



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Efecto de condiciones de cultivo, aceites y dispersantes en la viabilidad y virulencia de conidios de *Paecilomyces fumosoroseus*, patógeno de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

DAVID HUMBERTO BASILIO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MEXICO, D.F.

JUNIO DE 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Durante la realización de esta tesis, el alumno contó con una beca del CONACYT derivada del megaproyecto de investigación “Caracterización genotípica y fenotípica de hongos entomopatógenos: instrumentos para optimizar su selección como insecticidas biológicos contra plagas agrícolas”.

Clave G-31451-B.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Conchita Toriello, por las enseñanzas, y el apoyo brindado, pero sobre todo por la enorme paciencia hacia mi persona. Gracias por todo.

A los miembros de mi comité tutorial, por las sugerencias y atinados comentarios vertidos hacia este trabajo:

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Al Dr. Víctor Hernández, por las observaciones tan atinadas, así como por el apoyo, pero sobre todo por el interés hacia este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor, por las recomendaciones, y la rápida revisión de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Aranda, por el material biológico para la realización de los bioensayos de virulencia y el apoyo brindado.

A la M. en C. Angélica Berlanga del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico, SAGARPA, de Tecomán, Colima, por los aislados originales del hongo.

Al personal del Laboratorio de Micología Básica, por el apoyo brindado, y sobre todo por dejarme formar parte de tan agradable grupo de trabajo, a Hortensia Navarro y Amelia Pérez, por su amistad y apoyo incondicional, la preocupación hacia mi persona y los momentos inolvidables, Israel, Alfonso e Iliria, por perfilarse como buenos amigos.

También al personal que de una u otra manera formó parte de este laboratorio, y que la amistad perdurara por siempre, a Claudia Cano, Gina Cavallazzi, Lupita Olivares y Fabiola Vega. A las sras. Rosalía, Carmen, y Angélica.

## DEDICATORIA

A la familia Basilio Hernández, Manuel y Carmen, por ser los capitanes que guían el barco a buen puerto siempre, por darme la vida y por estar siempre en el lugar preciso, en el momento exacto. A Luis, Elisa, Marco y Susana, por remar hombro con hombro, juntos, hoy y siempre, y saber que cuento con ustedes, a Yarely y Ana, nuevas tripulantes, ojala siempre naveguemos juntos y en la misma dirección, Edith Flores por los momentos tan divertidos y endulzar los ratos amargos. A Facundo Hernández, por el apoyo otorgado desde algún lugar del infinito, y por el ejemplo heredado.

A Norma Alicia Gutiérrez Medina, gracias por llegar a mi vida, por apoyarme y comprenderme, por permanecer a mi lado, por regalarme tu tiempo para que la tesis saliera adelante, por aburrirte en el laboratorio mientras me esperabas, gracias por ser la luz que ilumina los oscuros caminos que a veces debo sortear. Ni millones de palabras podrían expresar todo lo que siento por ti, pero creo que dos lo podrían resumir: Te amo.

A la familia Gutiérrez Medina por aceptarme.

A los amigos, que siempre están en las buenas, pero sobre todo por estar en las malas. A Horte y Ame por ser las mejores compañeras que cualquiera puede tener, a María Ramos, por estar hoy y siempre. A Rafael López, Lety Ramírez, José Luis Mejía, Rocío Rojas, por que a pesar de los años, seguimos siendo el 3D. A Fernando Malvaez Sir Galahad por compañero y amigo, por las desveladas, el apoyo brindado y por piromaniaco. A Roberto Suárez, Cris Canteros y Jorge Sahaza gracias por todo. A Miguel Ayala por el apoyo y la amistad, a Judith Castellanos por ser un ejemplo. A Luisa Escobar, por la amistad sincera. A los que mi memoria a veces puede olvidar, pero mi corazón jamás lo hará.

Especialmente a Elena Montoya y Patricia Jiménez por ser como son, por los años de amistad y los momentos tan gratos que hemos compartido. Gracias, las quiero mucho.

A Daniel Villamil y Rafael García por saber ser amigos. A Víctor López y Susy Grimaldo, por ser tan divertidos.

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**1. INTRODUCCIÓN**

**2. ANTECEDENTES**

**3. JUSTIFICACIÓN**

**4. HIPÓTESIS**

**5. OBJETIVOS**

**5.1. OBJETIVO GENERAL**

**5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

**6. MATERIAL Y MÉTODOS**

**6.1. MATERIAL FÚNGICO**

**6.2. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Paecilomyces fumosoroseus***

**6.3. OBTENCIÓN DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* SIN TRATAMIENTO DE GLICEROL**

**6.4. OBTENCIÓN DE CONIDIOS CON TRATAMIENTO**

**6.5. FORMULANTES SELECCIONADOS**

**6.6. EFECTO DE FORMULANTES EN CONIDIOS DE *P. fumosoroseus*, PRUEBA DE VIABILIDAD DE CONIDIOS**

**6.7. CONTENIDO DE HUMEDAD (CH) DE LOS CONIDIOS**

**6.8. DISMINUCIÓN DEL CH DE LOS CONIDIOS**

**6.9. VIRULENCIA, ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO**

**6.10. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE  
CONSERVACIÓN (TIEMPO DE ANAQUEL) DE  
LOS CONIDIOS DE *P. fumosoroseus***

**6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**7. RESULTADOS**

**7.1. PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE CONIDIOS DE  
*Paecilomyces fumosoroseus* SIN TRATAMIENTO**

**7.2. OBTENCIÓN DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus*  
CON TRATAMIENTO**

**7.3. FORMULANTES SELECCIONADOS**

**7.4. EFECTO DE FORMULANTES EN LA VIABILIDAD  
DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* SIN Y CON  
TRATAMIENTO**

**7.5. CONTENIDO DE HUMEDAD DE LOS CONIDIOS**

**7.6. DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD  
(CH) DE LOS CONIDIOS DE *P. fumosoroseus***

**7.7. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE  
CONSERVACIÓN (TIEMPO DE ANAQUEL) DE  
LOS CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* CON  
BAJO CH POR LA VIABILIDAD DE CONIDIOS**

**7.8. VIRULENCIA EN *Bemisia tabaci* DE LOS  
CONIDIOS FORMULADOS**

**7.8.1. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO**

**7.8.2. VIRULENCIA INICIAL Y A LOS TRES MESES  
DE CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS  
EH-506/3 Y EH-511/3 DE *P. fumosoroseus***

**8. DISCUSIÓN**

**9. CONCLUSIONES**

**10. BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
I. Viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> formulados en Tween 80 al 1 %.	56
II. Viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> formulados en Traspore al 1 %.	56
III. Viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> formulados en Acemin-E al 1 %.	57
IV. Viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> formulados en citrolina.	57
V. Viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> formulados en aceite de maíz.	58
VI. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 sin tratamiento de glicerol.	59
VII. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 con tratamiento de glicerol.	60
VIII. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-511/3 sin tratamiento de glicerol.	61
IX. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-511/3 con tratamiento de glicerol.	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Comparación de la producción de conidios de los dos aislados de <i>P. fumosoroseus</i> estudiados.	19
2. Tipo de agentes formulantes seleccionados.	20
3. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 sin y con tratamiento de glicerol, en diferentes formulantes.	22
4. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 en Tween 80 al 1 %.	23
5. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 en Traspore al 1 %.	25
6. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 en Acemin-E al 1 %.	26
7. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 en citrolina.	28
8. Porcentaje de viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 y EH-511/3 en aceite de maíz.	30
9. Contenido de humedad (CH) inicial de los conidios de ambos aislados, sin y con tratamiento de glicerol.	30
10. Contenido de humedad (CH) final de los conidios sin y con tratamiento de glicerol a las 72 h.	31
11. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios con bajo contenido de humedad de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3.	32
12. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios con bajo contenido de humedad de <i>P. fumosoroseus</i> EH-511/3.	34
13. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-506/3 sin tratamiento de glicerol.	36
14. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-506/3 con tratamiento de glicerol.	37
15. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-511/3 sin tratamiento de glicerol.	39
16. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-511/3 con tratamiento de glicerol.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> . a) aspecto general de la colonia; b) conidióforos erectos agrupados en fiálides ensanchadas en las bases ; c) conidios catenulados, cilíndricos o fusiformes.	2
2. Mecanismo de infección de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> . Modificado de Clarkson y Charnley (1996).	3
3. Ciclo de vida de la mosquita blanca <i>Bemisia tabaci</i> . Se muestran los estadios de desarrollo del insecto.	4
4. Adultos de mosquita blanca. a) <i>Bemisia tabaci</i> ; b) <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , adulto cubierto por un polvo de apariencia harinosa, característica que da nombre a la familia.	5
5. Esquema general de trabajo.	12
6. Aspecto de las bolsas con el sustrato de arroz cubierto de <i>P. fumosoroseus</i> EH-511/6.	18
7. Comparación del crecimiento fúngico en bolsas de arroz sin y con tratamiento de glicerol. A) Las bolsas de la izquierda no tienen glicerol, mientras que las de la derecha si tienen el tratamiento y no se observa crecimiento fúngico. B) Acercamiento de una bolsa con arroz con tratamiento.	20
8. Conidio viable de <i>P. fumosoroseus</i> , EH-511/3 a las 8 horas de incubación en medio APD a 27 °C, con tubo germinal mayor al conidio. 100 X.	21
9. Efecto del Tween 80 al 1 % en la viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> .	23
10. Efecto del Traspore al 1 % en la viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> .	25
11. Efecto del Acemin-E al 1 % en la viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> .	26
12. Efecto de la citrolina en la viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> .	28
13. Efecto del aceite de maíz en la viabilidad de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> .	29
14. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios de <i>P. fumosoroseus</i> EH-506/3 con bajo contenido de humedad.	32

15. Viabilidad inicial y al tercer mes de conidios *P. fumosoroseus* EH-511/3 con bajo contenido de humedad de. 34
16. Aspecto del aerógrafo utilizado para simular una aspersión en campo agrícola. 35

## RESUMEN

Para que un agente de control biológico sea utilizado a gran escala, se deben realizar pruebas que validen su efectividad contra la plaga, la seguridad en otros organismos no blanco, una adecuada formulación del producto, y un tiempo de anaquel razonable del producto terminado. En el presente trabajo se evaluaron dos aislados (EH-506/3 y EH-511/3) de *Paecilomyces fumosoroseus*, agente fúngico utilizado en el control biológico de la plaga de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Se comparó la productividad conidial por gramo de sustrato (arroz); el efecto de diferentes formulantes (aceites y acuosos) sobre la viabilidad de los conidios por el método del tubo germinal, desde 24 h hasta 5 meses. Se ensayó un tratamiento de glicerol como preservador de los conidios; se disminuyó su contenido de humedad (CH) y se determinó el tiempo de conservación de los conidios con bajo CH, almacenados a 4 y 28 °C. También se ensayó la virulencia del hongo por el tiempo letal medio (TLM) en la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) al inicio y a los tres meses de almacenamiento. Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ), la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey, y en su caso por la t de Student. El TLM se calculó por análisis Probit. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) en la producción de conidios por g de arroz entre aislados (EH-506/3 =  $0.91 \times 10^9$ ; EH-511/3 =  $7.52 \times 10^9$  conidios/g de arroz). A las 120 h no hubo efecto adverso en la viabilidad de los conidios formulados en los 5 agentes seleccionados (acuoso: Tween 80 al 1%, Traspore; aceites: Acemin-E, citrolina y aceite de maíz) en ambos aislados. A los 5 meses la viabilidad conidial disminuyó en Tween 80, Traspore y Acemin-E a valores promedio de 50-60%, mientras que en citrolina y aceite de maíz, disminuyó aproximadamente al 20%, independientemente del tratamiento de glicerol y la temperatura de almacenamiento (4 y 28 °C). El CH de los conidios disminuyó a 8 % después de 72 h en el horno de secado al vacío. La viabilidad de los conidios disminuyó independientemente del tratamiento con glicerol, bajo CH, y almacenamiento a 4 y 28 °C. Los conidios de ambos aislados sin tratamiento de glicerol mostraron la mayor virulencia cuando se formularon con

aceite de maíz; y los conidios con tratamiento cuando se formularon con Acemin-E. El tratamiento de los conidios con glicerol no mejoró la viabilidad fúngica durante el almacenamiento en ambas temperaturas. Los resultados sugieren la formulación de los conidios en formulantes de aceite de 1 a 5 días antes de su aplicación en el campo.

## ABSTRACT

For a biological control agent to be used at a large scale, tests must be performed to validate its effectiveness against pests, its safety for other non-targeted organisms, an adequate formulation of the product, and a reasonable shelf-life of the finished product. In the present work, we assessed two isolates (EH-506/3 and EH-511/3) of *Paecilomyces fumosoroseus*, a fungal agent used for the biological control of the whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). We compared conidial productivity per gram of substrate (rice); the effect of different vehicles (oils and aqueous) on the viability of conidia by means of the germinal tube method, from 24 h to 5 months. We tested glycerol treatment as a conidia preservative; decreased the moisture content (MC), and determined the time of conidia conservation with low MC, stored at 4 and 28 °C. We also assessed the fungus virulence by means of the median lethal time (MLT) in the whitefly (*Bemisia tabaci*) at the start and at three months of storage. Data were analyzed through ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ), Tukey's multiple comparison test, and, when appropriate, Student's t test. MLT was calculated through Probit analysis. Significant differences ( $P < 0.01$ ) were found in the production of conidia per gram of rice between isolates (EH-506/3 =  $0.91 \times 10^9$ ; EH-511/3 =  $7.52 \times 10^9$  conidia/g of rice). At 120 h no adverse effect was observed on the viability of conidia formulated in the five chosen vehicles (aqueous: 1% Tween 80, Traspore; oils: Acemin-E, citroline, and corn oil) with both isolates. At 5 months, conidial viability decreased in Tween 80, Traspore, and Acemin-E to average values of 50-60%, whereas in citroline and corn oil, it decreased approximately to 20%, independently from the glycerol treatment and the storage temperature (4 and 28 °C). MC of conidia decreased to 8% after 72 h in the vacuum drier oven. Viability of conidia decreased independently from the treatment with or without glycerol, low MC, and storage temperature (4 and 28 °C). Conidia from both isolates without glycerol treatment showed the highest virulence when formulated with corn oil, whereas conidia treated with glycerol showed the highest virulence when formulated with Acemin-E. Glycerol treatment of conidia did not

improve the fungal viability during storage at either temperature. Results suggest oil formulation for conidia, 1 to 5 days before their field application.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas de origen químico en el campo agrícola ha llegado a ocasionar problemas severos de contaminación, los cuales afectan la salud humana directa o indirectamente, así como daños considerables al medio ambiente. Otra consecuencia del uso intensivo de insecticidas químicos es que los insectos considerados como plaga desarrollan resistencia a dichos productos, así como también, se causa daño a otros organismos benéficos para el ser humano.

El control biológico ofrece una alternativa para frenar el daño causado por el abuso de insecticidas químicos, utilizando hongos entomopatógenos como agentes microbianos, los cuales han demostrado ser en los últimos años una opción ecológicamente aceptable.

Entre las especies más usadas para el control biológico de plagas se encuentran las especies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. (Clarkson y Charnley, 1996).

Existen actualmente productos registrados cuyo ingrediente activo son esporas de hongos entomopatógenos, ya sea conidios aéreos o propágulos obtenidos de cultivos sumergidos (Wraight, *et al.*, 2001).

El hongo *Paecilomyces fumosoroseus* (Figura 1) es un patógeno común de insectos y ha demostrado excelentes resultados como micoinsecticida contra la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) (Osborne y Landa, 1992). Este hongo es considerado mitospórico, puesto que no se le conoce estado sexual, aunque posee las características de pared celular, bioquímicas y genéticas de un ascomiceto. Presenta colonias generalmente de crecimiento lento (4 cm en 14 días a 25°C en medio agar extracto de malta), con pequeñas acumulaciones en las colonias que van de un color blanco, pasando por tonalidades crema, hasta llegar a verse rosa o gris (Figura 1a). Produce grupos de conidióforos erectos agrupados en fiálides ensanchadas en las bases (Figura 1b), y los conidios, catenulados, son de cilíndricos a fusiformes y de dimensiones aproximadas de 3 x 1 µm (Domsch *et al.*, 1980) (Figura 1c).

El mecanismo de infección de este hongo sigue un proceso similar al de otros entomopatógenos, el cual consiste en la adhesión, penetración, proliferación y salida del hongo ya muerto el insecto (Figura 2). Una vez que el conidio se adhiere a la superficie cuticular del insecto, este germina y forma estructuras denominadas apresorios, las cuales permiten la penetración por medio de acciones combinadas de enzimas, principalmente proteasas y quitinasas, así como presión mecánica. Cuando el hongo llega al hemocele del insecto, produce propágulos fúngicos denominados blastosporas. El insecto muere por resultado de diferentes factores, entre ellos, la producción de toxinas fúngicas además de la colonización de los tejidos. El desarrollo del hongo obstruye la circulación de la hemolinfa, ocasiona pérdida de nutrientes e invasión de diferentes órganos. Después de la muerte del insecto, las hifas pueden salir del cadáver y producir conidios, y si las condiciones ambientales son adecuadas, estos pueden repetir el ciclo infectivo en otros insectos (Charnley y St. Leger, 1991; Clarkson y Charnley, 1996; Inglis *et al.*, 1997).

Debido a la capacidad de causar epizootias en diferentes regiones del mundo (Osborne y Landa, 1992), este hongo ha sido estudiado y se han desarrollado trabajos que ponen en evidencia su capacidad para ser utilizado como un prometedor agente microbiano para el control de diversos insectos plaga, entre ellos, la mosquita blanca (Jackson *et al.*, 1997).

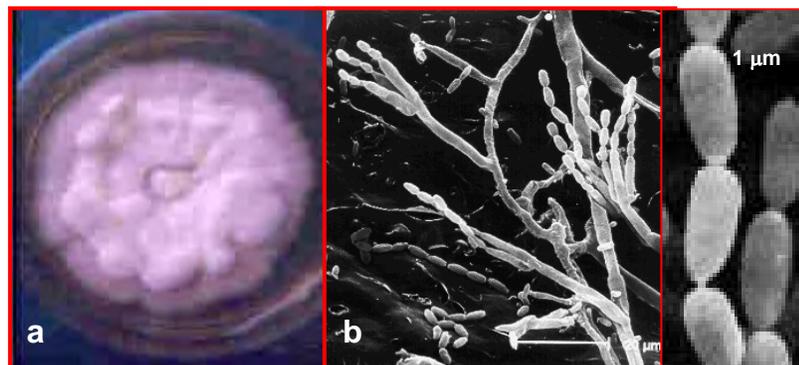


Fig. 1. *Paecilomyces fumosoroseus*. a) aspecto general de la colonia; b) conidióforos erectos agrupados en fialides ensanchadas en las bases ; c) conidios catenulados, cilíndricos o fusiformes. Imágenes: acervo del Laboratorio de Micología Básica, UNAM.

