Blastosporas fúngicas estables y métodos para su producción, estabilización y uso

Referencia cruzada

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/050,473, presentada el 15 de septiembre de 2014.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere, generalmente, a métodos y composiciones relacionadas con el control de plagas de artrópodos que involucra el uso de hongos entomopatógenos. Se describen, específicamente, metodologías y composiciones para producir y secar blastosporas (células vegetativas) tolerantes a la desecación de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* para controlar plagas de insectos de cuerpo blando.

[0004] Antecedentes

[0005] Las enfermedades y los daños a las plantas provocados por plagas de artrópodos resultan en pérdidas económicas significativas para la agricultura y las industrias basadas en plantas. Se han seguido muchos y variados enfoques para controlar las plagas que atacan a las plantas, especialmente, a las plantas con valor comercial. A pesar de esto, la destrucción de plagas de las plantas y los productos de las plantas es aún un problema de gran importancia.

[0006] Tradicionalmente, el control de plagas de artrópodos se ha seguido a través de la aplicación de insecticidas químicos. El uso de sustancias químicas se somete a un número de desventajas. Las plagas de insectos pueden y han desarrollado tolerancia a sustancias químicas con el tiempo, lo que produce poblaciones resistentes. De hecho, la resistencia a pesticidas es un desafío muy importante para la viabilidad del control químico de plagas en las industrias agrícolas y hortícolas. Además, los pesticidas químicos no siempre son selectivos en sus objetivos, frecuentemente afectan negativamente a especies beneficiosas, tales como los polinizadores. Debido a esto y a otros efectos adversos, tales como los efectos sobre la salud humana y el medioambiente, otros métodos de control biológico se han investigado por mucho tiempo. Uno de tales enfoques es el uso de ciertos hongos entomopatógenos como agentes de control biológico. La reactivación del interés en el control biológico tales como los insecticidas microbianos en los últimos 20 años ha surgido directamente de la presión pública en respuesta a las preocupaciones sobre las toxicidades químicas. El control biológico presenta un medio

alternativo para controlar las plagas de artrópodos que es potencialmente más eficaz y específico que los métodos actuales, así como también reducir la dependencia de las sustancias químicas.

[0007] Los patógenos fúngicos de insectos son útiles como agentes de control biológico debido a su capacidad para infectar una amplia variedad de plagas de insectos y su potencial para la producción en masa. La producción y formulación son componentes claves para su éxito como productos comerciales. Existen diferentes métodos para la producción en masa, que incluyen la fermentación de sustratos sólidos (SSF) para conidios aéreos y la fermentación de cultivos líquidos (LCF) para blastosporas similares a levadura, conidios microciclos, y microsclerotia. Hasta la fecha, la mayoría de los entomopatógenos fúngicos ascomicetos (Ascomycota: Hypocreales) desplegados en estrategias de control biológico incluyen *Beauveria bassiana* sensu lato (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, *Isaria fumosorosea* Wise (anteriormente *Paecilomyces fumosoroseus*), *Lecanicillium longisporum* y *L. muscarium* (Petch) R. Zare y W. Gams (anteriormente *Verticillium lecanii*), y *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin., y los conidios aéreos comprenden el ingrediente activo principal de estos micoinsecticidas que se producen en su mayoría mediante el uso de técnicas de cultivo sólidas. Desafortunadamente, el tiempo de fermentación para la esporulación en sustratos sólidos generalmente requiere semanas y el proceso es una labor intensa con un alto riesgo de contaminación, lo que resulta en altos costos de producción. La tecnología de fermentación líquida, por otra parte, puede reducir estos obstáculos/inconvenientes de la producción y proporcionar capacidades de ampliación más económicas para producir diferentes propágulos fúngicos bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas. Debido al corto tiempo de fermentación de unos pocos días, la facilidad de recuperación del producto, la automatización del proceso, y la disponibilidad de componentes de medios económicos, la fermentación líquida se considera el método más rentable para producir agentes fúngicos para el control biológico.

[0008] Por lo tanto, es deseable un método para producir propágulos fúngicos infecciosos en cultivo líquido. Sin embargo, existen obstáculos técnicos a superar. Primero, los hongos entomopatógenos hipocreales anamórficos tales como *B. bassiana* e *I. fumosorosea* producen blastosporas y no conidios en cultivo líquido. Aunque se denominan blastosporas, estas células son realmente células vegetativas, similares a levaduras y no son tolerantes a la desecación y tienen una vida útil relativamente limitada (Chong-Rodriquez y otros, 2011; Lohse y otros, 2014). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de metodologías para producir blastosporas

tolerantes a la desecación, estables en almacenamiento en cultivo líquido, de manera que las blastosporas puedan utilizarse para el control de plagas. En la presente, se describen tales metodologías.

[0009] Los hongos son bien conocidos por su capacidad de metabolizar una variedad de compuestos mediante la expresión de enzimas catabólicas y permeasas. Después del carbono y el oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en células fúngicas y es uno de los nutrientes más costosos en los medios de fermentación. Identificar las fuentes de nitrógeno de bajo costo es crítico para el desarrollo de un medio de producción de biopesticidas adecuado. Las fuentes de nitrógeno económicas, tales como harinas de semillas de algodón y de soya, son generalmente no refinadas que contienen principalmente proteínas y oligopéptidos. Estos subproductos agrícolas y de procesamiento de alimentos son menos costosos que las fuentes de nitrógeno más altamente refinadas, tales como caseína hidrolizada por ácido o por enzimas, hidrolizados de soya, o proteínas de carne, que contienen altas cantidades de aminoácidos libres. Estudios anteriores han demostrado la factibilidad de producir blastosporas de *I. fumosorosea* en cortos tiempos de fermentación (≤ 3 días) con buena tolerancia a la desecación mediante el uso de fuentes de nitrógeno más refinadas tales como la caseína hidrolizada por ácido.

