en ninfas de tercero y cuarto instar. Las avispas adultas obtienen energía y nutrientes por penetración del integumento de la ninfa por el ovipositor y se alimentan de la hemolinfa que escurre de la herida. La larva de avispa se desarrolla dentro de la ninfa o pupa de la mosquita blanca, las ninfas parasitadas son fácilmente reconocidas debido a que llegan a ser negras después de aproximadamente de 10 días de desarrollo de avispas jóvenes (Stevens III *et al.*, 2000).

HONGOS COMO BIOINSECTICIDAS

Aproximadamente en el año 900 a. C., se conoció en el oriente que los hongos podrían crecer en insectos. Los primeros trabajos de Bassi con *B. bassiana* en el gusano de seda en 1834, demostraron que los hongos pueden causar enfermedades infecciosas en los insectos. Desde 1880 hasta principios del siglo 20, espectaculares epizootias causadas por hongos entomopatógenos han conducidos a estudios de su uso potencial para el control de plagas (Tabla 4) (Valenzuela, 1987; Bartlett y Jaronski, 1988; Gillespie y Claydon, 1989, Bradley *et al.*, 1992; Altre *et al.*, 1999). Entre los microorganismos causantes de enfermedades en insectos, los hongos son únicos, debido a que infectan a través de la cutícula, por lo que no tienen que ser ingeridos por el insecto, esto le confiere cierta particularidad ya que los hongos entomopatógenos infectan a plagas que se alimentan por succión (Miller, *et al.*, 1983; Deacon, 1984; Klausner, 1984).

Tabla 4. Géneros de hongos con potencial como agentes de control biológico.

Subdivisión Deuteromicotina	Hospedero	Estado
Clase Coelomycetes		
<i>Aschersonia</i>	Mosquita blanca	En uso, Rusia
Clase Huyphomycetes		
<i>Beauveria</i>	Orugas, escarabajos, mosquitos, termitas, ácaros, hormigas, mosquita blanca	Registrado, en uso, Rusia, EUA
<i>Culicinomyces</i>	Mosquitos	
<i>Hirsutella</i>	Planhoppers, ácaros	Registrado, no en uso, EUA
<i>Metahrizium</i>	Spittlebugs, planthoppers, escarabajos, mosquitos, termitas	Registrado, en uso, Brasil
<i>Numoraea</i>	Orugas	
<i>Paecilomyces</i>	Orugas, escarabajos, mosquita blanca	Registrado, en uso, Filipinas
<i>Tolyocladium</i>	Mosquitos	
<i>Verticillium</i>	Afidos, mosquita blanca, thrips, ácaro, grasshoppers	

Tomado de Roberts *et al.* 1991

De 700 especies de hongos entomopatógenos conocidos, aproximadamente cerca de 100 géneros ampliamente distribuidos proporcionan una diversidad genética diversa para selección y desarrollo de candidatos para la producción de micoinsecticidas. Sin embargo, la mayoría de nuestro conocimiento sobre estos hongos, solamente se centra alrededor de pocas especies que han sido estudiadas intensamente (Soper y Ward, 1981; Roberts y Hajek, 1992; Lacey y Goettl 1995).

Modo de acción

Hay numerosas ventajas para el uso de los hongos como agente de biocontrol microbial, esta capacidad es la de infectar y matar activamente a insectos plaga de importancia agrícola. Las esporas fúngicas son capaces de germinar y penetrar a un insecto saludable y no requieren comprometerse con la defensa celular del huésped (Hung *et al.*, 1992; Hung y Boucias, 1993; Pendland *et al.*, 1993; Jackson, 1997).

El proceso de infección inicia cuando la conidia se adhiere a la cutícula del insecto huésped. Secreciones de un moco adhesivo como parte de la hinchazón de la conidia durante el desarrollo pregerminativo complementan las interacciones hidrofóbicas iniciales entre la conidia y la superficie de la cutícula (Samson *et al.*, 1988; Bidochka *et al.*, 1999). Una infección puede ser abortada si un factor esencial para una fase de adhesión, desarrollo microbial o patogénesis está ausente. Específicamente el proceso de infección puede ser impedido por baja humedad, incapacidad de utilizar un nutrimento sobre la cutícula o ausencia de factores necesarios para el reconocimiento de un huésped o sitios de infección penetrables (Samson *et al.*, 1988; Lane *et al.*, 1991). En algunos sistemas, los hongos fallan para invadir la cutícula, esto se atribuye

a la presencia de compuestos inhibidores como fenoles, quinonas y lípidos que se encuentran en la cutícula del insecto (Hsiao et al., 1992; Hajek y St. Leger, 1994).

Una germinación exitosa sobre la cutícula del huésped no siempre es sinónima de infección. El arribo de un elemento fúngico dentro del cuerpo del insecto, depende de la capacidad del tubo germinativo a penetrar la epicutícula externa y la procutícula interna. Debido a la dureza y grosor de la cutícula, está representada en realidad el principal obstáculo para la infección (Bidochka y Khachatourians, 1990; Bidochka y Khachatourians, 1994). La procutícula, la principal parte de integumento está compuesta de quitina embebida en una matriz de fibras de proteínas, corriendo paralelamente a la superficie con cambios ligeros y progresivos en la orientación de la fibra. La procutícula puede diferenciarse dentro de exocutícula esclerotizada y endocutícula blanda, dependiendo de la naturaleza de la proteína asociada con la quitina y el tipo de enlace entre la proteína y la quitina (Ferron, 1978; Samson *et al.*, 1988; Bidochka y Khachatourians 1988). Durante la esclerotización los compuestos difenólicos (N-acetildopamina y N-alanildopamina) son enzimáticamente oxidados a reactivos intermedios, los cuales se combinan con proteínas y otros compuestos (Roberts y Hajek, 1992).

La penetración del integumento duro involucra actividad mecánica y enzimática durante el desarrollo del tubo germinativo. La inflexión de la lámina cuticular es debido principalmente a la penetración de estructuras parecidas a clavijas producidas por los apresorios, lo que sugiere que fuerzas mecánicas están involucradas (Samšiháková *et al.*, 1971; Samson *et al.*, 1988). Sin embargo, las alteraciones cuticulares observadas durante la penetración del hongo, muestran el papel importante que juegan las enzimas liberadas por el tubo germinativo durante la perforación de la cutícula del insecto.

Estudios de ultra estructura y químicos demuestran que la digestión del integumento requiere un tratamiento secuencial de lipasas, proteasas y quitinasas (Vey y Fargues, 1977; Smith y Grula 1983; St. Leger *et al.* 1986; St. Leger, *et al.*, 1986; St. Leger, *et al.*, 1991; St. Leger *et al.*, 1996; Askary, *at al.*, 1999).

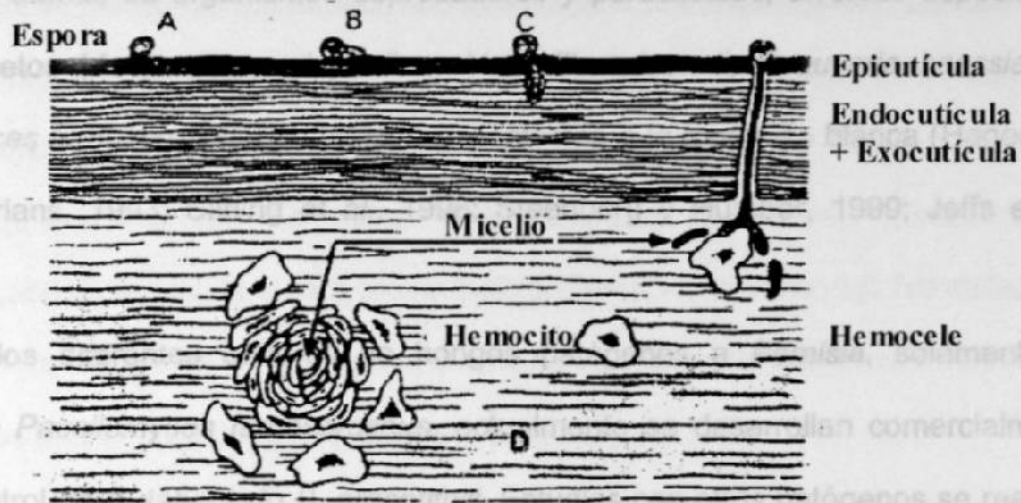


Figura 2. Establecimiento de una micosis en un invertebrado: A, adhesión de la espора a la cutícula; B, germinación; C, penetración de la cutícula por el tubo germinativo; D, colonización del hemocele y reacción defensiva del huésped.

En algunos casos, niveles de lipasas, proteasas y quitinasas se han correlacionado con la agresividad de los hongos entomopatógenos (Bidochka y Khachatourians, 1994). Se ha demostrado que todas las cepas virulentas de *B. bassiana* producen altas cantidades de proteasas entre las cuales están una quimioelastasa y una enzima semejante a tripsinasa que tienen actividad muy alta (Shimizu, *et al.*, 1993; St. Leger *et al.*, 1996; Vilcinskas y Wedde 1997; St. Leger *et al.*, 1997). El papel de estas proteasas en la penetración de la cutícula, se confirmó por la aplicación de sustancias inhibidoras de proteasas a la superficie de la cutícula, lo que causó un retraso significativo en la mortalidad cuando se comparó con el control (St. Leger *et al.*, 1986b; Vilcinskas y Wedde, 1998).

Hongos entomopatógenos para el control de mosquita blanca.

El control de las diferentes especies de *Bemisia spp* por métodos químicos convencionales se ha dificultado en los últimos años, esto ha forzado a los investigadores a buscar métodos alternos, particularmente por medio de control biológico. Además de organismos depredadores y parasitoides, diversas especies de deuteromicetos (*Aschersonia aleyrodis* y *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*) se conoce que infectan a la mosquita blanca (Hagedus y Khachatourians, 1993; Stirling *et al.*, 1998; Steenberg y Humber, 1999; Jeffs *et al.*, 1999).

De los diferentes géneros de hongos patógenos a *Bemisia*, solamente *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*, actualmente se desarrollan comercialmente para el control de *B. tabaci* y/o *B. argentifolii*. Estudios con otros patógenos se realizan con el objetivo de estandarizar técnicas de ensayo y comparar infectividad (Smith, 1993). Los tres bioinsecticidas comercialmente registrados y elaborados en Norte América son *Beauveria bassiana* (Mycontrol®) para el control de mosquita blanca y otros insectos de cuerpo blando en cultivos agrícolas, y dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Bio-Blast® y Bio-Path®) para el control de termitas y cucarachas, respectivamente (Jackson, 1997). *P. fumosoroseus* es el más importante enemigo natural de mosquita blanca en el mundo y con reportes de fuertes epizootias contra *Bemisia* y *Trialuroides spp.* tanto en ambientes de invernadero como de campo. En México, un producto que contiene conidias aéreas de *P. fumosoroseus* (Pae-Sin) es producido por Agrobiológicos del Noreste, S.A. de Culiacán, Sinaloa, es elaborado para aplicaciones de invernadero y campo; otro producto similar es desarrollado por

PROBIOAGRO, S.A. de Acarigua, Venezuela. Esfuerzos en Estados Unidos y Europa, se enfocan casi exclusivamente sobre el desarrollo de preparaciones de blastoesporas o blastoesporas/micelio (PFR-97 y PreFeRal) para el control de mosquita blanca en invernaderos y cultivos agrícolas (Wraight *et al.*, 2000).

P. fumosoroseus es una especie cosmopolita reportada como patógeno en diferentes insectos. La mayoría de los insectos huéspedes reportados pertenecen a las órdenes Lepidóptera, Coleóptera Homóptera y Diptera (Rodríguez-Rueda y Fargues, 1980; Mesquita *et al.*, 1996; Altre *et al.*, 1999). El primer reporte de *P. fumosoroseus* como patógeno de mosquita blanca fue en Beijing, China, donde el hongo fue aislado de *T. vaporariorum* después de presentarse epizootias naturales sobre este insecto en invernaderos (Smith, 1993; Lacey y Goettel 1995).

Bajo condiciones óptimas, el primer síntoma de infección se presenta dentro de 24 a 48 h, crecimiento hifal vigoroso toma lugar de 4 a 6 días y la producción de la masa conidial usualmente es entre 7 a 9 días después de iniciada la infección. Cepas de *P. fumosoroseus* muestran que el primer síntoma se presenta 24 a 48 h después del contacto con la conidia; estudios recientes con microscopía electrónica de transmisión y barrido revelaron que *P. fumosoroseus* se adhiere al dorso del insecto y las hifas están presentes en el hemocèle del huésped dentro de 24 h. El micelio está presente sobre el dorso del cuerpo del insecto dentro de 48 h y la esporulación se presenta a las 72 h (Osborne y Landa 1992; Castineiras *et al.*, 1996).

La patogenicidad de tres especies de hongos entomopatógenos contra *B. argentifolii* fue medida y comparada. Ninfas de tercer instar sobre hojas de *Hibiscus rosa-sinensis* fueron expuestas a la aplicación por rocío de 14 aislados de *B. bassiana*, 22 de *P. fumosoroseus* y 5 de *P. farinosus* de diversas regiones. Cuatro cepa de *B.*

bassiana y catorce de *P. fumosoroseus* fueron altamente patogénicas a ninfas de mosquita blanca con una dosis letal media entre el rango de 50 y 150 conidias/mm². El crecimiento hifal y la esporulación después de la muerte del insecto por *B. bassiana* fue relativamente lento y usualmente confinada a la región inmediata alrededor del cadáver, mientras que en *P. fumosoroseus* cubrió rápidamente el cadáver del insecto y el crecimiento se extendió por varios milímetros hacia la superficie circundante (Cliquet y Jackson, 1999). El aspecto de ninfas muertas de la mosquita blanca presentó una pronunciada pigmentación roja, mientras que con *P. fumosoroseus* mostró una ligera pigmentación amarilla o anaranjada. Los resultados indican que cepas altamente virulentas de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* con considerable potencial para el control de mosquita blanca son numerosas y ampliamente distribuidas (Jackson *et al.*, 1996; Cliquet y Jackson, 1997; Wraight *et al.* 1998; Lacey *et al.*, 1999).

La influencia de las condiciones ambientales, en particular la temperatura y humedad sobre la capacidad de los hongos entomopatógenos a infectar el insecto huésped es bien conocida (Fargues *et al.*, 1997; Fargues y Luz, 1998; Hallsworth y Maga 1999; Bustillo *et al.*, 1999). La humedad relativa tiene un papel importante entre los factores abióticos que afectan el ciclo de infección. Se ha demostrado que una conidiogénesis exitosa de diversos deuteromicetos (*Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces*) depende de humedad relativa alta (95-100%) y el proceso de infección no es completamente realizado cuando la humedad relativa está por debajo de este rango (Osborne y Landa 1992; Osborne y Landa 1994; James *et al.*, 1998; Luz y Fargues 1999). Para que el desarrollo sea exitoso como agente de control microbiano, el hongo entomopatógeno debe tolerar condiciones ambientales como y humedad en el área donde ellos van a emplearse. Estos factores afectan la supervivencia y capacidad

de infectar del patógeno, la susceptibilidad y resistencia del huésped y el progreso de la infección dentro del huésped (Ferron 1978; Hywel-Jones y Gillespie 1990; Vidal *et al.* 1997). Sin embargo, se conoce que las condiciones de temperatura y humedad en la superficie de las hojas puede diferir substancialmente de las condiciones ambientales. Al respecto, numerosos estudios indican que suficiente humedad existe dentro del microhabitat del huésped del insecto o dentro del microambiente de la superficie del cuerpo del huésped para apoyar la infección, independientemente de las condiciones de humedad ambiental (Inglis *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1998; Inglis *et al.*, 2000; Wraight *et al.*, 2000).

Métodos de producción

En general existen tres métodos para producir propágulos de hongos: utilización de plantas (producción de bioherbicidas), fermentación de substrato sólido y fermentación en cultivo líquido (Aregger 1992; Jackson y Slininger 1993; Jackson 1997).

La producción de esporas en substrato sólido es frecuentemente el primer método evaluado debido en parte a su naturaleza, ya que los hongos forman conidias sobre hifas aéreas (Ibrahim y Low 1993; Abbas y Boyette 2000). Debido a que los nuevos aislados de hongos aislados, crecen típicamente sobre agar nutritivo, las conidias aéreas son usualmente los primeros propágulos para probarse para el rango de huésped y eficacia de biocontrol (Boyette *et al.*, 1991; Bradley *et al.*, 1992). La esporulación en substrato sólido es ventajosa ya que la mayoría de los hongos esporulan en estos, además es fácilmente logrado en laboratorio y frecuentemente los propágulos que se producen en un ambiente aéreo, tienden a ser más tolerantes a la

deseccación y más estables como preparación seca comparadas a las esporas producidas en cultivo líquido (Agudelo y Falcon 1983, Bartlett y Jaronski 1988; Silman *et al.*, 1993). Desgraciadamente, la producción comercial de esporas de hongos usando métodos de sustrato sólido sufre de numerosas represiones técnicas y económicas (Roberts y Hajek 1992;Fravel y Lewis 1992; Jackson 1997).