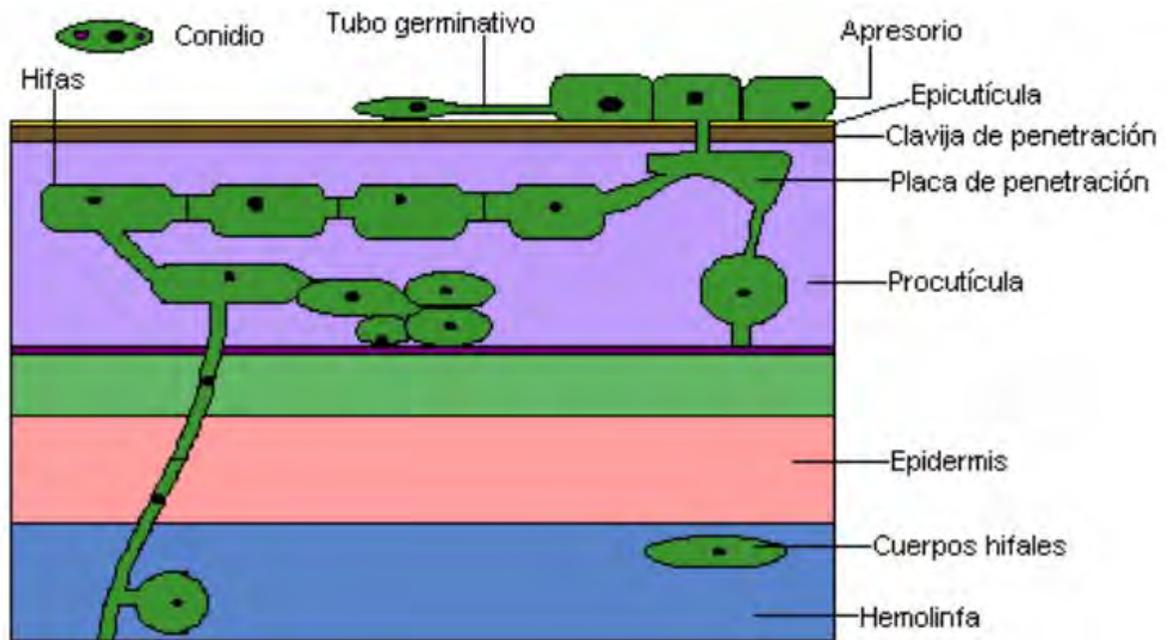


Fig. 2. Mecanismo de infección de *Paecilomyces fumosoroseus*. Modificado de Clarkson y Charnley (1996).

La mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) es una plaga polífaga que llega a causar severos daños de gran impacto económico en el campo agrícola. Se han descrito alrededor de 1200 especies agrupadas en 126 géneros alrededor de todo el mundo (Byrne, 1991; Ortega, 1991).

El ciclo de vida corto de este insecto, acompañado de la capacidad de reproducción por partenogénesis, explica el rápido crecimiento poblacional, por lo que la presencia de dicha plaga en zonas en donde no se encuentra con sus enemigos naturales representa un alto riesgo fitosanitario. La presencia de enemigos naturales endémicos mantienen regulados los niveles poblacionales por debajo del umbral de daño económico (Robles, 2002).

El ciclo de vida de este insecto (Figura 3) incluye una etapa de huevecillo y la etapa de ninfa, que a su vez se subdivide en 4 estadios. Cada estadio tiene una duración que varía de 5 a 6 días para el primero, 2 a 4 días para el segundo y de 4 a 6 días para el tercero. El cuarto estadio, llamado pupa, dura aproximadamente de 6 a 10 horas, de donde emerge el adulto que mide de 2 a 3 mm (Rodríguez, 1993).

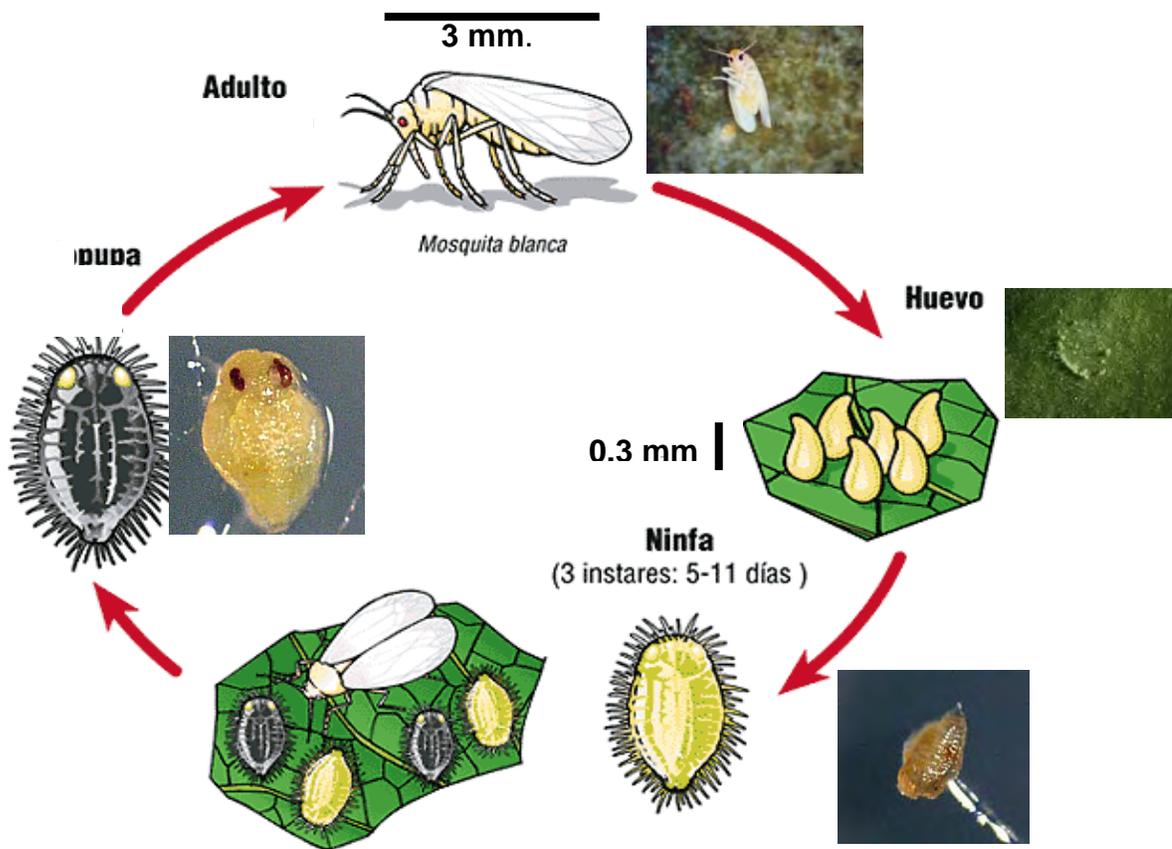


Fig. 3. Ciclo de vida de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. Se muestran los estadios de desarrollo del insecto (Ilustración tomada de [www.bayercropscience.com](http://www.bayercropscience.com); imágenes: acervo fotográfico del Laboratorio de Micología Básica, UNAM).

Los adultos (Figura 4) de ambos sexos están cubiertos por un polvo seroso, blanquecino, de apariencia harinosa, característica que da nombre a la familia (Aleyron = harina) (Figura 4b). Las patas tienen tarsos de 2 segmentos y antenas de siete; el macho posee un par de apéndices al final del abdomen y en la hembra dichos apéndices son menos prominentes (Rodríguez, 1993).

Las dos especies de mayor impacto en México son:

- *Bemisia tabaci* o *Bemisia argentifolii* (Figura 4a)
- *Trialeurodes vaporariorum* (Figura 4b)



Figura 4. Adultos de mosquita blanca. a) *Bemisia tabaci*; b) *Trialeurodes vaporariorum*, adulto cubierto por un polvo de apariencia harinosa, característica que da nombre a la familia.

Esta plaga afecta diferentes tipos de cultivos, entre otros, frijol, tabaco, tomate, algodón, chile, calabaza y muchos otros cultivos, incluidos plantas de ornato producidas en invernadero, tales como flor de nochebuena y flor de aretillo (*Fucsia* sp.), entre otras (Sánchez *et al.*, 1997).

El daño de esta plaga no solo es el causado por la alimentación del insecto mediante la succión de savia de las hojas del hospedero, sino porque es un vector de enfermedades, principalmente de tipo viral (geminivirus) que afectan cultivos de gran importancia económica. Además de que producen sustancias denominadas fumaginas, las cuales promueven el desarrollo de hongos fitopatógenos, los cuales afectan el desarrollo de la planta (Yañez, 1990; Ramírez, 1996).

Para que se incremente la utilización de los bioinsecticidas en el control biológico de plagas, se deben considerar diferentes puntos. Entre ellos, y de fundamental relevancia, es el de desarrollar una formulación del hongo en un vehículo adecuado, el cual debe ser compatible con la tecnología disponible para la aplicación del micoinsecticida en el campo agrícola. Los agentes microbianos deben ser seguros al ambiente y que no sean peligrosos al ser humano y a otros seres vivos.

Las formulaciones hechas en aceites permiten obtener formulaciones de ultra bajo volumen, las cuales permiten aplicar altas concentraciones del hongo en poco volumen (Lomer, *et al.*, 2001). Además, para la producción de un

micoïnsecticida efectivo, se deben tomar en cuenta aspectos como: tiempo de anaquel del producto terminado, esto es, la viabilidad de las esporas en el formulado, así como el efecto del tiempo de conservación sobre la virulencia del agente microbiano.

## 2. ANTECEDENTES

El control biológico de plagas usando hongos entomopatógenos se ha utilizado por más de 100 años, pero es en los últimos cuando se han desarrollado actividades que conlleven a su desarrollo a gran escala y nivel comercial.

En el mundo, se han llevado a cabo programas para el combate de la mosquita blanca. Desde 1971 se usa *Verticillium lecanii* para combatir esta plaga, para la década de los 80's se incrementa el número de patógenos para el combate de la plaga, entre ellos, *B. bassiana*, *V. lecanii* y *P. fumosoroseus* (Robles, 2002).

En México, el control biológico de la mosquita blanca solo se ha desarrollado a nivel de pruebas de laboratorio o en campos experimentales, sugiriendo su uso como un buen agente de control biológico. Así mismo se establece que la mejor opción para combatir la plaga con entomopatógenos es aplicando el agente durante los estadios ninfales. Datos obtenidos en estos experimentos sugieren a *P. fumosoroseus* como una opción viable para el combate de la plaga (Ruiz *et al*, 1995; Pineda y Alatorre-Rosas, 1995).

Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez (1995) estudiaron la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* al ser almacenados en un polvo humectable (bentonita, diatomita y mezcla entre ambas), y determinaron que la viabilidad en el polvo es superior a la viabilidad de conidios conservados en el arroz donde fueron almacenados a bajas temperaturas (0 y 7 °C), mientras que a temperatura ambiente, la viabilidad disminuyó considerablemente.

A pesar de estos resultados, no se han desarrollado estudios más profundos que permitan obtener una formulación óptima del hongo. Sin embargo, en México se reporta la existencia de un formulado comercial de *P. fumosoroseus* como polvo humectable, y en el cual el principio activo son conidios del hongo. El nombre comercial es Pae-Sin®, de Agrobionsa (Wraight *et al*, 2001).

Un paso de crucial importancia para el desarrollo de formulaciones de micoplaguicidas, fue el descubrir que los conidios formulados en aceites mejoran su eficacia y aumentan la velocidad en que matan al insecto en comparación con formulados realizados a base de agua (Prior y Greathead, 1989).

Se reconocen tres requerimientos para la producción a gran escala y uso exitoso de hongos como agentes de biocontrol contra plagas: primero, el hongo seleccionado debe ser de rápido crecimiento, abundante esporulación y alta virulencia sobre la plaga. En segundo lugar, los costos de producción deben ser lo más bajos posibles, y el tercer punto es que el producto debe ser convenientemente formulado para su almacenamiento por largo tiempo bajo condiciones naturales, sin pérdidas significativas de su eficiencia como biocontrolador (Hernández Velázquez, 2001).

Una de las principales desventajas de los hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano es el efecto negativo de las condiciones ambientales sobre su germinación y estabilidad en el campo, esto puede ser reducido favorablemente formulando la unidad infectiva adecuadamente (Moore *et al.*, 1995).

Las formulaciones básicas de entomopatógenos comprenden: líquidos (suspensiones acuosas o emulsificables), polvos humectables, cebos y granulados (Hernández Velázquez, 2001).

Debido a la condición lipofílica de los conidios de la mayoría de los entomopatógenos, estos pueden ser fácilmente suspendidos en aceites (Bateman, 1992). La mezcla resultante de aceite, esporas y agua forma una suspensión emulsificable. Los aceites son preferidos en formulaciones para ultrabajo volumen, ya que minimizan la evaporación del acarreador líquido, facilitan la adhesión y dispersión de los conidios en la cutícula del insecto, favoreciendo que penetren al interior del mismo (Prior *et al.*, 1988).

En México, se han evaluado formulados de *M. anisopliae* en citrolina y otros aceites vegetales y minerales para uso experimental contra langosta, *Schistocerca piceifrons*, mostrando mayor mortalidad en comparación con formulados en agua (Hernández Velázquez, 2001).

Este trabajo tiene como objetivo probar aceites y dispersantes que se puedan conseguir en México y llevar a cabo formulaciones con conidios de *P. fumosoroseus* que tengan un tiempo de anaquel razonable y sigan siendo virulentos contra la mosquita blanca.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

*Paecilomyces fumosoroseus* ofrece una opción al uso indiscriminado de productos químicos para el control de la mosquita blanca, lo cual contribuiría a detener el deterioro ambiental por agroquímicos. Sin embargo, hacen falta estudios de una formulación óptima que pueda ser comercializada y sea efectiva en el campo y así contribuir a que su uso se extienda y sea posible integrar a este agente de control biológico en un plan de manejo integrado de plagas. Este trabajo se enfocará a obtener una formulación de *Paecilomyces fumosoroseus* con ingredientes disponibles en México para su posterior aplicación en el campo.

#### **4. HIPÓTESIS**

El bajo contenido de humedad y el tratamiento con glicerol de los conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* prolongarán su viabilidad sin alterar su virulencia.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Obtener una formulación óptima de *Paecilomyces fumosoroseus* con tiempo de anaquel prolongado y alta efectividad biológica contra el insecto.

##### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el tiempo de conservación de los conidios de *P. fumosoroseus* en dos condiciones: cultivo tradicional y cultivo con un tratamiento previo adicionando glicerol, a un contenido de humedad bajo, menor al 10 %.
- Determinar la virulencia de los conidios obtenidos, en el modelo experimental de mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) mediante el porcentaje de mortalidad acumulado, y el tiempo letal medio (TLM).
- Determinar el tiempo de conservación de conidios obtenidos tradicionalmente y con glicerol a dos temperaturas (ambiente y refrigeración)
- Determinar el efecto de dispersantes, aceites vegetales y minerales sobre la viabilidad de los conidios. a dos temperaturas (refrigeración y temperatura ambiente).
- Determinar la virulencia de los conidios sin y con tratamiento, con bajo CH y almacenados a 4 y 28 °C.
- Someter los resultados a un análisis estadístico.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Material fúngico**

En este estudio se trabajó con los cultivos monospóricos EH-506/3 y EH-511/3, derivados de los aislados originales (PFCAM y AMBAS2 respectivamente), de la mosquita blanca, de la colección del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, México. Se escogieron estos aislados debido a que el primero mostró una alta virulencia y el segundo por ser también altamente virulento y un gran productor de conidios (Cavallazzi-Vargas, 2002; Castellanos-Moguel, 2002). Los aislados están conservados en la colección del Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. El esquema general de trabajo se muestra en la Figura 5.

### **6.2. Producción de conidios de *Paecilomyces fumosoroseus***

La producción de los conidios se realizó según la metodología propuesta por Jenkins *et al.* (1998) con algunas modificaciones, en un sistema difásico; primero con la producción de micelio en medio líquido y posteriormente una conidiación aérea en un sustrato sólido (arroz esterilizado).

La fase micelial se obtuvo de la inoculación de 1 ml de una suspensión de  $6 \times 10^6$  conidios/ml en matraces Erlenmeyer con 200 ml de medio nutritivo con extracto de levadura (20 g/l) y azúcar no refinada (20 g/l) esterilizado y adicionado de 50 g de perlas de vidrio para limitar la formación de pellets. Los matraces inoculados fueron incubados durante 3 días a 28 °C en agitación a 100 rpm.

Para la siguiente fase, a cada matraz se le agregaron 100 ml de agua destilada estéril. La conidiación aérea se realizó en bolsas de polipapel de 24 X 32 cm con 300 g de arroz procesado de la siguiente manera; diferentes enjuagues de solución de hipoclorito al 10% durante 10 min, agua hirviendo durante 1 min, y nuevamente de hipoclorito 1% durante 10 min. Después de este último enjuague, el arroz se escurrió durante 15 min para eliminar el exceso de agua. Luego del tiempo de escurrimiento, el arroz se depositó en bolsas de polipapel con un tapón de algodón, el cual se cubrió con papel aluminio, y se esterilizó a 120°C durante

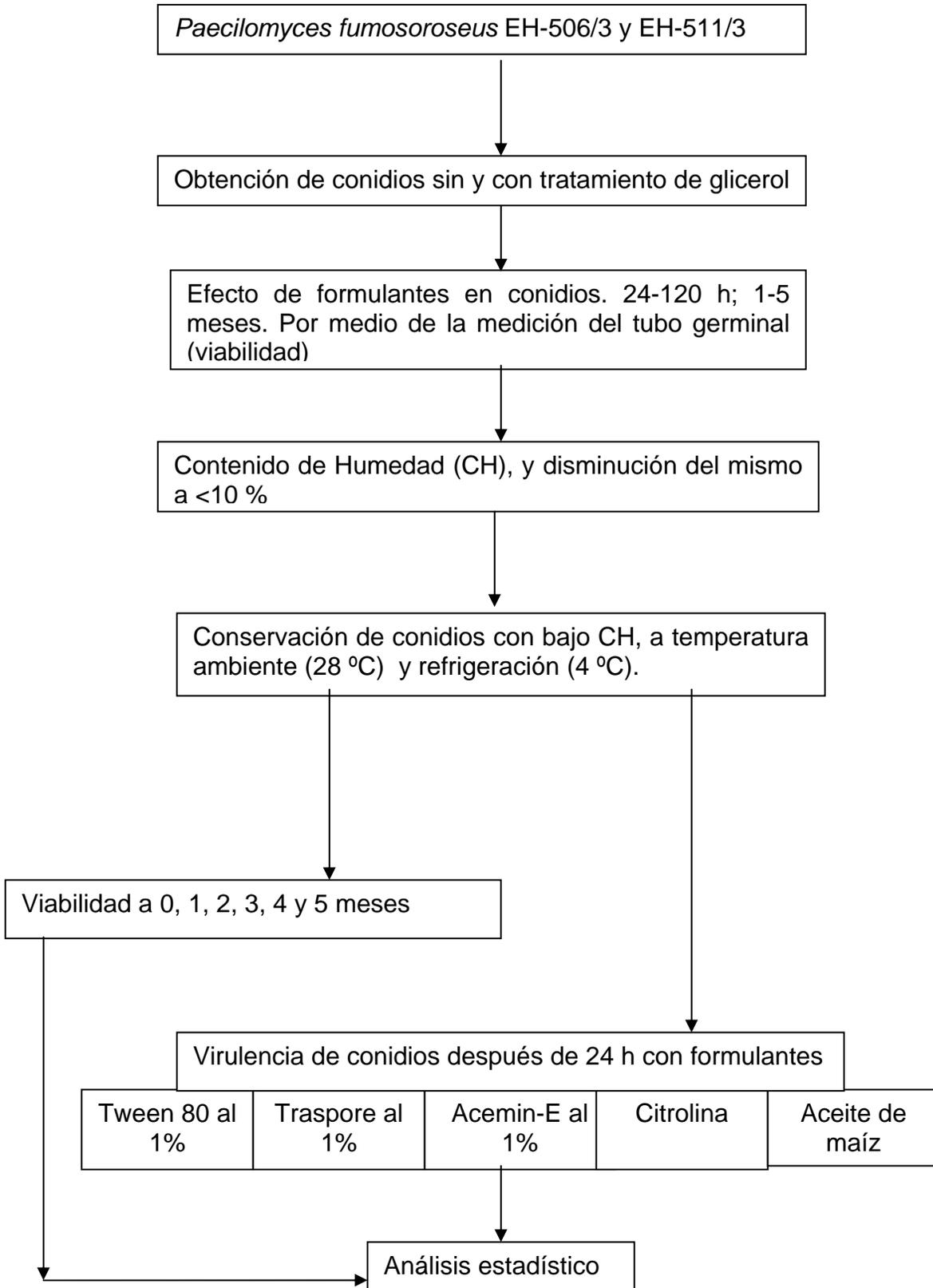


Figura 5. Esquema general de trabajo.