[0010] Debido a que los entomopatógenos fúngicos tienen una amplia variabilidad genética y responden de manera diferente cuando crecen en medios líquidos, deben considerarse los parámetros adecuados específicos de cepa mientras se evalúan y optimizan los parámetros de producción de cultivos líquidos. El trabajo con *I. fumosorosea* ha definido las condiciones nutricionales y ambientales que apoyan la rápida producción de altas concentraciones de blastosporas tolerantes a la desecación con una vida útil razonable. Sin embargo, el uso comercial de blastosporas de *B. bassiana* no existe debido a la necesidad de largos tiempos de fermentación y la pobre tolerancia a la desecación y la corta vida útil de las formulaciones de blastosporas. La producción de blastosporas tolerantes a la desecación, que exhiben estabilidad en almacenamiento con eficacia biológica concurrente como un agente de control biológico no se ha logrado anteriormente y por lo tanto, se desea.

Breve descripción de la invención

[0011] En una modalidad de la invención, se proporciona un método para producir una composición que contiene blastosporas en donde la composición comprende blastosporas tolerantes a la desecación de una especie de *Beauveria* o una especie de *Isaria* producidas

mediante la inoculación de un medio de cultivo líquido que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno con propágulos fúngicos de una especie de *Beauveria* o una especie de *Isaria*, mediante la incubación de dichos propágulos bajo condiciones de cultivo que proporcionan niveles de oxígeno disuelto por encima de cero y presión osmótica mayor que 0.5 MPa, mediante la incubación de los propágulos durante un tiempo suficiente para producir blastosporas, mediante la recolección de las blastosporas; y mediante el secado de las blastosporas, lo que produce de esta manera las blastosporas tolerantes a la desecación. En algunas modalidades, la especie de *Beauveria* es *B. bassiana*. En otras modalidades, la especie de *Isaria* es *I. fumosorosea*. En una modalidad particular, la fuente de carbono se encuentra en el medio de cultivo líquido a una concentración inicial de al menos seis por ciento. La fuente de carbono puede ser glucosa. En otra modalidad particular, la fuente de nitrógeno se encuentra en el medio de cultivo líquido a una concentración inicial de al menos uno y medio por ciento. La fuente de nitrógeno puede ser harina de semilla de algodón o caseína hidrolizada. En una modalidad específica, la fuente de carbono es glucosa y la fuente de nitrógeno es harina de semilla de algodón.

[0012] Otra modalidad proporcionada en la presente es una composición insecticida, que comprende un portador aceptable para la agronomía y blastosporas tolerantes a la desecación de una especie de *Beauveria* o una especie de *Isaria*, en donde el portador y las blastosporas se encuentran en un empaque hermético al aire y en donde las blastosporas se producen mediante la inoculación de un medio de cultivo líquido que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno con propágulos fúngicos de una especie de *Beauveria* o una especie de *Isaria*, mediante la incubación de los propágulos bajo condiciones de cultivos que proporcionan niveles de oxígeno disuelto por encima de cero y presión osmótica mayor que 0.5 MPa, mediante la incubación de los propágulos durante un tiempo suficiente para producir blastosporas, mediante la recolección de las blastosporas, y mediante el secado de las blastosporas, lo que produce de esta manera las blastosporas tolerantes a la desecación. En algunas modalidades, la especie de *Beauveria* es *B. bassiana*. En otras modalidades, la especie de *Isaria* es *I. fumosorosea*. En algunos casos, una composición insecticida contiene, además, un compuesto de depuración de oxígeno, un compuesto de depuración de humedad, o una combinación de ambos. En algunas modalidades, más del 60 % de las blastosporas son viables cuando se rehidratan después del

almacenamiento durante más de seis meses. En una modalidad particular, la composición insecticida puede almacenarse a temperaturas de 28ºC o menores.

[0013] Aún en otra modalidad de la presente invención, se proporciona un método para el control de insectos, el método que comprende aplicar al sitio de dichos insectos una cantidad con eficacia insecticida de blastosporas tolerantes a la desecación de una especie de *Beauveria* o una especie de *Isaria*. En algunos ejemplos, las blastosporas tolerantes a la desecación se producen mediante el método descrito anteriormente. En algunas modalidades, la especie de *Beauveria* es *B. bassiana*. En otras modalidades, la especie de *Isaria* es *I. fumosorosea*. En una modalidad particular, durante el crecimiento de las blastosporas, la fuente de carbono es glucosa y la fuente de nitrógeno es harina de semilla de algodón o caseína hidrolizada. El sitio de los insectos puede ser un cultivo agrícola.

Incorporación mediante referencia

[0014] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta descripción se incorporan en la presente mediante referencia a la misma medida como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específicamente e individualmente a ser incorporadas mediante referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0015] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones. Las características y ventajas de la presente invención se mencionan en la siguiente descripción detallada, y los dibujos que la acompañan de los que:

[0016] La Figura 1 proporciona una representación gráfica de la producción de blastosporas y la tolerancia de las blastosporas a la desecación por aislados GHA y ESALQ1432 de *B. bassiana* producidos mediante la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivo líquido.

