

**PRODUCCION MASIVA Y PREFORMULACION DE *Verticillium lecanii* (Zimm.)VIEGAS
PARA EL CONTROL BIOLOGICO DE LA MOSCA BLANCA DE LOS INVERNADEROS
Trialeurodes vaporariorum (Westwood)¹**

Claudia Marcela Quintana²
Adriana Consuelo Vanegas²
Alba Marina Cotes P.³

Resumen

Se aislaron 41 cepas nativas de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas (Deuteromycete: Moniliales) a partir de adultos de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) visiblemente parasitadas por el hongo en cultivos de frijol de la región del Sumapaz. En pruebas biológicas de invernadero se evaluaron algunas cepas por su actividad insecticida y se seleccionó una como promisoría para el control de la mosca blanca. Con el objeto de evaluar esta cepa a nivel de campo. En un trabajo paralelo se ensayaron para la producción masiva diferentes medios de cultivo con base en sustratos naturales, obteniendo los mejores rendimientos y productividad (54×10^7 UFC / ml), en el medio de cultivo con base en arroz cocido licuado líquido incubado a 25°C durante 12 días en condiciones de luz constante. Con el propósito de darle estabilidad al hongo frente a condiciones adversas, la biomasa obtenida en este medio de cultivo se mezcló con los protectores de luz ultravioleta CBUV 01 y CBUV 02, , estas mezclas fueron sometidas a dos procesos de secado; en estufa con corriente de aire a 25°C y mediante liofilización para posteriormente obtener un polvo. Para su aplicación en campo el polvo preformulado fue diseñado para reconstituirse en una base autoemulsificable que contenía una mezcla de aceite vegetal, Tween 80, Span 60 y un agente gelificante, que le sirve como vehículo y le proporciona protección y adherencia, para finalmente llevarlo al volumen de aplicación. Se demostró que los dos protectores de luz ultravioleta le brindaron

¹ Trabajo de tesis para optar al título de bacteriólogo.

² Estudiantes de bacteriología. universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

³ P.h. D. Directora laboratorio de control biológico. CORPOICA "Tibaitatá"

protección al hongo. Sin embargo el protector CBUV 02 fue el que le confirió la mayor protección cuando la biomasa preformulada fue secada mediante liofilización.

Materiales y Métodos

Aislamiento y conservación de *Verticillium lecanii*

El aislamiento de 41 cepas de *V. lecanii* se hizo a partir de 59 muestras de adultos de mosca blanca en cultivos de frijol y habichuela provenientes de cinco municipios de la región del Sumapaz (Silvania, Pasca, Fusagasugá, Arbelaez y San Bernardo). Las muestras colectadas presentaban síntomas claros de parasitismo por hongos entomopatógenos.

Los insectos colectados, fueron ubicados en cámaras húmedas, constituidas por una caja de Petri de 5 cm de diámetro que tenía en la base un papel filtro humedecido con agua destilada estéril. Sobre el papel se colocaron los insectos que estaban presumiblemente contaminados con hongos entomopatógenos. Las cajas de Petri se colocaron en una cubeta plástica. Las cubetas fueron tapadas e incubadas a 25°C en condiciones de oscuridad constante.

Después de 5 y 6 días de incubación el hongo fue aislado en medio de cultivo agar agua, e incubado por 4 ó 5 días a 25°C. Después de realizar la identificación microscópica del hongo, éste fue repicado en medio PDA (papa-dextrosa-agar), el cual se incubó durante 8 días a 25°C en oscuridad. Los aislamientos purificados fueron codificados como cepas VI seguida del número consecutivo correspondiente al aislamiento de *V. lecanii* y conservadas en el banco de cepas del programa de Manejo integrado de plagas (MIP), en tubos de medio PDA, crecido bajo las condiciones descritas anteriormente y en suelo estéril. La conservación de las cepas en suelo, se hizo a partir de una suspensión concentrada de esporas en agua destilada estéril obtenida de cultivos crecidos en PDA. 250 µl de la suspensión se inocularon en 0.5 g de suelo tamizado y esterilizado, contenido en ampollitas de vidrio con capacidad de 2 ml; luego fueron selladas herméticamente al vacío. Las cepas así conservadas fueron mantenidas a 9°C. Para

reconstituir las cepas a partir de suelo, se depositaron algunas partículas sobre una caja de PDA, la cual fue incubada a 25°C durante 8 días.

Las cepas aisladas fueron evaluadas tanto en invernadero como en campo en un trabajo realizado por García (1996), evaluando su actividad insecticida contra la mosca blanca de los invernaderos *T. vaporariorum*.

Para reactivar las cepas de *V. lecanii* en el insecto plaga, se tomaron 15 adultos de la mosca blanca, las cuales fueron introducidos en cámaras húmedas, en las que previamente se había introducido un trozo de medio de PDA con crecimiento del hongo esporulado. Una vez se observó desarrollo de micelio sobre los insectos se realizó el aislamiento del hongo en medio PDA.

Evaluación de diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *V. lecanii*

Con el propósito de buscar un medio de cultivo adecuado para el aislamiento del hongo bajo condiciones de laboratorio se ensayaron los siguientes medios semisintéticos: agar agua, agar papa dextrosa (PDA), agar Saboureaud, agar Saboureaud Rosa de Bengala, agar Rosa de Bengala, agar suelo y agar avena. Los ensayos fueron realizados con la cepa VL16 aislada de adultos de mosca blanca provenientes de un cultivo de habichuela de la región de Sumapaz, seleccionada por su capacidad para producir micelio y esporulación abundante. Los medios semisintéticos contenidos en cajas de Petri de 9.0cm de diámetro se inocularon en superficie con 0.1ml de una suspensión de propágulos de *V. lecanii* que contenía una concentración de 5×10^6 propágulos/ml homogenizando el inóculo por medio de un rastrillo de vidrio. Las cajas de Petri fueron incubadas a 25°C durante 15 días en condiciones de oscuridad constante.

Cada medio de cultivo se sembró en tres cajas Petri. Se evaluó el tipo de crecimiento y desarrollo en el tiempo teniendo en cuenta las características macroscópicas de las colonias (crecimiento micelial y esporulación).

Medios naturales

Se evaluaron diferentes medios de cultivo con base en sustratos naturales para buscar el medio de producción masiva del entomopatógeno de mayor rendimiento, productividad, facilidad de manejo y bajo costo. Los medios ensayados tuvieron sustratos con base en papa, zanahoria, papa-zanahoria, frijol, cebada, salvado, avena y arroz. A este último se le efectuaron modificaciones en su consistencia. Se utilizaron diferentes cantidades de cada uno de los sustratos, buscando que el medio de cultivo ocupará un área de crecimiento semejante donde el hongo pudiera desarrollarse.

Los medios de cultivo contenidos en Erlenmeyer de 500 ml fueron inoculados con 2 ml de una suspensión del hongo a una concentración de 5×10^6 propágulos/ml. Se incubaron a 25°C en oscuridad constante durante 15 días. Al cabo de éste tiempo, con el objeto de evaluar la productividad de los medios, se realizó un recuento en placa de Petri de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Se realizaron tres repeticiones, se halló la desviación estándar de las mismas y este valor fue adicionado y substraído al promedio respectivamente, obteniendo un rango al rededor de la media.

Para la evaluación de la productividad de estos medios de cultivo se adicionó a cada erlenmeyer 200 ml de solución de Tween 80 al 0.1% estéril y se agitó vigorosamente durante un minuto. De la suspensión resultante se hicieron diluciones seriadas desde 10^1 hasta 10^{-4} , de esta última dilución 100µl fueron sembrados sobre la superficie del medio de cultivo Saboureaud Rosa de Bengala, distribuyendo homogéneamente el inóculo con ayuda de una varilla de Huckey. Después de una incubación de tres días a 25°C se realizó el conteo en placa de Petri.

Para el medio de cultivo con base en arroz se realizaron cuatro variaciones en su consistencia las cuales fueron: arroz crudo licuado sólido, arroz crudo licuado semisólido, arroz crudo licuado líquido y arroz cocido licuado líquido. Para los tres primeros medios se pesaron 100g de arroz y se licuaron en 200, 850 y 1.200 ml. de agua destilada respectivamente. Para el medio de arroz cocido licuado se cocinaron 100g de arroz en 200 ml de agua y posteriormente se licuaron en 1800ml de agua destilada. Se realizaron

tres repeticiones de cada modificación en la consistencia del medio de cultivo con base en arroz y una replica en el tiempo.