20 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 h (Basilio-Hernández, 2004). A cada bolsa se le agregaron 30 ml del micelio diluido y se incubó a 28 °C, con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad. Los conidios se cosecharon a los 16 días. Al término del tiempo de cultivo se determinó la productividad de las bolsas de arroz, realizando diluciones seriadas y cuantificando los conidios/g de arroz con ayuda de una cámara de Neubauer. Se realizaron 10 conteos por bolsa, de un total de 10 bolsas para cada uno de los dos aislados utilizados.

### **6.3. Obtención de conidios de *P. fumosoroseus* sin tratamiento**

Después del tiempo de incubación del hongo en el arroz, los conidios fueron cosechados agregando 800 ml de Tween 80 al 1% a las bolsas, agitando vigorosamente y filtrando con gasa estéril. Se determinó la cantidad de conidios/g de arroz por conteos en cámara de Neubauer. La suspensión obtenida fue centrifugada a 5000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante fue desechado al constatar que no había conidios. El botón fue sacado de los tubos de centrifuga con un asa micológica y colocado en crisoles de porcelana para determinar el contenido de humedad.

### **6.4. Obtención de conidios con tratamiento**

La obtención de conidios con tratamiento de glicerol al 14 % (Hallsworth y Magan, 1995), consistió en cultivar y obtener los conidios como se describió en el párrafo anterior. Una vez centrifugados y separados del Tween 80, se agregó un volumen considerable de glicerol al 14 % hasta cubrir los conidios y se dejaron reposar durante 14 días a 4 °C, cubiertos con papel estraza para evitar contacto con alguna fuentes de luz. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para separar el glicerol.

### **6.5. Formulantes seleccionados**

Se seleccionaron dos agentes surfactantes para llevar a cabo los formulados acuosos: Tween 80 y Traspore. El primero se seleccionó porque es un producto ampliamente utilizado en el laboratorio de investigación y el segundo por su

utilización en el campo agrícola para aplicación de agroquímicos y facilitar la suspensión de polvos humectables. También se probó el agente emulsificante, Acemin-E, usado en el campo en México, para un formulado de agua en aceite.

Los aceites seleccionados para la prueba de formulación fueron citrolina (aceite de origen mineral derivado del petróleo) y aceite de maíz de la marca Great Value®. El primero se seleccionó debido a que ya se está utilizando en pruebas de formulación con hongos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas como la langosta *Schistocerca piceifrons* (Hernández-Velázquez *et al*, 2000) y el segundo se ha utilizado en pruebas de aceites con otros entomopatógenos con excelentes resultados. La marca del aceite de maíz fue la que mayor calificación obtuvo en un estudio de calidad realizado por la Procuraduría Federal del Consumidor (Profeco, 2002).

Antes de realizar los formulados, se llevó a cabo un control de calidad en todos los formulantes, colocando una gota de estos en medio de cultivo APD e incubado a 37 °C, durante 24 h para detectar la presencia de algún agente contaminante.

#### **6.6. Efecto de formulantes en conidios de *P. fumosoroseus*, prueba de viabilidad de conidios**

Se determinó el efecto inicial de los formulantes (Tween 80 al 1 %, Traspore® al 1 %, Acemin-E al 1 %, citrolina y aceite de maíz) sobre la viabilidad de conidios sin y con tratamiento de glicerol, al inicio de los ensayos, cada 24 h, durante 120 h, para verificar algún posible efecto adverso de los formulantes en los conidios.

Se obtuvieron conidios sin y con tratamiento como se describió en el apartado correspondiente y fueron suspendidos en cada formulante. La concentración se ajustó a  $1 \times 10^6$  conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad se determinó tomando una muestra de una suspensión de conidios y depositada en cajas con APD, dispersando con una varilla de vidrio e incubando a 28°C. Cada 24 h se midió la viabilidad en los conidios. El criterio para determinar la viabilidad fue la presencia de tubo germinal de igual o mayor tamaño al conidio (Moore *et al.*, 1995) y los conteos fueron realizados con ayuda de microscopios

Olympus CH-2 y CH-20 con el objetivo 40 X. Se contaron 300 conidios por caja, con 4 repeticiones.

Los datos obtenidos en porcentaje fueron transformados a arcoseno, y sometidos a un análisis de varianza con el programa estadístico SPSS para Windows, Ver. 12. Los datos donde se encontraron diferencias significativas se sometieron a un análisis de comparación múltiple de medias (Tukey). Al término de las 120 h, los formulados se almacenaron a temperatura ambiente (28 °C) y refrigeración (4 °C) y se determinó la viabilidad mensual, hasta completar cinco meses.

### **6.7. Contenido de humedad de los conidios**

Después de centrifugar los conidios sin y con tratamiento de glicerol, como se mencionó con anterioridad, se pesaron 0.5 g de conidios en un crisol de porcelana, e incubando a 100 °C en un horno Precision (USA), cada 24 h, hasta alcanzar un porcentaje menor al 10 %. Transcurrido este tiempo se volvió a pesar el material depositado en los crisoles y se determinó la diferencia de peso. Cada determinación se realizó por cuatuplicado.

### **6.8. Disminución del CH de los conidios**

Se tomaron muestras de aproximadamente 5 g de conidios y se esparcieron en papel aluminio estéril dejando una capa de aproximadamente 1 mm de espesor. Después, se introdujeron las muestras en un horno de secado al vacío Lab-Tech (Napco, USA) a temperatura ambiente. Se realizaron determinaciones del CH cada 24 h para determinar el tiempo en que las muestras disminuyen a menos del 10 % de humedad.

### **6.9. Virulencia, estandarización del ensayo**

La estandarización de los ensayos de virulencia se realizó con un aerógrafo de mezcla externa Badger® (México) para simular la aspersion en el campo agrícola. Se hicieron pruebas preliminares para determinar la cantidad de formulado asperjado por disparo del aerógrafo, y así evaluar la cantidad de conidios emitidos

en un área aproximada de 5 cm<sup>2</sup> de hojas de la planta con el insecto. Las pruebas consistieron en hacer 100 disparos de los vehículos formulantes con el aerógrafo y luego por diferencia de volumen inicial y final, se determinó un promedio de volumen desplazado por disparo realizado. Esto se hizo con cada uno de los formulantes, ya que los aceites son más densos que los agentes acuosos. Con los promedios de volumen desplazado se determinó la cantidad de conidios asperjados por cada disparo. También se estandarizó la manera en que se deberían realizar los disparos, la posición y distancia en que se deben poner las cajas Petri con respecto al aerógrafo, para así realizar la aspersion de la misma manera en cada uno de los ensayos de virulencia posteriores.

La virulencia del hongo fue evaluada según la metodología propuesta por Vidal *et al.* (1997) con algunas modificaciones, en el segundo y tercer estadio ninfal de *Bemisia tabaci*, ajustando la suspensión de los formulados a  $1 \times 10^7$  conidios/ml.

Se seleccionaron hojas de *Poinsetia* sp. (nochebuena) infestadas de mosquita blanca, se desinfectaron con enjuagues secuenciales de hipoclorito al 2.5 %, alcohol 70 % y agua destilada estéril. Se asperjó el envés de las hojas y luego se pusieron a secar en papel filtro estéril durante 5 min en la campana de flujo laminar. Posteriormente, las hojas fueron depositadas en cajas con medio KNOP (en g/l: KNO<sub>3</sub>, 0.125; CaNO<sub>3</sub>, 0.50; MgSO<sub>4</sub>, 0.125; KHPO<sub>4</sub>, 0.125; agar, 23) y se colocaron en incubación durante 24 h a 25 °C, 60 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 h luz-oscuridad. Después de la incubación se seleccionaron ninfas al azar y se depositaron en cajas Petri con agar agua, 25 ninfas por caja, por triplicado y una caja con 25 ninfas testigo (75 ninfas asperjadas y 25 testigo) y se incubaron en las condiciones arriba mencionadas. Las cajas fueron revisadas diariamente llevando un registro de la infección de ninfas. Cada bioensayo se realizó por triplicado y el testigo fue asperjado con los formulantes, Tween 80 al 1 %, Traspore 1%, Acemin-E 1%, citrolina y aceite de maiz sin conidios. El criterio para considerar a una ninfa muerta por el hongo, es confirmar la salida del micelio de su cuerpo, y obtener la colonia fúngica característica en medio APD.

#### **6.10. Determinación del tiempo de conservación (tiempo de anaquel) de los conidios de *P. fumosoroseus***

A los conidios obtenidos sin y con tratamiento, con bajo contenido de humedad, se les llevó a cabo las pruebas de viabilidad y virulencia con la metodología arriba mencionada. Estas pruebas se llevaron a cabo a los 0, 1, 2, 3, 4 y 5 meses.

#### **6.11. Análisis estadístico**

Todos los ensayos de viabilidad realizados en los conidios de ambos aislados formulados en los 5 agentes formulantes, sin y con tratamiento, obtenidos en porcentaje fueron transformados a arcoseno, y sometidos a un análisis de varianza con el programa estadístico SPSS para Windows, Ver. 12 para detectar diferencias significativas. Los datos donde se encontraron diferencias se sometieron a un análisis de comparación múltiple de medias (Tukey).

Los datos de viabilidad de conidios con el CH disminuido y almacenados a 4 y 28 °C, determinados mensualmente fueron sometidos a una prueba de t ( $\alpha = 0.05$ ) para detectar diferencias significativas entre los valores iniciales y finales.

Con los datos de virulencia obtenidos se determinó el tiempo letal medio (TLM) utilizando análisis Probit (Finney, 1972) con ayuda del programa Polo-PC (1987). Se registró la mortalidad acumulada a las 72 h, y los datos, expresados en porcentaje, fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA), previa transformación a arcoseno. En todos los análisis, la significancia considerada fue de  $\alpha = 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Producción y obtención de conidios sin tratamiento de *Paecilomyces fumosoroseus*

En la producción de conidios en bolsas de arroz se observó el crecimiento del hongo en el sustrato, hasta cubrirlo totalmente. Al término de 16 días se observó la coloración típica rosa grisáceo de los conidios cubriendo en su totalidad el arroz, en las bolsas con el aislado EH-511/3 (Figura 6). Las bolsas que contenían el aislado EH-506/3, mostraron esencialmente micelio sin la coloración típica de los conidios de *P. fumosoroseus*. El aislado EH-511/3, produjo una cantidad de conidios significativamente mayor ( $P < 0.01$ ), que el EH-506/3 (Tabla 1).



Fig. 6. Aspecto de las bolsas con el sustrato de arroz cubierto de *P. fumosoroseus* EH-511/6.

**Tabla 1. Comparación de la producción de conidios de los dos aislados de *P. fumosoroseus* estudiados**

	<b>EH-506/3</b>	<b>EH-511/3</b>
	<b>Conidios X 10<sup>9</sup>/g de arroz</b>	
	<b>Media ± EE*</b>	
Bolsa 1	0.41 ± 0.012	5.95 ± 0.078
Bolsa 2	0.44 ± 0.008	7.23 ± 0.062
Bolsa 3	0.91 ± 0.017	7.24 ± 0.074
Bolsa 4	0.62 ± 0.014	7.69 ± 0.080
Bolsa 5	1.12 ± 0.014	9.11 ± 0.078
Bolsa 6	0.86 ± 0.010	9.41 ± 0.082
Bolsa 7	1.12 ± 0.010	6.02 ± 0.052
Bolsa 8	1.38 ± 0.010	7.01 ± 0.063
Bolsa 9	1.16 ± 0.014	7.10 ± 0.072
Bolsa 10	1.09 ± 0.028	8.45 ± 0.050

EE = error estándar. La determinación se realizó 10 veces en diez bolsas diferentes (n = 100) para cada aislado

## **7.2 Obtención de conidios de *P. fumosoroseus* con tratamiento**

El primer método utilizado para la obtención de conidios con tratamiento de glicerol (agregar glicerol al arroz antes de la siembra del hongo) no se siguió utilizando (Figura 7). Al agregar glicerol al sustrato (arroz), aumentó la humedad en el mismo, lo que retardó el desarrollo de *P. fumosoroseus* y contribuyó a la rápida aparición de contaminantes. Este resultado fue observado tanto en el aislado EH-506/3 como en el EH-511/3.

Debido a este resultado se modificó el método propuesto al inicio de este estudio, y se obtuvieron conidios mediante el sistema difásico propuesto por Jenkins *et al.* (1998). Los conidios obtenidos como mencionado en material y métodos se depositaron en tubos Falcon estériles donde se cubrieron con glicerol al 14 % durante 10 días en refrigeración (4 °C) y cubiertos con papel estraza para evitar algún contacto con la luz.

### 7.3 Formulantes seleccionados

Se realizaron pruebas de control de calidad de los agentes formulantes (Tabla 2) y ninguno mostró agentes contaminantes a las 24 h de incubación, en el medio de cultivo utilizado (APD) a 37 °C.

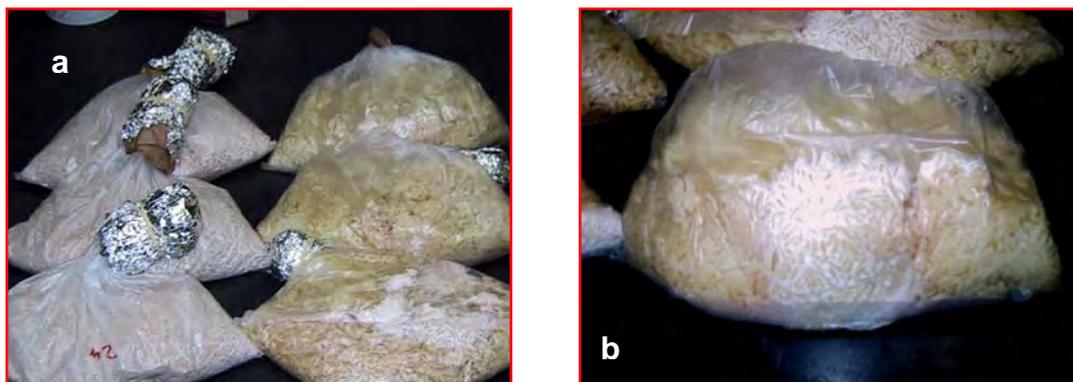


Fig. 7. Comparación del crecimiento fúngico en bolsas de arroz sin y con tratamiento de glicerol.

a) Las bolsas de la izquierda no tienen glicerol, mientras que las de la derecha si tienen el tratamiento y no se observa crecimiento fúngico. b) Acercamiento de una bolsa con arroz con tratamiento.

**Tabla 2. Tipo de agentes formulantes seleccionados**

Agente	Tipo de formulado	Tipo de aplicación
Tween 80 1%	Acuoso	AV
Traspore 1 %	Acuoso	AV
Acemin-E 1 %	Aceite parafínico para formulación en agua	AV
Citrolina	Aceite mineral	UBV
Aceite de maíz	Aceite vegetal	UBV

AV = Alto volumen,UBV = Ultra Bajo Volumen

### 7.4 Efecto de formulantes en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* sin y con tratamiento

Antes de llevar a cabo las formulaciones se determinó el efecto de los formulantes sobre la viabilidad de los conidios sin y con tratamiento de glicerol a temperatura ambiente (28 °C) y refrigeración (4 °C) durante 120 h. En la figura 8 se muestra un

conidio viable con un tubo germinal de mayor largo que el conidio. La viabilidad de los conidios de ambos aislados utilizados no mostró una disminución significativa ( $P < 0.01$ ) al cabo de 120 h de incubación con todos los formulantes ensayados (Tabla 3).



Fig. 8. Conidio viable de *P. fumosoroseus*, EH-511/3 a las 8 horas de incubación en medio APD a 27 °C, con tubo germinal mayor al conidio. 100 X.

Los conidios formulados mantuvieron una viabilidad alta, independientemente del formulante, la temperatura de almacenamiento, y el recibir o no tratamiento de glicerol. La viabilidad en todos los casos no disminuyó del 97.5 % al cabo de las 120 h del ensayo.

El ensayo de la viabilidad de los conidios en los cinco formulantes se continuó hasta cinco meses. La viabilidad fue disminuyendo paulatinamente en todos los casos (ver anexos I-V). El análisis estadístico se llevó a cabo comparando para cada aislado la viabilidad de los conidios inicial y al cabo de cinco meses sin y con tratamiento de glicerol a las 2 temperaturas (4 °C y 28 °C), para cada aislado.

En la figura 9 se observa el efecto del Tween 80 al 1 % en la viabilidad de los conidios. Se observó que la viabilidad inicial fue alta, superior al 98 % en todos los casos para ambos aislados. A los cinco meses, la viabilidad conidial disminuyó considerablemente al compararla con la inicial.

**Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 sin y con tratamiento de glicerol, en diferentes formulantes**

	EH-506/3				EH-511/3			
	Sin tratamiento		Con tratamiento		Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C						
<b>Tween 80</b>								
<b>1 %</b>								
Inicial	98.66 ± 1.18	98.08 ± 0.80	99.53 ± 0.42*	99.25 ± 1.13	99.08 ± 0.80	99.58 ± 1.53	98.25 ± 1.53	98.75 ± 0.84
120 h	98.08 ± 0.79	98.53 ± 1.57	98.33 ± 0.79	98.16 ± 0.78	98.25 ± 0.78	98.25 ± 0.79	98.08 ± 1.17	98.08 ± 1.18
<b>Traspore</b>								
<b>1 %</b>								
Inicial	98.75 ± 1.57	99.25 ± 2.00	99.5 ± 1.18	99.33 ± 1.95	99.66 ± 1.51	99.41 ± 1.19	99.41 ± 1.53	99.58 ± 1.30
120 h	98.33 ± 1.56	98.41 ± 2.35	97.53 ± 1.57	97.66 ± 1.18	98.25 ± 1.58	98.16 ± 1.18	98.83 ± 1.60	98.08 ± 1.19
<b>Acemin-E</b>								
<b>1 %</b>								
Inicial	99.91 ± 1.18	99.91 ± 0.05	100.0 ± 0.00	99.91 ± 0.79	99.25 ± 0.95	99.33 ± 1.17	98.75 ± 0.53	98.53 ± 0.80
120 h	98.16 ± 0.78	98.25 ± 0.79	98.41 ± 2.25	98.91 ± 1.19	98.33 ± 0.81	98.16 ± 1.05	99.00 ± 0.35	98.50 ± 1.18
<b>Citrolina</b>								
Inicial	99.50 ± 0.40	99.33 ± 1.50	98.50 ± 1.40	98.83 ± 0.78	98.41 ± 0.98	98.41 ± 0.98	99.25 ± 0.45	99.16 ± 0.79
120 h	97.58 ± 1.18	98.16 ± 1.42	98.33 ± 0.48	99.25 ± 0.78	99.58 ± 0.78	98.53 ± 0.78	98.33 ± 0.79	98.16 ± 0.75
<b>Aceite de maíz</b>								
Inicial	98.41 ± 0.35	98.66 ± 0.78	98.75 ± 0.74	99.66 ± 0.04	98.33 ± 0.79	98.58 ± 0.37	99.08 ± 0.70	98.16 ± 1.13
120 h	98.16 ± 0.35	98.25 ± 0.51	97.58 ± 0.78	98.16 ± 0.37	98.16 ± 0.45	98.16 ± 0.79	99.08 ± 0.37	98.50 ± 1.17

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición.

\*media ± EE.

Se observó que el Tween 80 al 1 % tuvo un efecto adverso en los conidios de ambos aislados al cabo de 5 meses. El aislado EH-506/3 no presentó diferencias significativas en la viabilidad inicial ( $P > 0.001$ ) independientemente del tratamiento con glicerol y temperaturas ensayadas, mientras que la viabilidad al cabo de los 5 meses si mostró diferencias ( $P < 0.001$ ). Los conidios almacenados a temperatura ambiente y con tratamiento de glicerol mostraron mayor viabilidad ( $64.75 \pm 0.09$  %) que los conidios sin tratamiento a ambas temperaturas ( $4\text{ °C} = 61.66 \pm 0.20$  %;  $28\text{ °C} = 61.66 \pm 0.20$  %). Los conidios con la menor viabilidad ( $P <$

0.001) fueron aquellos con tratamiento de glicerol y a 4 °C ( $58.58 \pm 0.05$  %) (Tabla 4).

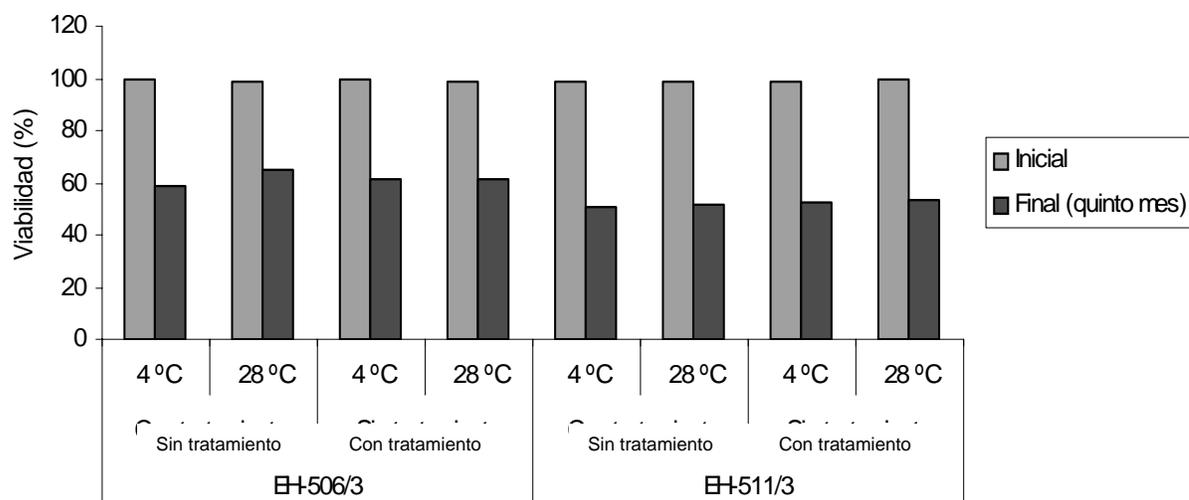


Fig. 9. Efecto del Tween 80 al 1 % en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus*

**Tabla 4. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 en Tween 80 al 1 %**

	sin tratamiento		con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
<b>506/3**</b>				
Inicial	$99.25 \pm 0.05^{a*}$	$98.58 \pm 0.05^a$	$99.58 \pm 0.05^a$	$98.66 \pm 0.06^a$
5o mes	$61.66 \pm 0.20^c$	$61.66 \pm 0.20^c$	$58.58 \pm 0.05^d$	$64.75 \pm 0.09^b$
<b>511/3***</b>				
Inicial	$98.75 \pm 0.02^{ab}$	$99.58 \pm 0.05^a$	$98.25 \pm 0.02^b$	$99.08 \pm 0.05^b$
5o mes	$52.75 \pm 0.08^c$	$53.75 \pm 0.08^c$	$50.75 \pm 0.15^d$	$51.41 \pm 0.15^d$

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición

\*Media  $\pm$  EE; EE = error estándar.

\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas ( $F = 3622.76$ ,  $gl = 7$ ,  $P < 0.001$ ) (Prueba de Tukey).

\*\*\* Letras iguales no presentan diferencias significativas ( $F = 8714.62$ ,  $gl = 7$ ,  $P < 0.001$ ) (Prueba de Tukey).

El aislado EH-511/3 mostró diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) desde el inicio observándose el mejor resultado en los conidios sin tratamiento a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $99.58 \pm 0.05\%$ ). Al cabo de los cinco meses, donde se observó una disminución notable de la viabilidad similar al otro aislado, también se observó la menor viabilidad ( $P < 0.001$ ) en los conidios con tratamiento de glicerol a ambas temperaturas ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} = 50.75 \pm 0.15\%$ ;  $28\text{ }^{\circ}\text{C} = 51.41 \pm 0.15\%$ ) (Tabla 4).

En la figura 10 se observa el efecto del Traspore al 1 %, en la viabilidad de los conidios. Se observó que la viabilidad inicial fue superior al 98 %, en todos los casos para ambos aislados. A los 5 meses ésta disminuyó considerablemente al compararla con la inicial.

Se observó que el Traspore al 1 % tuvo un efecto adverso en los conidios de ambos aislados al cabo de 5 meses (Tabla 5). El aislado EH-506/3 no presentó diferencias significativas en la viabilidad inicial ( $P > 0.001$ ), mientras que la viabilidad al cabo de los 5 meses mostró diferencias significativas ( $P < 0.001$ ). Los conidios almacenados a temperatura ambiente y sin tratamiento de glicerol mostraron mayor viabilidad ( $64.75 \pm 0.09\%$ ) que los conidios con tratamiento a ambas temperaturas ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} = 53.75 \pm 0.08\%$ ;  $28\text{ }^{\circ}\text{C} = 61.66 \pm 0.20\%$ ). La menor viabilidad ( $P < 0.001$ ) se presentó en aquellos conidios sin tratamiento de glicerol a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $58.58 \pm 0.05\%$ ) (Tabla 5).

El aislado EH-511/3 no mostró diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en la viabilidad inicial, y en todos los casos fue superior al 99 %. Al cabo de los cinco meses, se observó una disminución notable de la viabilidad similar al otro aislado. La mayor viabilidad se alcanzó en los conidios sin tratamiento almacenados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $61.66 \pm 0.20\%$ ), y la menor viabilidad ( $P < 0.001$ ) se observó en los conidios sin tratamiento de glicerol a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $50.75 \pm 0.15\%$ ) (Tabla 5).

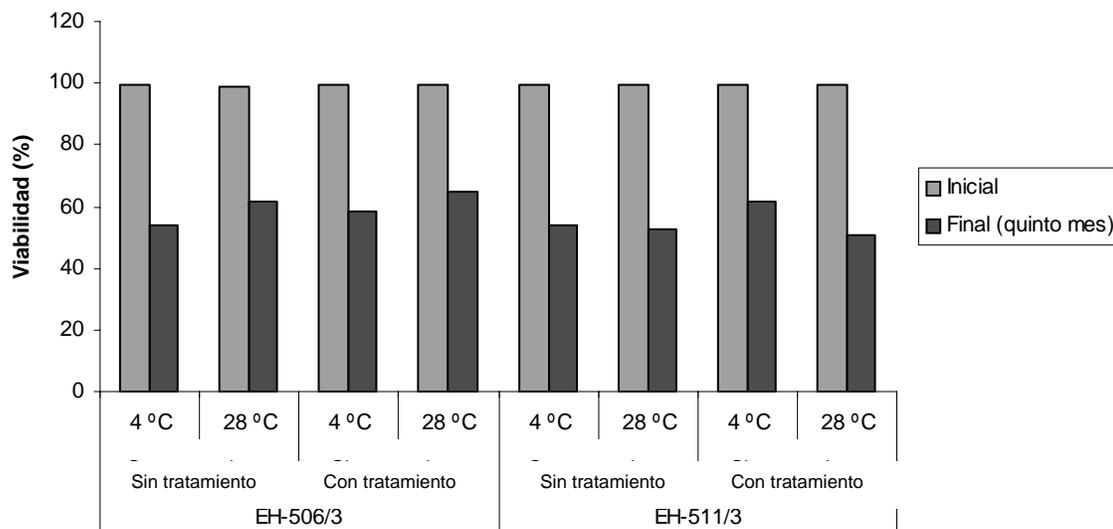


Fig. 10. Efecto del Traspore al 1 % en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus*

**Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 en Traspore al 1 %**

	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
<b>EH-506/3**</b>				
Inicial	99.33 ± 0.01 <sup>a*</sup>	99.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	99.50 ± 0.03 <sup>a</sup>	98.75 ± 0.02 <sup>a</sup>
5o mes	58.58 ± 0.05 <sup>d</sup>	64.75 ± 0.09 <sup>b</sup>	53.75 ± 0.08 <sup>e</sup>	61.66 ± 0.20 <sup>c</sup>
<b>EH-511/3***</b>				
Inicial	99.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	99.41 ± 0.07 <sup>a</sup>	99.41 ± 0.05 <sup>a</sup>	99.66 ± 0.04 <sup>a</sup>
5o mes	61.66 ± 0.20 <sup>b</sup>	50.75 ± 0.15 <sup>d</sup>	54.50 ± 0.22 <sup>c</sup>	52.75 ± 0.08 <sup>c</sup>

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición

\*media ± EE; EE = error estándar.

\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 6702.17, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

\*\*\* Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 4136.67, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

En la figura 11 se observa el efecto del Acemin-E al 1 % en la viabilidad de los conidios. Se observó que la viabilidad inicial fue superior al 99 %, en todos los casos para ambos aislados. A los 5 meses ésta disminuyó considerablemente al compararla con la inicial.

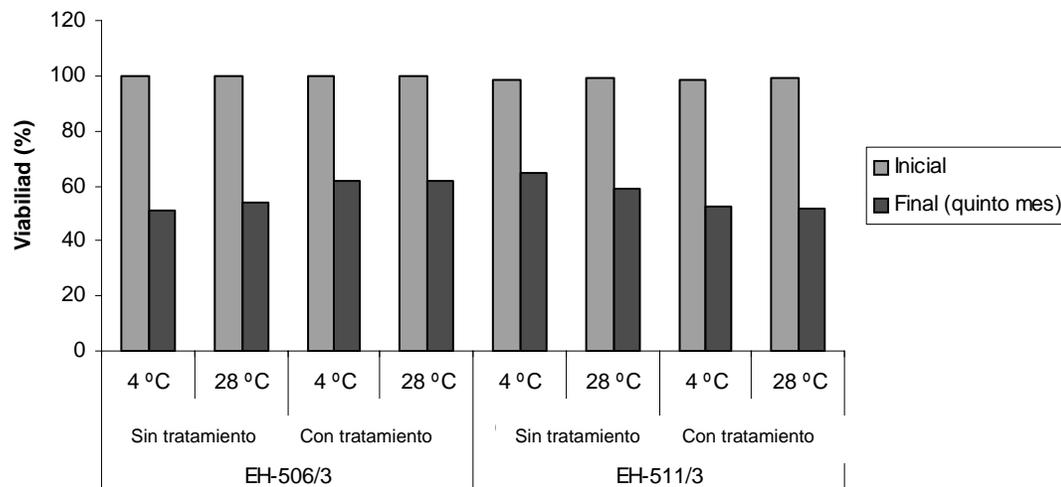


Fig. 11. Efecto del Acemin-E al 1 % en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus*

**Tabla 6. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 en Acemin-E al 1 %**

	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
<b>EH-506/3**</b>				
Inicial	99.91 ± 0.16 <sup>a*</sup>	99.91 ± 0.16 <sup>a</sup>	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	99.91 ± 0.16 <sup>a</sup>
5o mes	61.66 ± 1.18 <sup>b</sup>	61.66 ± 1.18 <sup>b</sup>	50.75 ± 0.87 <sup>d</sup>	53.75 ± 0.50 <sup>c</sup>
<b>EH-511/3***</b>				
Inicial	98.58 ± 0.50 <sup>a</sup>	99.33 ± 0.27 <sup>a</sup>	98.75 ± 0.73 <sup>a</sup>	99.25 ± 0.41 <sup>a</sup>
5o mes	52.75 ± 0.50 <sup>d</sup>	51.41 ± 0.87 <sup>e</sup>	64.75 ± 0.56 <sup>b</sup>	58.58 ± 0.31 <sup>c</sup>

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición.

\*\*Media ± EE; EE = error estándar.

\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 4420.78, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

\*\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 6713.18, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

Se observó que el Acemin-E tuvo un efecto adverso en los conidios de ambos aislados al cabo de 5 meses (Tabla 6). El aislado EH-506/3 no presentó diferencias significativas en la viabilidad inicial (P > 0.001), mientras que la viabilidad al cabo de los 5 meses si mostró diferencias significativas (P < 0.001) en cuanto al tratamiento de glicerol. Los conidios almacenados a ambas temperaturas y sin tratamiento de glicerol mostraron mayor viabilidad (61.66 ± 1.18 %), mientras que los conidios con tratamiento a 28 °C mostraron un valor de 53.75 ± 0.50 %.

menor viabilidad ( $P < 0.001$ ) se presentó en aquellos conidios con tratamiento de glicerol y a 4 °C ( $50.75 \pm 0.87 \%$ ) (Tabla 6).

El aislado EH-511/3 no mostró diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en la viabilidad inicial, y en todos los casos fue superior al 98 %. Al cabo de los cinco meses, se observó una disminución de la viabilidad. La mayor viabilidad se alcanzó en conidios con tratamiento almacenado a 4 °C ( $64.75 \pm 0.56 \%$ ) y la menor viabilidad ( $P < 0.001$ ) en los conidios sin tratamiento de glicerol a 28 °C ( $51.41 \pm 0.87 \%$ ) (Tabla 6).

En la figura 12 se observa el efecto de la citrolina en la viabilidad de los conidios. Se observó que la viabilidad inicial fue superior al 98 %, en todos los casos para ambos aislados. A los 3 meses ésta disminuyó a aproximadamente 15 % de la inicial y por lo tanto no se completaron los cinco meses.

Se observó que la citrolina tuvo un efecto adverso en los conidios de ambos aislados al cabo de 3 meses (Tabla 7). El aislado EH-506/3 no presentó diferencias significativas en la viabilidad inicial ( $P > 0.001$ ), mientras que la viabilidad al cabo de los 3 meses sí mostró diferencias ( $P < 0.001$ ). Los conidios almacenados a ambas temperaturas, con tratamiento de glicerol y los conidios sin tratamiento almacenados a 4 °C mostraron mayor viabilidad ( $P < 0.001$ ) que aquellos conidios sin tratamiento de glicerol y a 28 °C ( $11.16 \pm 0.43 \%$ ) (Tabla 7).

En el aislado EH-511/3 no hubo diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en la viabilidad inicial, y en todos los casos fue superior al 98 %. Al cabo de los tres meses, también se observó una disminución notable de la viabilidad, sin diferencias significativas ( $P > 0.001$ ) entre temperaturas y tratamiento (Tabla 7).

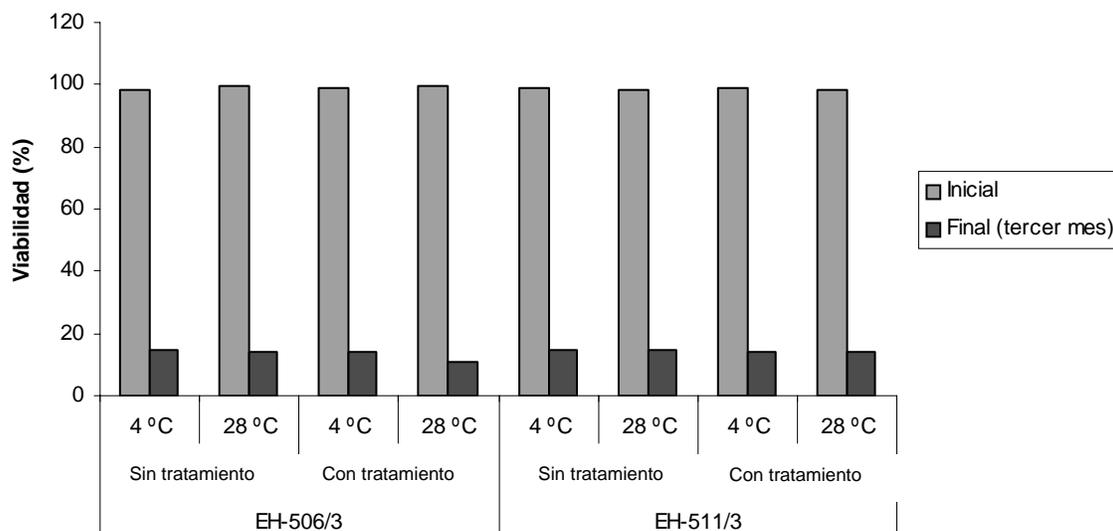


Fig. 12. Efecto de la citrulina en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus*

**Tabla 7. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 en citrulina**

	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
<b>EH-506/3**</b>				
Inicial	98.83 ± 0.43 <sup>a*</sup>	99.33 ± 0.00 <sup>a</sup>	98.50 ± 0.19 <sup>a</sup>	99.50 ± 0.19 <sup>a</sup>
3er mes	14.25 ± 0.56 <sup>b</sup>	11.16 ± 0.43 <sup>c</sup>	14.66 ± 0.60 <sup>b</sup>	14.33 ± 0.81 <sup>b</sup>
<b>EH-511/3***</b>				
Inicial	99.16 ± 0.33 <sup>a</sup>	98.41 ± 0.31 <sup>a</sup>	99.25 ± 0.16 <sup>a</sup>	98.41 ± 0.16 <sup>a</sup>
3er mes	14.33 ± 0.54 <sup>b</sup>	14.25 ± 0.16 <sup>b</sup>	14.41 ± 0.31 <sup>b</sup>	14.75 ± 0.63 <sup>b</sup>

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición.