[0017] La Figura 2 proporciona una representación gráfica del aumento del rendimiento y la tolerancia a la desecación de las blastosporas cuando se cultivan en presencia de niveles crecientes de glucosa.

[0018] La Figura 3 proporciona una gráfica que muestra la relación entre la actividad del agua (a_w) y el contenido de humedad en blastosporas secadas al aire de dos géneros fúngicos.

[0019] La Figura 4 proporciona las gráficas que demuestran las tasas de sobrevivencia a largo plazo de varias cepas de *B. bassiana* almacenadas a 4ºC.

[0020] La Figura 5 proporciona las gráficas que demuestran las tasas de sobrevivencia a largo plazo de varias cepas de *I. fumosorosea* almacenadas a 4ºC.

[0021] La Figura 6 proporciona una gráfica que muestra las tasas de sobrevivencia de blastosporas de *B. bassiana* a 28ºC en presencia de depuradores de oxígeno y de humedad.

[0022] La Figura 7 proporciona una gráfica que muestra las tasas de sobrevivencia de blastosporas de *B. bassiana* en presencia de depuradores de oxígeno y de humedad. Las células se secaron por pulverización con o sin ácido ascórbico (ASA).

[0023] La Figura 8 proporciona una gráfica que muestra la tasa de producción de blastosporas para cultivos de *B. bassiana* ESALQ1432 a diferentes concentraciones de glucosa y puntos de presión osmótica.

[0024] La Figura 9 proporciona el análisis morfológico de blastosporas cultivadas en presencia de presión osmótica aumentada.

[0025] La Figura 10 proporciona una gráfica que muestra que los niveles de oxígeno disuelto se afectan por el volumen del cultivo.

[0026] La Figura 11 proporciona dos paneles que muestran el rendimiento y la tolerancia a la desecación de las blastosporas en cultivos de volúmenes variables y diferentes fuentes de nitrógeno.

[0027] La Figura 12 proporciona dos paneles que demuestran los efectos de las blastosporas cultivadas en cultivos de alta presión osmótica sobre la eficacia entomopatógena.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0028] Las modalidades preferidas de la presente invención se muestran y se describen en la presente. Será evidente para aquellos con experiencia en la técnica que tales modalidades se proporcionan sólo a manera de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones ocurrirán para aquellos con experiencia en la técnica sin apartarse de la invención. Diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente pueden emplearse en la práctica de la invención. Se pretende que las reivindicaciones incluidas definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de esta manera.

[0029] A menos que se especifique lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los significados comprendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. La terminología usada en la descripción de la invención en la

presente es sólo para describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitantes de la invención. Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0030] A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, y así sucesivamente usados en la descripción y reivindicaciones se comprenderán como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, las propiedades numéricas que se exponen en la siguiente descripción y reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretenden obtener en las modalidades de la presente invención. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el alcance más amplio de la invención son aproximaciones, los valores numéricos que se exponen en los ejemplos específicos se informan tan precisos como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente del error encontrado en su medición respectiva. El término “aproximadamente” se define como más o menos el diez por ciento de un valor recitado. Por ejemplo, aproximadamente 1.0 g significa 0.9 g a 1.1 g.

[0031] Los términos aislado, purificado, o biológicamente puro, se refiere al material que se encuentra sustancialmente o esencialmente libre de componentes que acompañan normalmente al material referenciado en su estado nativo.

[0032] El término “estable en almacenamiento” y variaciones gramáticas de este, como se describe en la presente generalmente se refiere a blastosporas secadas al aire o secadas por pulverización (menos del 5 % de humedad) que demuestran viabilidad de un año o más cuando se almacenan a 4◦C, en donde la viabilidad se mide como al menos aproximadamente el 60 % de la germinación después de rehidratar e incubar las blastosporas secas en un medio líquido apropiado durante 6-7 horas.

[0033] El término “tolerante a la desecación” y variaciones gramáticas de este, como se describe en la presente se refiere, generalmente, a blastosporas secas que muestran el 50 % o más de germinación cuando se rehidratan y crecen en medio apropiado, tal como caldo de dextrosa de papa, a las seis a siete horas de incubación.

[0034] Los entomopatógenos fúngicos se consideran la primera línea de herramientas bioracionales para manejar poblaciones de numerosas plagas de insectos que incluyen moscas blancas con el potencial de integrarse con la aplicación de insecticidas químicos sintéticos para disminuir el desarrollo de la resistencia de insectos a insecticidas. Una gran parte de la literatura se ha enfocado en el uso de conidios aéreos de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* utilizados como insecticidas biológicos de contacto para el control de la mosca blanca. Varios estudios demostraron que la fase de levadura (blastospora) de *I. fumosorosea* fue más eficaz que los conidios aéreos en controlar moscas blancas, termitas subterráneas, saltadores de plantas, áfidos y escarabajos. En un estudio reciente de control de la mosca blanca mediante el uso de conidios aéreos, se identificaron aislados brasileños virulentes de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* que fueron eficaces en infectar y destruir varias etapas de vida del biotipo B de la mosca blanca de la hoja plateada *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae).