Estos medios de cultivo fueron servidos en cajas de Petri de 14 cm de diámetro e inoculados con 2 ml de una suspensión del hongo en concentración de 5×10^6 propágulos/ml. Se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad constante durante 15 días, al cabo de los cuales se obtuvieron las colonias formadas por raspado (en medios sólidos) o extracción (medios líquidos) de las colonias formadas sobre la superficie del medio para realizar el recuento en placa de Petri de UFC/ml.

Evaluación de las condiciones de incubación para la producción masiva de *Verticillium lecanii*

Utilizando el medio de cultivo con base en arroz cocido licuado líquido y la metodología de inoculación descrita anteriormente se realizaron estudios con el fin de evaluar el efecto que sobre el rendimiento en la producción del hongo ofrecían cuatro diferentes condiciones de incubación. Estas fueron:

- Agitación a 100 r.p.m. en presencia de luz.
- Agitación a 100 r.p.m. en oscuridad.
- Sin agitación en presencia de luz.
- Sin agitación en oscuridad.

Se realizaron tres repeticiones y tres replicas en el tiempo. Todos los tratamientos fueron incubados a 25°C durante 12 días. Al cabo de este tiempo, la biomasa obtenida se suspendió en 30 ml de Tween 80 al 0.1% y se homogeneizó en vortex durante 1 minuto. De esta suspensión se hicieron diluciones seriadas para realizar el procedimiento de siembra en placa de Petri siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Se halló la desviación estándar de las repeticiones y este valor fue adicionado y substraído al promedio respectivamente, obteniendo un rango al rededor de la media. El promedio de crecimiento del hongo en las tres repeticiones se expresó, como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Estandarización de la producción masiva de *Verticillium lecanii*

Para la producción masiva de *V. lecanii* se utilizó la cepa VI 26 la cual fue seleccionada por García (1996), por su alta actividad insecticida contra *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), bajo condiciones de invernadero.

Previa a la siembra de esta cepa para su producción masiva se realizó una reactivación en el insecto. Posteriormente los insectos infectados por el hongo fueron introducidos en cajas de Petri con medio de PDA. Estas cajas se incubaron durante 10 días a 25°C. Del cultivo crecido se realizó un raspado para hacer una suspensión de propágulos, la cual fue ajustada a una concentración de 5×10^6 propágulos/ml. De esta suspensión se utilizaron 2 ml para inocular en bandejas de aluminio, de 15 x 24 x 4 cm. con 200 ml del medio de cultivo con base en arroz cocido licuado líquido. Los recipientes se cubrieron con doble capa de película de polivinilo y se incubaron a 25 °C en condiciones de luz constante durante 12 días.

Métodos de separación

Con el fin de separar la biomasa del hongo de los medios de cultivo preseleccionados por su alto rendimiento se probaron cuatro procedimientos de separación: lavado con agitación manual; lavado con agitación mecánica; homogenización; y licuado.

Para evaluar la eficiencia de los métodos de separación, al producto obtenido por cada uno de estos métodos se le realizó recuento de propágulos/mililitro en cámara de Neubauer.

Preformulación de la biomasa del hongo

Se diseñó como forma de presentación del producto un polvo mojable el cual estaba conformado por la biomasa del hongo recubierta con un protector de luz ultravioleta. Este polvo debía ser suspendido en un portador que constara de una base oleosa, tensioactivos, y agentes gelificantes. La emulsión resultante debía ser diluida en agua para su aplicación en campo.

Para el recubrimiento de la biomasa de *Verticillium lecanii* se utilizaron dos protectores de luz ultravioleta (CBUV 01 y CBUV 02), los cuales fueron aplicados a la biomasa como una pasta que contenía una mezcla del protector de luz ultravioleta y un adherente. Se realizaron mezclas de cada uno de los protectores de luz ultravioleta con el agente gelificante. El procedimiento se realizó tomando 2 ml. del adherente preparado a diferentes concentraciones, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.00%, 1.50% y 2.00%. Cada concentración, se mezcló con 2, 3, 4, 5 y 6 gramos del protector de luz ultravioleta y se seleccionó la pasta, teniendo en cuenta características físicas de maleabilidad y consistencia (Tabla 1).

TABLA 1. Ensayo de diferentes proporciones adherente-protector de radiación U.V. en la elaboración de la pasta de recubrimiento.

PROT	ADHERENTE						
	PROTECTOR	0.25 %	0.50 %	0.75 %	1.00 %	1.50 %	2.00 %
	Protector U.V.	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
	Protector U.V.	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
	Protector U.V.	4 g	4 g	4 g	4 g	4 g	4 g
	Protector U.V.	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
	Protector U.V.	6 g	6 g	6 g	6 g	6 g	6 g

Selección de la relación pasta-propágulos.

Este ensayo buscó seleccionar la relación pasta-propágulos que ofreciera el mejor recubrimiento del hongo, buscando el mayor porcentaje de propágulos cubiertos o parcialmente cubiertos, teniendo en cuenta que no se presentara un exceso de partículas del protector de luz ultravioleta sin adherirse a los propágulos del hongo.

Para estos ensayos se tomaron 10 ml de biomasa húmeda y se mezclaron en cajas de Petri de 5cm de diámetro con 0.5, 0.8, 1.0, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0,

8.0, 9.0, 10.0 gramos de pasta. Estas preparaciones fueron secadas en estufa con corriente de aire a 25° C durante 2 días y posteriormente se pulverizaron manualmente en mortero.

Mediante observaciones microscópicas se determinó la mejor proporción pasta-propágulos observando el porcentaje de propágulos cubiertos, parcialmente cubiertos y desnudos. Este dato fue obtenido después de contar 100 propágulos en varios campos microscópicos.

Producción masiva y formulación de *V. lecanii*

Con el propósito de obtener suficiente producto para su aplicación en campo se realizó un pequeño escalamiento de la cepa VI 26 la cual fue formulada con el protector solar.

Para este fin se sembraron semanalmente 70 bandejas durante doce días en condiciones de luz constante. Por cada bandeja que contenía medio de arroz cocido licuado líquido en la que había crecido *V. lecanii* se extrajeron 30 ml de biomasa. A esta biomasa se le adicionó 5.4 g de pasta que contenía el protector CBUV 01 y 6.0 g de pasta que contenía CBUV 02. Cada protector de radiación UV fue tratado como una preformulación diferente, adicionándolo por separado a la biomasa extraída.

Esta mezcla fue licuada durante un minuto, y posteriormente se extendió una capa fina de 3 mm aproximadamente, en la base de cajas de petri. Estas cajas fueron cubiertas con papel absorbente estéril. La mezcla fue sometida a los siguientes métodos de secado:

Flujo de aire continuo a 25°C. El hongo preformulado se secó en estufa con corriente de aire continua a 25°C durante 2 días. Una vez seca la biomasa preformulada, se procedió a la trituración manual en mortero hasta obtener un tamaño de partícula pequeño, el cual se pasó a través de un tamiz de tela. Se evaluó la viabilidad del hongo antes y después del proceso de secado mediante la técnica de recuento en placa de Petri de UFC/g.

Liofilización. La liofilización se utilizó como método de secado rápido, obteniéndose igualmente un polvo mojable. Para proteger al principio activo de las condiciones de

liofilización se evaluaron en mezcla con propágulos los siguientes excipientes: Leche, pasta de recubrimiento seleccionada en procesos anteriores y mezcla leche pasta. Se colocaron 2 ml de cada una de las mezclas en viales de vidrio de 10 ml de capacidad. Se evaluó la viabilidad del hongo antes y después del proceso de liofilización mediante la técnica de recuento en placa de Petri, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por gramo de producto (UFC/g).

Una vez estandarizada la técnica para obtener el preformulado secado mediante la técnica de liofilización, se procedió a utilizar esta metodología para la obtención del producto para evaluación en campo. Para estos ensayos se utilizaron viales de 40ml de capacidad, se sirvió 1/3 del vial, 40 ml o 12ml respectivamente, con la biomasa húmeda preformulada a una concentración de 1×10^8 propágulos/ml. Se congelaron a -70°C durante una hora, posteriormente se liofilizaron durante 27 horas para lograr la perfecta deshidratación del producto.