\*media ± EE; EE = error estándar

\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 36984.98, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

\*\*\* Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 59576.48, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

En la figura 13 se observa el efecto del aceite de maíz en la viabilidad de los conidios. Se observó que la viabilidad inicial fue superior al 98 %, en todos los casos para ambos aislados. A los 4 meses ésta disminuyó aproximadamente a 20 % de la inicial, por lo cual no se continuó el ensayo hasta los 5 meses.

Se observó que el aceite de maíz tuvo un efecto adverso en los conidios de ambos aislados al cabo de 4 meses (Tabla 8). El aislado EH-506/3 no presentó diferencias significativas en la viabilidad inicial ( $P > 0.001$ ), mientras que la viabilidad al cabo de los 3 meses si mostró diferencias ( $P < 0.001$ ). Los conidios almacenados a 4 °C con tratamiento de glicerol mostraron mayor viabilidad ( $18.25 \pm 0.68 \%$ ) que aquellos conidios sin tratamiento (4 °C =  $16.25 \pm 0.41 \%$ ; 28 °C =  $16.00 \pm 0.60 \%$ ) y con tratamiento almacenado a 28 °C ( $16.50 \pm 0.43$ ) (Tabla 8).

En el aislado EH-511/3 no hubo diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en la viabilidad inicial, y en todos los casos fue superior al 98 %. Al cabo de los cuatro meses, se observó una disminución similar al aislado anterior. La mayor viabilidad ( $P < 0.001$ ) se alcanzó en los conidios con tratamiento almacenados a 4 °C ( $24.00 \pm 0.47 \%$ ), y la menor se observó en los conidios almacenados a 28 °C (sin tratamiento =  $21.08 \pm 0.41 \%$ ; con tratamiento =  $20.58 \pm 0.41 \%$ ) (Tabla 8).

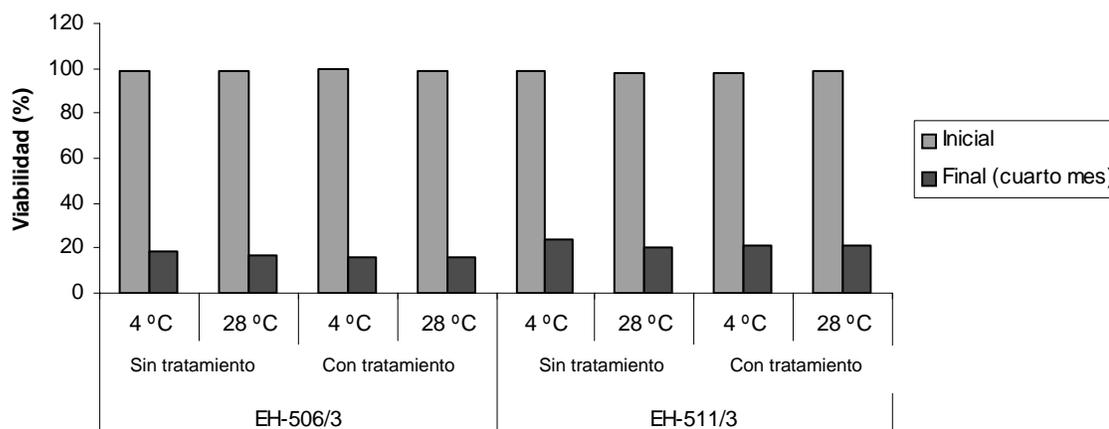


Fig. 13. Efecto del aceite de maíz en la viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus*

### 7.5. Contenido de humedad de los conidios

El contenido de humedad inicial del botón de conidios al ser centrifugados, en el momento de ser cosechados, independientemente del tratamiento o no de glicerol, se muestra en la tabla 9.

**Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-511/3 en aceite de maíz**

	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
<b>EH-506/3**</b>				
Inicial	99.66 ± 0.27 <sup>a*</sup>	98.66 ± 0.38 <sup>a</sup>	98.75 ± 0.16 <sup>a</sup>	98.41 ± 0.31 <sup>a</sup>
4 mes	16.25 ± 0.41 <sup>c</sup>	16.00 ± 0.60 <sup>c</sup>	18.25 ± 0.68 <sup>b</sup>	16.50 ± 0.43 <sup>c</sup>
<b>EH-511/3***</b>				
Inicial	98.16 ± 0.19 <sup>a</sup>	98.58 ± 0.16 <sup>a</sup>	99.08 ± 0.41 <sup>a</sup>	98.33 ± 0.27 <sup>a</sup>
4 mes	21.58 ± 0.16 <sup>c</sup>	21.08 ± 0.41 <sup>d</sup>	24.00 ± 0.47 <sup>b</sup>	20.58 ± 0.41 <sup>d</sup>

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición.

\*media ± EE; EE = error estándar

\*\*Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 39653.05, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

\*\*\* Letras iguales no presentan diferencias significativas (F = 58757.43, gl = 7, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

**Tabla 9. Contenido de humedad (CH) inicial de los conidios de ambos aislados, sin y con tratamiento de glicerol**

Aislado	CH (%)*
EH-506/3 sin tratamiento de glicerol	63.50 ± 0.45 <sup>ab**</sup>
EH-506/3 con tratamiento de glicerol	64.24 ± 0.37 <sup>ab</sup>
EH-511/3 sin tratamiento de glicerol	62.62 ± 0.56 <sup>a</sup>
EH-511/3 con tratamiento de glicerol	65.93 ± 0.41 <sup>b</sup>

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones.

\*Media ± Error estándar.

\*\*En letras iguales no hay diferencias significativas (F = 3.08, gl = 3, P < 0.001(Prueba de Tukey).

La mayor diferencia encontrada fue en el aislado EH-511/3 donde se observó el mayor CH en los conidios con tratamiento de glicerol.

### **7.6 Disminución del contenido de humedad (CH) de los conidios de *P. fumosoroseus***

El tiempo en que las muestras de conidios cosechados alcanzaron un CH menor al 10 % en el horno al vacío, fue a las 72 h (Tabla 10).

**Tabla 10. Contenido de humedad (CH) final de los conidios sin y con tratamiento de glicerol a las 72 h**

Aislado y tratamiento	CH (%)
EH-506/3 sin tratamiento de glicerol	8.15 ± 0.19*
EH-506/3 con tratamiento de glicerol	8.46 ± 0.35
EH-511/3 sin tratamiento de glicerol	8.90 ± 0.33
EH-511/3 con tratamiento de glicerol	7.98 ± 0.37

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones

\*Media ± EE; EE = Error estándar

No se encontró diferencia significativa ( $P > 0.001$ ) entre el CH de ambos aislados a las 72 h independientemente si fueron cosechados sin o con tratamiento de glicerol. Se determinó este tiempo como el indicado para que los conidios disminuyeran su CH para los ensayos posteriores.

### **7.7 Determinación del tiempo de conservación (tiempo de anaquel) de los conidios con bajo contenido de humedad (CH) de *P. fumosoroseus* por la viabilidad de conidios**

La viabilidad de los conidios con CH disminuido se registró de manera mensual, como descrito en material y métodos, hasta el quinto mes, sin embargo para una mejor comprensión de los resultados, el análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos al tercer mes. Se observó en todos los casos que al transcurrir el tiempo la viabilidad disminuyó.

La figura 14 muestra la disminución del porcentaje de viabilidad de *P. fumosoroseus* EH-506/3 durante los primeros 3 meses del ensayo, de los conidios sin y con tratamiento a 4 y 28 °C, mostrando al cabo del tiempo una disminución del alrededor del 30 % de la viabilidad inicial.

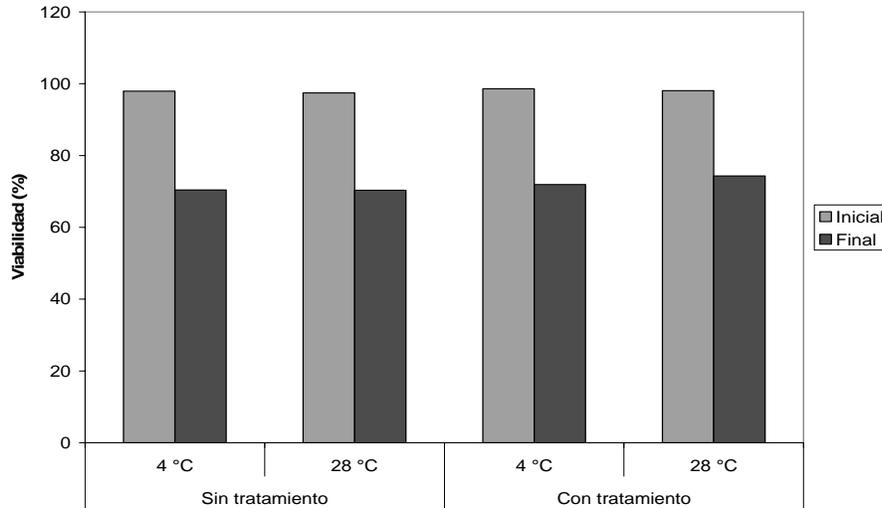


Fig. 14. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios de *P. fumosoroseus* EH-506/3 con bajo contenido de humedad

Al inicio del ensayo se observó un alto porcentaje de viabilidad en los conidios con tratamiento a ambas temperaturas (4 °C =  $98.58 \pm 0.01$  y 28 °C =  $98.08 \pm 0.01$ ) (Tabla 11). Sin embargo el análisis estadístico (prueba de t) no reveló diferencias significativas entre la viabilidad inicial independientemente del tratamiento y temperatura.

**Tabla 11. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios con bajo contenido de humedad de *P. fumosoroseus* EH-506/3**

Tiempo (meses)	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
0	$97.91 \pm 0.03^*$	$97.41 \pm 0.01$	$98.58 \pm 0.01$	$98.08 \pm 0.01$
3	$70.41 \pm 0.01$	$70.33 \pm 0.01$	$71.91 \pm 0.01$	$74.33 \pm 0.01$

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición.

\*Media  $\pm$  EE; EE = error estándar.

Al tercer mes la viabilidad mostró valores dentro del intervalo de  $70.33 \pm 0.01$  % hasta  $74.33 \pm 0.01$  %, es decir, hubo una disminución de alrededor de un 30 % en los valores de porcentaje de viabilidad, mostrando otra vez un porcentaje menor de viabilidad en los conidios sin tratamiento a 28 °C ( $70.33 \pm 0.01$ ). Sin

embargo el análisis estadístico (prueba de t) tampoco reveló diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre todos los valores de viabilidad final, independientemente del tratamiento con glicerol y la temperatura de almacenamiento. Cabe hacer mención que al quinto mes, la viabilidad de este aislado tuvo un intervalo de viabilidad desde  $58.41 \pm 0.01$  hasta  $64.75 \pm 0.01$  %, presentándose el valor mas bajo y mas alto en conidios con tratamiento, y almacenados a 4 y 28 °C respectivamente.

La figura 15 muestra la disminución del porcentaje de la viabilidad del aislado EH-511/3 con bajo CH, durante los tres primeros meses del ensayo, de los conidios sin y con tratamiento de glicerol a 4 y 28 °C, mostrando al final que la viabilidad disminuyó aproximadamente 30 % del inicial, mismo patrón observado en el otro aislado. En este aislado, la viabilidad inicial fue superior al 97 %, y el análisis estadístico (prueba de t) no reveló diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los conidios sin y con tratamiento a ambas temperaturas, mientras que tercer mes tampoco hubo diferencias significativas entre los conidios sin y con tratamiento en ambas temperaturas (Tabla 12).

Al quinto mes se observó que este aislado tuvo una disminución cercana al 50 %, la menor viabilidad se registró en conidios con tratamiento de glicerol y almacenados a 4 °C ( $50.75 \pm 0.10$  %) y el mayor porcentaje de viabilidad se registró en conidios sin tratamiento almacenado a temperatura ambiente ( $53.75 \pm 0.05$  %).

Cabe resaltar que en ambos aislados se observó el mismo patrón de comportamiento, es decir, una viabilidad inicial cercana al 100 %, y una viabilidad alrededor del 70 % al cabo del tercer mes, el análisis estadístico se realizo con los datos del tercer mes, debido a que el análisis estadístico de los ensayos de virulencia también se realizaron con conidios hasta el tercer mes.

En resumen, se observó que la viabilidad disminuyó de una manera similar en ambos aislados al tercer mes, independientemente del tratamiento o no de glicerol, y de la temperatura de almacenamiento.

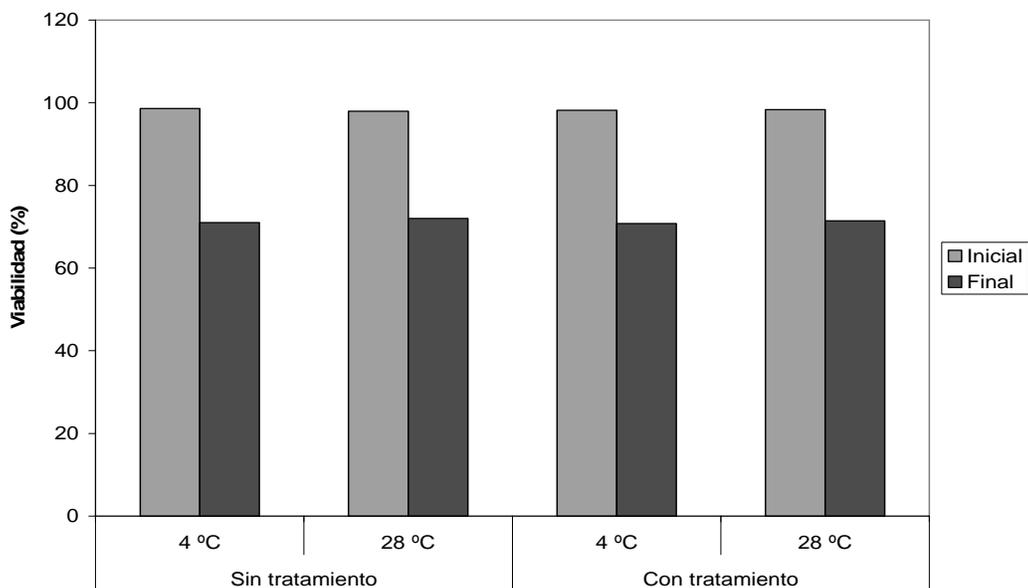


Fig. 15. Viabilidad inicial y al tercer mes de conidios de *P. fumosoroseus* EH-511/3 con bajo contenido de humedad

**Tabla 12. Porcentaje de la viabilidad inicial y al tercer mes de conidios con bajo contenido de humedad de *P. fumosoroseus* EH-511/3**

Tiempo (meses)	Sin tratamiento		Con tratamiento	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
0	98.58 ± 0.01*	97.91 ± 0.03	98.16 ± 0.03	98.33 ± 0.07
3	71.00 ± 0.16	72.00 ± 0.16	70.75 ± 0.08	71.41 ± 0.08

La media corresponde al resultado de cuatro repeticiones contando 300 conidios por repetición  
 \*Media ± EE; EE = error estándar

## 7.8 Mortalidad en *B. tabaci* de los conidios formulados

### 7.8.1 Estandarización del ensayo

Se utilizó un aerógrafo (Figura 16) para simular la aplicación por aspersión en el campo. En las pruebas preliminares se determinó que cada disparo del aerógrafo con bote nuevo de gas propelente proyectaba 0.15 ml de formulantes acuosos (Tween 80 al 1 %, Traspore al 1 % y Acemin-E al 1 %). La concentración inicial de los formulados fue de  $1 \times 10^7$  conidios por ml, o sea que por cada disparo se asperjaron  $1 \times 10^6$  conidios. La cantidad depositada en hojas infestadas de ninfas de mosquita blanca cubrieron un área aproximada de  $5 \times 5$  cm, obteniendo 400 conidios por  $\text{mm}^2$ . Los formulantes en aceite (citrolina y aceite de maíz) proyectaron 0.07 ml por disparo, asperjando  $7 \times 10^5$  conidios por disparo (280 conidios por  $\text{mm}^2$ ). Por esta razón se determinaron dos disparos para asperjar una cantidad similar de conidios en formulados con los aceites. Estos datos se obtuvieron con el aerógrafo a 10 cm de las cajas con hojas infestadas, en una posición de  $45^\circ$ .

Para el análisis estadístico de los ensayos de virulencia se consideró la mortalidad acumulada a las 72 h, debido a que en este tiempo se observó la mayor diferencia entre los formulados (Anexos VI a IX). Se compararon los resultados de la mortalidad inicial y la del tercer mes, ya que los conidios almacenados a temperatura ambiente, a partir del cuarto mes, ya no presentaron ninfas con los síntomas de infección por *P. fumosoroseus*.



Fig. 16. Aspecto del aerógrafo utilizado para simular una aspersión en campo agrícola.

### 7.8.2 Mortalidad inicial y a los tres meses de conservación de los aislados EH-506/3 y EH-511/3 de *P. fumosoroseus*

Los conidios del aislado EH-506/3 sin tratamiento de glicerol mostraron en todos los casos una disminución de la mortalidad al cabo de tres meses (Tabla 13).

**Tabla 13. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-506/3 sin tratamiento de glicerol**

		4 °C		28 °C	
		Mortalidad acumulada (%)*		Mortalidad acumulada (%) TLM (h)	
Tween 80 1 %	Inicial	64.0 ± 0 <sup>cd**</sup>	53.15	66.66 ± 0.29 <sup>c</sup>	51.91
	3er mes	60.0 ± 0 <sup>d</sup>	58.7	22.66 ± 0.29 <sup>gh</sup>	90.59
Traspore 1%	Inicial	84.0 ± 0 <sup>b</sup>	48.89	80.0 ± 0 <sup>b</sup>	51.45
	3er mes	53.33 ± 0.29 <sup>e</sup>	66.99	25.33 ± 0.29 <sup>g</sup>	94.18
Acemin-E 1 %	Inicial	84.0 ± 0 <sup>b</sup>	39.22	85.33 ± 0.59 <sup>b</sup>	42.79
	3er mes	62.66 ± 0.29 <sup>cd</sup>	57.31	25.33 ± 0.29 <sup>g</sup>	87.25
Citrolina	Inicial	84.0 ± 0 <sup>b</sup>	29.55	81.33 ± 0.29 <sup>b</sup>	25.18
	3er mes	52.0 ± 0 <sup>e</sup>	98.04	36.0 ± 0 <sup>f</sup>	64.64
Aceite de maíz	Inicial	100.0 ± 0 <sup>a</sup>	54.01	100.0 ± 0 <sup>a</sup>	48.27
	3er mes	49.33 ± 0.29 <sup>e</sup>	56.24	17.33 ± 0.29 <sup>h</sup>	109.79

La media corresponde al resultado de tres repeticiones con 25 ninfas por repetición.