El escalamiento del método de producción de sustrato sólido a nivel comercial es difícil debido a problemas asociados con la esterilización de sustrato, intercambio de gases, control de temperatura, mantenimiento del cultivo puro y recuperación del producto del sustrato. El tiempo de fermentación para la esporulación sobre sustrato sólido, generalmente requiere de semanas en lugar de días, por consiguiente incrementa los costos de producción. En general, el método de esporulación en sustrato sólido son demasiado costosos para su uso comercial (Samson *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1994). Los sistemas de cultivo sólido son comercialmente utilizados en China y Brasil y en escala piloto en Estados Unidos para la aplicación de *B. bassiana* y *Metarhizium anisoliae*. Los rendimientos reportados varían en diversos órdenes de magnitud dependiendo del hongo, sustrato y condiciones de crecimiento. Gottel (1984) reportó la producción utilizando cacerolas planas conteniendo hojuelas de trigo humedecidas cubiertas con celofán colocado directamente sobre las hojuelas. El cultivo creció sobre el celofán y fueron cosechados por simple raspado del micelio. Esto resultó ser un proceso eficiente para la producción de pequeñas cantidades de diferentes hongos con rendimientos equivalentes a 1.1×10^{12} conidias por kilogramo de hojuelas para *B. bassiana* y 3.3×10^{11} /kg para *M. anisopliae*.

El uso exitoso del método de sustrato sólido para la producción de biopesticidas de hongos es confiar en el mercado para el producto, el cual puede tolerar una entrada

alta o un mercado donde la mano de obra barata sea disponible para la producción, tal como en la producción en los países del tercer mundo. Mycontrol®, un producto de Mycotech Corporation, consiste de conidias de *B. bassiana*, este producto comercial es producido por fermentación en substrato sólido y el éxito comercial de este organismo está basado en la concentración de esporas extremadamente alto y en los cultivos de alto valor (vegetales, algodón) sobre los cuales este producto es utilizado (Bartlett y Jaronski 1988; Jackson 1997).

En el presente, la fermentación en cultivo líquido es el principal método económico para la producción de la mayoría de los microorganismos como agentes de biocontrol. La producción de antibióticos, aminoácidos, etanol y ácidos orgánicos han proporcionado un extenso conocimiento para optimizar procesos y diseñar vasos de fermentación para la producción de cultivo líquido de biopesticidas. Utilizando fermentación en cultivo sumergido, un ambiente nutricional homogéneo puede ser mantenido y monitoreado. La homogeneidad de un cultivo líquido simplifica métodos de producción y procesado y ayuda para el desarrollo de condiciones optimizadas de nutrición para la producción. Además, factores ambientales, tales como, temperatura, aireación y pH son fácilmente controladas, en comparación a la fermentación de substrato sólido. Condiciones controladas de nutrición y ambiental, capacidad de escalamiento del proceso, seguridad en la calidad emitida y facilidad en la recuperación del producto, en general se traduce en costos de producción bajos para propágulos de hongos usando métodos de producción en cultivo líquido (Humphreys *et al.*, 1989; Humphreys *et al.*, 1990; Robert y Hajek 1992; Jackson, 1997).

Jackson (1997) desarrolló una técnica de cultivo líquido para producir blastoesporas tolerantes a la desecación de *P. fumosoroseus* para un proceso de producción comercial. Evaluó diferentes medios líquidos para la producción de blastoesporas basados sobre el rendimiento de esporas y estabilidad como preparaciones secas. Encontró que todos los medios sustentan la esporulación en cultivo sumergido, alta concentración de blastoesporas (5.8×10^8 esporas/ml) fueron producidos en medios conteniendo 80 g de glucosa y 13.2 g de Casamino ácidos (medio MS) y un porcentaje significativamente alto (79%) de estas blastoesporas, sobrevivieron al secado al aire. Medio conteniendo concentraciones de glucosa superior a 20 g/l y concentraciones de Casamino ácidos entre 13.2 g y 40 g/l soportaron producción máxima de blastoesporas tolerante a la desecación. De los 23 aislados de *P. fumosoroseus* en el medio MS produjeron altas concentraciones de blastoesporas tolerantes a la desecación. Cuando se almacenaron a 4 °C más del 60% de las blastoesporas liofilizadas producidas en el medio MS fueron todavía viables después de 7 meses de almacenaje, mientras que menos del 25% de las blastoesporas secadas al aire sobrevivieron 90 días de almacenaje. Un bioensayo estándar con mosca blanca se realizó para comparar blastoesporas secadas al aire de la cepa de *P. fumosoroseus* ARSEF 4491 con conidias producidas en substrato sólido de *B. bassiana* ARSEF 252. Las blastoesporas secadas al aire resultaron con DL₅₀ de 60 y 113 blastoesporas mm⁻³ para mosca blanca (*Bemisia argentifolii*) en dos bioensayos separados con coeficientes de potencia (LD₅₀ *B. bassiana*/LD₅₀ *P. fumosoroseus*) de 3.9 y 3.8 respectivamente. Jackson demostró que concentraciones altas de blastoesporas de *P. fumosoroseus* pueden ser rápidamente producidas en cultivo líquido, permanecer viables después de secadas e infectar y matar la mosca blanca (Jackson *et al.*, 1997).

Blastoesporas son una fuente fácilmente producida de inóculo para el control biológico. La principal debilidad es su rápida pérdida de viabilidad en almacenaje, lo cual representa un problema en diversos programas de control utilizando *B. bassiana*. Cuando *B. bassiana* es cultivada en medios líquidos complejos o definidos produce blastoesporas, este tipo de producción de cultivo sumergido ofrece ventaja sobre producción de conidias en medios semisólidos, ya que un gran número de blastoesporas se pueden producir en volúmenes relativamente pequeños bajo condiciones precisamente definidas (Humphreys *et al.*, 1989).

En cultivos limitados de nitrógeno, la fuente de nitrógeno es el primer nutriente que se agota, mientras que en cultivos limitados de carbono lo es el carbono. El crecimiento en cultivos limitados de nitrógeno lleva a un desbalance, tanto que la síntesis de proteínas es inhibida, sin embargo la síntesis neta de carbohidratos y lípidos procede mientras que el medio contenga una fuente de carbono (Campbell *et al.*, 1983). Inch (1986) mostró que el contenido de glicógeno de *P. fumosoroseus* fue más alto en blastoesporas producidas en cultivos limitados de nitrógeno que en blastoesporas producidas en cultivos limitados de carbono y esto sugería que el contenido de glicógeno puede influir en la longevidad de estas esporas en el almacenaje (Inch *et al.*, 1986). Lane y col. (1991) cultivó *B. bassiana* en medios limitados de nitrógeno y carbono. El volumen modal, grosor de la pared celular y reservas endógenas (total de carbohidratos, glucógeno y lípidos) de blastoesporas cosechadas de la fase estacionaria de cultivos limitados de nitrógeno fueron todos más grandes que los valores observados de los cultivos limitados de carbono. Se les determinó la longevidad de conidias y blastoesporas producidas en cultivos limitados de nitrógeno, almacenadas a 4°, 25° y 30 °C en solución Ringer's. En cualquier temperatura dada, las conidias

sobrevivieron por más tiempo que las blastoesporas, pero a 25° las blastoesporas en nitrógeno limitado sobrevivieron por más tiempo que las blastoesporas limitadas de carbono. Las reservas endógenas de las blastoesporas de cultivos limitados de nitrógeno y carbono, que declinaron durante el almacenaje a 25° fueron relacionados con la longevidad de la espora (Lane *et al.*, 1991; Lane *et al.*, 1991).

Trabajando con *B. bassiana*, Samsinakova y col. (1981) reportó rendimientos de 6.4×10^8 blastoesporas por mililitro. Hall (1980), con *V. lecanii* reporta rendimientos de 5×10^7 blastoesporas/ml. *V. lecanii* fue desarrollado comercialmente como Veralec y Mycotal por Tate y Lyle en el Reino Unido para el control de áfidos y mosquita blanca en invernaderos con rendimientos por arriba de 10^{10} blastoesporas o conidias/ml. Las blastoesporas son poco estables, con una vida de anaquel limitado y pobre estabilidad en campo. Como resultado, una investigación más reciente sobre producción en cultivo sumergido se enfocan en el desarrollo de medios de cultivo en el cual el hongo produce más conidia que blastoesporas. Una patente rusa describe el medio y una cepa seleccionada de *B. bassiana* con rendimientos de $2.5 - 5.0 \times 10^{12}$ conidias por litro de medio de cultivo. Además de la composición del medio de cultivo, la selección de la cepa es importante para la producción eficiente de conidias de *B. bassiana* en cultivos sumergidos. Al respecto Thomas y col. (1987) reporta resultados similares utilizando un medio químicamente definido con rendimientos superiores a 4.9×10^{11} conidias por litro. También observaron conidias producidas individualmente de células esporógenas que presentan una ramificación corta o directamente sobre micelio; además, también se observó conidiación "microciclo" con conidias producidas directamente de blastoesporas. Estas conidias sumergidas parecen diferentes de las conidias aéreas, ya que éstas son más largas con 4 μ m de diámetro comparado con 3 μ m de la conidia aérea creciendo

en cultivo superficial y tienen diferentes características superficiales (Thomas *et al.*, 1987; Hegedus *et al.*, 1990).

Formulaciones

La formulación de pesticidas es definida como la composición resultante cuando el insecticida candidato es mezclado con algún otro componente, incluyendo el agua. Por lo tanto, cualquier combinación de un biocida activo con un segundo material es técnicamente una formulación. Se menciona que el desarrollo de una formulación insecticida microbial está estrechamente relacionado al desarrollo de los insecticidas químicos. Esto es debido a que los químicos y patógenos de insectos deberán ser formulados para facilitar su mezclado y aplicación (Boyette *et al.*, 1991; Brayant 1994; Boyette *et al.*, 1996). Las formulaciones básicas tanto de químicos como patógenos de insectos comprende: 1) líquidas (suspensiones acuosas o emulsiones emulsificables), 2) polvos humectables, 3) polvos, 4) cebos, 5) gránulos. Ya que los patógenos de insectos son entidades vivas insolubles, estos no pueden ser formulados como polvos solubles (Primo y Carrasco 1977; Couch e Ignoffo 1981; Sánchez *et al.*, 1993; Bryan 1994). En el desarrollo comercial de una formulación básica de un entomopatógeno, las investigaciones se enfocan en mantener la viabilidad y virulencia del patógeno durante el proceso de producción y desarrollo del producto dentro de los cuales se preservan o mejoran estas propiedades. Para llevar a cabo esto, el conocimiento de la biología del patógeno e insecto blanco es esencial (Fravel y Lewis 1992; Rhodes 1993; Womack y Burge 1993).

La formulación de un producto biológico con una vida de anaquel extensa es crítica para su industrialización. La razón es simple, pérdidas en la viabilidad, virulencia

y estabilidad por períodos prolongados de una preparación es simplemente no económicamente comercializable (Khachatourians 1992; Brayant 1994). Formulaciones de *Bacillus thuringiensis* lo ilustra adecuadamente, ya que desde su comercialización en los años cincuenta la cepa bacteriana, rendimiento en fermentadores, formas de productos y estabilidad se han mejorado, lo que hacen de este microorganismo una alternativa económicamente efectiva a los insecticidas químicos (McGuire y Shasha 1990; Brayant 1994; McGuire y Shasha 1995).

Formulaciones con hongos entomopatógenos

Existe un gran número de hongos entomopatógenos que infectan a una amplia variedad de especies de insectos. Sin embargo, su uso en el control de plagas agrícolas es limitado debido, en parte, a los resultados inconsistentes obtenidos de las aplicaciones de campo. Variación en el grado de control de la plaga puede ser causado por numerosos factores que limitan la efectividad del patógeno. Entre éstas se encuentran: la dificultad en preparar y aplicar formulaciones, vida de almacenaje corto, vida corta sobre la superficie de la planta y requerimientos de humedad relativa alta por un período prolongado (Daoust y Roberts 1983; Bradley *et al.*, 1992; Wright 1993; Nankinga y Moore 2000).

Las formulaciones más convenientes para un hongo, requieren del entendimiento completo del ciclo de vida y especialmente la biología de los estados infectivos. Las características físicas y químicas de los propágulos a ser formulados afectan la calidad final y propiedades de la formulación resultante. (Soper y Ward 1981; Bradley *et al.*, 1992). Los ingredientes seleccionados para la formulación deberán no interferir con el proceso de infección y mejorar la viabilidad y virulencia, transmisión de la enfermedad y

persistencia en el campo. En otras palabras, la compatibilidad de los ingredientes utilizados para una formulación deberá tener una vida de anaquel larga, alta viabilidad y virulencia más grande que aquellos no formulados o formulados de otra forma. Por otro lado, el control de insectos blanco con diferentes hábitat biológicos como, insectos de suelo, desfoliadores, barrenadores, requieren de formulaciones y técnicas de aplicación diferentes (Feng *et al.*, 1994; Stirling *et al.*, 1998). Los tres estados de desarrollo de los hongos entomopatógenos, conidias, blastoesporas y micelio, se han formulado exitosamente para pruebas de campo en pequeña escala o aplicaciones a gran escala (Feng *et al.*, 1994; Booth y Shanks Jr. 1998; Booth *et al.*, 2000).

Los requerimientos de las formulaciones varían entre los diferentes entomopatógenos. Investigaciones sobre formulaciones en *Hirsutella thompsonii* mencionan que el requerimiento del contenido de humedad fue más alto que los niveles más bajos en formulaciones con *B. thuringiensis* (Couch y Ignoffo 1981).

La mayoría de las formulaciones, las cuales proveen una vida de anaquel extensa requiere células para ser mantenidas en estado seco. El secado puede realizarse por diferentes medios que incluyen secado por congelación, secado al vacío y secado con sílica gel. Los organismos varían en su capacidad de resistir desecación y almacenaje en estado seco, pero las formulaciones pueden, en algunos casos permanecer estables por un período de varios años. (Rhodes 1993; Amsellem *et al.*, 1999).

Formulaciones con pelet de alginato

El atrapamiento de células dentro de esferas de alginato de calcio, es una de las técnicas ampliamente utilizadas para aplicación en inmovilización de células vivas o

muertas en bioreactores, inmovilización de microplastos de plantas para micropropagación e inmovilización de células híbridomas para la producción de anticuerpos monoclonales. En 1983, el uso de pelets de alginato para la producción y formulación de micoherbicidas, se reportó para encapsular agentes de biocontrol en matrices de alginato a hongos como *Hirsutella*, *Lagenidium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Colletotrichum* (Walker y Connick, 1983; Axtell y Guzmán 1987; Connick *et al.*, 1991; Daigle y Cotty 1992; Lackey *et al.*, 1993; Hebbar *et al.*, 1998). Las formulaciones contienen mejoras nutricionales (harina de soya, avena y maíz), rellenos (caolín y silicatos) y diferentes gelantes (cloruro de calcio y gluconato de calcio) (Daigle y Cotty, 1992; Connick *et al.*, 1997).

La encapsulación con alginato puede incrementar la eficiencia de agentes de biocontrol; éstas incluyen modificaciones del producto de fermentación a ser formulado, además de que los constituyentes de relleno modifican el volumen y peso del pelet, los adyuvantes influyen en el crecimiento de los agentes atrapados y la liberación del pelet y gelante (Axtell y Guzman, 1987; Daigle y Cotty, 1992).

Preparaciones en pelet con alginato, ofrecen mayor ventaja comparado con suspensiones conidiales, estos pueden ser almacenados secos y entonces reactivarse por rehidratación, además de proteger al hongo de la radiación UV y otros factores ambientales que podrían resumir su eficacia en el campo (Knudsen *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 1999). Formulaciones con micelio seco de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en alginato y almidón de maíz o almidón de maíz-aceite mostraron ser estables durante el almacenaje en cuarto de temperatura y presentaron mejoramiento en la potencia de la producción conidial después de varios meses de almacenados, además estos presentaron la mejor potencia que las preparaciones de micelio seco

puro, después del mismo período de almacenamiento (Pereira y Roberts 1990). El alginato también tiene como ventaja evitar la degradación de hongo por radiación solar, mientras que las formulaciones con almidón de maíz fueron menos efectivas (Pereira y Roberts, 1991; Daigle y Cotty, 1992; Feng *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1995).

Formulaciones en aceite

Los aceites por si mismos presentan un efecto insecticida por diferentes caminos: los aceites pueden inundar los espiráculos del insecto provocando una asfixia rápida; interactúa con ácidos grasos en el cuerpo, interfiriendo con el metabolismo y actuando como un veneno; o evitando la liberación de productos venenosos; aceites derivados del petróleo o extractos de aceites de plantas como el algodón, pueden funcionar como repelentes de insectos. Los aceites tienen un papel sinérgico cuando se combina con microorganismos e insecticidas (Smith 1993; Womack *et al.*, 1996).