Elaboración de la base autoemulsificable

Para resuspender el producto se diseñó una base autoemulsificable constituida por aceite, tensioactivos y gelificantes. Se ensayaron los siguientes aceites: girasol, maíz, ricino y mineral. También se tuvo en cuenta en la selección de la proporción de aceite-preformulado características cualitativas de suspendibilidad y velocidad de sedimentación.

Se realizaron cálculos del balance hidrófilo-lipófilo para hallar la cantidad de tensioactivos necesarios para obtener una completa miscibilidad entre el aceite seleccionado y el agua. Se empleó una mezcla de los tensioactivos Tween 80 y Span 60, utilizando por cada ml de aceite 82.% y 19% de los tensioactivos respectivamente.

Los agentes gelificantes ensayados fueron goma arábica, carragenan, gelatina y metilcelulosa en diferentes concentraciones, para dar al producto reconstituido, una mayor suspendibilidad al momento de la aplicación en campo (Tabla 2).

TABLA 2. Ensayo de diferentes concentraciones con los gelificantes evaluados.

GELIFICANTES	CONCENTRACIONES		
Gelatina	1.00 %	1.30 %	1.50 %
Carragenan	0.50 %	0.80 %	1.00 %
Goma arábica	1.00 %	1.20 %	1.50 %
Metil celulosa	1.00 %	1.25 %	1.30 %

Una vez constituida la base autoemulsificable, se realizaron ensayos para hallar la relación del volumen de la base a utilizar por gramo de producto ensayando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10ml de la base autoemulsificable.

Evaluación del efecto de la radiación ultravioleta sobre los productos preformulados

Con el fin de evaluar el efecto de la luz U.V. sobre la viabilidad de *Verticillium lecanii* en las preformulaciones obtenidas con cada uno de los dos protectores solares, se realizó un ensayo que consistió en exponer 3 muestras de 1g cada una del polvo mojable de cada preformulación (biomasa seca recubierta con protector de radiación U.V.) y un control que consistió en la biomasa seca no recubierta (3 muestras de 1g), extendido sobre la base de una caja de Petri descubierta de 5cm de diámetro, durante 0, 30, 60 y 120 minutos a una lámpara de luz ultravioleta que emite una longitud de onda de 253.7 nm. Por cada ensayo se realizaron tres repeticiones. Se evaluaron tanto productos secados por liofilización como aquellos secados con corriente de aire. La viabilidad de los propágulos fue evaluada mediante recuento en placa de Petri (UFC/g).

Pruebas De Almacenamiento

Se realizaron pruebas de almacenamiento de *V. lecanii* en forma de propágulos secos y propágulos recubiertos con cada uno de los protectores de radiación ultravioleta. Para este fin se almacenó en viales de vidrio 1g de cada uno de los productos a temperatura

ambiente (18°C) y a 9°C en cuarto frío. Se evaluó la viabilidad del hongo por medio de recuentos en placa de Petri de UFC/g a los 0, 8, 15, 30, 45 y 60 días de el ensayo, realizando 3 repeticiones por periodo de almacenamiento.

Resultados y Discusión

Conformación de un banco de cepas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas.

Se contribuyó significativamente a la conformación de un banco de cepas, que en la actualidad cuenta con 41 accesiones de *V. lecanii*, obtenidas a partir de moscas blancas infectadas en campo provenientes de los municipios de Fusagasugá, Silvania, Pasca, Arbelaez y San Bernardo. Este banco, se encuentra en el laboratorio de Control Biológico del Programa de Manejo Integrado de Plagas en el centro de investigaciones "Tibaitatá" de CORPOICA.

Selección de un medio de cultivo para el mantenimiento de *V. lecanii* en laboratorio

De los medios semisintéticos evaluados, se seleccionaron los medios agar papa dextrosa (PDA) para realizar las pruebas en laboratorio de reactivación de cepas, siembra del inóculo y producción masiva; y el medio agar Saboureaud Rosa de Bengala para realizar los recuentos en placa de Petri de UFC.

El desarrollo micelial y la esporulación de *V. lecanii* en el medio PDA fue abundante con colonias grandes y redondeadas, más elevadas que en los anteriores medios, de bordes irregulares, aterciopeladas, compactas, con crecimiento homogéneo sobre la superficie del medio. El recuento presentado fue de 54×10^4 UFC/ml.

En agar Saboureaud Rosa de Bengala, *V. lecanii* presentó colonias diferenciadas, puntuales, redondas, de bordes uniformes, elevadas, aterciopeladas, tamaño mediano y uniforme, con abundante crecimiento micelial y un recuento de 46×10^4 UFC/ml. El crecimiento puntual de micelio se debe al efecto inhibitorio del colorante Rosa de Bengala, el cual actúa como agente fungistático. Este colorante tiene además propiedades bactericidas útiles para evitar contaminación bacterial. Por las características de crecimiento que el hongo presentó, se seleccionó este medio para realizar los recuentos en placa de Petri de UFC.

Selección de medios de cultivo para la producción masiva de *V. lecanii*

En el medio de salvado *V. lecanii* presentó un pobre crecimiento micelial de 50×10^4 UFC/g, las colonias fueron pequeñas y aisladas sobre la superficie, alcanzando sólo a cubrir un 5% de la superficie total del medio de cultivo.

En el medio de cultivo de avena, el entomopatógeno creció sobre la superficie formando una biomasa compacta gruesa de apariencia aterciopelada y uniforme. El recuento en placa de Petri fue 40×10^5 UFC/g (Figura 1). Aunque éste es un medio rico en sustancias nutritivas, que proporciona gran cantidad de hidratos de carbono, proteínas y vitaminas, la forma en que se presentó (hojuelas humectadas), tal vez no fue la adecuada para la utilización y absorción de los nutrientes por parte del hongo.

En el medio de papa el crecimiento de *V. lecanii* fue escaso desde los primeros días, poco uniforme, con colonias indefinidas, con un recuento en placa de Petri de 48×10^5 UFC/g (Figura 1). Este sustrato cuenta con una proporción moderada de hidratos de carbono que no brindan al hongo la suficiente cantidad para sus requerimientos nutricionales.

En el medio de papa-zanahoría el crecimiento de *V. lecanii* fue moderado, poco uniforme, con colonias aterciopeladas. El mayor desarrollo se observó sobre la zanahoria y al igual que en el medio anterior, la papa mostró escaso crecimiento. Este medio mostró un conteo en placa de Petri de 62×10^5 UFC/g (Figura 1).

El desarrollo de *V. lecanii* en el medio de frijol fue uniforme y abundante en los primeros días, con colonias aterciopeladas que recubrían el grano. Se obtuvo un conteo en placa de Petri de 91×10^5 UFC/g. El crecimiento abundante de *V. lecanii* en el medio de frijol se debe al gran contenido nutritivo de este sustrato, ya que más del 50% de su composición

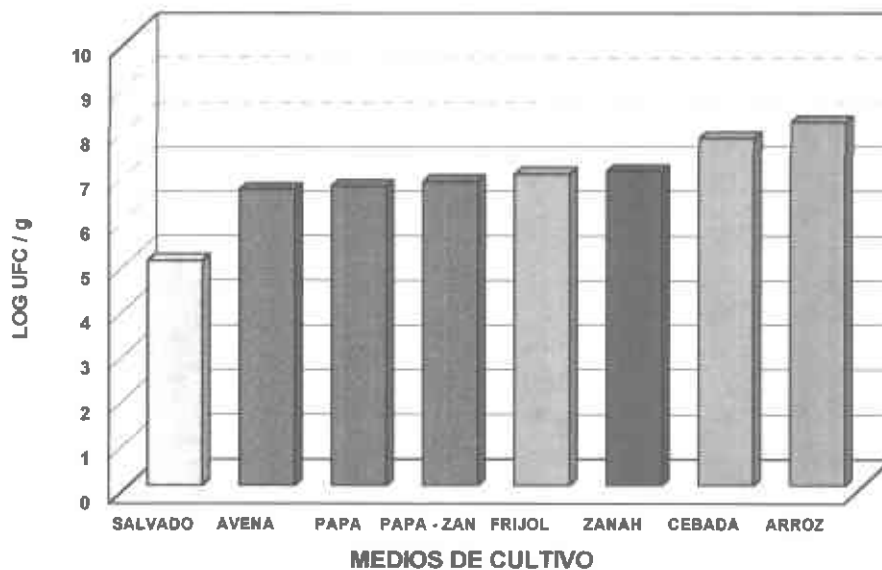


Figura 1 . Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción masiva *Verticillium lecanii*

son hidratos de carbono, 21% de proteínas, que proporcionan una excelente fuente de nitrógeno, además posee una gran cantidad minerales. Su contenido de vitaminas es muy limitado, lo cual pudo incidir sobre el desarrollo del hongo (Griffin, 1981).