\*Media ± EE; EE = error estándar

\*\*En letras iguales no hay diferencias significativas (F = 585.45, gl = 19, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

El porcentaje de mortalidad acumulada más alto (100 %) se registró en los conidios formulados en aceite de maíz conservados a ambas temperaturas. En los conidios formulados en citrolina, Acemin-E y Traspore a ambas temperaturas también se registraron mortalidades altas, dentro de un intervalo de 80 a 85.33 ± 0.59 %. En todos los casos al tercer mes la mortalidad fue significativamente menor (P < 0.001) a las registradas al inicio. El menor porcentaje de mortalidad se

registró en los conidios almacenados a temperatura ambiente y formulados en aceite de maíz ( $17.33 \pm 2.30$  %). El TLM varió entre todos los formulados inicialmente entre 39.22 y 54.01, con la excepción de los conidios formulados con citrolina que mostraron un TLM mucho menor de 29.55 y 25.18 a 4 y 28 °C respectivamente. A los tres meses de almacenamiento el TLM aumentó de mayor manera en los conidios conservados a 28 °C, y en los formulados con citrolina.

Los conidios del aislado EH-506/3 con tratamiento de glicerol mostraron en todos los casos una disminución de la mortalidad al cabo de tres meses (Tabla 14).

**Tabla 14. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-506/3 con tratamiento de glicerol**

		4 °C		28 °C	
		Mortalidad acumulada (%)*	TLM (h)	Mortalidad acumulada (%)	TLM (h)
Tween 80 1 %	Inicial	$76.0 \pm 0^{cd**}$	49.06	$84.0 \pm 0^{ab}$	48.35
	3er mes	$65.33 \pm 0.29^{ef}$	55.56	$17.33 \pm 0.29^k$	109.57
Traspore 1%	Inicial	$66.66 \pm 0.29^{ef}$	54.24	$78.66 \pm 0.29^{bc}$	51.06
	3er mes	$62.66 \pm 0.29^{fg}$	56.63	$22.66 \pm 0.29^{jk}$	106.27
Acemin-E 1 %	Inicial	$84.0 \pm 0^{ab}$	56.31	$86.66 \pm 2.30^a$	48.6
	3er mes	$53.33 \pm 0.29^{hi}$	73.93	$17.33 \pm 0.29^k$	108.21
Citrolina	Inicial	$70.66 \pm 0.29^{de}$	55.67	$49.33 \pm 0.29^i$	45.59
	3er mes	$58.66 \pm 0.29^{gh}$	76.46	$20.0 \pm 0^{jk}$	113.93
Aceite de maíz	Inicial	$73.33 \pm 0.29^{cd}$	25.65	$57.33 \pm 0.29^{gh}$	24.33
	3er mes	$65.33 \pm 0.29^{ef}$	63.47	$25.33 \pm 0.29^j$	101.53

La media corresponde al resultado de tres repeticiones con 25 ninfas por repetición.

\*Media  $\pm$  EE; EE = error estándar.

\*\*En letras iguales no hay diferencias significativas ( $F = 395.40$ ,  $gl = 19$ ,  $P < 0.001$ ) (Prueba de Tukey).

El porcentaje de mortalidad acumulada inicial mas alto ( $86.66 \pm 0.29$  %) se registró en los conidios formulados en Acemin-E a temperatura ambiente. En los

conidios formulados en Acemin-E a temperatura de 4 °C y en Tween 80 al 1 % a 28 °C también se registró mortalidad alta aunque significativamente menor a la mayor registrada ( $86.66 \pm 0.29$  %). En todos los casos al tercer mes la mortalidad fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ) a las del inicio. El menor porcentaje de mortalidad a los tres meses se registró en conidios almacenados a temperatura ambiente y formulados en Acemin-E y Tween 80 al 1 % (igual para ambos =  $17.33 \pm 0.29$  %). El TLM tuvo la misma tendencia que con la mortalidad acumulada, observándose el menor TLM al inicio en los conidios formulados en aceite de maíz (4 °C = 25.65; 28 °C = 24.33). A los tres meses de incubación se observó la mayor virulencia (menor TLM) en todos los conidios conservados a 4 °C y en todos los formulantes previos a la aplicación.

Los conidios del otro aislado, EH-511/3 sin tratamiento de glicerol, mostraron en todos los casos una disminución de la mortalidad al cabo de tres meses (Tabla 15). El mayor porcentaje de mortalidad acumulada inicial ( $61.33 \pm 0.29$  %) se registró en los conidios formulados en Acemin-E a temperatura de refrigeración. En los conidios formulados en Tween 80 al 1 %, Acemin-E al 1 % a 28 °C y aceite de maíz a 4 °C, ( $57.33 \pm 0.29$  % para los primeros y  $60.0 \pm 0$  % para los dos siguientes) se registraron mortalidades altas aunque significativamente menores a la mayor registrada. En todos los casos, al tercer mes, la mortalidad fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ) a las registradas al inicio. El porcentaje de mortalidad significativamente menor ( $P < 0.001$ ) se registro en conidios almacenados a temperatura ambiente y formulados en Traspore al 1 % y Acemin-E al 1 % almacenados a temperatura de 4 °C ( $6.66 \pm 0.29$  y  $5.33 \pm 0.29$  respectivamente) (Tabla 15). El TLM mostró la misma tendencia que con la mortalidad acumulada. En general, a los tres meses se observa también que la virulencia (valores de TLM mayores) disminuye en mayor grado en los conidios almacenados a 28 °C, independientemente de los formulantes utilizados.

**Tabla 15. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-511/3 sin tratamiento de glicerol**

		4 °C		28 °C	
		Mortalidad		Mortalidad	
		acumulada (%)	TLM (h)	acumulada (%)	TLM (h)
Tween 80 1 %	Inicial	54.66 ± 0.29 <sup>bc</sup>	71.25	57.33 ± 0.29 <sup>ab</sup>	77.18
	3er mes	20.0 ± 0 <sup>fg</sup>	94.26	10.66 ± 0.29 <sup>ij</sup>	115.56
Traspore 1%	Inicial	49.33 ± 0.29 <sup>cde</sup>	67.23	50.66 ± 0.29 <sup>cd</sup>	66.0
	3er mes	25.33 ± 0.29 <sup>f</sup>	92.86	6.66 ± 0.29 <sup>j</sup>	117.5
Acemin-E 1 %	Inicial	61.33 ± 0.29 <sup>a</sup>	63.75	60.0 ± 0 <sup>ab</sup>	63.97
	3er mes	5.33 ± 0.29 <sup>j</sup>	100.47	13.33 ± 0.29 <sup>hi</sup>	113.19
Citrolina	Inicial	46.66 ± 0.29 <sup>de</sup>	70.74	44.0 ± 0 <sup>e</sup>	70.51
	3er mes	17.33 ± 0.29 <sup>gh</sup>	95.74	17.33 ± 0.29 <sup>gh</sup>	130.84
Aceite de maíz	Inicial	60.0 ± 0 <sup>ab</sup>	65.01	58.66 ± 0.29 <sup>ab</sup>	65.04
	3er mes	20.0 ± 0 <sup>fg</sup>	94.15	10.66 ± 0.29 <sup>ij</sup>	120.83

La media corresponde al resultado de tres repeticiones con 25 ninfas por repetición.

\*Media ± EE; EE = error estándar.

\*\*En letras iguales no hay diferencias significativas (F = 337.72, gl = 19, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

Los conidios del aislado EH-511/3 con tratamiento de glicerol mostraron en todos los casos el mismo comportamiento de los mencionados anteriormente, o sea, una disminución significativa (P < 0.001) de la mortalidad al cabo de tres meses (Tabla 16). El porcentaje de mortalidad acumulada inicial significativamente mayor (P < 0.001) (62.66 ± 0.29 %) se registró en los conidios formulados en aceite de maíz. En todos los casos al tercer mes la mortalidad fue significativamente menor (P < 0.001) a las registradas como iniciales. El menor porcentaje de mortalidad se registró en conidios almacenados a temperatura ambiente y formulados en Acemin-E al 1 % (10.66 ± 0.29 %) (Tabla 16).

**Tabla 16. Mortalidad acumulada de insectos a las 72 h y Tiempo Letal Medio (TLM) del aislado EH-511/3 con tratamiento de glicerol**

		4 °C		28 °C	
		Mortalidad		Mortalidad	
		acumulada (%)	TLM (h)	acumulada (%)	TLM (h)
Tween 80 1 %	Inicial	29.33 ± 0.29 <sup>de</sup>	77.18	53.33 ± 0.29 <sup>bc</sup>	69.01
	Final	20.0 ± 0 <sup>fg</sup>	91.04	22.66 ± 0.29 <sup>efg</sup>	111.11
Traspore 1%	Inicial	29.33 ± 0.59 <sup>de</sup>	71.15	52.0 ± 0 <sup>bc</sup>	65.69
	Final	26.66 ± 0 <sup>def</sup>	89.69	25.33 ± 0.29 <sup>def</sup>	113
Acemin-E 1 %	Inicial	30.66 ± 4.6 <sup>cd</sup>	70.72	62.66 ± 0.29 <sup>a</sup>	62.12
	Final	25.33 ± 0.29 <sup>def</sup>	83.85	10.66 ± 0.29 <sup>h</sup>	169.22
Citrolina	Inicial	26.66 ± 0.29 <sup>def</sup>	76.32	49.33 ± 0.29 <sup>c</sup>	69.97
	Final	25.33 ± 0.29 <sup>def</sup>	91.97	17.33 ± 0.29 <sup>gh</sup>	131.33
Aceite de maíz	Inicial	25.33 ± 0.29 <sup>def</sup>	73.44	57.33 ± 0.29 <sup>ab</sup>	65.96
	Final	22.66 ± 0.29 <sup>efg</sup>	86.95	20.0 ± 0 <sup>fg</sup>	160.43

La media corresponde al resultado de tres repeticiones con 25 ninfas por repetición.

\*Media ± EE; EE = error estándar.

\*\*En letras iguales no hay diferencias significativas (F = 106.00, gl = 19, P < 0.001) (Prueba de Tukey).

El TLM mostró que en todos los casos la virulencia disminuyó (mayores horas) a los tres meses de almacenamiento de los conidios con bajo CH, observación igual a todos los casos anteriores, en este aislado es notoria la menor virulencia en los conidios con tratamiento de glicerol almacenados a 28 °C.

## 8. DISCUSIÓN

Debido a la importancia que han adquirido estrategias alternativas al uso de productos químicos en el combate de plagas agrícolas, el control biológico ha adquirido una gran relevancia en la actualidad por su bajo impacto ambiental, costos accesibles y su alta eficiencia biológica. El uso de hongos entomopatógenos en este control ha mostrado eficiencia (García-Sandoval y Gutiérrez-Baeza, 1998; Gutiérrez-Baeza y García-Sandoval, 1998; Vandenberg *et al.*, 1998) y seguridad en su uso (Mier *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2006).

El control biológico está siendo desarrollado y lentamente incorporado a las técnicas para el control de plagas, aun cuando es relativamente más económico el uso de plaguicidas químicos comunes. El desarrollo de nuevas tecnologías de producción de agentes microbianos permitirá disminuir sus costos (Quimby *et al.*, 2002).

Un requerimiento relevante para la producción a gran escala y aplicación de un hongo como agente microbiano contra plagas, es que el producto final debe ser formulado convenientemente para su almacenamiento por un tiempo adecuado, sin pérdidas significativas de su eficiencia como biocontrolador (Hernández-Velázquez, 2001).

Se deben hacer estudios que validen la efectividad de un agente microbiano, para conocer los rangos en los que el biocontrolador realiza su función de manera exitosa. Estos estudios comprenden una serie de experimentos tales como determinación de la temperatura óptima de desarrollo (Ouedraogo *et al.*, 1997), temperatura óptima de almacenamiento (Hernández-Velázquez, 2001), virulencia (Ekesi *et al.*, 2003), y efectos del almacenamiento (temperatura y modo de almacenaje) (Milner *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 2001).

Una vez seleccionado el agente idóneo en pruebas preliminares de laboratorio, se le debe caracterizar fenotípicamente y genotípicamente (Cavallazzi-Vargas, 2002) para así poder pasar a las pruebas definitivas en el campo agrícola.

Se han reportado algunos estudios en los que se logra mejorar la calidad de un agente de control biológico con una adecuada formulación (Hernández-Velázquez y Arredondo-Bernal, 2003), secado del material fúngico a utilizar

(Sandoval-Coronado *et al.*, 2001), adición de agentes químicos para proteger los conidios (Altre y Vandenberg, 2001a), entre otros.

En el presente estudio se pretendió alargar el tiempo de almacenamiento de producto terminado, mediante la disminución del contenido de humedad de los conidios a utilizar, y verificar la utilidad de un tratamiento de glicerol a los conidios para alargar la vida de anaquel de los mismos.

Para iniciar los estudios de producción de un agente microbiano, se debe estandarizar una metodología que permita obtener grandes cantidades de material biológico a bajo costo. Esto se logró gracias a la metodología de un cultivo bifásico para la producción de entomopatógenos (Jenkins *et al.*, 1998). Las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de cantidades importantes de conidios en sustrato de arroz, permitió la producción de cantidades importantes de *P. fumosoroseus* a un costo relativamente bajo (Basilio-Hernández, 2004). La diferencia en la producción de conidios de ambos aislados estudiados, puede ser explicada por la gran variabilidad encontrada en cepas de la misma especie en estudios previos (Cavallazzi-Vargas *et al.*, 2002; Castellanos-Moguel, 2002). El aislado más virulento reportado fue el que menos conidios produjo, sin embargo, se ha reportado que esta especie puede ser inducida a mostrar una mayor productividad si se cultiva en condiciones especiales de luz (Sánchez-Murillo *et al.*, 2004).

Para la obtención de conidios con tratamiento de glicerol, se propuso de manera inicial agregar el glicerol al sustrato de cultivo (arroz), sin embargo, esta forma de producción inhibió el desarrollo fúngico, y por consiguiente se reflejó en una muy baja producción de conidios. El motivo puede ser explicado debido a que la adición de glicerol al arroz aumentó la humedad del mismo. En estudios previos se había demostrado que el arroz con un gran contenido de humedad inhibía el desarrollo del hongo y favorecía la rápida aparición de hongos contaminantes (Basilio-Hernández, 2004). Debido a estos resultados, se seleccionó el tratamiento con un contacto directo de los conidios con el glicerol durante 14 días, después de su cosecha del arroz.

En este trabajo, se demostró que los agentes formulantes no tuvieron un efecto adverso en conidios frescos al cabo de 120 h de contacto. Kubilay y Gökce (2004) reportan que *P. fumosoroseus* resiste altas concentraciones de algunos productos químicos de uso extensivo en el campo agrícola, principalmente pesticidas químicos, durante los dos primeros días. Al cabo de 14 días encontraron que la viabilidad de los conidios disminuyó, pero éstos aun mantuvieron un considerable nivel de viabilidad. La disminución de la viabilidad que encontramos en los conidios al cabo de cinco meses en contacto con los formulantes puede deberse a productos químicos y/o biológicos (por ejemplo, metabolitos secundarios de plantas) que interfieren con los procesos vitales del hongo, inhibiendo o retardando la germinación de los propágulos fúngicos (Vega *et al.*, 1997). Resultados similares también se han observado para otros entomopatógenos de amplio uso en el campo agrícola. Stathers *et al.* (1993) realizaron un estudio similar en conidios de *Metarhizium flavoviride* observando que los aceites mineral, vegetal y animal, no tuvieron efectos adversos en la viabilidad de los conidios al cabo de 1 semana, pero al cabo de 4 meses se detectó una disminución considerable de la misma.

El contenido de humedad de los conidios inmediatamente después de la cosecha se mantuvo alto, debido a la metodología misma (cosecha con Tween 80 al 1 %). En el presente trabajo se logró disminuir el CH de los conidios aproximadamente al 8 %, después de 72 horas en el proceso de secado en el horno de vacío. Hallsworth y Magan (1999) reportan que conidios de diferentes especies de entomopatógenos permanecen viables por más tiempo sin afectar considerablemente su virulencia, al disminuir el CH de los conidios. Resultados similares se observaron en muestras de propágulos fúngicos de *P. fumosoroseus* (blastosporas, conidios sumergidos y conidios aéreos) al ser desecados por diferentes métodos (desecación con sílica gel, arena y tierras diatomeas) (Cliquet y Jackson, 1997).

El CH obtenido en el presente trabajo permitió una viabilidad alrededor del 96 % al cabo de un mes. En el aislado EH-506/3 se obtuvo una viabilidad superior al 58 % al cabo de 5 meses, y para el aislado EH-511/3 la viabilidad permaneció

arriba del 51 %. Estos resultados concuerdan con trabajos similares realizados con anterioridad para muestras de conidios de diferentes especies de hongos, incluyendo *Paecilomyces* spp. donde un bajo CH alargó la viabilidad de los conidios (Stathers *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 1997).

En la determinación del tiempo de anaquel mediante la determinación de la viabilidad, se encontró que al tercer mes los conidios del aislado EH-506/3 disminuyó a valores aproximados del 70 %. Se encontró que en todos los casos (temperatura de almacenamiento y tratamiento o no de glicerol), la disminución fue similar. El tratamiento de glicerol para este aislado no alargó el tiempo de anaquel, ya que la comparación de los valores de la viabilidad sin y con tratamiento fue similar. Así mismo, la temperatura en que se almacenaron los conidios tampoco mostró diferencias significativas entre tratamientos.

Hong *et al.* (2000) realizaron pruebas de viabilidad de conidios de *M. flavoviride* con el CH disminuido, y encontraron que la viabilidad de estos conidios disminuyó considerablemente al realizar el proceso de secado de manera rápida. Por el contrario, un proceso de secado un poco más lento (alrededor de 5 días) ofrece mejores condiciones de viabilidad para conidios que van a ser almacenados por algún tiempo. El tiempo usado en este estudio para el secado de los conidios fue de 72 h (3 días). Se sugiere probar otros tiempos o procesos de secado para evaluar si la velocidad de secado usado en este estudio tiene un efecto adverso en los conidios de los aislados estudiados.

Datos similares se observaron en Moore y Higgins (1997), quienes mostraron una disminución del 30 % aproximadamente en la viabilidad de conidios de *M. flavoviride* con un bajo CH, al cabo de 20 días, almacenados a temperatura ambiente. En ese mismo trabajo se observó que la mejor temperatura para almacenar conidios con bajo CH fue a -10 °C. Estos datos sugieren que en nuestro trabajo, la temperatura de 4 °C no ofreció ventajas en el almacenamiento de conidios de *P. fumosoroseus* con el tratamiento de glicerol, al observar valores similares de viabilidad al cabo de tres meses para ambos aislados estudiados al compararlos con los datos obtenidos a temperatura ambiente.

Fargues y Bon (2004) estudiaron la influencia de la temperatura en el desarrollo de cepas de *P. fumosoroseus*. Encontraron que algunas cepas de este hongo pierden viabilidad al ser almacenadas en refrigeración, también sugieren que la mejor temperatura de almacenamiento es de alrededor de -5 °C. Batta (2003) reporta también una disminución en la viabilidad de conidios de *M. anisopliae* con un bajo CH. Al cabo de 2 meses encontró una disminución del 30 % de la viabilidad. Se menciona que los dos factores más importantes a considerar en estudios de este tipo, son el tiempo y la manera en que se disminuye el CH.