Formulaciones basadas en aceite se pueden aplicar al utilizar el método de gota controlada en volúmenes ultra bajo, tanto como un litro por hectárea, siendo esto una gran ventaja sobre las voluminosas formulaciones basadas en agua. Formulaciones y aplicación de hongos patógenos en aceites vegetales incrementan su eficacia contra insectos comparados con formulaciones en agua (Prior *et al.*, 1988).

Debido a la naturaleza lipofílica de las conidias de los hongos entomopatógenos, estos son fácilmente suspendidos en aceites y pueden ser utilizados en aplicaciones en volumen ultra bajo en áreas de baja humedad (Douro-Kpindou *et al.*, 1995). La retención de viabilidad alta de las conidias es importante en formulaciones conidiales durante el almacenamiento (McClatchie, *et al.*, 1994). La vida de anaquel de un biopesticida debe ser al menos 18 meses, el cual puede ser logrado sin pérdida de

virulencia con formulaciones en aceite de *M. flavoviride* a 17 °C (Couch y Ignoffo, 1981).

Trabajos iniciales sugieren que la temperatura y humedad son factores críticos en almacenamiento de formulaciones (Stathers *et al.*, 1993; Hedgecock *et al.*, 1995). Formulaciones de conidias almacenadas durante 30 meses en aceites vegetales, cacahuate o soya, o aceite mineral retienen completa virulencia comparado con formulaciones frescas (Moore *et al.*, 1995; Langewald *et al.*, 1997).

Formulaciones con blastoesporas

P. fumosoroseus, al igual que muchos otros entomopatógenos crecen en forma filamentosa y conidian sobre sustrato sólido, pero crecen semejantes a levaduras en medios líquidos. Este crecimiento en cultivo líquido conduce a la formación de blastoesporas o cuerpos hifales, los cuales son similares al modo de crecimiento del hongo en la hemolinfa del insecto. Se reporta que las blastoesporas producidas por diferentes entomopatógenos, producen altas concentraciones en diferentes medios líquidos y estas estructuras son altamente infectivas, pero han sido caracterizadas como efímeras e intolerantes al secado que las conidias aéreas (Cliquet y Jackson 1997; Vandenberg *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 1998).

La mayoría de las técnicas de secado a escala de laboratorio reportados en la literatura se realiza con bacterias; estas técnicas incluyen desecación en sílica gel, secado por aspersión y desecación con humedad controlada en una cámara de confinamiento. Solamente unos pocos reportes describen el secado por aire en incubadoras, en una cámara con flujo de aire o secado al vacío y más recientemente el secado al aire de conidias bajo humedad relativa controlada (Cliquet y Jackson 1997).

Blastoesporas de *B. bassiana* producidos en cultivo líquido se caracterizan por su pared lisa y forma elipsoidal, esta morfología y su inestabilidad en los procesos de secado determinan que los formulados de blastoesporas se apliquen en forma limitada. La obstrucción puede presentarse si son formulados por aspersión por aire con equipo convencional (Feng *et al.*, 1994; Prenerová 1995).

Las formulaciones granulares de blastoesporas de *B. bassiana* producidas en cultivo sumergido, a pesar de presentar bajo costo de producción y altos rendimientos, mostraron serios problemas de almacenamiento. La máxima vida de anaquel fue de 5-8 meses bajo condiciones de oscuridad, secado y frío. Las blastoesporas secas y formuladas como gránulos (1.2-1.4 mm de diámetro) con 1% de contenido de agua, fueron relativamente estables durante los primeros 5 meses de almacenados a ≤ 0 °C para después perder drásticamente la viabilidad. El promedio de viabilidad fue del 50% después de 8 meses, 40% después de 10-12 meses y solamente el 3-10% después de 12-23 meses. Las blastoesporas secadas por aspersión perdieron el 83 y 91% de viabilidad cuando se almacenaron a 13-15 °C por 30 y 60 días, respectivamente y pocas permanecieron viables cuando se almacenaron a temperatura ambiente por 30 días durante el verano (Feng *et al.*, 1994)

Se desarrolló un método de cultivo líquido para la producción rápida de altas concentraciones de blastoesporas de *P. fumosoroseus* (Jackson *et al.* 1997). Las blastoesporas producidas mediante este método mostraron excelente tolerancia a la desecación con tasas de supervivencia después de secados del 80-90%, pero muy pobre sobrevivencia cuando se almacenan en cuarto de temperatura. Solamente las blastoesporas liofilizadas en una suspensión de lactosa – albúmina de suero bovino

mostró estabilidad razonable cuando se almacenó a 4 °C (Jackson *et al.*, 1996; Vega *et al.*, 1999).

Obviamente, el desarrollo comercial de estos propágulos par el uso como agentes de biocontrol requiere de métodos de producción rápidos y confiables, además de una vida de anaquel razonable a una temperatura elevada. Es por todo esto, que estudios sobre medios de cultivo líquido para la producción de blastoesporas tolerantes a la desecación y la evaluación de diferentes soportes para la formulación y almacenaje de estos propágulos son dos de los principales factores que tienen impacto en la supervivencia de las blastoesporas. Debido a la gran importancia que presentan estos aspectos en nuestra investigación, consideramos de gran interés determinar la influencia de dos medios líquidos sobre la tolerancia de blastoesporas al secado con diferentes soportes.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Seleccionar diferentes soportes para formulación que mejoren la estabilidad al almacenamiento de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus* producidas en cultivo líquido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes soportes inertes y orgánicos como agentes para formulaciones de blastoesporas producidas en dos medios de cultivo diferentes.
- Estimar la supervivencia inicial de las blastoesporas en las diferentes formulaciones secas al aire.
- Valorar la supervivencia de las blastoesporas durante el almacenaje prolongado a dos temperaturas (4 y 28 °C)

MATERIAL Y MÉTODO

Cepa utilizada

La cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* (Pfr-612) fue proporcionada por la compañía Mycotech Corp., Butte, MT, USA. Esta cepa se aisló de una mosquita blanca de la hoja plateada (*Bemisia argentifolii*) en Weslaco TX., USA. Cultivos stock se hicieron crecer como aislados de esporas individuales en agar papa dextrosa (PDA) por 21 días en cuarto de temperatura (24-26 °C) y almacenadas como tabletas de 1 mm de PDA en glicerol al 10% a -80 °C hasta su uso.

Obtención de conidias

A partir de una cepa de *P. fumosoroseus* conservada en congelación, se dejaron descongelar por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se agitó vigorosamente por 1 minuto y se tomaron 100 µl de muestra, los cuales se colocaron en el centro de 10 placas de PDA, esparciéndose por toda la placa para obtener crecimiento uniforme en toda la placa. Las placas inoculadas se dejaron crecer a 26-28°C en un cuarto de temperatura durante 14-21 días con luz blanca continua para fomentar la esporulación de la cepa. Para realizar la suspensión de conidias se utilizaron frascos de dilución de 200 ml de capacidad. Se tomó una placa con una edad de crecimiento adecuada y se inundó con 5 a 10 ml de agua destilada estéril, agitándose suave y cuidadosamente, de tal manera que se desprendieran las esporas del conidióforo. La suspensión de esporas se agitó vigorosamente para separar las conidias que se encontraban todavía unidas en cadenas. Posteriormente se determinó el número de esporas obtenidas en un hematocitómetro Neubauer para poder ajustar el

número de esporas (10^5 esporas /ml) que se utilizó para inocular los medios líquidos de producción.

Producción de blastoesporas en medios líquidos

A partir de una suspensión de conidias de 10^5 esporas/ml de un cultivo de 14-21 días de edad se inocularon dos medios líquidos de producción con la siguiente composición: Medio líquido 1 (LM 1), Medio basal por litro: KH_2PO_4 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 37 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 16 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg; timina, ribflavina, pentotenato, niacina, piridoxamina, ácido tiótico, 500 μg de cada uno; ácido fólico, biotina, vitamina B12, 50 μg de cada uno, 80 g/litro de glucosa (Difco) y 25 g/litro de Casamino ácidos (Difco, libre de vitaminas). El medio tuvo un pH inicial de 5.5 y éste no se controló durante el crecimiento del hongo. Se prepararon soluciones stock de glucosa concentrada (20%), las cuales fueron esterilizadas por separado y posteriormente agregadas al medio completo. Medio líquido 2 (LM 2), con la siguiente composición: glucosa, 30 g/litro; peptona de colágena, 20 g/litro,; levadura entera, 5 g/litro; NaCl, 5 g; CaCO_3 , 1 g/litro; pH 7.0.

Los dos medios de cultivo fueron inoculados con conidias de *P. fumosoroseus* obtenidas de placas de PDA con una concentración final de 10^5 conidias/ml (Jackson *et al.*, 1997). Se inocularon matraces de 500 ml conteniendo 200 ml de ambos medios de producción, los cuales se colocaron en un incubador con agitador rotatorio a 300 r.p.m. y 26 °C. Después de 72 horas de crecimiento, se observó la pureza del cultivo y el número de blastoesporas producidas fueron determinadas microscópicamente con un hematocitómetro Neubauer. Para eliminar el micelio producido en ambos medios fueron filtradas cuando menos dos veces utilizando una doble capa de tela tipo manta, la cual

se colocó sobre un embudo de porcelana y usando una bomba de vacío se aceleró el filtrado del producto. Las blastoesporas filtradas fueron empleadas para ser formuladas con los diferentes soportes a probar.

Formulaciones en aceite

Se realizaron algunas formulaciones en aceite con blastoesporas producidas en el medio líquido LM 1. Para estas formulaciones se mezcló aceite de maíz (Cártamo), lecitina de soya (20%) y blastoesporas filtradas de *P. fumosoroseus* en 8 proporciones diferentes. Se utilizó un volumen total de 5 ml colocados en tubos de 16 x 100 mm y sellados con parafilm y almacenados a temperatura ambiente (26-28 °C) y a temperatura de refrigeración (4 °C). Las muestras se tomaron periódicamente para determinar la viabilidad de las blastoesporas.

Formulaciones en polvo

Las blastoesporas concentradas que se colectaron de los dos medios de cultivo se formularon con los siguientes soportes: 5% (p/p) tierra de diatomeas (HYFLO), Celite Corp., Lompoc, CA, USA.); 5% (p/p) de tres diferentes talcos (fueron obtenidos del comercio informal, sin etiqueta de presentación); 5% de una cal mexicana (Callider[®], Villa de Garcia, N.L., MEX.) 5, 2.5, 1.25% (p/p) de una caolín hidrofílica calcinada (Surround[®], Engelhard Corp., Iselin, NJ, USA); 7.5, 5, 2.5% (p/p) de fécula de maíz (Maizena[®] Productos de maíz, S.A. de C.V., D.F., MEX.); 5% (p/p) de harina de arroz (Tres Estrellas[®], Nabisco S.A. de C.V. D.F., MEX.). Los soportes se mezclaron con el filtrado de blastoesporas concentradas, respectivamente, y el exceso de agua se removió de la

formulación por filtrado al vacío sobre un embudo de porcelana usando papel Whatman No. 1. Las formulaciones resultantes se colocaron a secar al aire toda la noche en un cuarto de temperatura con 26-28 °C, después de secado el producto se tomaron muestras individuales de 0.3 g de cada formulado y se colocaron en bolsas de plástico, las cuales se sellaron con calor y almacenadas a temperatura de 4 y 26-28 °C.

Prueba de viabilidad de las blastoesporas

La supervivencia de las blastoesporas formuladas secadas al aire se evaluó semanalmente usando el siguiente protocolo: Al menos tres muestras selladas al calor de cada una de las formulaciones con blastoesporas de *P. fumosoroseus* se abrieron y se tomaron 0.2 g de preparaciones de esporas secas de cada muestra y se colocaron en matraces bafleados de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo Sabouraud dextrosa y puesto a agitar en un incubador con agitación rotatoria a 300 r.p.m durante 6 horas. Seguida de la incubación, se tomaron tres alícuotas de cada suspensión y fueron colocados sobre porta objetos y se observaron microscópicamente. Se contaron blastoesporas tanto germinadas como no germinadas en grupos al azar de 100 blastoesporas. Las blastoesporas con tubo germinativo tan largo como la longitud de la espora se reportaron como viables. Datos de tolerancia a la desecación o supervivencia de las blastoesporas se analizaron estadísticamente usando análisis de varianza. Los valores medios se separaron para su análisis utilizando la prueba de Tukey (LSD) para determinar diferencia mínima significativa de cada formulado.

Bioensayos contra *Bemisia argentifolii*

Para los bioensayos contra la mosquita blanca se tomaron todos los formulados con buena viabilidad inicial de blastoesporas secas. Las preparaciones se probaron contra mosquita blanca de la hoja plateada (*B. argentifolii*) del tercer instar. Los formulados se suspendieron en Tween 80 acuoso al 0.01% y aplicados como alícuotas de una suspensión de blastoesporas usando un Potter Precision Tower (Burkard Manufacturing Co. Ltd, Hertfordshire, England) en el envés de una plántula de melón infestadas con mosquita blanca. Cada suspensión fue asperjada a una presión de 0.7 kg/cm². Todas las suspensiones fueron agitadas por 5 minutos y utilizadas después de 10 minutos. Tres réplicas de hojas se usaron para cada preparación de blastoesporas y se incluyó en cada tratamiento un control con tres repeticiones, usando Surround al 5% sin blastoesporas el cual se suspendió en una solución acuosa de Tween 80 al 0.01%.

Seguida a cada aplicación por aspersion, las plántulas fueron encerradas en bolsas de plástico y mantenidas por 24 h bajo condiciones de humedad saturada a 25 ± 1 °C. Después de esto, las hojas se desempacaron y se seleccionaron ninfas de tercer instar con un pequeño punto de tinta indeleble a un lado de cada ninfa para monitoriarla continuamente. Cada una de las unidades fueron incubadas a 25 ± 1 °C, 40-50% de humedad relativa (HR) y foto periodo de luz-oscuridad de 16:8 h. Las plántulas se regaron cuando lo requirieron y las ninfas marcadas se observaron diariamente durante 10 días para determinar la mortalidad.

Solamente los insectos muertos potencialmente infectados por los formulados con blastoesporas se incluyeron en los análisis. La corrección de Abbot para la mortalidad del control no fue considerada. Porcentajes de micosis fueron normalizados a través de una

transformación angular para minimizar correlaciones entre las medias y varianza de los datos. El valor angular de la micosis fue analizado por un análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico SYSTAT versión 5.2. Las medias fueron apropiadamente separadas usando la prueba de Tukey para diferencia significativa honesta (DSH) ($P < 0.05$).

RESULTADOS

La producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* en los dos medios líquidos probados, presentó diferencias en cuanto el número de propágulos obtenidos. Encontramos que en el medio líquido LM 1 se obtuvieron 5×10^8 esporas/ml⁻¹, mientras que en el medio líquido LM 2 se produjeron 5×10^7 esporas/ml⁻¹. Observaciones microscópicas de las blastoesporas producidas en el LM 1, presentaron campos con células muy bien definidas y homogéneas, por otro lado en el LM 2, las blastoesporas producidas fueron muy poco definidas y los grupos de células por campo, presentaron blastoesporas en etapas de germinación. También se observó que el LM 2 presenta fragmentos de micelio mucho más largos que el LM 1, esto se observó después del tiempo de crecimiento y posterior filtrado del cultivo líquido con tela de manta. Durante la filtración del cultivo con manta, el paquete de micelio formado en el LM 2 fueron muy gruesos, y dificultaba la filtración del mismo, contrario a lo observado en el LM 1 (Figura 3). La viabilidad de las blastoesporas frescas sin formular fue en el LM 1 de 96% y el LM 2 de 83%. Se encontró diferencia mínima significativa en la viabilidad entre los dos medios con una significancia de $P \leq 0.01$ (Figura 4).