El micelio de *V. lecanii* en el medio de zanahoria se presentó de manera uniforme, con colonias blancas, aterciopeladas, extendidas sobre la superficie de los trozos de zanahoria. Este sustrato es pobre en elementos nutritivos tales como proteínas, minerales y contiene una baja proporción de hidratos de carbono. Cabe anotar que la zanahoria tiene una alta cantidad de vitamina A, pero ésta no ha sido reportada como necesaria en los requerimientos esenciales para el crecimiento de los hongos.

En el momento de la separación del hongo por agitación manual, éste se mezcló con el medio, lo que dificultó el proceso. Así mismo, el producto final disminuyó su calidad, debido a la cantidad de medio incorporado en él. El recuento en placa de Petri obtenido fue 10×10^6 UFC/g (Figura 1).

En el medio de cultivo con base en cebada se observó un crecimiento de *V. lecanii* abundante, uniforme, con colonias pequeñas, aisladas y puntiformes que cubrieron progresivamente el grano, con un buen desarrollo. Este medio al igual que los anteriores presentó inconvenientes en el momento de la separación ya que el micelio después de la agitación quedó adherido firmemente al sustrato, siendo rescatado en el lavado sólo una parte de la biomasa producida. El conteo en placa de Petri fue 58×10^6 UFC/g (Figura 1).

En el medio de arroz el crecimiento del entomopatógeno fue homogéneo, con colonias aterciopeladas que lentamente cubrían la superficie del grano, y un abundante desarrollo de micelio. En el proceso de separación de la biomasa se observó que el micelio penetró el sustrato. En el momento de la separación, se produjo una pérdida de la mayor parte del principio activo al quedar este incorporado al medio de cultivo; además, el grano absorbió gran cantidad de solución de lavado dificultando el proceso. En este medio se obtuvo el mayor recuento en placa de Petri, 13×10^7 UFC/g (Figura 1).

El sustrato de arroz fue seleccionado para realizar la producción masiva, ya que el recuento en placa de Petri de 13×10^7 UFC/ml. expresó los mayores rendimientos y productividad (Figura 1). Debido a que el grano está conformado en una alta cantidad de almidón que proporciona una rica fuente de carbono 80%, cantidad superior a la ofrecida por los demás medios de cultivo ensayados, elemento principal para el desarrollo de los hongos. El contenido de carbono es directamente proporcional a la duración de la fase de crecimiento exponencial del hongo y su agotamiento determina la iniciación de la fase de decadencia (Griffin, 1981). La fuente de nitrógeno es obtenida de los aminoácidos presentes en el contenido proteico del arroz equivalente al 9% e igualmente este sustrato brinda otros elementos nutritivos como magnesio, fósforo, azufre, potasio, calcio y otros iones, además de vitaminas del complejo B como riboflavina y tiamina y la vitamina niacina que influyen en el crecimiento del hongo. Además de su contenido nutricional, este medio fue escogido por su facilidad de adquisición, manejo y menor costo para la producción masiva del entomopatógeno.

Sin embargo el proceso de separación del componente activo del entomopatógeno (propágulos) se dificultó porque el micelio penetró el grano de arroz quedando

firmemente adherido al sustrato. Para superar este inconveniente se efectuaron variaciones en la consistencia del medio, para aumentar la productividad del hongo; para lo cual se ensayaron cuatro medios de cultivo licuados con diferentes grados de humedad: medio de arroz sólido, semisólido, líquido y arroz cocido líquido.

Los medios de arroz licuado sólido y semisólido presentaron un pobre crecimiento micelial, poco uniforme, con colonias aisladas y difíciles de separar. No se realizó conteo en placa de Petri, por la dificultad en la manipulación de las escasas colonias formadas.

El medio de arroz crudo licuado líquido no fue homogéneo durante la incubación, ya que *V. lecanii* desarrolló colonias de crecimiento aislado y escaso.

El medio de arroz cocido licuado líquido fue más homogéneo en consistencia en relación con los anteriores medios. *V. lecanii* en este medio presentó un crecimiento abundante, rápido y uniforme, cubrió completamente la superficie, obteniendo una biomasa de micelio abundante, aterciopelada y de fácil separación del sustrato. En el recuento en placa de Petri se mostró un rendimiento de 3×10^8 UFC/ml (Figura 2). Esta concentración superó la lograda en el medio de arroz sólido en grano; debido probablemente a que en el medio líquido se recupera la totalidad de la biomasa del hongo, mientras que en el medio sólido se observó una pérdida al quedar la biomasa adherida al sustrato. De otra parte, en un medio de consistencia acuosa los nutrientes están fácilmente disponibles para su utilización, mientras que en los medios sólidos se requiere mayor actividad metabólica para obtener los elementos nutritivos.

Las características de crecimiento de *V. lecanii* sobre el medio de arroz cocido licuado líquido fueron las que se tomaron en cuenta en la selección de éste para la producción masiva del entomopatógeno. Además de ser un medio de sencilla preparación y manejo, facilita la separación de la biomasa (micelio y esporas) y reúne las características registradas en la literatura de humedad relativa necesaria para el óptimo desarrollo del hongo, $\geq 95\%$, que contribuyen a su esporulación (Heyler *et. al*, 1992).

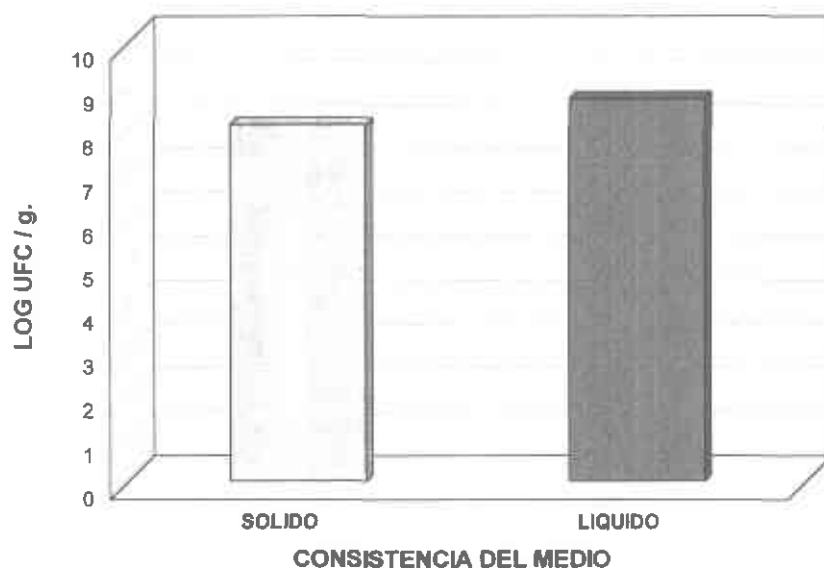


Figura 2. Efecto de la consistencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Verticillium lecanii*

Una vez elegido el medio de producción masiva, se evaluaron cuatro condiciones de incubación para optimizar la producción de *V. lecanii* en el medio de arroz cocido licuado líquido. En los medios sometidos a agitación constante a 100 r.p.m. se observó que el movimiento compacta el hongo sobre si mismo desarrollando colonias esféricas, aisladas y suspendidas en la totalidad del medio de cultivo. Los ensayos sometidos a agitación presentaron un menor desarrollo del hongo con un recuento en placa de Petri de 38×10^6 UFC/ml, mientras que en los medios incubados en condiciones estáticas se obtuvo un mayor recuento en placa de Petri de 39×10^7 UFC/ml, estos resultados se deben a que en condiciones de agitación en fermentación sumergida las colonias formadas no presentan esporulación (Cotes, 1997), ya que no se encuentran disponibles las condiciones de luz y aerobiosis requeridas para el óptimo desarrollo del entomopatógeno (Figura 3).