El glicerol y otros polioles ofrecen a los conidios ventajas para su almacenamiento, ya que altas concentraciones de estos compuestos en el interior de las células fúngicas, permite conservar la función y estructura enzimática, así como un mantenimiento de la actividad metabólica durante largos periodos cuando el CH es bajo (Hallsworth y Magan, 1994; 1995). Las ventajas del glicerol para mejorar el tiempo de conservación es evidente en especies como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *acridum*, pero a temperaturas menores de -10 °C.

El glicerol otorga beneficios en la conservación de los conidios, pero los resultados consultados en la bibliografía indican temperaturas menores a 0 °C, por lo tanto, se sugiere ampliar el intervalo de temperaturas de almacenamiento, por ejemplo, a temperaturas menores a 0 °C.

Referente a la virulencia, este hongo ha sido caracterizado como altamente virulento hacia la plaga de la mosquita blanca, principalmente *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, pero también es patógeno de otras plagas como *Plutella xilostella* (Aitre *et al.*, 1999) y *Diuraphis noxia* (Vandenberg *et al.*, 1998). Se han desarrollado diferentes tipos de bioensayos donde se valida la efectividad del hongo contra la plaga, entre ellos, destaca el que desarrollaron Vidal *et al.* (1997), bioensayo que fue modificado para nuestro trabajo.

El aislado EH-506/3 sin tratamiento de glicerol registró al inicio una gran virulencia, alcanzando los valores más altos de mortalidad acumulada en los conidios formulados en aceites, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Mientras que con Tween 80 (acuoso) se registró la menor

mortalidad. Esta variación en la virulencia entre formulaciones sugiere que los aceites en que se formularon los conidios permiten una mejor distribución del formulado sobre la hoja, ya que su superficie es lipofílica; en cambio, se observó que la suspensión de Tween 80 no se distribuyó uniformemente, al quedar gotitas de formulado atrapadas en los tricomas de la hoja. Los aceites formaron una capa uniforme que cubrió toda la superficie foliar. Con este mismo aislado pero con tratamiento de glicerol, se observó también virulencia inicial alta, sin embargo, los conidios formulados en aceites y almacenados a temperatura ambiente mostraron menores valores de virulencia, sugiriendo una asociación negativa entre el tratamiento de glicerol y la temperatura de 28 °C para el almacenamiento, ya que independientemente del tratamiento de glicerol, se observó que los conidios que presentaron la mejor virulencia fueron aquellos almacenados a temperatura de refrigeración. Altre y Vandenberg (2001b) concuerdan en que dentro de un mismo ensayo se pueden presentar diferencias en la virulencia, las cuales dependen de diversos factores, tales como el estadio del insecto problema, la dureza de la cutícula del insecto, e incluso la zona de la hoja donde se asperja el hongo. Al cabo de tres meses, la disminución más evidente de la virulencia se mostró en los conidios almacenados a temperatura ambiente. Este dato concuerda con otros estudios (Altre y Vandenberg, 2001a) que muestran que la temperatura de refrigeración mantiene por más tiempo la viabilidad de los conidios.

En el caso de la disminución de la virulencia tan marcada con una viabilidad de conidios semejante sugiere que el tratamiento de glicerol puede afectar las propiedades de la pared celular del conidio, incluyendo la hidrofobicidad del mismo (Dunlap *et al.*, 2005).

Con el aislado EH-511/3 en los conidios con tratamiento de glicerol y almacenados a 4 °C, se observó que a pesar de tener una viabilidad alta (cercana al 100 %) los valores de virulencia fueron bajos. En este caso, el glicerol pudo afectar las características de la pared conidial (Dunlap *et al.*, 2005) y además por el hecho que el glicerol protege a los conidios pero cuando se van a conservar a temperaturas inferiores a 0 °C (Hallsworth y Magan, 1994). A 4 °C no se pudo

observar la eficiencia del glicerol en el mantenimiento de la virulencia de los conidios.

El aislado EH-506/3 siempre mostró valores más altos de virulencia que el EH-511/3, apoyando la caracterización previa de virulencia en otros estudios (Cavallazzi-Vargas *et al.*, 2002).

En nuestro trabajo, el tratamiento de glicerol no ofreció ventajas para la conservación de los conidios de los aislados de *P. fumosoroseus* estudiados, ya que se mostraron valores similares en todos los casos (temperaturas de almacenamiento y formulante). Nuestros resultados sugieren realizar estudios donde se hagan comparaciones en las características electrostáticas e hidrofóbicas entre *P. fumosoroseus* y otros entomopatógenos (Dunlap *et al*, 2005), y así ajustar un ensayo basado en las características propias para este hongo.

Para verificar si efectivamente hay un efecto adverso en la virulencia al paso del tiempo, se sugiere realizar pruebas inoculando la misma cantidad de conidios viables al inicio y al final, ya que hay que considerar que la viabilidad conidial a los tres meses fue del 70 %. Una disminución de la virulencia puede ser atribuida a que se estaban asperjando menos conidios viables al final, y no propiamente a la disminución de la virulencia al cabo del tiempo del ensayo.

## 9. CONCLUSIONES

- El aislado EH-506/3 produce menos conidios por gramo de sustrato pero mayor virulencia que el EH-511/3, ambos son virulentos, lo que sugiere la probabilidad de usar una mezcla de ambos para ensayos en campo.
- Los formulantes ensayados no afectan los conidios al cabo de 120 h, independientemente de la temperatura de almacenamiento, lo que sugiere que si los conidios con bajo contenido de humedad (CH) son almacenados por varios meses, se podrían formular entre 1-5 días antes de ser aplicados al campo.
- El contenido de humedad (CH) alcanzado en los conidios fue de 8 % después de 72 h de secado al vacío, en comparación con otros estudios que tardan hasta 15 días.
- Los conidios con CH bajo disminuyeron su viabilidad al 70 % al cabo de tres meses, independientemente del aislado, tratamiento de glicerol y temperatura de almacenamiento, sugiriendo que el almacenamiento debe ser a menores temperaturas.
- La mayor virulencia del aislado EH-506/3 sin tratamiento de glicerol se alcanzó con los conidios formulados en aceite de maíz y citrolina; la mayor virulencia de este aislado con tratamiento de glicerol se alcanzó en conidios formulados en Acemin-E; la mayor virulencia del aislado EH-511/3 sin tratamiento de glicerol se alcanzó en conidios formulados en aceite de maíz y Acemin-E; y la mayor virulencia de este aislado con tratamiento, se alcanzó en conidios formulados en Acemin-E, estos datos sugieren el uso de aceites para su aplicación en campo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Altre, J.A., Vandenberg, J.D., Cantone, F.F. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xilostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 332-338.
- Altre, J.A., Vandenberg, J.D. 2001a. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 81-86.
- Altre, J.A., Vandenberg, J.D. 2001b. Factors influencing the infectivity of isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against diamondback moth, *Plutella xilostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 31-36.
- Basilio-Hernández, D.H. 2004. Termotolerancia y producción de conidios en sustrato sólido de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- Batta, Y.A. 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection* 22: 415-422.
- Bateman, R.P. 1992. Controlled droplet application of mycoinsecticides to locust. En: Lomer, C.J., Prior, C., (Eds.). *Biological control of locust and grasshoppers*. CAB International Publishing, UK. pp. 249-254
- Berlanga-Padilla, A.M., Hernández-Velázquez, V.M. 1995. Viabilidad de conidias de *Paecilomyces fumosoroseus* formuladas como polvo humectable. En: *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas, México. Nov 9-10. pp 66-67.
- Braga, G.L., Flint, S.D., Millar, C.D., Anderson, J., Roberts, D.W. 2001. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus. *Photochemistry and Photobiology* 74: 734-739.
- Byrne, D. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36: 431-457.
- Castellanos-Moguel, M.J. 2002. Relación entre los niveles de proteasa y quitinasa en aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y

- Smith y su patogenicidad hacia la mosquita blanca. Tesis de Maestría. IPN. México.
- Cavallazzi-Vargas, G., Basilio-Hernández, D.H., Reyes-Montes, M. R., Aranda, E., Berlanga-Padilla, A., Toriello, C. 2002. Determinación de la virulencia por medio del tiempo letal medio (TLM) de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* de México en mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). En: Báez, R., Juvera, J., (Eds.) Memorias del XXV Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico, 14-15 noviembre. Hermosillo, Sonora, México. pp 144-146.
- Cavallazzi-Vargas, G.M. 2002. Caracterización genotípica de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith aislado en México y análisis de su virulencia *in vitro* en la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de Mestría. UNAM. México.
- Charnley, A., St. Leger, R. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole, T.G., Hoch, C.H. (Eds.). The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, N.Y. pp. 203-207.
- Clarkson, J. M., Charnley, A. 1996. New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology 5: 197-202.
- Cliquet, S., Jackson, M.A. 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.
- Domsch, K., Gams, W., Anderson, T. 1980 Compendium of Soil Fungi. Academic Press, New York. pp. 529-530.
- Dunlap, C.A., Biresaw, G., Jackson, M.A. 2005. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 46: 261-266.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. Journal of Invertebrate Pathology 83: 157-167.

- Fargues, J., Bon, M. 2004. Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. *Journal of Invertebrate Pathology* 87: 94-104.
- Finney D.J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, London.
- García-Sandoval, J., Gutiérrez-Baeza, A., 1998. Impacto de *Paecilomyces fumosoroseus* contra la mosca blanca *Bemisia tabaci* en Quintana Roo. En XXI Congreso Nacional de Control Biológico. SAGAR. Tamaulipas, México. Nov. 5-6. pp 189-192
- Gutiérrez-Baeza, A., García-Sandoval, J., 1998. Efecto de *Paecilomyces fumosoroseus* contra mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en chile jalapeño. En XXI Congreso Nacional de Control Biológico. SAGAR. Tamaulipas, México. Nov. 5-6. pp 193-195
- Hallsworth, E., Magan, N. 1994. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology* 140: 2705-2713.
- Hallsworth, E., Magan, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*. 141: 1109-1115.
- Hallsworth, E., Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomopathogenic fungi *Bauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 261-266-
- Hernández-Velázquez, V.M., Berlanga-Padilla, A. Barrientos-Lozano, L. 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* to control the central american locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research* 9: 223-227.
- Hernández Velázquez, V.M., 2001. Formulación y aplicación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Walker) para el control de *Schistocerca piceifrons piceifrons* en México. En: Memoria del Taller Internacional de Transferencia de Tecnología en Control Microbiano de Langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* WALKER. 2-5 octubre 2001, Mérida, Yucatán, México. pp 63-67.

- Hernández-Velázquez, V.M., Arredondo-Bernal, H.C. 2003. Formulación y aplicación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae acridum* Driver & Milner (Hyphomycetes) para el control de *Schistocerca piceifrons* Walker (Orthoptera: Acrididae) en México. *Vedalia* 9-10: 85-91.
- Inglis, G., Johnson, D., Goettel, M. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycoses (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptendulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology* 26: 400-409.
- Hong, T.D., Ellis, R.H., Moore, D. 1997. development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Annals of Botany* 79: 121-128.
- Hong, T.D., Jenkins, N.E., Ellis, R.H. 2000. The effect of duration of developmental drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research* 104: 662-665.
- Jackson, M. A., McGuire, M. R., Lacey, L. A., Wraight, S. P. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research* 101: 35-41.
- Jenkins, N.E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A.J., Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides, *Biocontrol News and Information* 19: 21N-31N.
- Kubilay, M., Gökce, A. 2004. Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biological Control* 31: 398-404.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. 2001. Biological control of locust and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46: 667-702.
- Mier, T., Olivares-Redonda G., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana, M., Pérez-Torres, A., Toriello, C. 2005. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from Whiteflies. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 103-111.
- Milner, R.J., Staples, J., Lutton, G. 1997. The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 64-69.

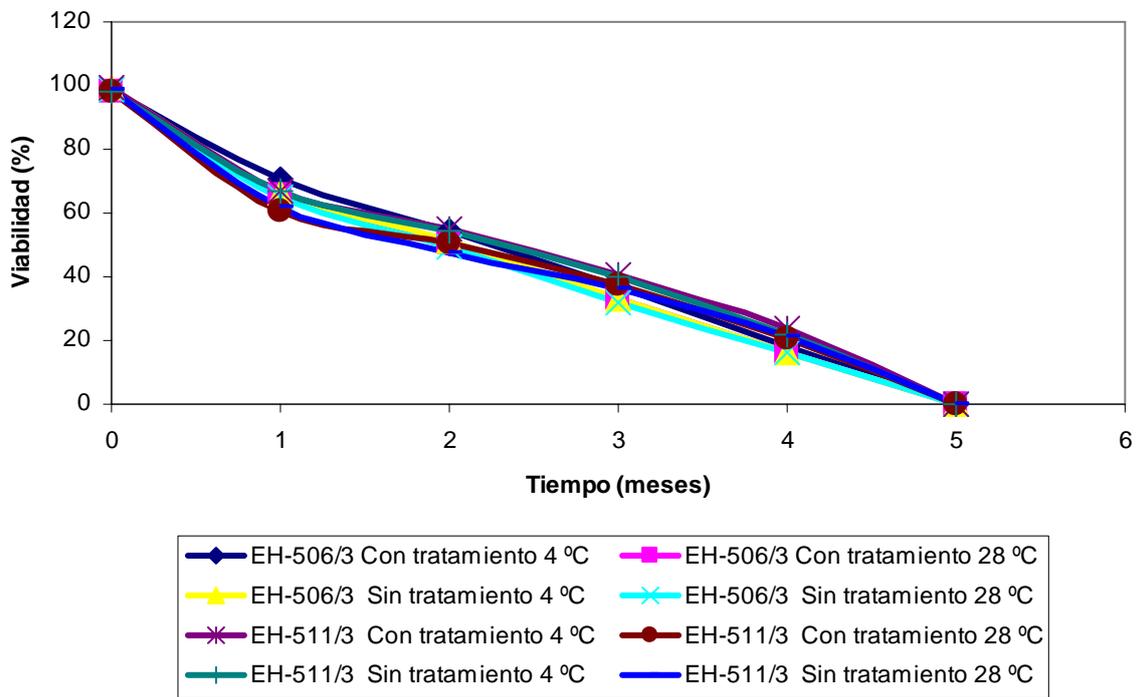
- Moore D., Bateman, R.P., Carey M., Prior, C. 1995. Long-term flavoviride conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers, storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science Technology* 5: 193-199.
- Moore, D., Higgins, P.M. 1997. Viability of stored conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, produced under differing culture regimes and stored with clays. *Biocontrol Science and Technology* 7: 335-343.
- Ortega, A. L. 1991. Mosquitas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) vectores de virus en hortalizas. En: *Plagas de hortalizas y su manejo en México*. Amaya, S., Bautista, N. (Eds.). Centro de Entomología y Acarología, Sociedad Mexicana de Entomología. p 13-16.
- Osborne, L., Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist* 75: 465-471.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C. 1997. Effect of temperatura on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137: 37-43.
- Pineda, S., Alatorre-Rosas, R. 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* sobre la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. En: XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas, México. Nov 9-10. p 77-78.
- Prior, C., Jollands, P., Le Patourel, H. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhyctes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 66-72.
- Prior, C., Greathead, D.J. 1989. Biological control of locust: the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin* 37: 37-48.
- Profeco, 2002. Aceites vegetales comestibles. *Revista del Consumidor* 305: 1-7.
- Quimby, P.C., King, L.R., Grey, W.E. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88: 147-152.

- Ramírez, M. R. 1996. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía, Culiacán, Sinaloa. México.
- Robles, N., 2002. Patogenicidad de *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecanii* en mosquita blanca bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
- Rodríguez, L. 1993. Aspectos generales del control biológico. En: Memoria del II Taller sobre Control Biológico de mosquita blanca. Culiacán, Sinaloa, México. CNRCB. SARH. Dic. 1-3. pp 3-5.
- Ruiz, V., Ibarra, J., Perez, P. 1995. Bioensayos con hongos entomopatógenos de mosquita blanca a distintas humedades relativas. En: XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas, México. Nov 9-10. pp 72-74.
- Sánchez, A., Geraud-Pouey, F., Esparza, D. 1997. Biología de la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y potencial para desarrollar sus poblaciones sobre cinco especies de plantas hospederas. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) Venezuela 14: 193-206.
- Sánchez-Murillo, R.I., De la Torre-Martínez, M., Aguirre-Linares, J., Herrera-Estrella, A. 2004. Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. Microbiology 150: 311-319.
- Sandoval-Coronado, C.F., Luna-Olvera, H.A., Arévalo-Niño, K., Jackson, M.A., Poprawski, T.J., Galán-Wong, L.J. 2001. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 423-428.
- Stathers, T.E., Moore, D., Prior, C. 1993. The effect of different temperatures on viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. Journal of Invertebrate Pathology 62: 111-115.
- Toriello, C., Pérez, A., Burciaga-Díaz, A., Navaro-Barranca, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana-Jiménez, M., Mier, T. 2006. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. Ecotoxicology and Environmental Safety. In press.

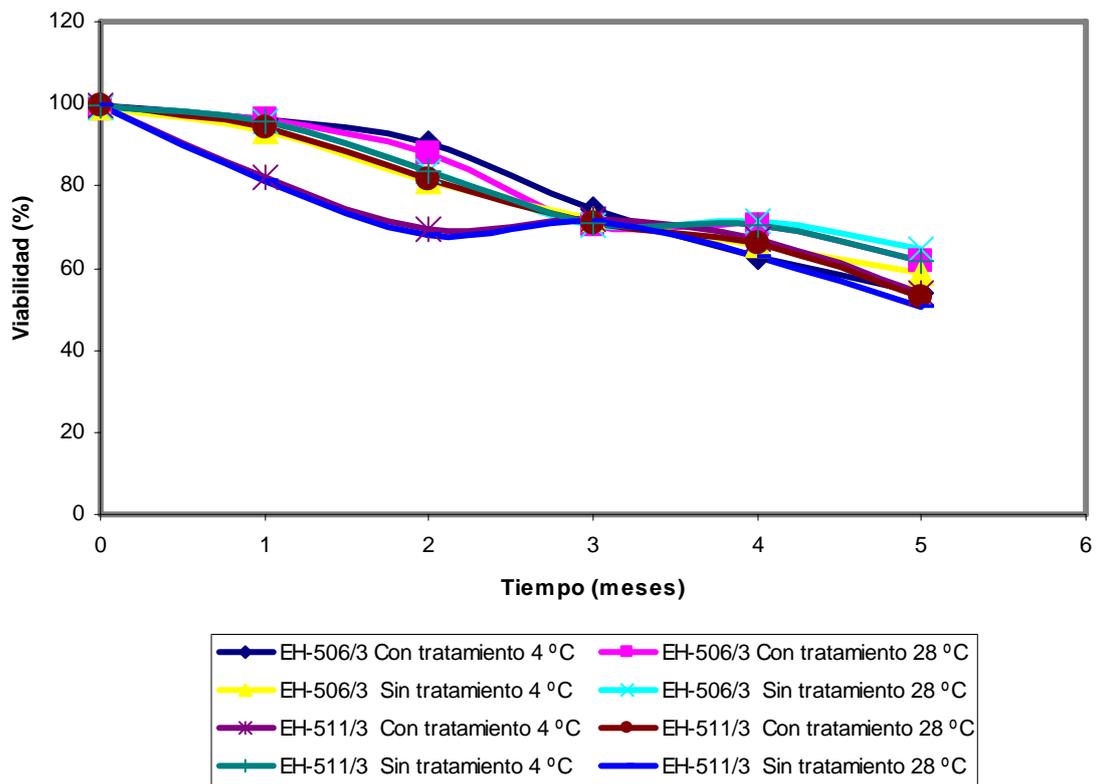
- Vandenberg, J.D., Jackson, M.A., Lacey, L. 1998. Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the russian wheat aphid. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 181-183.
- Vega, F.E. Dowd, P., McGuire, M., Jackson, M.A., Nielsen, T. 1997. *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 70:209-213.
- Vidal, C., Lacey, L.A., Fargues, J. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *Journal of Economic Entomology* 90: 765-771.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., de Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International Publishing, UK. pp. 253-287.
- Yañez, M. 1990. La mosquita blanca. Agromundo, Sepomex, México. pp. 14-22.