[0035] En la presente se describe un método de fermentación de cultivo líquido para producir blastosporas tolerantes a la desecación, estables en almacenamiento bajo condiciones de cultivo líquido. En una modalidad favorecida, las condiciones de cultivo incluyen altas tasas de aeración, presión osmótica de al menos 0.5 Megapascal (MPa), al menos 1.5 % de una fuente adecuada de nitrógeno, y al menos 6 % de una fuente adecuada de carbono. Las técnicas de cultivo líquido pueden usarse en el crecimiento de especies entomopatógenas del género *Beauveria* para promover las cualidades mencionadas anteriormente de estabilidad en almacenamiento, tolerancia a la desecación y mejorada eficacia biológica contra insectos patógenos. *Las especies de Beauveria* que pueden utilizarse con el método de fermentación de cultivo líquido como se describió incluyen *Beauveria alba, Beauveria amorpha, Beauveria arenaria, Beauveria asiatica, Beauveria australis, Beauveria bassiana, Beauveria brongniartii, Beauveria brumptii, Beauveria caledonica, Beauveria chiromensis, Beauveria coccorum, Beauveria cretacea, Beauveria cylindrospora, Beauveria delacroixii, Beauveria densa, Beauveria dependens, Beauveria doryphorae, Beauveria effusa, Beauveria epigaea, Beauveria felina, Beauveria geodes, Beauveria globulifera, Beauveria heimii, Beauveria kipukae, Beauveria laxa, Beauveria malawiensis, Beauveria melolonthae, Beauveria nubicola, Beauveria oryzae, Beauveria paradoxa, Beauveria paranensis, Beauveria parasitica, Beauveria petelotii, Beauveria pseudobassiana, Beauveria rileyi, Beauveria rubra, Beauveria shiotae, Beauveria sobolifera, Beauveria spicata, Beauveria stephanoderis, Beauveria sulfurescens, Beauveria*

sungii, Beauveria tenella, Beauveria tundrensis, Beauveria velata, Beauveria varroae, Beauveria vermiconia, Beauveria vexans, Beauveria viannai, Beauveria virella. Otros hongos entomopatógenos filamentosos que son dimórficos que incluyen *Metarhizium* spp., *Hirsutella* spp., *Lecanicillium* spp., *Isaria* spp., y *Nomuraea* spp. probablemente producirán blastosporas eficazmente y profusamente mediante el uso de las presentes condiciones de crecimiento comprendidas por la combinación de alta aeración, presión osmótica, y apropiada fuente y concentración de nitrógeno.

[0036] Las blastosporas de los hongos entomopatógenos de esta invención pueden utilizarse para infectar y destruir una amplia variedad de artrópodos económicamente importantes, que incluyen insectos que habitan tierra, suelo y canopia. Sin limitarse a estos, los artrópodos que pueden controlarse por las composiciones de esta invención incluyen gorgojos de raíz, gusanos de la raíz, gusanos alambre, moscas de la fruta, gusanos del suelo, gusanos de raíz, termitas, garrapatas, pulgas, saltamontes, hormigas, y una variedad de otros insectos de importancia agrícola, hortícola, médica y veterinaria. Algunos ejemplos no limitantes de insectos objetivo incluyen, gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp), gorgojo negro de la vid *Otiorhynchus sulcatus*), gorgojo de la raíz de cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), gorgojo de la papa dulce (*Cylas formicarius*), gusano de la raíz de la remolacha azucarera (*Tetanops myopaeformis*), gusano de la col (*Delia radicum*), gusano de la cebolla (*Delia antigua*), gusano del nabo (*Delia floralis*), gusano de la semilla del maíz (*Delia platura*), mosca del nabo de zanahoria (*Psila rosae*), escarabajo japonés (*Popillia japonica*), gusano europeo (*Rhizotrogus majalis*), termita subterránea (*Reticulitermes* y *Coptotermes* spp.), barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*), polilla gitana (*Lymantria dispar*), y gorgojo de la pacana (*Curculio caryae*), oruga del tabaco (*Spodoptera litura*), gusano cogollero del tabaco, oruga del capullo del algodón (*Helicoverpa armigera*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano de mazorca del maíz (*Helicoverpa zea*), barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), barrenador asiático del maíz (*Ostrinia furnacalis Guenee*) barrenadores del tallo de sorgo (*Chilo partellus, Coniesta ignefusalis, Busseola fusca, Chilo* spp.), barrenador amarillo del tallo de arroz (*Scirpophaga incertulas*), enrollador de hojas del arroz (*Cnaphalocrocis medinalisi*), saltador marrón de plantas de arroz (*Nilaprvata lugens*), trips del arroz (*Stenchaetothrips biformis*), insecto saltador (*Hishimonus phycitis*), saltamontes (*Melanoplus* spp.), gorgojo de cactus (*Metamasius spinolaei*), mosca blanca de la hoja plateada (*Bemisia argentifolii*), gusano soldado del betabel