En cuanto a los medios de cultivo incubados en presencia o ausencia de luz, el hongo no presentó diferencias importantes en su desarrollo, aunque hubo una tendencia a una mayor productividad en presencia de luz constante, con recuentos en placa de Petri de

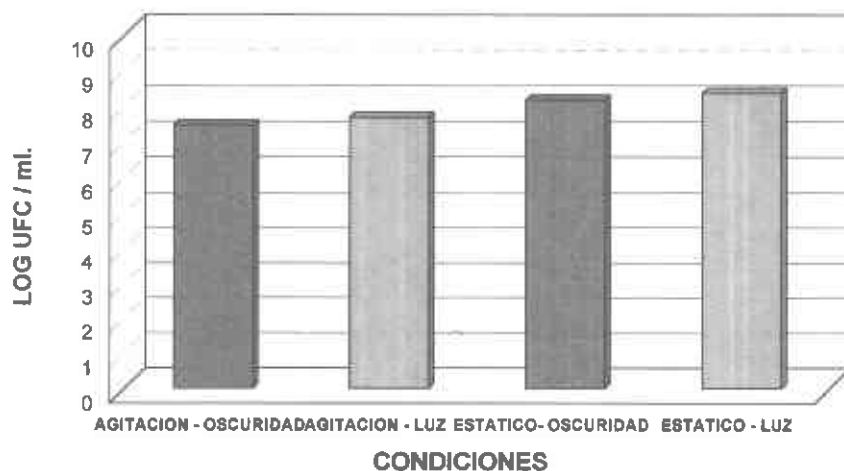


FIGURA 3. Efecto de las condiciones de incubación sobre el crecimiento de *Verticillium lecanii*

29×10^7 UFC/ml en presencia de luz constante y de 15×10^7 UFC/ml en oscuridad constante (Figura 3).

Esto se debe a que la luz incide directamente sobre el crecimiento del hongo, y produce un incremento en las tasas de crecimiento específico del cultivo, pero no necesariamente sobre la esporulación (Griffin, 1981).

Se seleccionaron como condiciones óptimas de incubación a 25°C para la producción masiva, la presencia de luz constante, sin agitación. Bajo estas condiciones el hongo presentó la mayor productividad, al compararlo con las obtenidas bajo las restantes condiciones estudiadas.

Selección del método separación de la biomasa

En el medio de arroz sólido crudo en grano, la separación de la biomasa del hongo, mediante lavado con agitación manual en vortex y la homogeneización fueron los

procedimientos menos eficientes debido a que el micelio del hongo penetra el grano y no se desprende fácilmente del sustrato; por lo tanto, el líquido rescatado presenta una escasa concentración de 56×10^3 propágulos/ml. En este mismo medio de cultivo el licuado resultó un proceso poco práctico porque el producto final quedó mezclado con una gran cantidad de sustrato, impidiendo la determinación microscópica de la concentración de propágulos/ml en cámara de Neubauer.

Al observar la poca eficiencia de los métodos empleados y la dificultad para separar los propágulos del hongo del grano de arroz, se seleccionó el medio de arroz cocido licuado líquido en el cual se ensayaron los mismos procedimientos de separación.

En el medio de arroz cocido licuado líquido la separación de la biomasa por agitación manual, agitación en vortex y homogeneización fueron procesos en los que se desprendió una cantidad considerable de propágulos, de 4×10^7 propágulos/ml en los dos primeros y, 2×10^8 propágulos/ml. en el último procedimiento. Sin embargo, la gran cantidad de líquido que queda adherido a la biomasa dificultó el proceso posterior de secado.

Para el medio de cultivo de arroz cocido licuado líquido también se ensayó el método de licuado. La biomasa extraída manualmente del medio de cultivo arroz cocido licuado líquido, licuada con soluciones de lavado, presentó una alta concentración de 6×10^7 propágulos/ml. Este resultado se optimizó al licuar la biomasa fresca sin medio de cultivo o sin soluciones de lavado alcanzando una concentración de 5×10^8 propágulos/ml. Este procedimiento permitió obtener un licuado homogéneo, sin exceso de humedad lo que facilitó el proceso ulterior de secado.

En cuanto a los líquidos de lavado el Tween 80 al 0.1%, sustancia tensioactiva detergente, actúa disminuyendo la tensión superficial y ayuda a desprender los propágulos del medio, por lo tanto, este tensioactivo fue escogido para experimentos posteriores. Se pudo concluir al ensayar diferentes aceites para la separación de la biomasa que el aceite no fue adecuado, pues por su alta densidad formó una película sobre el hongo adherido al grano, limitando el desprendimiento de las esporas y del

micelio. Al comparar los resultados obtenidos mediante los diferentes procedimientos de separación de propágulos del medio, se optó por el licuado de la biomasa pura (sin líquidos de lavado, ni medio de cultivo), extraída del medio de arroz cocido licuado líquido, por su alto rendimiento, disminución en el tiempo del procedimiento y reducción de etapas en la manipulación de la biomasa, que evitan el daño y riesgo de contaminación del biocontrolador.

Preformulación del entomopatógeno

La biomasa de *V lecanii* obtenida por extracción manual y homogeneizada por licuado fue recubierta con cada uno de los protectores de luz U.V. (CUBV 01 y CUBV 02). Para tal fin, se seleccionó la mejor pasta de recubrimiento y la proporción de la misma en el producto final.

Se realizó una observación cualitativa de las características físicas de las diferentes proporciones evaluadas de protector de luz U.V. y agente gelificante. Se concluyó que a mayor concentración de agente gelificante las pastas presentaron apariencia más blanda tendiendo a ser líquidas y a menor concentración de agente gelificante fueron más duras y con aspecto granular. En cuanto a la adición de los protectores de radiación U.V. las pastas fueron más blandas cuando se agregó menor cantidad de éstos y más duras cuando se aumentó la cantidad de protector (Tabla 3).

Las mezclas que contenían menor concentración de agente gelificante y mayor cantidad de protector U.V., fueron las pastas más duras, con gránulos toscos, gruesos, de difícil disolución y manejo; mientras que las mezclas que contenían mayor concentración de agente gelificante y menor cantidad de protector U.V. las pastas fueron blandas, homogéneas, tendiendo a ser fluidas.

TABLA 3. Consistencia de las pastas que contenían diferentes proporciones de protector U.V. y de agente gelificante.

Adherente (2ml) Protector	0.25 %	0.50 %	0.75 %	1.00 %	1.50 %	2.00 %
2 g	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	blanda	liquida
3 g	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	pastosa	blanda
4 g	dura	granular	granular	granular	granular	granular
5 g	dura	granular	granular	granular	granular	granular
6 g	granular dura	granular dura	granular dura	granular	granular	granular

Se seleccionó una mezcla de consistencia pastosa que se puede incorporar fácilmente a los propágulos del hongo ofreciendo un buen recubrimiento. Teniendo en cuenta los criterios de maleabilidad, consistencia pastosa, homogeneidad y ausencia de gránulos, la pasta de proporción 1:1, agente gelificante al 1.0% - protector U.V.

Selección de la relación pasta-propágulos

La pasta seleccionada fue incorporada en diferentes cantidades a 10 g de biomasa húmeda del hongo. Esta mezcla homogeneizada, secada con estufa de corriente de aire fue triturada manualmente.

A los polvos obtenidos, se les realizó una evaluación microscópica, la cual permitió concluir que la cantidad de pasta de recubrimiento necesaria por cada 10 ml de biomasa húmeda extraída fue de 1.8g para la pasta con protector CBUV 02 y de 2.0g para la pasta con protector CBUV 01. Además de la observación microscópica, se tuvieron en cuenta las características de trituración de la preformulación seca. Con el protector CBUV 02 se obtuvo una preparación más fácil de triturar y un tamaño de partícula más fino, mientras el producto con el protector CBUV 01 presentó mayor dificultad en la trituración y las partículas obtenidas fueron más gruesas.