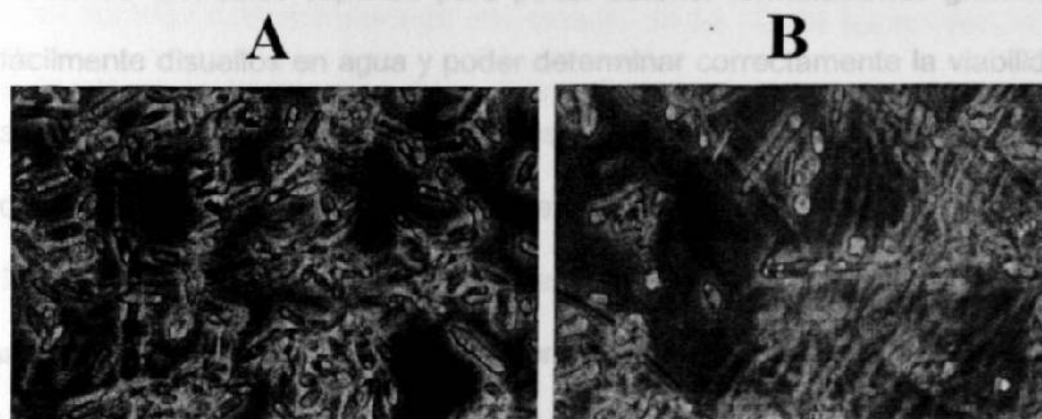


Figura 3. Producción de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus* en el medio líquido LM 1 (A) y LM 2 (B)

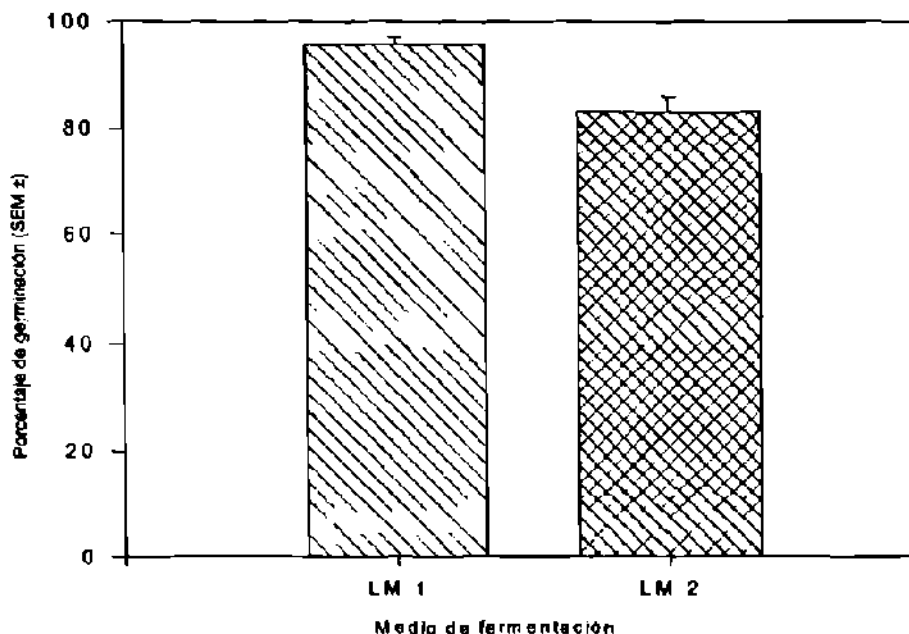


Figura 4. Germinación de blastosporas de los medios de fermentación líquidos LM 1 (medio a base de caseína y glucosa) y LM 2 (medio a base de peptona de colágena y glucosa). Porcentaje de germinación en Caldo Sabouraud Dextrosa después de 6 horas a 300 rpm.

Se probaron diferentes ingredientes para elaborar formulaciones de blastoesporas de *P. fumosaroseus* producidas en cultivo líquido. Primeramente, se seleccionaron algunos soportes orgánicos para determinar su factibilidad de ser utilizados dentro de las formulaciones. Se probaron algunos soportes como: pectina, gelatina de cerdo, glicerol, aceite de maíz y goma de acacia. Se realizaron diversas combinaciones con estos soportes para poder obtener formulaciones granulares que sean fácilmente disueltos en agua y poder determinar correctamente la viabilidad de la espora. Aproximadamente 15 combinaciones o mezclas con los soportes mencionados se probaron para evaluar si en éstos era posible recuperar la espora cuando se disolvían en agua. Se encontró que en todas las mezclas probadas fueron difíciles de eliminar el exceso de agua y mezclado, el producto que se obtuvo después del secado perdió muchas veces su consistencia y otras simplemente se evaporó completamente. En aquellas como las formulaciones con gelatina, pectina y goma de acacia se

formaron compuestos sólidos, los cuales se molían hasta un tamaño de partícula uniforme, sin embargo estos gránulos presentaron una consistencia muy dura y difícil de disolverse en agua. Para poder disolverlos se tuvieron que someter a una temperatura de 45 °C por aproximadamente 30 minutos. El uso de estos soportes para elaborar formulaciones de blastoesporas de *P. fumosoroseus* derivados de una fermentación líquida fue abandonado, ya que presentaron demasiados problemas sobre todo para poder recuperar y cuantificar la viabilidad de las esporas.

Evaluación de formulaciones líquidas

Para la elaboración de formulaciones líquidas se utilizaron blastoesporas producidas en el medio LM 1. Las blastoesporas obtenidas se mezclaron con diferentes proporciones de aceite de maíz y lecitina de soya (20%). Se elaboraron 8 formulaciones líquidas (FL 1-8), con un volumen total de 5 ml, para cada una de las formulaciones utilizando tubos de 13 x 100 mm. Los resultados que se obtuvieron con formulaciones en aceites almacenados en dos temperaturas (4 y 28 °C), mostraron que la sobrevivencia de las blastoesporas al tiempo 0 fue de casi el 100% de viabilidad. Cuando se sometió a temperatura de almacenaje de 28 °C, la supervivencia declinó dramáticamente a los 10 días de almacenados, alcanzando valores por debajo del 15% de viabilidad, mientras que a los 21 días de elaboración y almacenados a la misma temperatura, la viabilidad de las blastoesporas fue prácticamente 0 en todas las formulaciones probadas (Tabla 5). Por otra parte, estos mismos formulados pero almacenados a 4 °C, encontramos que la sobrevivencia de las blastoesporas se mantuvo por arriba del 70% de viabilidad después de 23 días de almacenaje. Después de los 33 días la viabilidad de las blastoesporas comenzó a bajar ligeramente y a los 65

días de almacenados la mayoría de los formulados caen por debajo del 50% de viabilidad y solamente el formulado FL5 sustentó supervivencia del 60%. El último muestreo que fue a los 111 días, la viabilidad de las blastoesporas se encontró por debajo del 40% (Figura 5).

Tabla 5. Porcentaje de germinación de blastoesporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1 y formuladas en una emulsión aceite-agua almacenados a 28 °C.

Formulado	inicial (%)	10 días (%)	21 día (%)
FL1 (6.25%)	98.45	0.33	0.0
FL2 (11.6%)	98.68	2.51	0.0
FL3 (16.6%)	98.04	4.93	0.0
FL4 (21%)	98.18	4.3	0.0
FL5 (25%)	98.34	7.4	0.0
FL6 (28.4%)	98.68	11.51	0.0
FL7 (31.8%)	98.68	5.36	0.0
FL8 (34.6%)	98.35	14.19	0.0

Los formulados se prepararon en un volumen total de 5 ml mezclando una proporción de aceite y agua para obtener la concentración final del ingrediente activo del formulado. Se utilizaron tubos de 16 x 100 mm los cuales se almacenaron en refrigeración a 4 °C ± 0.5.

Evaluación de formulaciones secas

Se evaluaron diferentes soportes como posibles acarreadores para el secado de blastoesporas de *P. fumosoroseus* producidos en cultivo líquido. Para este experimento se utilizaron dos medios líquidos de producción diferentes: una formulación a base de Casamino ácidos y glucosa propuesta por el Dr. Mark Jackson (medio líquido LM 1) y otro basado en peptona de colágena y glucosa (medio líquido LM 1).

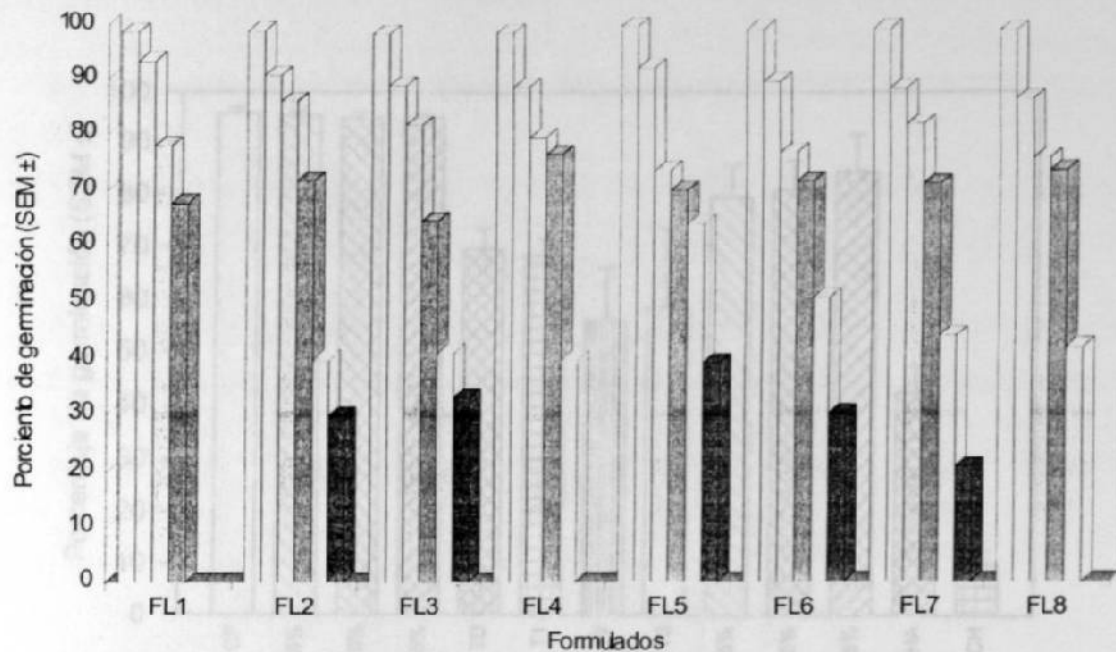


Figura 5. Viabilidad de blastosporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1 en formulaciones líquidas (aceite de maíz, lecitina) almacenadas a 4°C durante 111 días.

Figura 6. Germinación de blastosporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1, formuladas con diferentes soportes: CF, cultivo fresco; S, Surround 5, 2.5 y 1.25%; TD, tierra de diatomeas 0%; T, diferentes talcos; FEC, fécula de maíz 7.5, 5 y 2.5%; H, harina de arroz y cal hidratada.

La viabilidad inicial de las blastosporas producidas en los dos medios y que se mezclaron con los diferentes soportes mostraron que las blastosporas producidas en el medio LM 1 y formuladas con Surround (S) a tres concentraciones 5, 2.5 y 1.25% (p/v) fueron viables, ya que mantiene valores de viabilidad similar a los del cultivo fresco (CF) >95%. En tierra de diatomeas y tres diferentes talcos (T 1, 2 y 3) la viabilidad inicial de las blastosporas disminuyó hasta 69% con tierra de diatomeas y entre 55 a 68% con los talcos. En formulaciones con fécula de maíz a concentraciones de 7.5, 5, y 2.5% se encontró una viabilidad entre 79 a 84%. En formulaciones con harina de arroz y cal hidratada presentó los valores más bajos con el 42% y 10% de blastosporas viables respectivamente (Figura 6)

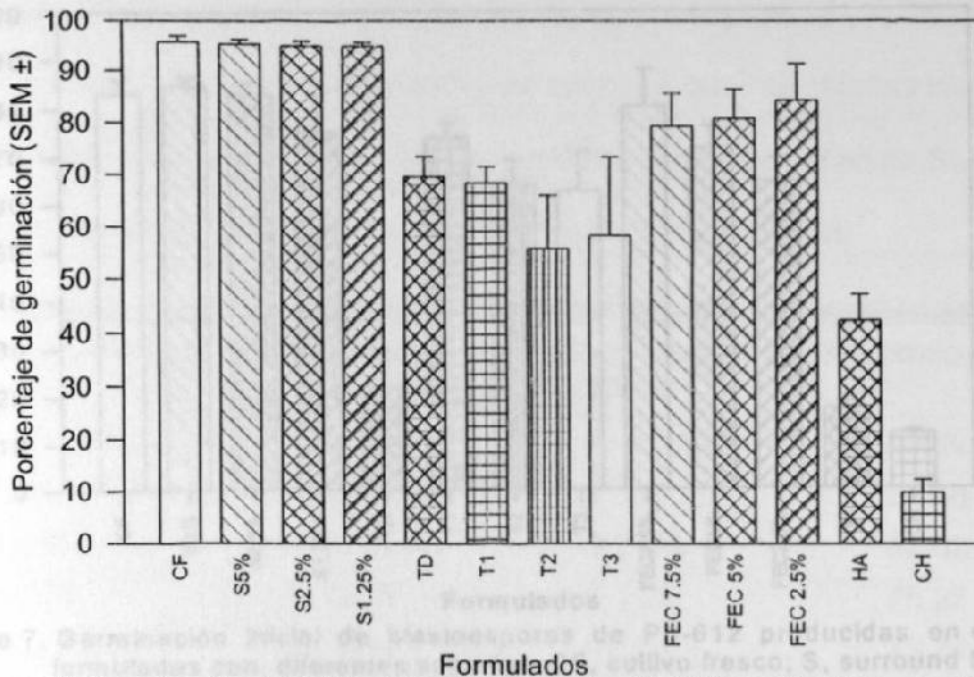


Figura 6. Germinación inicial de blastosporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1, formuladas con diferentes soportes. CF, cultivo fresco; S, Surround 5, 2.5 y 2.5%; TD, tierra de diatomeas 5%; T, diferentes talcos; FEC, fécula de maíz 7.5, 5 y 2.5%; HA, harina de arroz 5%; CH, cal hidratada 5%.

La viabilidad inicial de formulaciones secas de blastosporas obtenidas del medio LM 2 y mezclados con los diferentes soportes, mostraron que con el soporte Surround en sus tres concentraciones, la viabilidad fue entre 75 y 84% de esporas viables; con tierra de diatomeas del 21%; del 62 a 72% con los tres diferentes talcos; con fécula de maíz al 7.5, 5 y 2.5 % con el 80, 71 y 22% de blastosporas viables, respectivamente; 17% con formulaciones con harina de arroz; y 11% en formulaciones con cal hidratada (Figura 7).

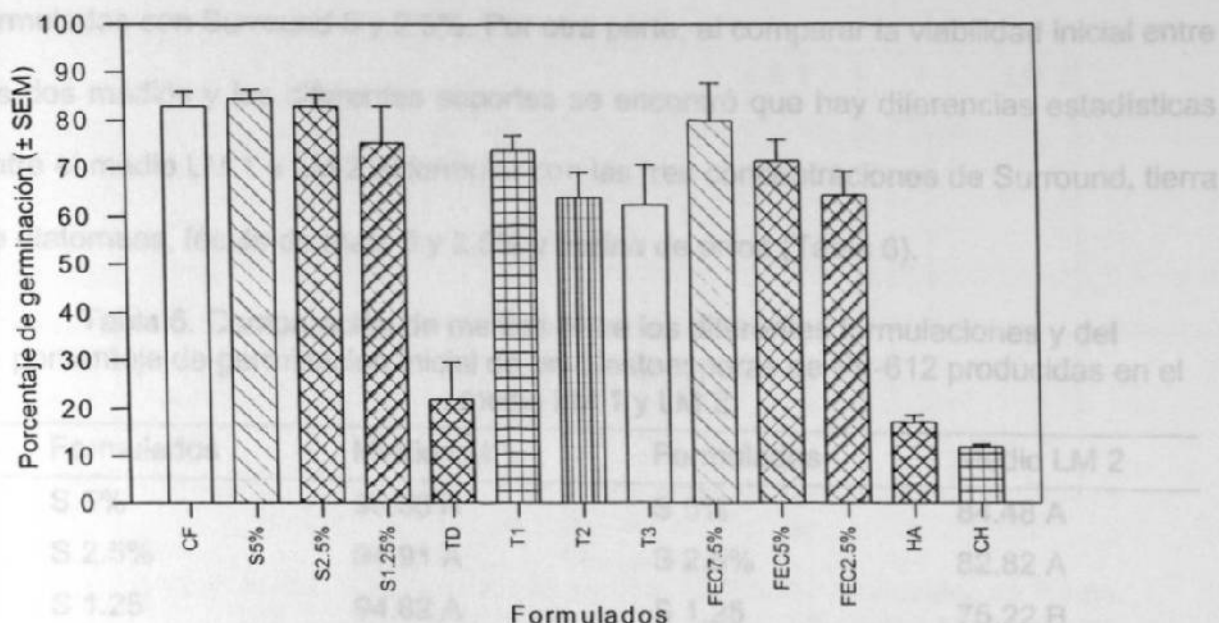


Figura 7. Germinación inicial de blastosporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1 formuladas con diferentes soportes. CF, cultivo fresco; S, surround 5, 2.5 y 1.25; TD, tierra de diatomeas 5%; T, diferentes talcos 5%; FEC, fécula de maíz 7.5, 2.5%; HA, harina de arroz 5%; CH, cal hidratada 5%.

Se distinguen seis grupos estadísticos con blastosporas producidas en el medio LM 1, en donde los mejores grupos estadísticos son el formado por las tres concentraciones de Surround (> del 90% de germinación inicial) y por las tres concentraciones de fécula de maíz (porcentaje de germinación entre 79-84) (Tabla 6). No se encontró diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de Surround y el cultivo fresco con blastosporas producidas en el medio LM 1; con los demás soportes si se encontró diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.01. Para blastosporas producidas en el medio LM 2, los mejores grupos estadísticos fueron los formados por Surround al 5 y 2.5% (84 y 82% de viabilidad) y el formado por Surround al 1.25%, T1, FEC 7.5 y 5% (germinación entre el 71-75%) no encontrando diferencia estadísticamente significativa entre Surround 5 y 2.5%; con respecto a los demás soportes probados si se encontró diferencias significativas en relación a los

formulados con Surround 5 y 2.5%. Por otra parte, al comparar la viabilidad inicial entre los dos medios y los diferentes soportes se encontró que hay diferencias estadísticas entre el medio LM 1 y LM 2 al formular con las tres concentraciones de Surround, tierra de diatomeas, fécula de maíz 5 y 2.5% y harina de arroz (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de medias entre los diferentes formulaciones y del porcentaje de germinación inicial de las blastoesporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1 y LM 2.