(*Spodoptera exigua*), escarabajo del pepino (*Diabrotica undecimpunctata*), falso medidor de la alfalfa (*Autographa californica*), áfido de algodón (*Aphis gossypii*), termitas (*Odontetermes obesus, Odontotermes* spp., *Trinervitermes biformis*), saltarilla (*Emboasca kerri*), trips (*Frankliniella schultzei, Scirtothrips dorsalis, Podothrips bicolor*), polilla de dorso de diamante (*Plutella xylostella*), áfido verde del melocotonero (*Aphis gossypii*), áfido de papa (*Macrosiphum euphorbiae*) , trips (*Anephothrips dorsalis, Thrips palmi*), chinche harinosa (*Maconellicoccus hirsutus*), saltamontes (*Melanoplus* spp.), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), barrenador de brotes de berenjena (*Leucinodes orbonalis*), barrenadores de tallo, gusano soldado del betabel, (Spo*doptera exigua, Spodoptera* spp.), falso medidor de la col (*Trichoplusia ni, Trichoplusia* spp.), oruga espinosa del algodonero (*Earias insulana*), gusano moteado (*Earias vitella*), enrollador de hojas (*Sylepta derogata*), ácaros (*Leyranychus telari*), saltarilla de la okra (*Amrasca biguttula*), mosquito (*Anopheles gambiae, Culex quinquefasciatus*), mosca doméstica (*Musca domestica*), cucarachas (*Periplanata americana*) y garrapatas (*Ixodes dammini*), *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus*, garrapata blanda pegajosa (*Argas persicargas persicus*), garrapata de bovino (*Rhipicephalus microplus*), *Babesia microti*, garrapata de patas negras o garrapata de los ciervos (*Ixodes scapularis*), ácaro de la sarna de carneros (*Psoroptes ovis*), ácaro de aves tropicales (*Ornithonyssus bursa*), pulgas *Siphonaptera*, pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) y piojo del ganado (*Haemaptopinus eurysternus*).

[0037] Condiciones de cultivo

[0038] Los hongos útiles en la práctica de la presente invención, específicamente *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, exhiben formas polimórficas que van desde conidios hasta pseudohifas, hifas, y blastosporas (células vegetativas similares a levaduras), en dependencia de las diferencias, la edad, el medio y las condiciones de cultivos del aislado. Como la mayoría de los hongos, las condiciones de cultivo bajo las que se cultivan, afectan múltiples aspectos de la biología del organismo, que incluye la forma morfológica y el espectro de los productos biológicos.

[0039] Por lo tanto, Un experto en la técnica reconocerá que pueden modificarse múltiples condiciones de cultivo en la práctica de la invención descrita en la presente. Los ejemplos no limitantes de las condiciones de cultivo que pueden modificarse durante la aplicación y en la práctica de las invenciones descritas en la presente, incluyen: 1) temperatura; 2) fuente primaria de carbono; 3) concentración de oxígeno; 4) fuente primaria de nitrógeno; 5) pH; 6) concentración de minerales y otros iones; 7) edad/crecimiento de la fase del cultivo; 8)

organización de un fermentador industrial; y 9) forma morfológica predominante. Un experto en la técnica reconocerá que pueden modificarse otros parámetros del cultivo que afectan la producción deseada de los productos biológicos y el rendimiento de los productos biológicos.

[0040] En un aspecto de la invención, los cultivos de las cepas fúngicas descritos en la presente pueden cultivarse a cualquier temperatura que facilite la producción de uno o más productos biológicos. Por ejemplo, un cultivo puede cultivarse a una temperatura de 15º-30ºC, o cualquier grado total o parcial dentro de ese intervalo, que incluye, pero sin limitarse a 15.0ºC, 15.5ºC, 16.0ºC, 16.5ºC, 17.0ºC, 17.5ºC, 18.0ºC, 18.5ºC, 19.0ºC, 19.5ºC, 20.0ºC, 20.5ºC, 21.0ºC, 21.5ºC, 22.0ºC, 22.5ºC, 23.0ºC, 23.5ºC, 24.0ºC, 24.5ºC, 25.0ºC, 25.5ºC, 26.0ºC, 26.5ºC, 27.0ºC, 27.5ºC, 28.0ºC, 28.5ºC, 29.0ºC, 29.5ºC, y 30.0ºC.

[0041] En algunas modalidades, las cepas fúngicas descritas en la presente pueden cultivarse bajo condiciones donde el pH del cultivo facilite la producción de una o más formas morfológicas de interés. Por ejemplo, un cultivo puede cultivarse en medios donde el pH se encuentre entre 3.0 y 8.5, 4.5 y 6.5, o cualquier valor dentro de ese intervalo, que incluye, pero no se limita a pH 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5. Un experto en la técnica reconocerá que no necesita mantenerse un pH estable en la totalidad del cultivo de la cepa que produce el(los) producto(s) biológico(s) de interés. Por lo tanto, en algunas modalidades, variará el pH de un cultivo microbiano de la presente invención. En otras modalidades, pueden añadirse amortiguadores de pH para mantener un pH relativamente estable en el que el pH del medio de cultivo durante la vida del cultivo no varía desde un punto de partida escogido en más de ±0.5.