Así mismo, el protector CBUV 02 ofreció un cubrimiento de los propágulos mayor debido a su menor tamaño de partícula ($0.3 \mu\text{m}$) respecto al protector CBUV 01 ($0,6 \mu\text{m}$), facilitando la adherencia y recubrimiento de los propágulos del biocontrolador.

Secado de los propágulos recubiertos

De acuerdo a las pruebas de viabilidad realizadas antes y después del proceso de secado, se observó que la biomasa preformulada y secada en estufa con corriente de aire a 25°C mostró una pérdida notable de viabilidad (Figura 4). El recuento en placa de Petri expresado como UFC/g. de la biomasa sin protectores antes de ser sometida al procedimiento de secado fue 14×10^7 y para la biomasa preformulada con los protectores CBUV 01 y CBUV 02 el recuento en placa de Petri fue 27×10^7 UFC/g y 14×10^7 UFC/g respectivamente. Después de secar los productos en estufa con corriente de aire a 25°C durante 2 días, se obtuvieron recuentos de 68×10^6 , 58×10^6 y 14×10^6 UFC/g respectivamente.

Durante el tiempo de secado se pudo presentar lisis celular a causa de la entrada de agua a las células, siendo este efecto más notable en la preformulación con CBUV 01 debido quizás al mayor tamaño de su partícula y a que éste es un agente desinfectante suave y astringente ligero que podría interferir en la viabilidad del entomopatógeno, mientras que el CBUV 02 no tiene estas características.

Como etapa previa al proceso de secado por medio de liofilización se realizaron ensayos para determinar si un criopreservante como la leche le ofrecía protección a las esporas durante la liofilización. La preparación propágulos-pasta de recubrimiento presentó la menor pérdida de viabilidad después del proceso de liofilización ya que de un recuento inicial en placa de Petri de 26×10^6 UFC/ml descendió a 15×10^6 UFC/ml, no representando una pérdida importante. En la mezcla pasta-leche-propágulos el recuento inicial disminuyó de 20×10^6 UFC/g a 91×10^5 UFC/g, y la preformulación propágulos-leche mostró un drástico descenso en la concentración de propágulos después del proceso de secado, pasando de 33×10^6 UFC/g a 39×10^5 UFC/g. En los dos últimos casos, el descenso en la viabilidad podría deberse a que la presencia de la leche, (criopreservante) no produce la pérdida de la viabilidad si no que en la extracción de

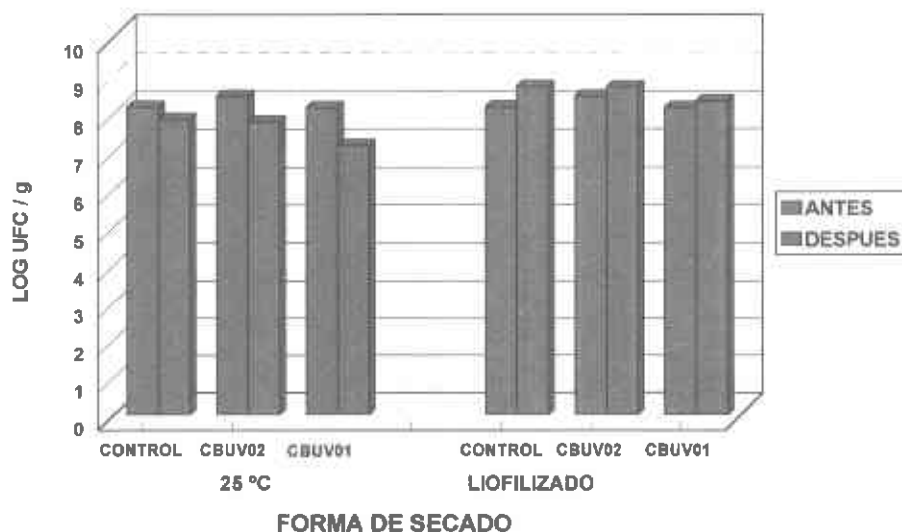


Figura 4. Efecto de dos métodos de secado sobre la viabilidad de *Verticillium lecanii*

humedad del preparado en el proceso de secado disminuye la concentración de propágulos/ml al quedar adheridos al producto preformulado componentes de la leche que actúan como diluyentes del principio activo.

Los resultados obtenidos en este ensayo, permitieron concluir que la mejor mezcla para liofilización fue propágulos-pasta, ya que en ésta el biocontrolador conservó su viabilidad alcanzando la concentración requerida para la formulación de un bioplaguicida.

En cuanto a la evaluación de la liofilización como método de secado de acuerdo a los recuentos en placa de Petri expresados como UFC/g de la biomasa preformulada y no preformulada antes y después del proceso de liofilización, se observó que después de la liofilización no se perdió viabilidad de *V. lecanii* ni en el control ni en los productos preformulados. Se observó un ligero ascenso en la concentración final del producto debido a la pérdida de la humedad (Figura 4).

Los resultados presentados permiten concluir que en el procedimiento de secado por liofilización la viabilidad permanece estable, posiblemente debido a que la congelación previa puede activar mecanismos de latencia en el biocontrolador (Griffin, 1981), y el proceso de extracción de humedad rápido es menos nocivo para el entomopatógeno, mientras que el secado en estufa además de ser un proceso lento, es un método bastante irregular en sus condiciones no pudiéndose asegurar la pérdida progresiva de humedad. Así mismo, la humedad presente en la pasta preformulada durante el tiempo de secado en estufa con corriente de aire a 25°C, podría permitir la germinación de las esporas de *V. lecanii*, haciéndolas más sensibles a la desecación. Además al carecer la espora germinada de las condiciones para su desarrollo, agota sus reservas energéticas y muere.

Efecto de la luz ultravioleta sobre la viabilidad de las esporas desnudas y preformuladas de *Verticillium lecanii*

Cuando la biomasa fue secada en estufa con corriente de aire a 25°C se observó que tanto las esporas desnudas como los productos preformulados mostraron un descenso de la viabilidad en los primeros 30 minutos de exposición a la luz UV (Figura 5). Sin embargo, los productos preformulados con protectores de luz ultravioleta lograron estabilidad durante el tiempo restante de exposición. Es importante observar que la preformulación con el protector CBUV 02 presentó menor pérdida de la viabilidad, pues pasó de 43×10^7 UFC/g a 59×10^6 UFC/g, respecto al CBUV 01 que de 67×10^7 UFC/g descendió a 32×10^6 UFC/g durante el tiempo de la prueba (Figura 5).

Cuando la biomasa se secó mediante liofilización, el control (propágulos desnudos) presentó una drástica disminución de la viabilidad en los primeros 30 minutos de exposición, la cual continuó en forma menos radical durante los restantes 90 minutos. La preformulación con CBUV 02 mostró total estabilidad durante las dos horas del ensayo pues de 47×10^7 UFC/g descendió a 38×10^7 UFC/g, mientras que la preformulación con CBUV 01 presentó un ligero descenso en la viabilidad, pasando de 20×10^7 UFC/g a 12×10^7 UFC/g a partir de los 60 minutos de exposición (Figura 6).

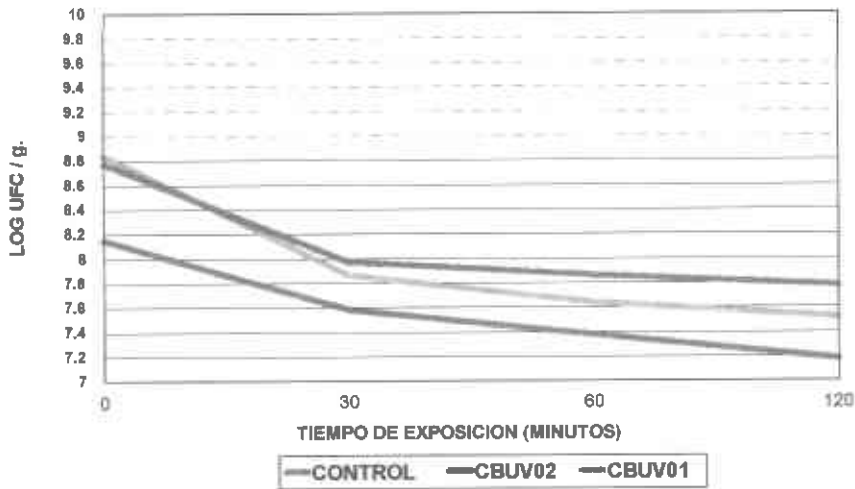


Figura 5 . Efecto de la radiación U.V. sobre dos preformulados de *Verticillium lecanii* secados a 25° C