Formulados	Medio LM 1	Formulados	Medio LM 2
S 5%	95.33 A	S 5%	84.48 A
S 2.5%	94.91 A	S 2.5%	82.82 A
S 1.25	94.82 A	S 1.25	75.22 B
FEC 2.5%	84.51 B	T1 5%	73.74 B
FEC 5%	81.03 B	FEC 7.5%	71.59 B
FEC 7.5%	79.54 B	FEC 5%	64.50 C
TD 5%	69.56 C	T2 5%	63.92 C
T1 5%	68.39 C	T3 5%	62.40 C
T3 5%	58.45 D	FEC 2.5%	22.90 D
T2 5%	55.83 D	TD 5%	21.88 D
HA 5%	42.36 E	HA 5%	17.03 DE
CH 5%	9.09 F	CH 5%	11.84 E

Germinación de blastoesporas fresca fue en LM 1 95.7% y en LM 2 83.08%. Para comparación de medias se utilizó Tukey a un nivel de 0.01

Se evaluó la estabilidad al almacenamiento a dos temperaturas de formulaciones preparadas con Surround con los dos medios de producción. La supervivencia de blastoesporas producidas en LM 1 y formuladas con S 5%, presentó excelente viabilidad por encima del 70% durante los 42 días de almacenados a 4 °C, para después caer hasta casi el 20% de esporas viables a los 63 días. Con el medio LM 2, la viabilidad disminuyó en los primeros 7 días hasta el 20% y a los 14 días a menos del 5% de blastoesporas viables. (Figura 8).

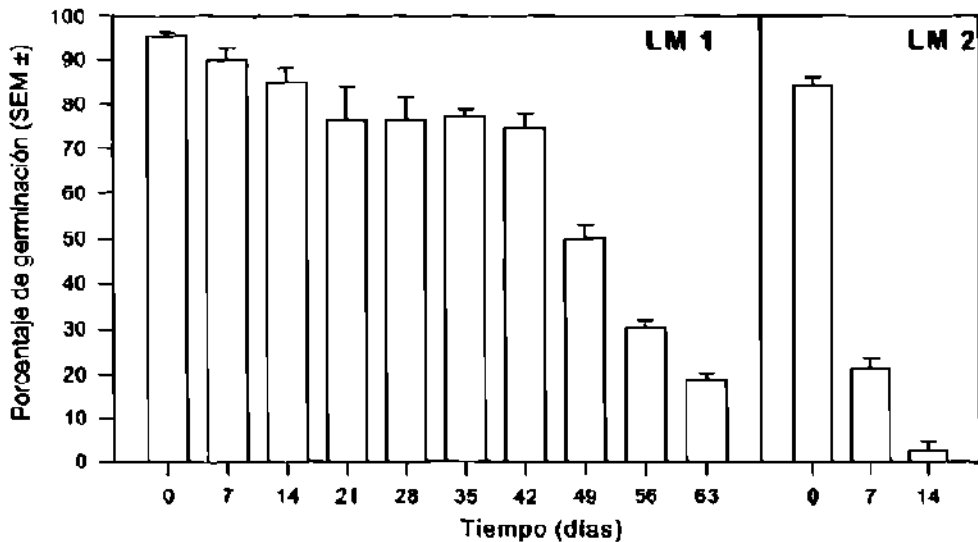


Figura 8. Supervivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 5% (p/v) y almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porcentaje de germinación.

Al utilizar S 2.5% se encontraron valores similares que con S 5%, la viabilidad de blastoesporas producidas en el medio LM 1 se mantuvieron por arriba del 70% después de 35 días de almacenados a 4 °C, después de este tiempo la viabilidad disminuyó por debajo del 20% durante 63 días de almacenaje. Con el medio LM 2 la supervivencia de las blastoesporas de Pfr-612 declinó hasta menos del 20% durante los 14 días que permanecieron en almacén. (Figura 9).

Cuando se probó S 1.25%, la viabilidad de las blastoesporas producidas en el medio LM 1, presentó el 70% de supervivencia hasta los 14 días de almacén a 4 °C y presentó una disminución progresiva en los siguientes días hasta alcanzar el 10% después de 63 días. Con la misma formulación pero con blastoesporas producidas en el medio LM 2 mostró un decremento notorio del 10% solamente en los 14 días almacenados. (Figura 10)

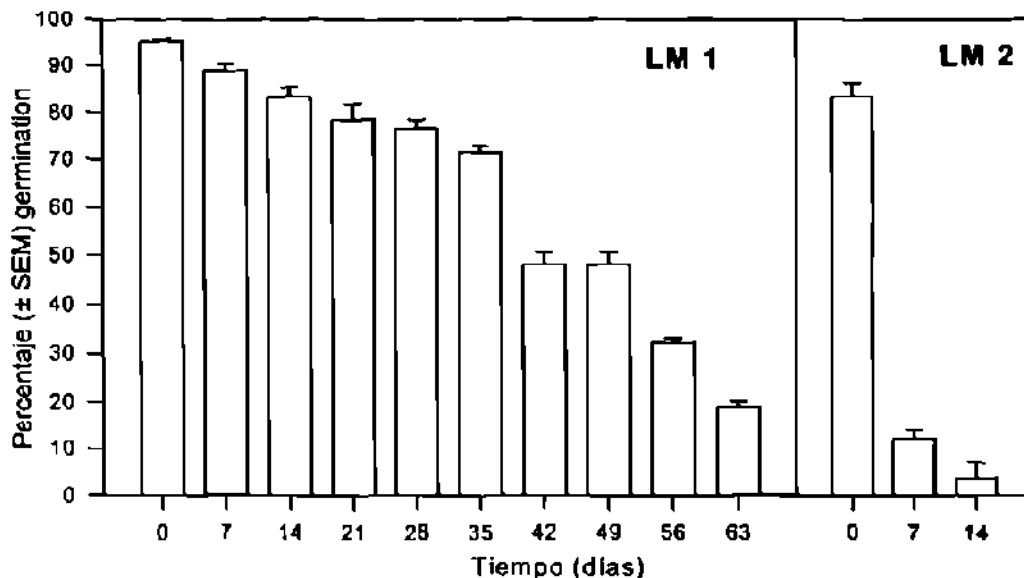


Figura 9. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 2.5% (p/v) y almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

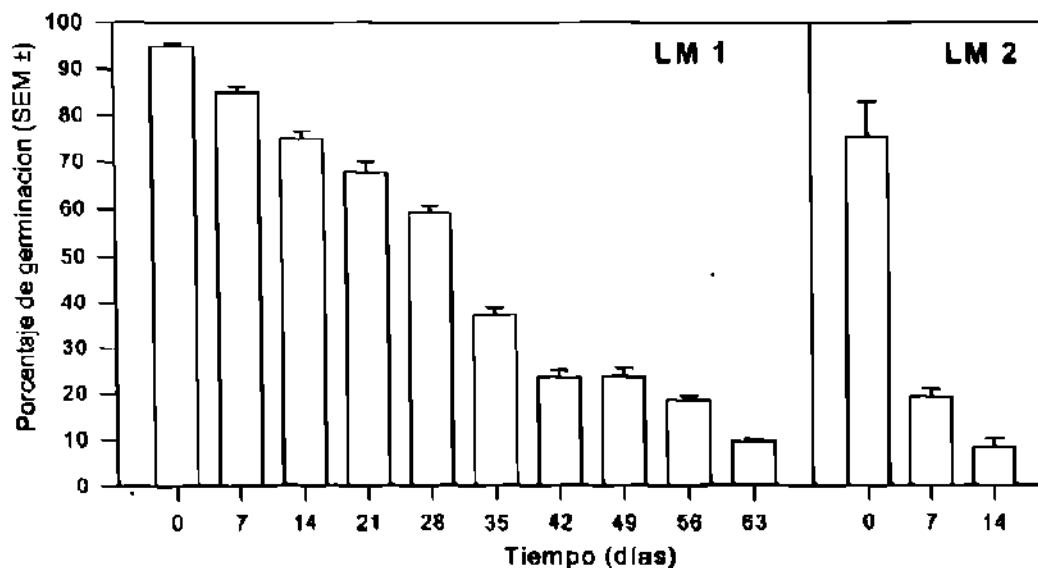


Figura 10. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 1.25% (p/v) almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

Por otro lado, cuando se sometieron estas mismas formulaciones a condiciones de almacenaje de 28 °C, la supervivencia bajó hasta el 20% después de 21 días de prueba en las tres concentraciones de Surround probadas. A una concentración de 5% (p/v) la viabilidad llegó a mantenerse por arriba del 70% a los 14 días de almacenados con blastoesporas producidas en el medio LM 1; mientras que, las blastoesporas producidas en le medio LM 2 la sobrevivencia disminuyó drásticamente a los 7 días hasta un 5% (Figura 11). Con la concentración de Surround al 2.5% y formuladas con el medio LM 1, se encontró ligeros cambios con respecto a la anterior concentración, alcanzando el 68% de germinación a los 14 días de almacenados; con lo que respecta al medio LM 2, la viabilidad bajó hasta el 10% a los 7 días para después ser prácticamente cero a los 14 días (Figura 12). Con Surround 1.25% la caída en la supervivencia de las blastoesporas en el medio LM 1 fue más notoria, cayendo por debajo del 60% a los 7 días, 50% a los 14 días y 10% a los 21 días de almacenaje; la misma concentración pero con Surround al 1.25% el comportamiento de la supervivencia de las blastoesporas producidas en el medio LM 2 fue el mismo que las anteriores concentraciones (Figura 13).

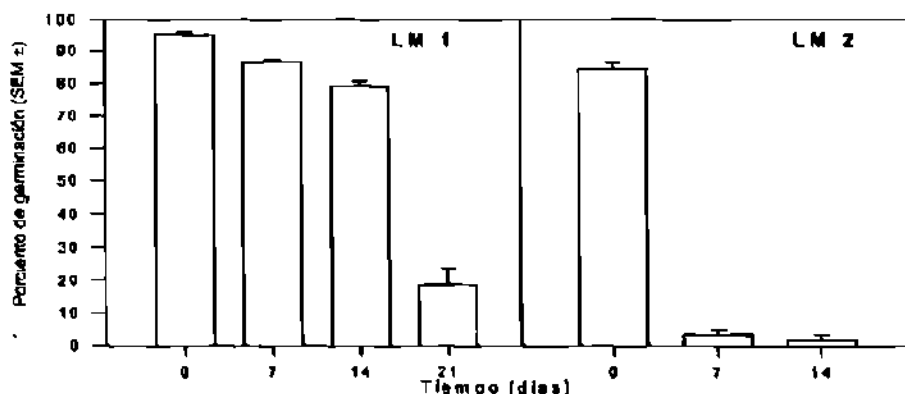


Figura 11. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 5% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porcentaje de germinación.

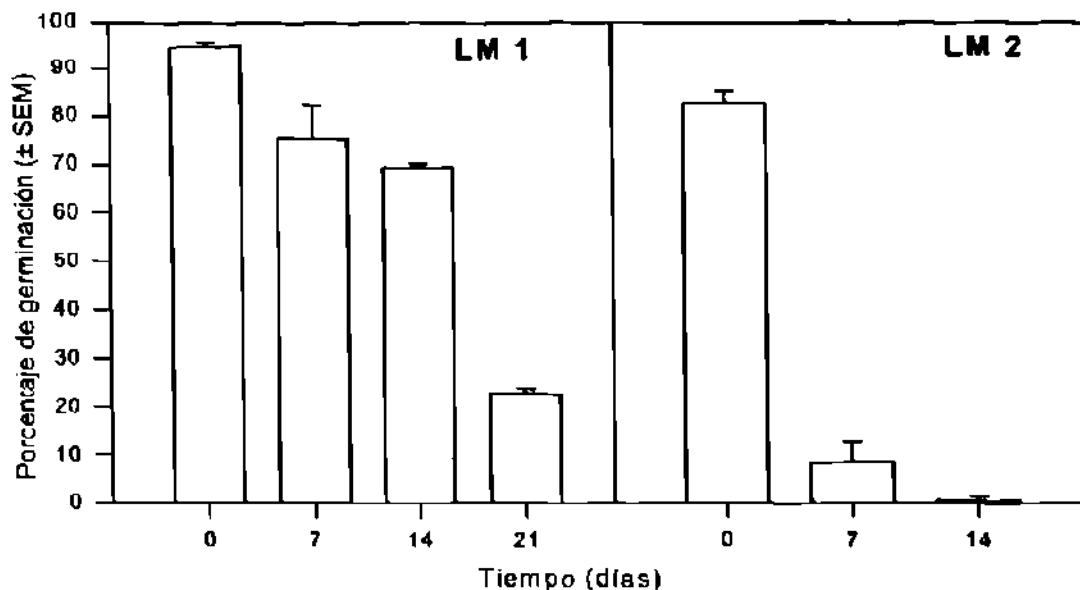


Figura 12. Supervivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 2.5% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

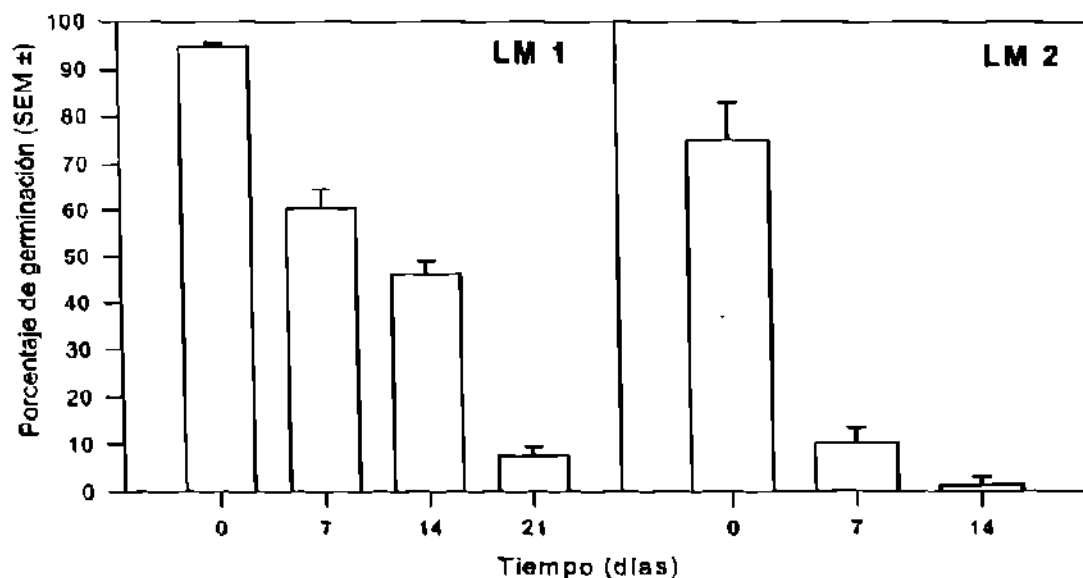


Figura 13. Supervivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con Surround 1.25% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

El análisis estadístico con las mejores formulaciones mostró que no hay diferencia significativa entre las formulaciones con Surround al 5, 2.5 y 1.25% en la viabilidad inicial de las blastoesporas producidas en el medio LM 1 (0 días). Las concentraciones de 5 y 2.5% se mantienen sin diferencia estadística hasta los 28 días de almacenados a 4 °C. Mientras que, la formulación que peor comportamiento presentó fue la de Surround 1.25%, la cual siempre mostró ser estadísticamente diferente a las dos primeras desde la primera semana de almacenados (Tabla 7)

Tabla 7. Comparación de medias de blastoesporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1 formuladas con Surround y almacenadas a 4°C durante 63 días.

Formulados	Días									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
S 5%	95.33 A	90.17 A	85.44 A	79.1 A	76.62 A	77.12 A	73.11 A	50.01 A	32.29 A	19.15 A
S 2.5%	94.91 A	88.93 A	83.27 A	79.04 A	76.50 A	71.54 B	48.07 B	48.15 A	30.22 A	18.75 A
S 1.25%	94.82 A	84.82 B	75.00 B	67.72 B	59.12 B	37.24 C	23.39 C	23.42 B	18.44 B	09.49 B

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos. La comparación de medias se realizó con Tukey a un nivel de significancia del 0.01

Preparaciones con fécula de maíz presentaron efecto más notorio en ambos medios de producción y temperatura de almacenamiento. La supervivencia de blastoesporas producidas en el medio LM 1 y formuladas en concentraciones de 7.5, 5 y 2.5% presentaron una disminución del 50% a los 7 días con respecto a la viabilidad inicial almacenados a 4 °C (Figuras 14, 15, 16); en el caso con blastoesporas producidas en el medio LM 2, el efecto en la viabilidad fue menor del 5% en solamente una semana de almacenados a la misma temperatura (Figuras 14, 15, 16).