[0042] En algunas modalidades, las cepas microbianas de la presente invención pueden cultivarse en presencia de fuentes particulares de carbono. Por ejemplo, un cultivo puede cultivarse en presencia de fuentes simples de carbono tales como (D- o L-) arabitol, sacarosa, fructosa, glucosa, manosa, galactosa, arabinosa, arabinosa, xilosa, manitol, glucitol, galactitol, xilitol, ribitol, treitol, glicerol, ácido glucónico, glucosamina, o meso-eritritol. Alternativamente, un cultivo puede cultivarse en presencia de fuentes complejas de carbono tales como celulosa, almidón, melaza de remolacha, vaina de algarrobo, hidrolizados de harina de maíz, jarabe de maíz, vinagre de la fermentación del etanol, pulpa de piel de uva, aceites vegetales, hidrolizado de turba, almidón de papa hidrolizado, y licor de sulfito agotado. Pueden utilizarse fuentes de

carbono que son también fuentes para otras necesidades nutricionales, tales como nitrógeno. Por ejemplo, los medios para el uso en la presente invención pueden incluir aminoácidos tales como aspartato, treonina, lisina, metionina, isoleucina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, prolina, alanina, valina, leucina, triptófano, tirosina, fenilalanina y sus intermediarios metabólicos. Estas listas no son limitantes y está dentro de las capacidades de Un experto en la técnica utilizar otras fuentes de carbono en la práctica de la presente invención. Cualquier fuente de carbono puede usarse sola o en conjunto con otras fuentes de carbono.

[0043] Otros parámetros nutricionales también pueden variarse, que incluyen las fuentes de nitrógeno. Los ejemplos no limitantes de fuentes de nitrógeno incluyen las fuentes de nitrógeno orgánicas (p. ej., harina de semilla de algodón, caseína hidrolizada por ácida, levadura autolisada, ácido glutámico, peptona, pomada de frijol de soya, extracto de levadura, salsa alimentaria, extracto de malta, licor de maíz macerado y harina de frijol de soya) y fuentes de nitrógeno inorgánicas (p. ej., urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio) pueden incluirse en los medios de cultivo utilizados en la práctica de la presente invención. En algunas modalidades, una fuente de nitrógeno se encuentra en una cantidad de 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 3.5 %, 4 %, 4.5 %, 5 %, 5.5 %, 6 %, 6.5 %, 7 %, 7.5 %, 8 %, 8.5 %, 9 %, 9.5 %, 10 %, 10.5 %, 11 %, 11.5 %, 12 %, 12.5 %, 13 %, 13.5 %, 14 %, 14.5 %, 15 % o más. Preferentemente, la concentración se encuentra entre 1.5 % y 9 %.

[0044] Las fuentes de fosfato tales como dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de dipotasio y sus sales correspondientes que contienen sodio pueden incluirse en los medios de cultivo según sea necesario. Las sales metálicas y minerales tales como sales de zinc, hierro, magnesio, manganeso, calcio y cobre pueden incluirse según sea necesario. Otros suplementos nutricionales, tales como vitaminas (p. ej., biotina, tiamina) también pueden incluirse. Un experto en la técnica reconocerá que la composición nutricional variable del cultivo puede utilizarse para maximizar la producción de un producto biológico de interés y disminuir la producción de subproductos no deseados. Cualquiera de estos nutrientes puede usarse solo o en conjunto con cualquier otro nutriente.

[0045] En algunas modalidades, los osmolitos se usan para controlar la presión osmótica del cultivo líquido. Pueden utilizarse osmolitos tales como azúcares (glucosa, galactosa, fructosa, trehalosa etcétera), polioles (manitol, glicerol, eritritol etcétera), proteínas, aminoácidos, sales,

polímeros (polivinilpirrolidona, polietilenglicol etcétera), y cualquier compuesto que pueda usarse para cambiar la presión osmótica en los medios de cultivo para fermentación sumergida. En general, de conformidad con la presente invención, las mejoras en la forma y producción de blastosporas puede lograrse mediante el aumento de la presión osmótica a >0.5 MPa.

[0046] En una modalidad particular de la presente invención las técnicas de cultivo líquido para producir esporas tolerantes a la desecación utilizan concentraciones de al menos 1.5 % - 9 % de una fuente de nitrógeno y aproximadamente 4 % - 25 % de una fuente de carbono, con al menos 0.5 MPa de presión osmótica.

[0047] Pueden añadirse nutrientes al cultivo en cualquier régimen de alimentación, que incluye, pero no se limita a cultivos de alta densidad celular, cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo discontinuo alimentado constantemente, cultivo discontinuo alimentado exponencialmente, cultivo continuo, o una mezcla de estos enfoques para diferentes nutrientes.

[0048] En algunos casos puede modificarse la longitud del tiempo de crecimiento del cultivo para mejorar o comenzar producción de un producto biológico de interés. Por ejemplo, un cultivo puede cultivarse durante 10-300 horas, o más, o cualquier punto de tiempo dentro del intervalo, por ejemplo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 horas, o más antes que comience la recolección de un producto biológico.

[0049] En cultivos líquidos bajo agitación, los cultivos de la presente invención pueden cultivarse para aumentar el oxígeno disuelto. Los factores que afectan los niveles de oxígeno disuelto incluyen el volumen del cultivo, el volumen del recipiente, la velocidad de rotación y, en un fermentador, la tasa de aeración, la velocidad del agitador, el diseño del impulsor, el diseño del tanque de fermentación, la presión de cabeza del tanque, y la mezcla del gas de aeración. En algunas modalidades, un cultivo puede agitarse en un agitador rotatorio a cualquier velocidad viable desde 50-400 rpm. Las tasas de aeración para fermentadores puede ser cualquier tasa viable de cero a 700 litros estándar por minuto (slpm), que incluye, pero no se limita a 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más slpm. La velocidad del agitador puede ser de 50-1000 rpm en dependencia del tamaño del fermentador. La presión de cabeza del fermentador puede variar de 0-30 psi para aumentar los niveles de oxígeno disuelto. Las mezclas de gas de aeración pueden variar en el contenido de oxígeno desde el aire normal, que es 21 % de

oxígeno, hasta el oxígeno puro. Los niveles de oxígeno disuelto en modalidades preferidas se mantendrán por encima de cero.