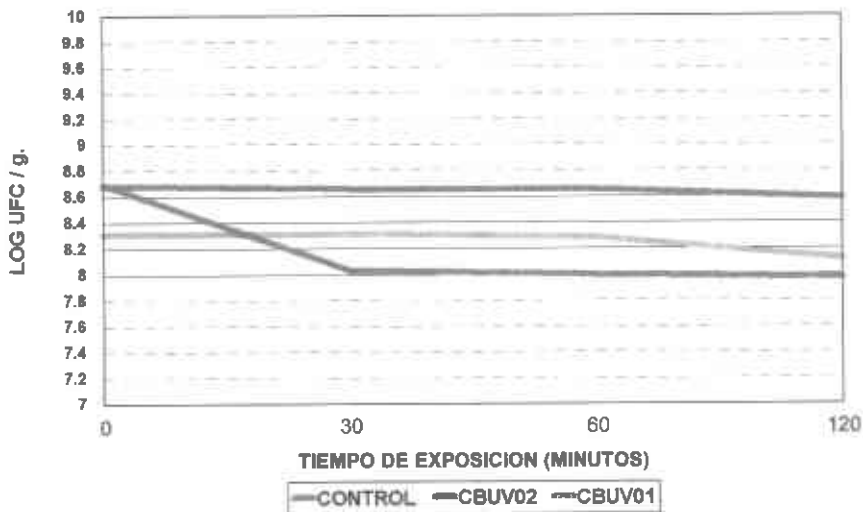


Figura 6 . Efecto de la radiación U.V. sobre dos preformulados de *Verticillium lecanii* secados mediante liofilización

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que ambos protectores de luz UV actuaron eficazmente evitando el efecto germicida de esta radiación ya que éstos absorben la luz UV sirviendo como filtros de esta radiación, por tal razón son utilizados en cosmetología. Para ambos métodos de secado se observó que el producto preformulado con el protector CBUV 02 le confirió mayor estabilidad a los propágulos de *V. lecanii* que el preformulado con el protector CBUV 01, esto podría deberse a que el tamaño de partícula de este último, es menor que la del CBUV 01 ofreciendo mayor recubrimiento y protección al hongo. Por lo tanto, se seleccionó el protector de radiación U.V. CBUV 02 como el más adecuado para la preformulación del producto secado tanto en estufa con corriente de aire a 25°C como mediante liofilización.

Base autoemulsificable

Se diseñó una base autoemulsificable como portadora del producto. Esta permitió una buena suspendibilidad y adherencia del producto, requisitos necesarios para garantizar la acción insecticida del biocontrolador.

En ensayos de preformulación se evaluó el efecto de diferentes aceites sobre *V. lecanii* encontrando que el aceite vegetal de girasol no afectó significativamente la viabilidad del hongo, además los propágulos de éste mostraron mayor suspendibilidad en presencia de dicho aceite, la cual fue evaluada por la velocidad de sedimentación (mm a la hora), donde el aceite de girasol presentó la menor sedimentación, de 14 mm a la hora, con respecto a los demás aceites que presentaron entre 21, 48 y 67 mm a la hora de sedimentación de producto preformulado (Tabla 4).

Como tensioactivos se definió que la mezcla adecuada debía contener 81% de Tween 80 y 19% Span 60 y que esta mezcla debería representar el 10% del peso de la fase oleosa para lograr un HLB de 13.

TABLA 4. Evaluación cuantitativa y cualitativa de los aceites ensayados en la base autoemulsificable.

ACEITE	UFC / MI	VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN (mm/hora)
Girasol	32×10^7	14
Maíz	30×10^7	21
Ricino	25×10^7	48
Mineral	23×10^7	67

La metilcelulosa en una proporción de 1.25% fue un adecuado agente emulsificante, aumentó la densidad del vehículo y disminuyó la velocidad de sedimentación del producto al momento de la aplicación.

Se determinó que cada gramo del polvo debía ser resuspendido en 5 ml de base autoemulsificable, la cual contiene aceite vegetal de girasol, tensioactivos y agente gelificante. Este aceite actúa como vehículo adherente y protege al biocontrolador de la pérdida de humedad; con los tensioactivos se forman la emulsión fase oleosa en el líquido de aplicación: El agente gelificante metilcelulosa al 1.25% en una proporción 1:1 en relación a la fase oleosa, ayuda a la suspendibilidad del producto en la base autoemulsificable.

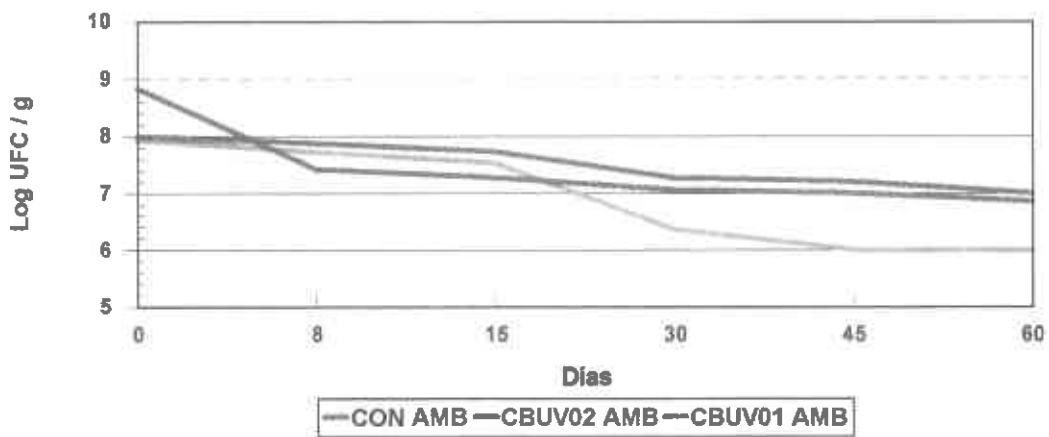
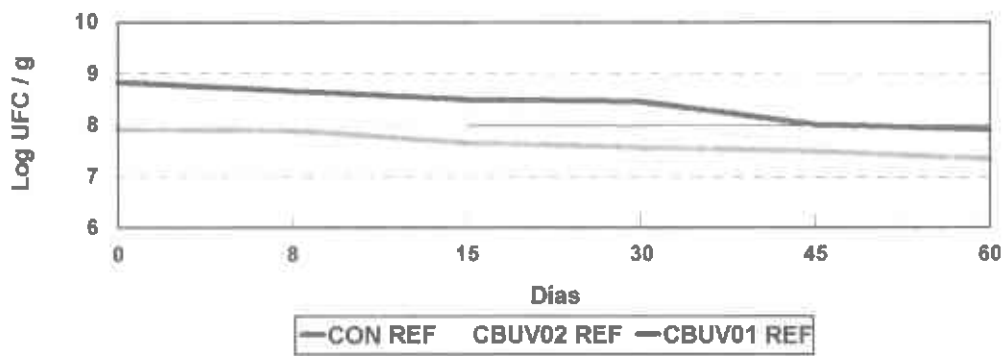
Ensayos de almacenamiento

Los productos obtenidos del secado, tanto en estufa como por liofilización fueron sometidos a pruebas de almacenamiento durante dos meses a temperatura ambiente y a 9°C. La evaluación se realizó mediante conteo en placa de Petri de UFC/g a 0, 8, 15, 30, 45 y 60 días.