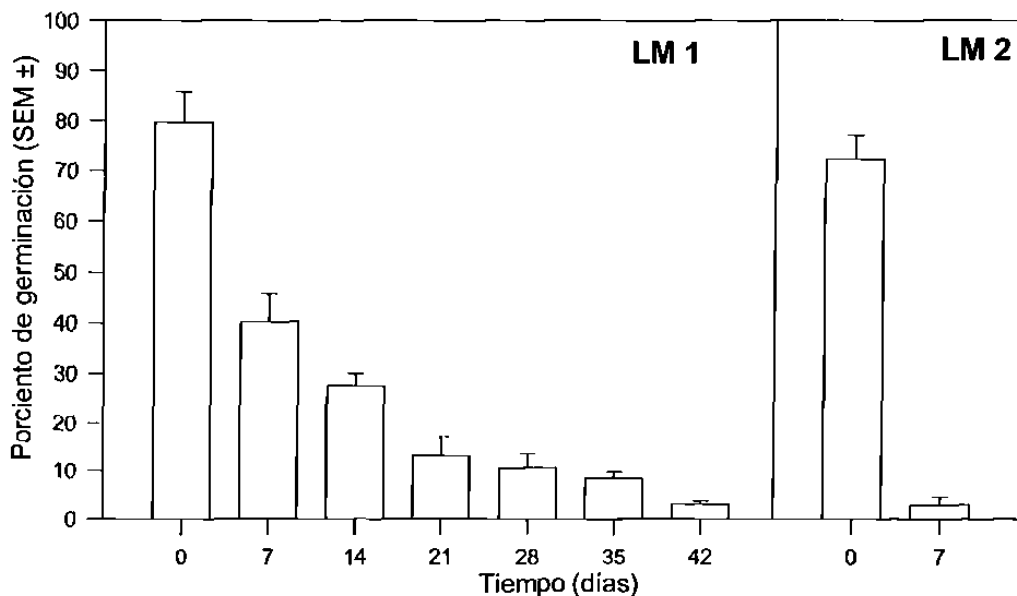


Figura 14. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 7.5% (p/v) y almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porcentaje de germinación.

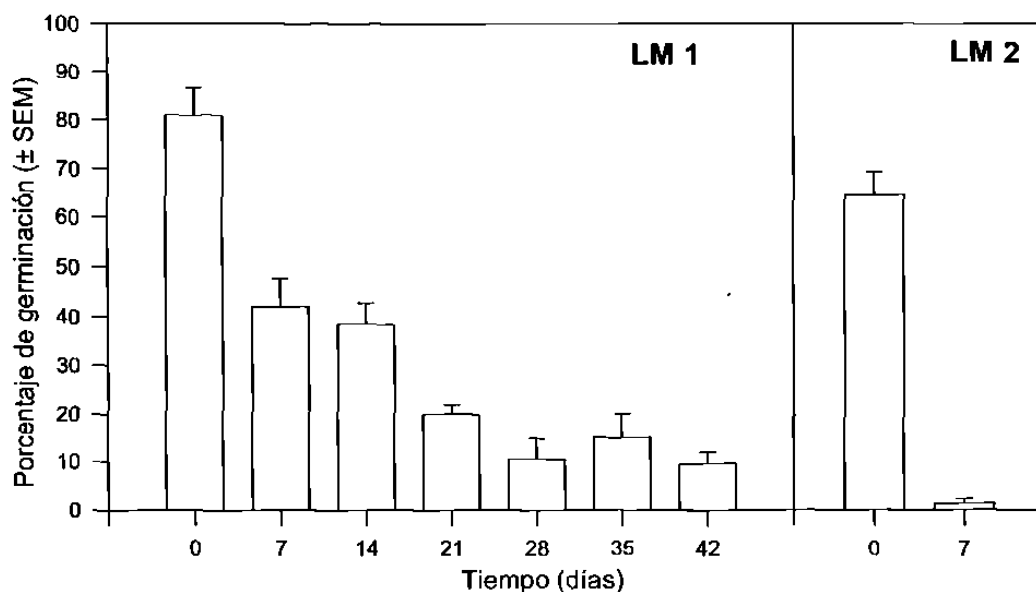


Figura 15. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 5% (p/v) y almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porcentaje de germinación.

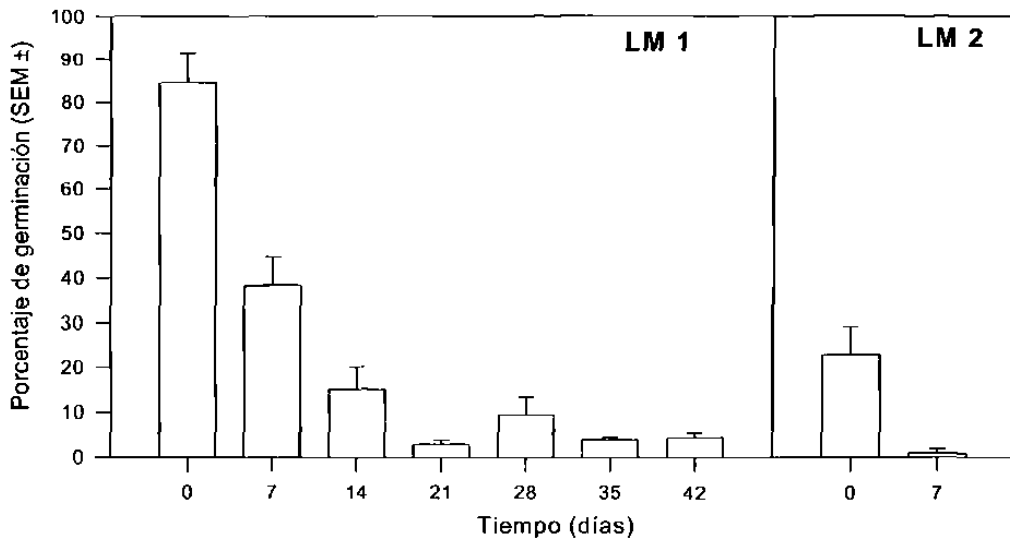


Figura 16. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 2.5% (p/v) y almacenados a 4 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

Al someter estos mismos formulados pero almacenados a 28 °C, la viabilidad de las blastoesporas en el medio LM 1 se reduce hasta menos del 20% en la primera semana, para mantenerse en 10% o menos después de 21 días de almacenados; mientras que, con blastoesporas en el medio LM 2 la germinación es prácticamente cero en las tres concentraciones probadas de fécula de maíz bajo las mismas condiciones de almacenamiento (Figuras 17, 18, 19).

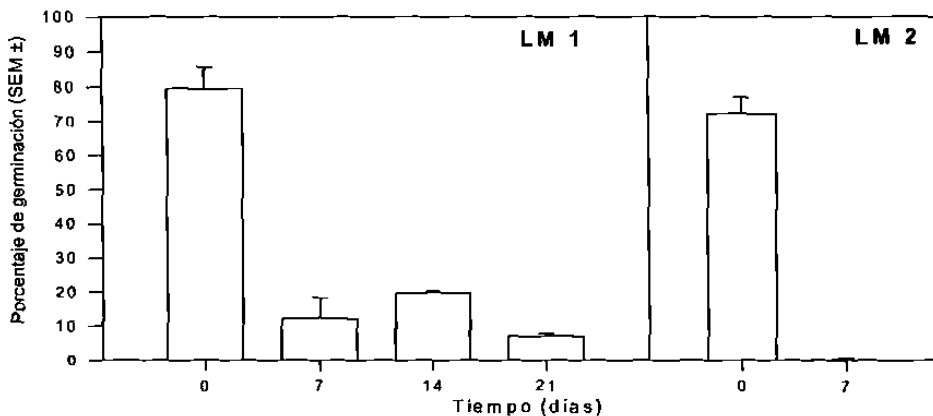


Figura 17. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 7.5% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento

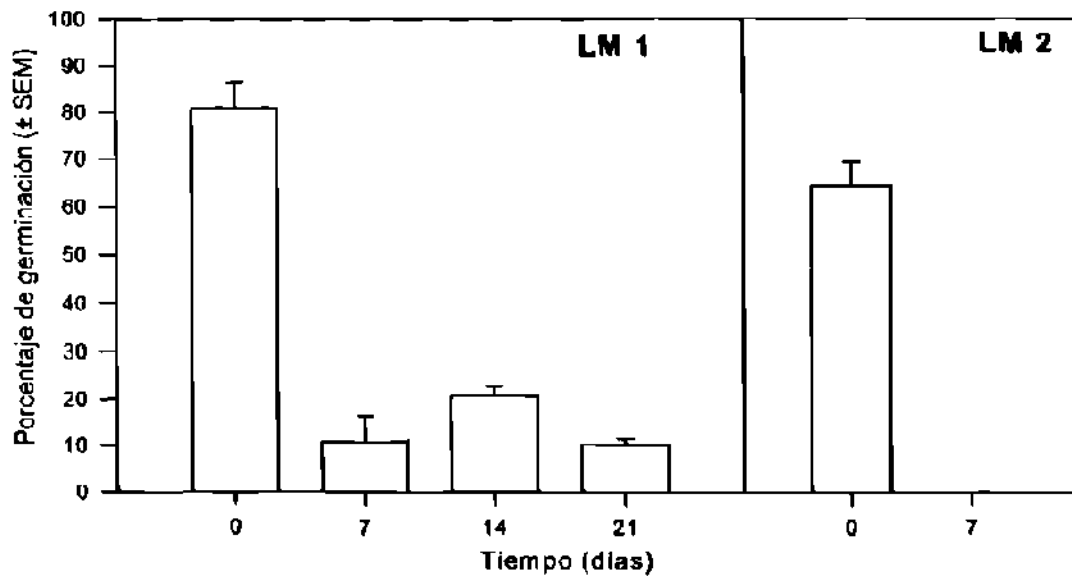


Figura 18. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 5% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

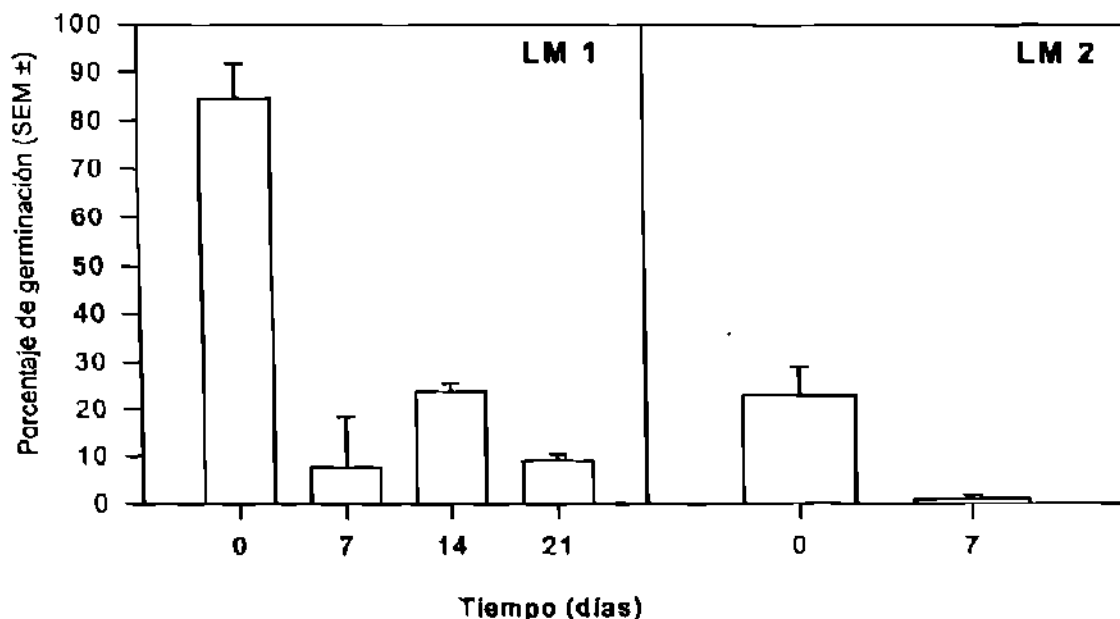


Figura 19. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio LM 1 y LM 2 formulados con fécula de maíz 2.5% (p/v) y almacenados a 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

Las formulaciones realizadas con tierra de diatomeas y tres diferentes talcos, utilizando blastoesporas producidas en el medio LM 1 y almacenadas por 21 días a 4 y 28 °C, mostraron que en tierra de diatomeas se presentó la mejor sobrevivencia a 4 °C obteniendo más del 50% de esporas viables, seguida del talco T 1 con menos del 40%, los demás formulados presentaron menos del 15% de sobrevivencia a la misma temperatura; y los mismos formulados pero almacenados a 28 °C, en las cuatro formulaciones presentaron menos del 10% (Figura 20).

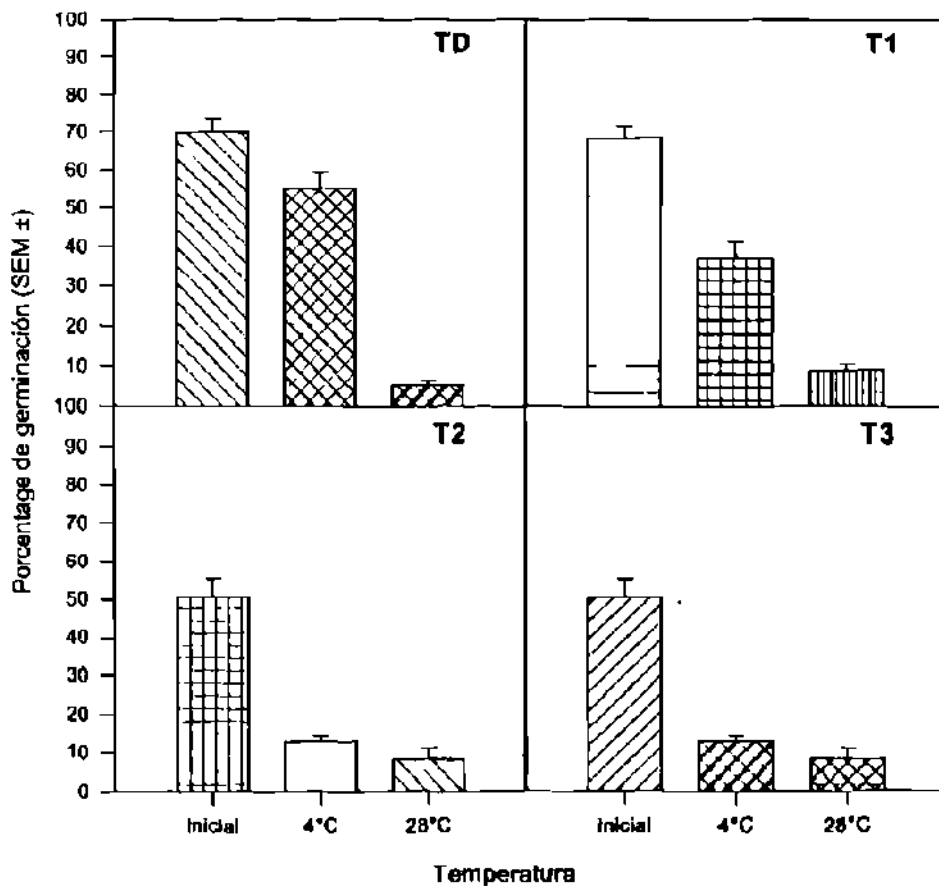


Figura 20. Sobrevivencia de blastoesporas de Pfr-612 producidas en el medio LM 1, formulados con tierra de diatomeas (TD) y diferentes talcos (T1, T2, T3) y almacenados 21 días a 4 y 28 °C. Barra representa el error estándar para el porciento de germinación.

El porcentaje de humedad de las diferentes formulaciones con blastoesporas de *P. fumosoroseus* varió grandemente desde 0.01 a 12.1%. El contenido de humedad de las formulaciones fue generalmente similar a la capacidad de humedad de los soportes utilizados en el estudio. Las matrices de harina de arroz y fécula de maíz presentaron el más alto contenido de humedad del 9.6% sin formular y las formuladas con blastoesporas mostraron entre el 11.4 a 12.1%. Contrariamente, los soportes del tipo talco y tierra de diatomeas son normalmente secos (0.03-0.04%) y formulados presentaron un contenido de humedad menor al 1% (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de humedad de los diferentes soportes sin formular y formulados con blastoesporas de Pfr-612 producidas en medio líquido

Soporte	Soporte sin formular (% de humedad)	Formulado (% de humedad)
Surround 5%	0.3	2.5
Surround 2.5%	0.3	0.8
Surround 1.25%	0.3	0.7
Tierra de diatomeas 5%	0.04	0.6
Talco 1	0.03	0.4
Talco 2	0.03	0.3
Talco 3	0.04	0.4
Fécula de maíz 7.5%	9.6	11.4
Fécula de maíz 5%	9.6	12.1
Fécula de maíz 2.5%	9.6	11.8
Harina de arroz 5%	9.8	11.6
Cal mexicana 5%	0.01	2.9

Los bioensayos realizados a los mejores formulados no presentaron diferencias significativas en la mortalidad contra ninfas de tercer instar de *B. argentifolii*. La formulación con Surround 5% (p/v) fue la que presentó mejor mortalidad con 94.7% seguida de los tratamientos con fécula de maíz 5% y tierra de diatomeas 5% con 93.6 y

93.3 respectivamente. La mortalidad que se presentó con blastoesporas frescas originadas en el medio LM 1 fue de 90.7% y con blastoesporas producidas en el medio LM 2 fue el tratamiento que presentó la menor mortalidad con un 84% (Tabla 9). El resto de las formulaciones como las elaboradas con blastoesporas producidas en el medio LM 1 basados en talcos, harina de arroz y cal hidratada no se realizaron, debido al bajo porcentaje de germinación de las blastoesporas con estos soportes. De la misma manera, solamente se realizó el bioensayo con blastoesporas frescas del medio LM 2, ya que las formulaciones realizadas con blastoesporas de este medio presentaron menor porcentaje de germinación inicial que las derivadas del medio LM 1 con los diferentes soportes probados.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de ninfas del 3er instar de *B. argentifolii* con blastoesporas frescas y diferentes formulaciones de Pfr-612.