[0050] Además, la optimización de la producción de células fúngicas puede depender del crecimiento de un cultivo hasta un punto particular del ciclo de vida. Por ejemplo, un cultivo puede cultivarse hasta la fase de adaptación temprana, la fase de adaptación media, la fase de adaptación tardía, la fase exponencial temprana, la fase exponencial media, la fase exponencial tardía, la fase estacionaria temprana, la fase estacionaria media, o la fase de muerte. En algunos ejemplos, los cultivos pueden mantenerse en una fase de crecimiento (p. ej., mediante el cultivo continuo alimentado) para mantener una fase de crecimiento particular para el cultivo.

[0051] En otras ocasiones, las condiciones de cultivo pueden alterarse de manera que una forma morfológica de las cepas fúngicas predomine sobre otras formas morfológicas. Por ejemplo, las condiciones de cultivo pueden controlarse de manera que predominen las formas similares a levadura (blastosporas), predominen los conidios, o predominen las hifas/pseudohifas.

[0052] En algunas modalidades preferidas, las blastosporas producidas mediante la utilización de la presente invención pueden secarse antes de su uso como un agente de control biológico. Para las blastosporas de secado al aire, el caldo de cultivo que contiene blastosporas (2-5 días de fermentación) se recolecta del caldo de cultivo mediante filtración, centrifugación, o cualquier otro medio conocido en la técnica para eliminar el medio agotado. Las blastosporas pueden mezclarse con un auxiliar de filtro adecuado, tal como, pero no se limita a, arcilla, tierra de diatomeas, talco, dióxido de silicio, o silicato de calcio. Esta mezcla puede filtrarse al vacío para eliminar los medios agotados y formar una torta de filtración. Las tortas de filtración pueden romperse mediante el uso de cualquier equipo de granulación adecuado. La torta de filtración de blastosporas granulada se seca después mediante el uso de secado al aire, secado al vacío, o secado en lecho fluidizado para un contenido final de humedad menor que 5 % o actividades del agua (a_w) por debajo de 0.3. Alternativamente, el secado por pulverización o el secado en lecho fluidizado de blastosporas se realiza mediante el secado por pulverización del caldo de cultivo que contienen blastosporas o suspensiones de blastosporas separadas con o sin portadores o estabilizadores. Los portadores o estabilizadores pueden incluir compuestos que mejoran la fluidez, la capacidad de suspensión, la tolerancia a la desecación, y/o la estabilidad de almacenamiento de la formulación de blastosporas y pueden incluir pero no se limitan a proteínas, carbohidratos, leche desnatada, maltodextrina, disacáridos, azúcares simples, melazas,

PVP, arcillas, tierra de diatomeas, talco, dióxido de silicio, o silicato de calcio. El secado por pulverización se realiza a temperaturas de entrada/salida que minimizan la exposición de las blastosporas a altas temperaturas y que resultan en una formulación de blastosporas fluida secadas a menos de 6 % de humedad. Se prefieren los protocolos de secado por pulverización tales como el uso de temperaturas de entrada de 90 °C/de salida de 50 °C. Otros protocolos de temperatura de entrada/salida del secado por pulverización son adecuados siempre y cuando la formulación de blastosporas secas solo se exponga brevemente a altas temperaturas. El secado en lecho fluidizado pudiera emplear los portadores descritos anteriormente y pudiera operarse a temperaturas propicias para la sobrevivencia de las esporas.

[0053] Composiciones de control biológico

[0054] En algunas modalidades, las blastosporas producidas mediante los métodos de la presente invención se combinan con uno u otros componentes más para producir una composición de control biológico, típicamente para el uso como un insecticida. En algunos ejemplos, la composición de control biológico comprende al menos un portador aceptable para la agricultura. Algunos ejemplos no limitantes de tales portadores incluyen estimulantes de carga, agentes anti torta, agentes humectantes, emulsionantes, enmiendas nutricionales y antioxidantes. Tales portadores pueden usarse solo o en cualquier combinación. Un experto en la técnica es capaz de escoger los portadores apropiados para aplicaciones particulares. Los estimulantes de carga pueden ser una fuente de carbohidratos, tal como un disacárido que incluye, por ejemplo, trehalosa y sacarosa, o monosacáridos tales como fructosa o glucosa. Los agentes anti torta potenciales pueden incluir tarco, dióxido de silicio, silicato de calcio, o arcilla de caolín. Los agentes de humectación incluyen, pero no se limitan a surfactantes o polvo de leche desnatada. Los emulsionantes pueden incluir emulsionantes basados en soya tales como lecitina o emulsionantes basados en vegetales tales como monoglicéridos. Los antioxidantes pueden incluir, pero no se limitan a, glutamato, ácido ascórbico y ácido cítrico.