## ANEXOS

### I. VIABILIDAD DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* FORMULADOS EN TWEEN 80 AL 1 %



### II. VIABILIDAD DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* FORMULADOS EN TRASPORE AL 1 %

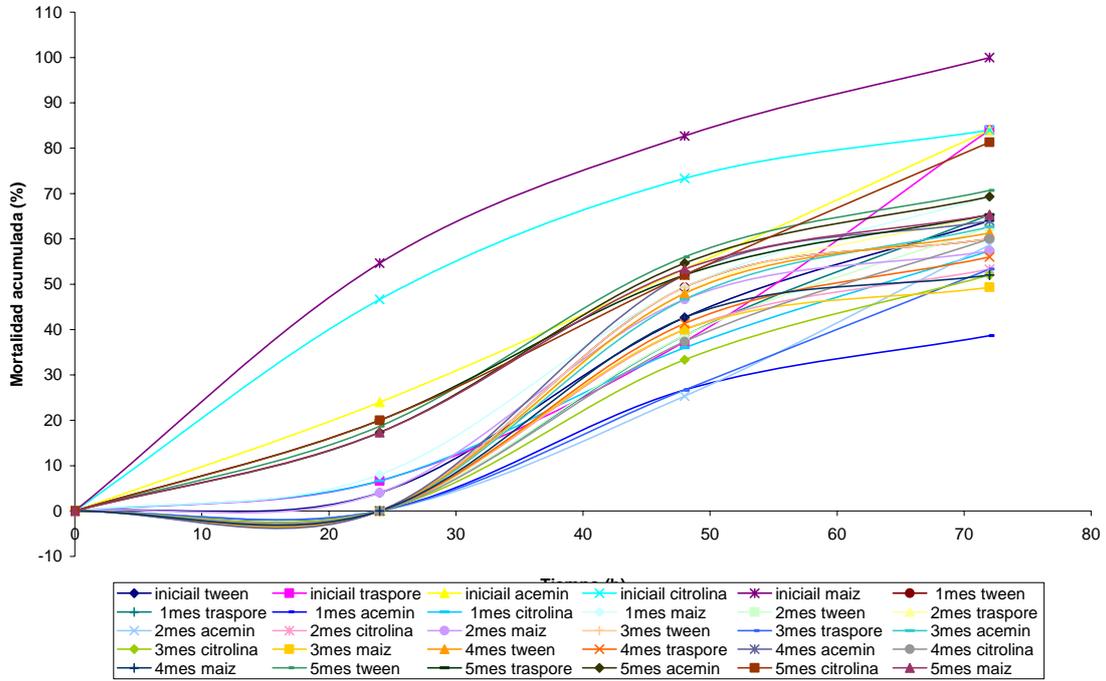




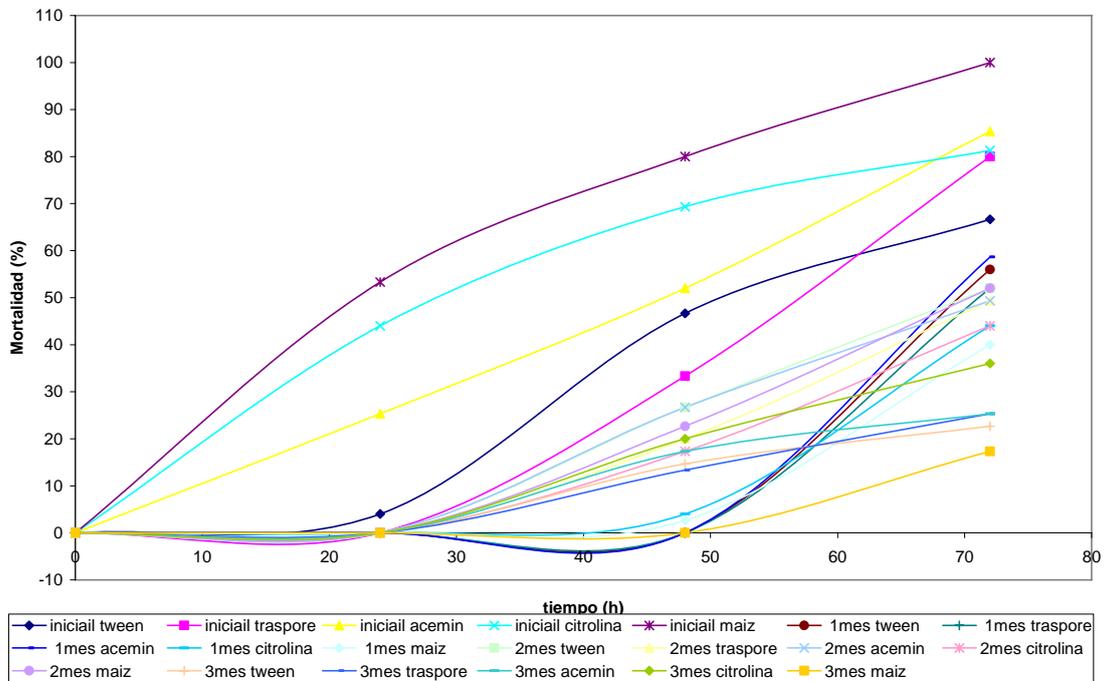


## VI. MORTALIDAD ACUMULADA DE INSECTOS A LAS 72 h DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* EH-506/3 SIN TRATAMIENTO DE GLICEROL

EH-506/3 sin tratamiento 4 °C

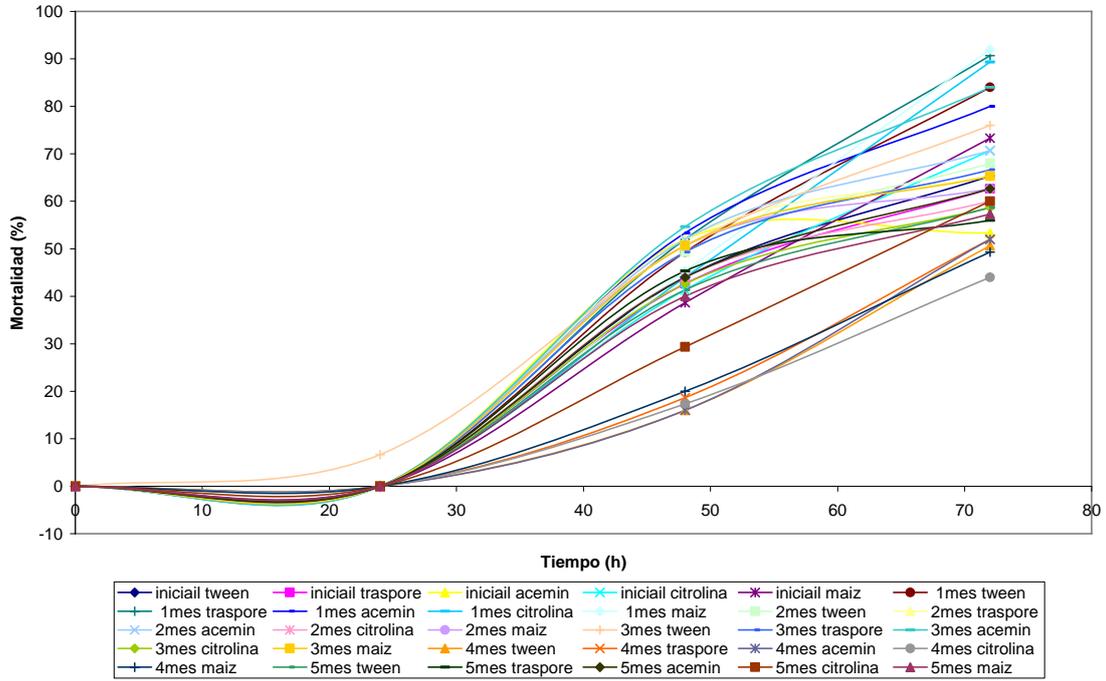


EH-506/3 sin tratamiento 28 °C

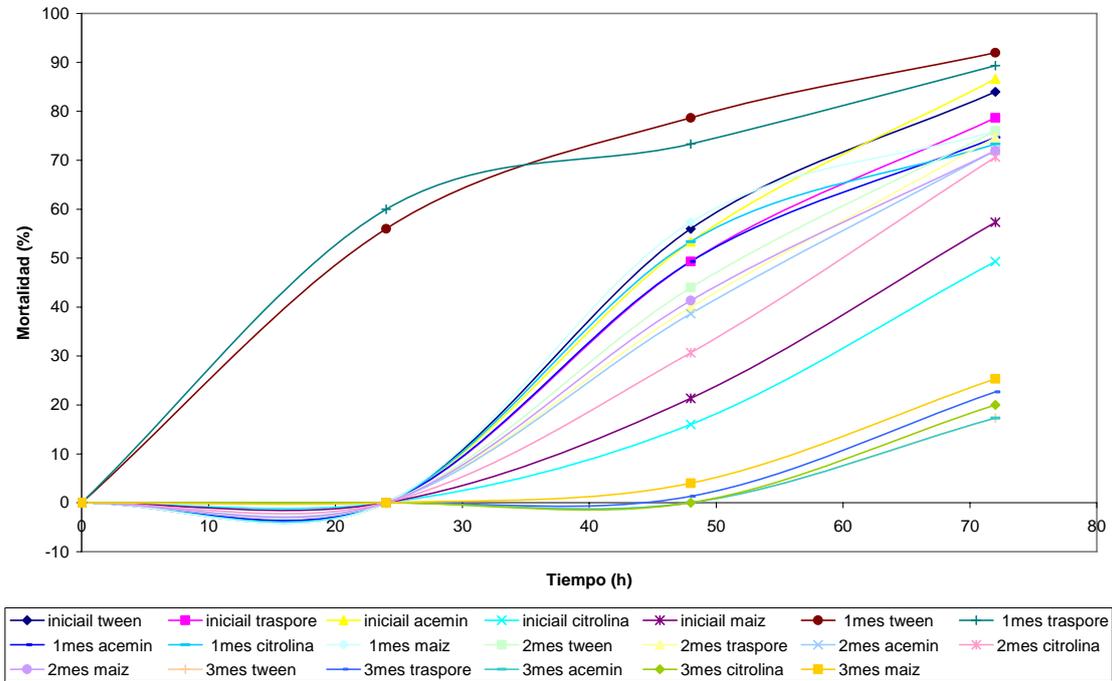


## VII. MORTALIDAD ACUMULADA DE INSECTOS A LAS 72 h DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* EH-506/3 CON TRATAMIENTO DE GLICEROL

EH-506/3 con tratamiento 4 °C

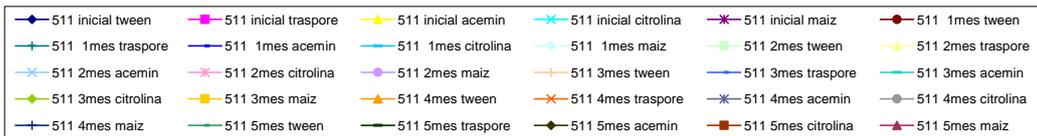
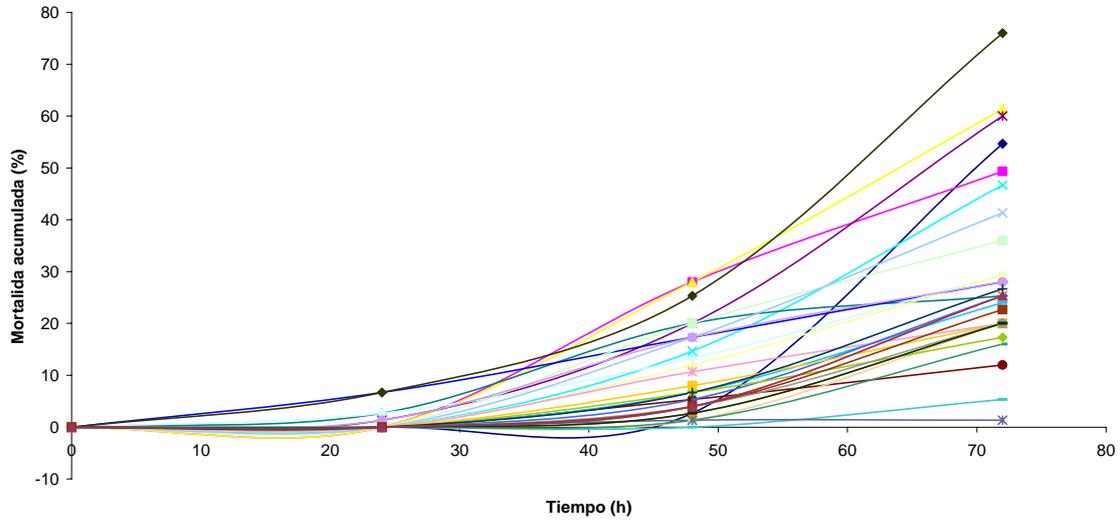


EH-506/3 con tratamiento 28 °C

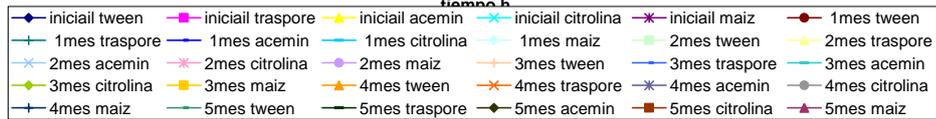
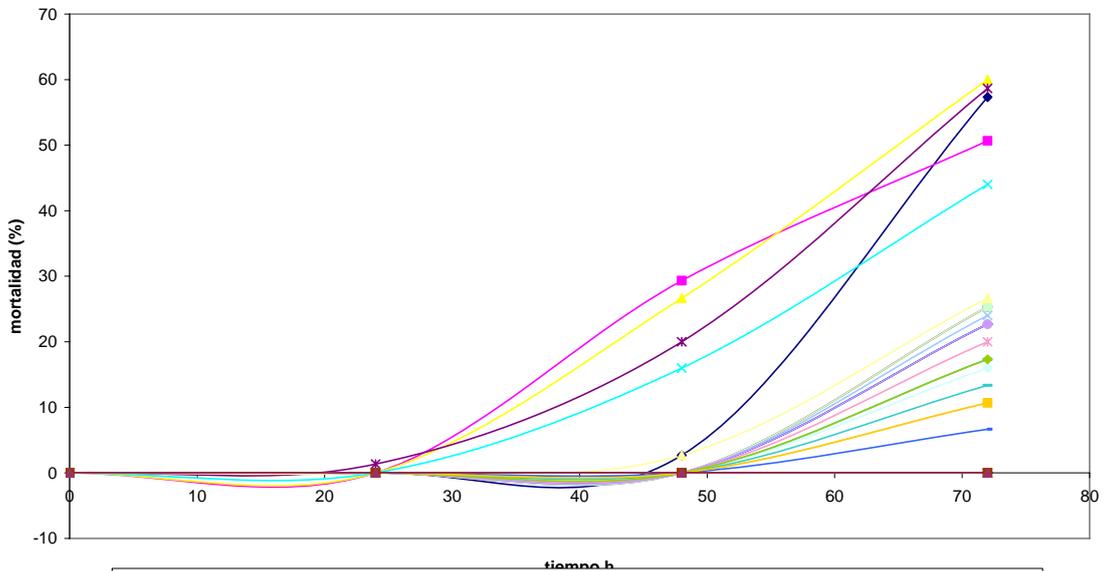


## VIII. MORTALIDAD ACUMULADA DE INSECTOS A LAS 72 h DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* EH-511/3 SIN TRATAMIENTO DE GLICEROL

EH-511/3 sin tratamiento 4°C

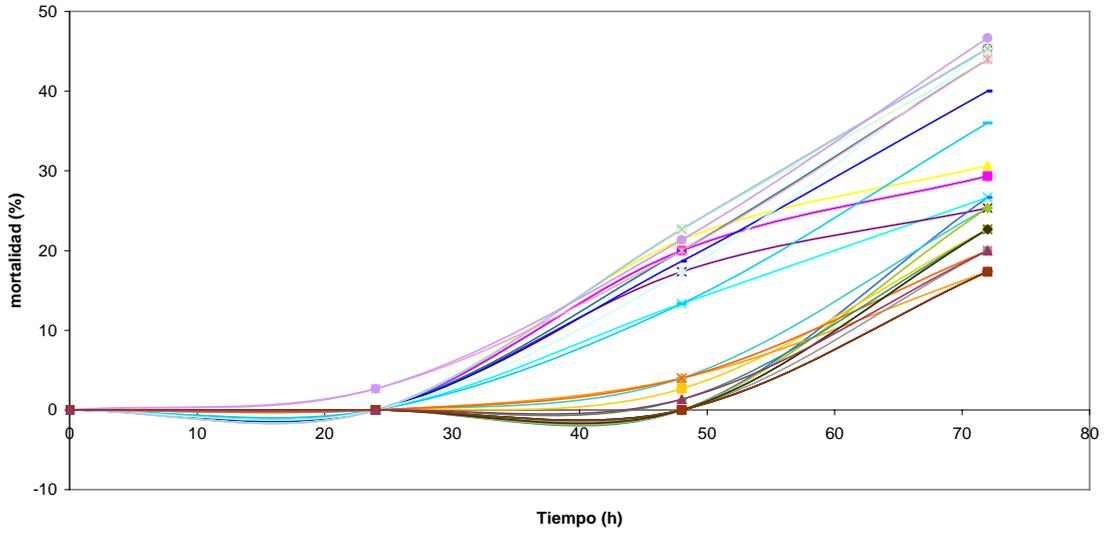


EH-511/3 sin tratamiento 28 °C



# IX. MORTALIDAD ACUMULADA DE INSECTOS A LAS 72 h DE CONIDIOS DE *P. fumosoroseus* EH-511/3 CON TRATAMIENTO DE GLICEROL

EH-511/3 con tratamiento 4 °C



EH-511/3 con tratamiento 28 °C