Tratamiento	Número de ninfas tratadas	Número de ninfas muertas	Mortalidad (%)
LM 1*	70	64**	90.7 ± 9.3% A
LM 2*	74	62**	84 ± 28.0% A
S 5%	66	62**	94.7 ± 5.3% A
TD 5%	74	69**	93.3 ± 6.7% A
FEC 5%	62	58**	63.6 ± 4.5% A
Control	64	2***	3.3 ± 3.3% B

*Blastoesporas frescas producidas en el medio LM 1 y LM 2; ** ninfas micosadas; *** ninfas no micosadas. LM, medio líquido, S, Surround, TD, tierra de diatomeas; FEC, fécula de maíz. ANOVA: F = 12.34; df = 5,12; P = 0.0002. Mismas letras representan que no hay diferencias significativas.

DISCUSION

Nosotros hemos mostrado que tanto la composición del medio y el soporte para el secado, pueden tener un impacto sobre la viabilidad de blastoesporas producidas en cultivo líquido del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus*. Bajo las condiciones usadas en nuestro estudio, el medio suplementado con Casamino ácidos (LM 1) produjo altas concentraciones de blastoesporas, las cuales no solamente sobreviven mejor que las blastoesporas originadas en el medio basado en peptona de colágena (LM 2), sino que también mantienen la viabilidad durante períodos más largos de almacenaje en los soportes para formulaciones probados. Al respecto Jackson y col. utilizando un medio líquido semi-definido a base de Casamino ácidos y glucosa, encontraron una alta y rápida producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus* (5×10^8 esporas/ml) semejantes a las obtenidas en nuestro estudio, además una alta concentración de estas blastoesporas fueron tolerantes a la desecación con tierra de diatomeas y liofilizadas (Jackson *et al.*, 1997; Cliquet y Jackson 1999).

En general las formulaciones líquidas mostraron buena germinación de blastoesporas hasta los 33 días de evaluación y la formulación FL 5 mantiene porcentaje de viabilidad por encima del 60%. La dificultad de mantener la emulsión por tiempo prolongado y la correcta evaluación de estos formulados representó un gran desafío, esto posiblemente ocasionó que las blastoesporas iniciales dentro de la mezcla agua-aceite germinaran y produjeran nuevas conidias o blastoesporas después de un tiempo prolongado de almacenaje. Anteriores estudios se enfocaron a mezclar conidias con aceite suspendidas en querosén, por lo que en dichas formulaciones no presentaron dificultad en mantener la emulsión, debido a que fueron exentas de agua y de esta manera logran mantener la viabilidad de las conidias por 1 ó 2 años (Prior *et*

al., 1988; McClatchie *et al.*, 1994; Langewald *et al.*, 1997; Sieburth *et al.*, 1998). Se deben realizar estudios adicionales encaminados a mantener las emulsiones aceite-agua por tiempo prolongado, en donde se utilicen diferentes surfactantes o emulsificantes, a fin de poder evaluar adecuadamente la viabilidad de las blastoesporas.

La naturaleza de los soportes para secado, mostró tener un impacto significativo sobre la estabilidad al almacenaje de todas las blastoesporas, particularmente aquellas producidas en el medio LM 1. Bajo las condiciones utilizadas de producción, secado y almacenaje en la investigación, las formulaciones con Surround (calcined kaolin) almacenadas a 4 °C presentaron mejor estabilidad que las almacenadas bajo condición ambiental (28 °C). Al respecto, Alves y col. (1996) probaron diferentes soportes como talco, silica gel, harina de arroz y almidón de maíz para formular con conidias de *B. bassiana* producidas en fermentación sólida y encontraron que bajo condiciones de almacenaje ambiental (15-38 °C) disminuye rápidamente la viabilidad de las conidias independientemente de la formulación (Alves *et al.*, 1996)

El medio LM 1 es un medio que está basado sobre una composición en donde previamente se ha demostrado que produce blastoesporas tolerantes a la desecación de *P. fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997; Jackson 1999). En este estudio, la sobrevivencia de blastoesporas después de secadas en tierra de diatomeas fue de 69%, comparable a los valores reportados previamente (Jackson *et al.*, 1997) (Figura 20). Por el contrario, solamente el 21% de las blastoesporas producidas en el medio LM 1 sobrevivieron al secado en el mismo soporte. El contenido de nitrógeno del medio LM 2, es proporcionado por la peptona de colágena y levadura hidrolizada, está en una

concentración que se muestra apropiada para la producción de blastoesporas tolerantes a la desecación de *P. fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997). Nuestros resultados sugieren que la peptona de colágena resultó ser una fuente de nitrógeno inapropiada para la producción de blastoesporas de *P. fumosoroseus*. Los primeros estudios, han mostrado que la fuente de nitrógeno presente en el medio impacta la tolerancia a la desecación de blastoesporas producidas en cultivo líquido de *P. fumosoroseus* (Jackson *et al.*, 1997; Cliquet y Jackson 1999; Jackson 1999).

Mientras que la estabilidad al almacenaje de blastoesporas producidas en el medio LM 1 fue en todos los casos superior a la del almacenaje de las blastoesporas producidas en el medio LM 2, diferencias significativas en la sobrevivencia de las blastoesporas en el medio LM 1 se observaron para los diferentes soportes y temperatura de almacenaje utilizados en el estudio. Como se esperaba, la sobrevivencia de las blastoesporas fue siempre mejor cuando se almacenó a 4 °C que a 28 °C. Después de 7 días de almacenados a 28 °C, el porcentaje de sobrevivencia más alto se obtuvo (20%) con blastoesporas producidas en el medio LM 1 con Surround 5% (p/v). Este soporte, también proporcionó la mejor sobrevivencia al almacenaje de blastoesporas producidas en el medio LM 1 almacenados a 4 °C. Después de 6 semanas de almacenamiento, más del 70% de las blastoesporas formuladas con Surround al 5% (p/v) fueron aún viables (Figura 8). Estudios anteriores mostraron que la humedad relativa del secado al aire puede tener impacto sobre la estabilidad al almacenaje de blastoesporas secadas de *P. fumosoroseus* (Jackson 1999); en blastosporas secas de *P. fumosoroseus* con una humedad realtiva (>65%) mejoró su estabilidad al almacenamiento (Cliquet y Jackson 1997). Como estos estudios de secado se realizaron en una cámara de flujo laminar bajo condiciones ambientales, es

posible que estas preparaciones estuvieran sujetas a condiciones de humedad relativa muy baja y el proceso de secado fue muy rápido lo cual afectó la viabilidad de las blastoesporas.

Aquellas formulaciones con menos concentración de Surround, probablemente se secaron mucho más rápidamente bajo condiciones realizadas en el estudio, posiblemente esto condujo a reducir el contenido de humedad y la estabilidad al almacenamiento. Estudios del porcentaje de humedad apoyan esta teoría y muestran que preparaciones de 5% de Surround mantuvieron el contenido de humedad más alto después de secado que las formulaciones de Surround con 1.25 y 2.5% (Tabla 8). De hecho, un rango amplio de niveles de humedad se noto en las diferentes formulaciones de *P. fumosoroseus*. El contenido de humedad de la formulación final estuvo en el rango mayor al 12% para algunas de las preparaciones con almidón de maíz, y menor al 5% de humedad para las preparaciones con talcos. Previos estudios muestran que al disminuir del 50 al 4% en un tiempo de 4 h el contenido de humedad en tierra de diatomeas, la viabilidad de las blastoesporas decreció rápidamente hasta el 2%, pero cuando el secado se realizó a una humedad relativa del 70%, la humedad de la muestra bajó lentamente durante las primeras 10 horas de 50% hasta el 24% de humedad y solamente se observó un 30% en pérdida de la viabilidad de las blastoesporas (Cliquet y Jackson 1997). Estudios adicionales sobre el impacto de las condiciones de secado y contenido de humedad del producto final sobre la supervivencia y estabilidad al almacenamiento de las blastoesporas de *P. fumosoroseus* son necesarios para un completo entendimiento de estos resultados.

Pensamos que el medio de producción y el soporte utilizado durante el secado tienen efecto sobre la tolerancia a la desecación y estabilidad al almacenaje de *P.*

fumosoroseus. El medio de producción debe proveer un ambiente nutricional conducente para la formación de blastoesporas que les permitan sobrevivir a la desecación y al almacenaje en un estado de sequedad. Igualmente, las formulaciones o soportes deben proveer una matriz que permita a las blastoesporas adaptarse a los procesos de secado y la proteja de las condiciones nocivas durante el almacenaje. Mostramos que el Surround se puede utilizar para formular blastoesporas de *P. fumosoroseus*, y que un mejoramiento en la estabilidad durante el almacenamiento es necesario si estos procesos se van a utilizar para la producción comercial de estos bioinsecticidas. Los estudios dirigidos a optimizar condiciones de secado y almacenaje de blastoesporas de *P. fumosoroseus* se deben continuar y con esto ayudar a mejorar la tolerancia a la desecación y su estabilidad durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES

1. Se demostró que según la composición del medio líquido, la concentración de blastoesporas de *P. fumosoroseus* producidas se vió afectada y se encontró mayor producción en el medio líquido LM 1 a base de Casamino ácidos y glucosa.
2. La viabilidad de las blastoesporas producidas en el medio líquido LM 1 soportaron mejor el proceso de secado que las blastoesporas obtenidas del medio líquido LM 2.
3. De los soportes utilizados, Surround mostró la más alta supervivencia inicial (> 90%) de blastoesporas de *P. fumosoroseus* que los demás soportes probados.
4. Surround al 5% fue el soporte que mantuvo la más alta viabilidad (> 70%) durante el mayor tiempo (42 días) de almacenaje a temperatura de 4 °C.
5. La temperatura de almacenaje de 28 °C mostró una influencia negativa sobre la viabilidad de las blastoesporas formuladas con todos los soportes probados. Las formulaciones a base de Surround en sus tres concentraciones mantienen la viabilidad por arriba del 60% después de 14 días de almacenados.

LITERATURA CITADA

- Abbas, H.K., and C.D. Boyette. 2000. Solid substrate formulations of the mycoherbicide *Colletotrichum truncatum* for hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Biocontr. Sci. Technol.* **10**: 291-300.
- Agudelo, F., and L.A. Falcon. 1983. Mass production, infectivity, and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 124-132.
- Altre, J.A., J.D. Vandenberg, and F.A. Cantone. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamonback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 332-338.
- Alves, S.B., R.M. Pereira, J.L. Stimac, and S.A. Vieira. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontr. Sci. Technol.* **6**: 575-581.
- Amsellem, Z., N.K. Zidack, P.C. Quimby Jr., And J. Gressel. 1999. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Protection.* **18**: 643-649.
- 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.
- Askary, H., N. Benthamous, and J. Brodeur. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 1-13.

- Axtell, R.C. and D.R. Guzman. 1987. Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in calcium alginate. *Journal of the American Mosquito Control Association*. **3**: 450-459.
- Barson, G., N. Renn, and A.F. Bywater. 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for control of the fly (*Musca domestica* L.) a pest of intensive animal units. *J. Invertebr Pathol.* **64**: 107-113.
- Bartlett M.C., and S.T. Jaronski. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. M.N. Burge ed., Manchester University Press, New York, pp. 61-85.
- Brayant, J.E. 1994. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **49**: 31-35.
- Bidochka, M.J., T.A. Pfeifer and G.G. Khachatourians. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*. **99**: 77-83.
- Bidochka, M.J., and G.G. Khachatourians. 1988. N-Acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2699-2704.
- Bidochka, M.J. and G.G. Khachatourians. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. pathol.* **56**: 362-370.
- Bidochka, M.J. and G.G. Khachatourians. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *J. Invertebr. Pathol.* **63**:7-13.

- Bidochka, M.J. and G.G. Khachatourians. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 26-32.
- Bidochka, M.J., S. Burke, and L. Ng. 1999. Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: adaptations for pathogenesis. *Can. J. Microbiol.* **45**: 856-864.
- Bográn, C.E., J.J. Obvrycki, and R. Cave. 1998. Assessment of biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on common bean in Honduras. *Fla. Entomol.* **81**: 384-392.
- Booth, S.R., and C.H. Shanks Jr. 1998. Potential of a dried rice/mycelium formulation of entomopathogenic fungi to suppress to subterranean pests in small fruits. *Biocontr. Sci. Technol.* **8**: 197: 206.
- Booth, S.R., L. Tanigoshi, and I. Dewes. 2000. Potential of dried mycelium formulation of an indigenous strain of *Metarhizium anisopliae* against subterranean pest of cranberry. *Biocontr. Sci. Technol.* **10**: 659-668.
- Boyette, C.D., P.C. Quimby, Jr., A.J. Caesar, J.L. Birdsall, W.J. Connick, Jr., D.J. Daigle, M.A. Jackson, G.H. Egley, and H.K. Abbas. 1996. Adjuvants, formulations, and spraying systems for improvement of mycoherbicides. *Weed Technol.* **10**: 637-644.
- Boyette, C.D., P.C. Quimby, Jr., W.J. Connick, Jr., D.J. Daigle, and F.E. Fulgham. 1991. Progress in the production, formulation, and application of mycoherbicides. In TeBeest, D.O. (Ed.), *Microbial Control of Weed*. Chapman & Hall, New York, pp. 209-222.
- Bradley, C.A., W.E. Black, R. Kearns, and P. Wood. 1992. Role of production technology in mycoinsecticide development. In "Frontiers in Industrial Mycology" (G.F. Leathman, Ed.). Chapman and Hall, New York, pp.160-173,

- Brownbridge, M., A. Adamowicz, M. Skinner, and B.L. Parker. 1999. Prevalence of fungal entomopathogens in the life cycle of pear thrips, *Taeniothrips inconsequens* (Thysanoptera: Thripidae), in Vermont maple forests. *Biol. Control*. **16**: 54-59.
- Bryan, J.L. 1994. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **49**: 39-35.
- Bustillo, A.E., M.G. Bernal, P. Benavides, and B. Chaves. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Fla. Entomol.* **82**: 491-498.
- Campbell, R.K., G.L. Barnes, B.O. Cartwright, and R.D. Eikenbary. 1983. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. *J. Invertebr. Pathol.* **41**:117-121.
- Castineiras, A. 1995. Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cuba. *Fla. Entomol.* **78**: 538-540.
- Castineiras, A., J.E. Peña, R. Duncan, and L. Osborne. 1996. Potencial of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Fla. Entomol.* **79**: 458-461.
- Cliquet, S., and M.A. Jackson. 1999. Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. *J. Ind. Microbiol.* **23**: 97-102.
- Cliquet, S., and M.A. Jackson. 1997. Comparison of air-drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture-produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **13**: 299-303.