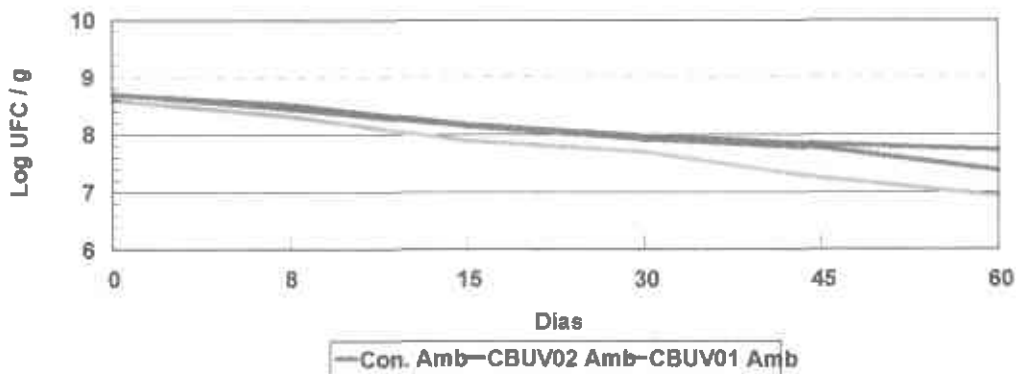
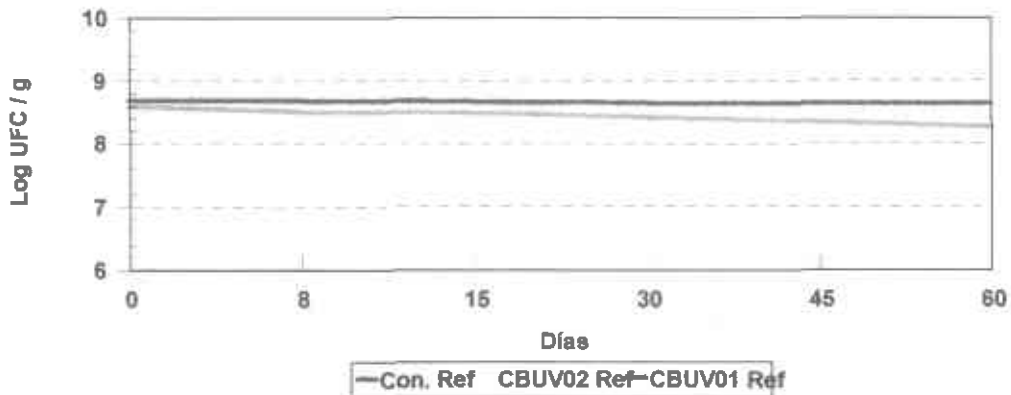
Los resultados obtenidos mostraron que tanto el producto secado a 25°C (Figuras 7-8) como el sometido a liofilización (Figuras 9-10), fueron mas estables cuando se almacenaron a 9°C que a temperatura ambiente, ya que de un recuento en placa de Petri a 9°C a los 0 días se obtuvo 36×10^7 UFC/g y a los 60 días descendió a 16×10^7 UFC/g, mientras que a temperatura ambiente partiendo del mismo recuento en placa de Petri, a los 0 días descendió hasta 34×10^6 UFC/g a los 60 días. Esto podría deberse a que a bajas temperaturas el hongo entra en estado de latencia (Griffin, 1981), mientras que a temperatura ambiente el microorganismo es totalmente activo fisiológicamente, las esporas germinan si encuentran condiciones adecuadas; pero al carecer de los elementos nutritivos y ambientales necesarios se imposibilita el desarrollo con la consecuente muerte del entomopatógeno.

Se observaron diferencias en las esporas desnudas liofilizadas conservadas a 9°C con respecto a las secadas a 25°C, los primeros presentaron 48×10^7 UFC/g a los 0 días y 42×10^7 UFC/g a los 60 días, mientras que los segundos mostraron 68×10^7 UFC/g a los 0 días y 82×10^6 UFC/g a los 60 días. Las preformulaciones con los protectores de luz ultravioleta mostraron total estabilidad a 9°C, notándose una pequeña diferencia en el secado a 25°C donde la preformulación con CBUV 01 descendió ligeramente.

Tanto los controles como los productos preformulados almacenados a temperatura ambiente mostraron un drástico y progresivo descenso en la viabilidad del entomopatógeno. Los preformulados con protector CBUV 02 sufrieron menor disminución en la viabilidad del hongo, mientras los preformulados con CBUV 01 manifestaron menor tolerancia a las condiciones de almacenamiento.



Figuras 7-8. Efecto de las condiciones y tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad de *Verticillium lecanii* en los productos secados a 25°C



Figuras 9-10 Efecto de las condiciones de almacenamiento y tiempo sobre la viabilidad de *Verticillium lecanii* de los productos secados mediante liofilización

Conclusiones

El arroz cocido licuado líquido fue el medio de cultivo que le proporcionó a *Verticillium lecanii* los requerimientos necesarios para su crecimiento y esporulación, además, por su fácil manejo, preparación y bajo costo fue escogido para realizar la producción masiva semiindustrial necesaria para las aplicaciones en campo.

El licuado de la biomasa separada manualmente, fue el procedimiento más adecuado para la obtención del principio activo de *Verticillium lecanii*, facilitando los posteriores procesos de preformulación.

El protector de luz ultravioleta CBUV 02 consiguió una mejor protección del principio activo frente a los efectos nocivos de ésta radiación, por que su tamaño de partícula de 0.3u es más pequeño que la del protector CBUV 01(0.6u), permitiendo un mejor recubrimiento de la superficie de los propágulos, teniéndose en cuenta el protector CBUV 02 para la preformulación del producto.

La liofilización mostró ser el mejor método de secado para la biomasa preformulada, ya que ocasionó la menor pérdida de la viabilidad y sus características físicas permiten un mejor manejo en las aplicaciones de campo.

El producto final fue un polvo diseñado para reconstituirse en una base autoemulsificable que contenía aceite vegetal de girasol, Tween 80 Span 60 y metilcelulosa. Esta suspensión se llevó a volumen final de aplicación con agua y se asperjó con bombas convencionales.

El producto preformulado con base en *Verticillium lecanii* mostró mayor estabilidad en almacenamiento a 9°C que a temperatura ambiente durante el tiempo del ensayo, ya que a temperatura de refrigeración se activan mecanismos de latencia del hongo.

Recomendaciones

Realizar estudios para evaluar la actividad insecticida de las 32 cepas nativas restantes del banco de cepas del laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, para hallar una cepa más promisoría en el control de la mosca blanca de los invernaderos en condiciones de invernadero y campo.

Continuar con los estudios de formulación del producto preformulado con base en *V. lecanii* orientado a proteger el hongo de otras condiciones medioambientales adversas, y continuar con los estudios de almacenamiento.

Implementar las técnicas seleccionadas en la producción masiva y preformulación de *V. lecanii* para lograr mayor esporulación y rendimiento viable desde los puntos de vista tecnológicos y económicos.

Realizar una producción industrial del producto para su evaluación en condiciones comerciales de cultivo.

Determinar la persistencia e inocuidad de *Verticillium lecanii* en el medio ambiente y su posible efecto frente a organismos no huésped.

Agradecimientos

Alba Marina Cotes directora del laboratorio de control biológico de CORPOICA en "Tibaitatá" por su asesoría prestada en la fase de producción y preformulación del entomopatógeno.

Javier García investigador del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas por su colaboración en los ensayos biológicos.

Rubén Molina auxiliar técnico de CORPOICA por su colaboración y apoyo en las labores de producción y preformulación del hongo entomopatógeno.

CORPOICA y PRONATTA por la colaboración logística y financiera para la ejecución de este proyecto de investigación.

Bibliografía

COTES, A. M. 1997. Producción masiva y formulación de microorganismos biocontroladores de fitopatógenos. En: Seminario Internacional de Control Biológico de Fitopatógenos (4º: 1997: Mosquera). Memorias del Seminario Internacional de Control Biológico de Fitopatógenos (Colombia). CORPOICA. p. 18-23.

GARCIA, J. 1996. Evaluación de cepas nativas de *Verticillium lecanii* en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. Santafé de Bogotá, 121 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá (Colombia). p. 120.

GÓMEZ, M y VILLAMIZAR, L. 1996. Estudio tecnológico para la producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarrhizium* spp. para el control biológico de la langosta sudamericana. Santafé de Bogotá. Trabajo de grado Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá (Colombia). p. 105.

GRIFFIN, D. 1981. Fungal physiology. 1 ed. New York : Wiley-Interscience. (Estados Unidos).

HEYLER, N; GILL, G; BYWATER, A; CHAMBERS, R. 1992. Elevated humidities for control of chrysanthemum pests with *Verticillium lecanii*. En: Pesticide Science. Londres (Inglaterra): Vol. 36. p. 373-378.