- Connick, Jr., W.J., C.D. Boyette, and J.R. McAlpine. 1991. Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process. *Biological Control*. **1**: 281-287.
- Connick, Jr., W.J., M.A. Jackson, K.S. Williams, and C.D. Boyette. 1997. Stability of microsclerotial inoculum of *Colletotrichum truncatum* encapsulated in wheat flour-kaolin granules. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **13**: 549-554.
- Couch, T.L., and C.M. Ignoffo. 1981. Formulation of insect pathogens. In: Burgess HD, ed. *Microbial Control of Pests and Diseases 1970-1980*. London: Academic Press. pp. 621-634.
- Daigle, D.J., and P.J. Cotty. 1992. Production of conidia of *Alternaria cassiae* with alginate pellets. *Biol. Control*. **2**: 278-281.
- Damsteegt, V.D. 1999. New and emerging plant viruses. *American Phytopathological Society Net*. 1-12.
- Daoust, R.A., and D.W. Roberts. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* **41**: 143-150.
- Deacon, J.W. 1984. Aspect of Microbiology 7: Microbial control of plant pests and diseases. *Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd.* pp. 31-42.
- DeQuattro, J.D., D. Senft, and M. Wood. 1997. The whitefly plan 5-year update. *Agricultural Research*. **6**: 4-12.
- Douro-Kpindou, O.K., I. Godonou, A. Houssou, C.J. Lomer, and P.A. Shah. 1995. Control of *Zonocerus variegatus* by ultra-low volume application of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontr. Sci. Technol.* **5**: 131-139.
- Drost, Y.C., J.C. van Lenteren, and H.J.W. van Roermund. 1998. Life-history parameters of different biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to

- temperature and host plant: a selective review. *Bolletín of Entomological Research*. **88**: 219-229.
- Fargues, J., M.S. Goettel, N. Smits, A. Quedraogo, and Rougier. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*. **89**: 383-392.
- Fargues, J., and C. Luz. 1998. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Science and Technology*. **8**: 323-334.
- Feng, M.G., T.J. Poprawski, and G.G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontr. Sci. Technol.* **4**: 3-34.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.
- Fravel, D.R., and J.A. Lewis. 1992. Production, formulation and delivery of beneficial microbes for biocontrol of plant pathogens. In *Pesticide formulation and application systems*. **11**: 173-179.
- Geden, C.J., D.A. Rutz, and D.C. 1995. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. *Biol. Control*. **5**: 615-621.
- Gill, R.J. 1990. The morphology of whiteflies. En: Gerling ed. *Whiteflies: their bionomic, pest status and management*, Andover, UK: Intercept. pp. 13-45.
- Gillespie, A.T., and N. Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.* **27**: 203-215.

- Goettel, M.S. 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycete fungi. *J. Microbial Methods*. **3**: 15-20.
- Hallsworth, J.E., and N. Maga. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 261-266.
- Hall, R.A., D.D. Peterkin, B. Ali, and V.F. Lopez. 1980. Influence of culture age on rate of conidiospore germination in four deuteromycetous entomogenous fungi. *Mycol. Res.* **98**: 763-768.
- Hajek, A.E. and R.J. St. Lager. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- Hebbar, K.P., R.D. Lumsden, J.A. Lewis, S.M. Poch, and B.A. Bailey. 1998. Formulation of mycoherbicidal strains of *Fusarium oxysporum*. *Weed Science*. **46**: 501-507.
- Hegedus, D.D., M.J. Bidochka, and G.G. Khachatourians. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 641-647.
- Hegedus, D.D., and G.G. Khachatourians. 1993. Identification of Molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Metarhizium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4283-4288.
- Hedgecock, S., D. Moore, P.M. Higgins, and C. Prior. 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Science and Technology*. **5**: 371-377.
- Hoelmer, K.A., L.S. Osborne, F.D. Bennett, and R.K. Yokomi. 1994. Biological control of sweetpotato whitefly in Florida. *Pest Management in the Subtropics, Biol. Control-a Florida Perspective*. pp. 101-113.

- Hoelmer, K.A., L.S. Osborne, and R.K. Yokomi. 1994. Interactions of the whitefly predator *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) with parasitized sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* **23**: 136-139.
- Humphreys, A.M., P. Matewele, and A.P.J. Trinci. 1989. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. *Mycol. Res.* **92**: 257-264.
- Humphreys, A.M., P. Matewele, B. Cunliffe, and A.P.J. Trinci. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. *Mycol. Rev.* **94**: 1046-1050.
- Hung, S.Y., and D.G. Boucias. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 152-158.
- Hung, S.Y., D.G. Boucias, and A.J. Vey. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 179-187.
- Hsiao, W.-F., M.J. Bidochka, and G.G. Khachatourians. 1992. Effects of diphenols on the growth of three entomopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1000-1003.
- Hywel-Jones, N.L., and A.T. Gillespie. 1990. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **94**: 389-392.
- Inch, J.M.M., A.M. Humphreys, A.P.J. Trinci, and A.T. Gillespie. 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans Br. Mycol. Soc.* **87**: 215-222.

- Ibrahim, Y.B., and W. Low. 1993. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management*. **39**: 288-292.
- Inglis, G.D., T.J. Ivie, G.M. Duke, and M.S. Goettel. 2000. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and colorado potato beetle larvae. *Biol. Control*. **18**: 55-64.
- Jackson, M.A., M.R. McGuire, L.A. Lacey, and S.P. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* **101**: 35-41.
- Jackson, M.A. B.S. Shasha, and D.A. Schisler. 1996. Formulation of *Colletotrichum truncatum* microsclerotia for improved biocontrol of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Biol. Control*. **7**: 107-113.
- Jackson, M.A., and P.J. Slininger. 1993. Submerged culture conidial germination and conidiation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the amino acid composition of the medium. *Journal of Industrial Microbiology*. **12**: 417-422.
- Jackson, M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **19**: 180-187.
- Jackson, M.A. 1999. Method for producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. U.S. Patent # 5,968,808. Oct. 19, 1999.
- James, R.R., B.A. Croft, B.T. Shaffer, and B. Lighthart. 1998. Impact of temperature and Humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. *Environ. Entomol.* **27**: 1506-1513.

- James, R.R., and S.T. Jaronski. 2000. Effect of low viability on infectivity of *Beauveria bassiana* toward the silverleaf whitefly. *J. Invertebr. Pathol.* **76**: 227-228.
- Jefferies, L.B., L.L.J. Xavier, R.E. Matai, and G.G. Khachatourians. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* **45**: 936-948.
- Jones W. E., J. K. Grace, and M. Tamashiro. 1996. Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Environ. Entomol.* **25**: 481-487.
- Khachatourians, G.G. 1992. Virulence of five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper, *Melaoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 212-214.
- Klausner, A. 1984. Microbial insect control. *Bio/technology.* 409-419.
- Knudsen, G.R., J.B. Johnson, and D.J. Eschen. 1990. Alginate pellet formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids. *J. Econ. Entomol.* **83**: 2225-2228.
- Lacey, L.A., and M.S. Goettel. 1995. Current developments in microbial control insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga.* **40**: 3-27.
- Lacey, L.A., A.A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier, and C. Vidal. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontr. Sci. Technol.* **9**: 9-18.

- Lackey, B.A., A.E. Muldoon, and B.J. Jaffee. 1993. Alginate-pellet formulation of *Hirsutella rhossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biol. Control*. **3**: 155-160.
- Lane, B.S., A.P.J. Trinci, and A.T. Gillespie. 1991. Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. *Mycol. Res.* **95**: 821-828.
- Lane, B.S., A.P.J. Trinci, and A.T. Gillespie. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycol. Res.* **95**: 829-833.
- Landa, Z., L. Osborne, F. Lopez, and J. Eyal. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biol. Control*. **4**: 341-350.
- Langewald J., C. Kooyman, O. Douro-kpindou, C.J. Lomer, A.O. Dahmoud, and H.O. Mohamed. 1997. Field treatment of desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskål) hoppers in mauritania using an oil formulation of the entomopathogenic fungus *Metarthizium flavoviride*. *Biocontr. Sci. Technol.* **7**: 603-611.
- Lewis, J.A., D.R. Fravel, R.D. Lumsden, and B.S. Shasha. 1995. Application of biocontrol fungi in granular formulations of pregelatinized starch-flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*. *Biol. Control*. **5**: 397-404.
- Liu, T.X., and P.A. Stansly. 1998. Life history of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae). *Fla. Entomol.* **81**: 437-444.
- Luz, C. and J. Fargues. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*. **146**: 33-41.

- Luz, C. and J. Fargues. 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* **72**: 97-103.
- Mesquita, A.L.M., L.A. Lacey, G. Mercadier, and F. Leclant. 1996. Entomopathogenic activity of a whitefly derived isolate of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) with the description of an effective bioassay method. *European Journal of Entomology.* **93**: 69-75.
- McAuslane. H. J. 1996. Influence of leaf pubescence on ovipositional preference of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on soybean. *Environ Entomol.* **25**: 834-841.
- McClatchie, G.V., D. Moore, R.P. Bateman, and C. Prior. 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycol. Rev.* **98**: 749-756.
- McGuire M.R, and B.S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **83**: 1813-1817.
- McGuire M.R, and B.S. Shasha. 1995. Starch encapsulation of microbial pesticides. *Biorational Pest Control Agents, Formulation and Delivery*, ACS Symposium 596. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 229-237.
- Miller, L.K., A.J. Lingg, L.A. Bulla, Jr. 1983. Bacterial, viral, and fungal insecticides. *Science.* **219**: 715-721.
- Moore, D., R.P. Bateman, M. Carey, and C. Prior. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontr. Sci. Technol.* **5**: 193-199.

- Moore, D., J. Langewald and F. Obognon. 1997. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycoinsecticide formulations. *Biocontr. Sci. Technol.* **7**: 87-94.
- Nankinga, C.M., and D. Moore. 2000. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontr. Sci. Technol.* **10**: 645-657.
- Olson, D.L., and R.D. Oetting. 1999. The efficacy of mycoinsecticides of *Beauveria bassiana* against silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on poinsettia. *J. Agric. Urban Entomol.* **16**: 179-185.
- Osborne, L.S., and Z. Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla. Entomol.* **75**: 456-471.
- Osborne, L.S., and Z. Landa. 1994. Utilization of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Bulletin of the International Organization of Biological Control. Western Palearctic Regional Section.* **17**: 201-206.
- Pacheco, C.J.J. y F.M. Pacheco. 1998. Temas selectos para el manejo integrado de la mosquita blanca. INIFAP. *Memorias Científicas* N° 6. ISSN 1405-373X. pp. 1-155.
- Pendland, J.C., S.Y. Hung, and D.G. Boucias. 1993. Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cell of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J. Bacteriol.* **175**: 5962-5969.
- Pereira, R.M., and D.W. Roberts. 1990. Dry Mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **56**: 39-46.

- Pereira, R.M., and D.W. Roberts. 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.* **84**: 1657-1661.
- Poprawski, T.J. J.C. Legaspi, and P.E. Parker. 1998. Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* **27**: 785-795.
- Prenerová, E. 1995. Accelerated germination by aeration: a novel method of preparation of germinated blastospores of *Paecilomyces farinosus* for practical application. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 225-229.
- Prior, C., P. Jollands, and G. le Patourel. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 66-72.
- Primo, Y.E., y J.M. Carrasco. 1977. *Química agrícola II, plaguicidas y fitoreguladores*. Ed. Alhambra S.A. Madrid, España. pp. 1-637.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of biological control agents. In *Exploitation of Microorganisms*. D.G. Jones Published. Chapman and Hall, London. pp. 413-439.
- Roberts, D.W. and A.E. Hajek. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In G. Leatham, ed., *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman and Hall, New York. pp. 228
- Rodríguez-Rueda, D., and J. Fargues. 1980. Pathogenicity of entomopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumoso-roseus* and *Nomuraea rileyi*, to eggs of noctuids, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* **36**: 399-408.

- Salas, J., and O. Mendoza. 1995. Biology of the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. Fla. Entomol. 78: 154-159.
- Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Largé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Ed. Springer-Verlag. pp.1-172.
- Samširiáková, A., S. Kálalová, V. Vlček and J. Kybal. 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. J. Invertebr. Pathol. 38: 169-174.
- Samširiáková, A., S. Misikova, and J. Leopold. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). J. Invertebr. Pathol. 18: 322-330.
- Sánchez, M., T.E. Méndez, and O. Almazán. 1993. Comportamiento de un biopreparado en polvo de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) durante el almacenamiento. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 35: 59-63.
- Shah, P.A., M. Aebi, and U. Tuor. 1999. Production factors involved in the formulation of *Erynia neoaphidis* as alginate granules. Biocontr. Sci. Technol. 9: 19-28.
- Shimizu, S., Y. Tsuchitani, and T. Matsumoto. 1993. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. J. Invertebr. Pathol. 61: 192-195.
- Sieburth, P.J., W.J. Scheoeder, and R.T. Mayer. 1998. Effects of oil and oil-surfactant combinations on silverleaf whitefly nymphs (Homoptera: Aleyroididae) on collards. Fla. Entomol. 81: 446-450.
- Silman, R.W., R.J. Bothast, and D.A. Schisler. 1993. production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy. Biotech. Adv. 11: 561-575.

- Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information*. **14**: 71-77.
- Smith, R.J., and E.A. Grula. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 319-326.
- Soper, R.S., and M.G. Ward. 1981. Production, formulation and application of fungi for insect control. In "Biological Control in Crop production, BARC Symposium No. 5" (G.C. Papavizas Ed), pp. 161-180, Allanheld, Asmun, Montclair, New Jersey.
- St. Leger, R.J., R.M. Cooper, and A. K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr. Pathol.* **47**: 167-177.
- St. Leger, R.J., A. K. Charnley, and R.M. Cooper. 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the APIZYM sistem. *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 375-376.
- St. Leger, R.J., A. K. Charnley, and R.M. Cooper. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 85-95.
- St. Leger, R.J., R.M. Cooper, and A. K. Charnley. 1991. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**: 415-426.
- St. Leger, R.J., L. Joshi, M.J. Bidochka, and D.W. Roberts. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6349-6354.
- St. Leger, R.J., L. Joshi, M.J. Bidochka, N.W. Rizzo, and D.W. Roberts. 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1257-1264.

- St. Leger, R.J., L. Joshi, and D.W. Roberts. 1997. Adaption of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*. **143**: 183-192.
- Stansly, P.A., D.J. Schuster, and T.X. Liu. 1997. Apparent parasitism of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) by aphelinidae (Hymenoptera) on vegetable crops and associated weeds in south Florida. *Biol. Control*. **9**: 49-57.
- Stathers, T.E., D. Moore, and C. Prior. 1993. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 11-115.
- Steenberg, T., and R.A. Humber. 1999. Entomopathogenic potencial of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 309-314.
- Stevens III, T.J., R.L. Kilmer, and S.J. Glenn. 2000. An economic comparison of biological and conventional control strategies for whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouse poinsettias. *J. Econ. Entomol.* **93**: 623-629.
- Stirling, G.R., K.A. Licastro, L.M. West, and L.J. Smith. 1998. Development of commercially acceptable formulations of the nematophagous fungus *Verticillium Chlamydosporium*. *Biol. Control*. **11**: 217-223.
- Thomas, K.C., G.G. Khachatourians, and W.M. Ingledew. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **33**: 12-20.
- Tsai, J.H., and K. Wang. 1996. Development and reproduction of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on five host plants. *Environ. Entomol.* **25**: 810-816.

- Valenzuela, L.E. 1987. Microorganismos entomopatógenos: Su aprovechamiento en el control de insectos plaga. Universidad Autónoma de chapingo. pp. 1-119.
- Vandenberg, J.D., M.A. Jackson, and L.A. Lacey. 1998. Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the russian wheat aphid. J. Invertebr. Pathol. **72**: 181-183.
- Vega, F.E., M.A. Jackson, and M.R. McGuire. 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Mycopathologia. **147**: 33-35.
- Vey, A., and J. Fargues. 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria basiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. J. Invertebr. Pathol. **30**: 207-215.
- Vidal, C., J. Fargues, and L.A. Lacey. 1997. Intraespecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*. Effect of temperature on vegetative growth. J. Invertebr. Pathol. **70**: 18-26.
- Vidal, C., L.A. Lacey, and J. Fargues. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Alyrodidae) with a description of a bioassay method. Journal of Economic Entomology. **90**: 765-772.
- Vidal, C., L.S. Osborne, L.A. Lacey, and J. Fargues. 1998. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. Biol. Control. **12**: 191-199.
- Vidal, C., J. Fargues, L.A. Lacey, and M.A. Jackson. 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic

- activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*. **143**: 33-46.
- Vilcinskis A., and M. Wedde. 1997. Inhibition of *Beauveria bassiana* proteases and fungal development by inducible protease inhibitors in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Biocontrol Sciences and Technology*. **7**: 591-601.
- Walker, H.L., and W.J. Connick, Jr., 1983. Sodium alginate for production and formulation of Mycoherbicides. *Weed Science*. **31**: 333-338.
- Womack, J.G., and M.N. Burge. 1993. Mycoherbicide formulation and the potential for bracken control. *Pestic. Sci*. **37**: 337-341.
- Womack, J.G., G.M. Eccleston, and M.N. Burge. 1996. A vegetable oil-based invert emulsion for mycoherbicide delivery. *Biol. Control*. **6**: 23-28.
- Wright, S.P. and D. W. Roberts. 1987. Insect control efforts with fungi. *Developments in Microbiology*. **28**: 77- 87.
- Wright, S.P., R.L. Carruthers, C.A. Bradley, S.T. Jaronski, L.A. Lacey, P. Wood, and S. Galaini-Wright. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. And *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol*. **71**: 217-226.
- Wright, J.E..1993. Control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) with naturalis-L: mycoinsecticide. *J. Econ. Entomol*. **86**: 1355-1358.
- Wright, S.P., R.I. Carruthers, S.T. Jaronski, C.A. Bradley, C.J. Garza, and S. Galaini-Wright. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control*. **17**: 203-217.

Yee, W.L., C. N. Toscano, J. C. Palumbo, M. J. Blua, and H. A. Yoshida. 1997.
Seasonal population trends of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on
alfafa in southern California and Arizona. *Environ. Entomol.* **26**: 241-249.



DONATIVO