[0055] En varias modalidades, la composición de control biológico es una composición estable capaz de soportar la viabilidad reproductiva del componente celular fúngico, o capaz de retener la eficacia insecticida durante un período de tiempo de entre 2 semanas y 2 años. En algunos ejemplos este período es aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses,

aproximadamente seis meses, aproximadamente siete meses, aproximadamente ocho meses, aproximadamente nueve meses, aproximadamente diez meses, aproximadamente once meses, aproximadamente doce meses, aproximadamente trece meses, aproximadamente catorce meses, aproximadamente quince meses, aproximadamente dieciséis meses, aproximadamente diecisiete meses, aproximadamente dieciocho meses, aproximadamente diecinueve meses, aproximadamente veinte meses, aproximadamente veintiún meses, aproximadamente veintidós meses, aproximadamente veintitrés meses, aproximadamente veinticuatro meses, o más. Tales periodos de almacenamiento pueden lograrse a cualquier temperatura entre 0-35 ºC.

[0056] Para facilitar el almacenamiento a largo plazo, en algunas modalidades, pueden utilizarse los componentes tales como los depuradores de oxígeno, y los depuradores de humedad (desecantes) en conjunto con el empaque de la composición. Típicamente, el empaque tiene un diseño hermético al aire y al agua. El material particular del empaque no es importante para la invención y cualquier material comercialmente disponible puede utilizarse para el empaque, tal como películas de aluminio sellables o películas mylar. Un desecante es una sustancia higroscópica usualmente en una bolsa o bolsillo poroso que se coloca dentro de un empaque sellado. Los desecantes favorecidos son químicamente estables o químicamente inertes, e incluyen gel de sílice, carbón activado, sulfato de calcio (Drierite), cloruro de calcio, tamiz molecular (típicamente, zeolitas), incozol 2, Loxanol®, Byk®-2616, Trixene AS, Tyzor® IBAY, AMP 95, AMPD, Sylosiv®A3, Silquest®A-171, NEWOTEC®547, USI®-SL25, Modarez®, Zeolum®, TAFTIC™, y similares. Los depuradores de oxígeno pueden incluir cualquier sustancia eficaz que absorbe oxígeno, típicamente a través de una reacción de oxidación. Los ejemplos no limitantes de depuradores de oxígeno que pueden utilizarse en la presente invención incluyen la oxidación mediada por enzimas (Bioka®S-100, Bioka®S-75), la oxidación basada en hierro (Ageless®FX-100, FreshPax®), ascorbato, hidrógeno carbonato de sodio, y similares.

[0057] Las composiciones de control biológico de la presente invención pueden utilizarse en conjunto con otros componentes que pueden nombrarse colectivamente sustancias agroquímicas. Los ejemplos de las categorías de sustancias agroquímicas que pueden combinarse con los propágulos fúngicos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a germicidas, herbicidas, insecticidas y acaricidas, reguladores del crecimiento de las plantas, bioestimulantes, fungicidas, y similares. Tales componentes adicionales pueden utilizarse solos o en cualquier combinación.

[0058] En algunos ejemplos, una composición de control biológico de la presente invención comprende, además, blastosporas de un hongo entomopatógeno y uno o más germicidas pueden incluir: captán, tiuram, ziram, zineb, maneb, mancozeb, propineb, policarbamato, clorotalonil, quintoceno, captafol, iprodiona, procimidona, fluoroimida, mepronil, flutolanil, pencicuron, oxicarboxin, fosetil-aluminio, propamocarb, triadimefon, triadimenol, propiconazol, diclobutrazol, bitertanol, hexaconazol, miclobutanil, flusilazol, etaconazol, fluotrimazol, flutriafen, penconazol, diniconazol, ciproconazol, fenarimol, triflumizol, procloraz, imazalil, pefurazoato, tridemorf, fenpropimorf, trifolin, butiobato, pirifenox, anilazina, polioxina, metalaxil, oxadixil, furalaxil, isoprotiolano, probenazol, pirrolnitrina, blasticidina S, kasugamicina, validamicina, sulfato dihidrostreptomicina, benomilo, carbendazima, metil tiofanato, himexazol, cloruro de cobre básico, sulfato de cobre básico, acetato de fentina, hidróxido de trifenilestaño, dietofencarb, quinometionato, binapacrilo, lecitina, bicarbonato de sodio, ditianón, dinocap, fenaminosulf, diclomezina, guazatina, dodina, IBP, edifenfos, mepanipirim, ferimzona, triclamida, metasulfocarb, fluazinam, etoquinolac, dimetomorf, filoquinona, tecloftalam, ftalida, óxido de fenazina, tiabendazol, triciclazol, vinclozolina, cimoxanil, ciclobutanilo, guazatina, hidrocloruro de propamocarb, ácido oxolínico, ciflufenamida, iminoctadina, cresoxim-metilo, triazina, fenhexamida, ciazofamida, ciprodinil, protioconazol, fenbuconazol, trifloxistrobina, azoxistrobina, hexaconazol, imibenconazol, tebuconazol, difenoconazol, carpropamid, y similares. Un experto en la técnica reconocerá que esta no es una lista exhaustiva y puede utilizarse cualquier germicida aceptable para la agronomía y la horticultura.

[0059] En algunos casos, una composición de control biológico de la presente invención comprende blastosporas de un hongo entomopatógeno y uno o más herbicidas que incluyen, pero no se limitan a: 2,4-D, MCPA, clomeprop, dicamba, clorotolurón, diurón, linurón, isourón, fenurón, neburona, simazina, atrazina, simetrina, prometrina, hexazinona, propazina, desmetrilina, terbocetón, propanilo, bromoxinilo, ioxinil, piridato, cloridazón, bentazón, clometoxifeno, bifenox, acifluorfen de sodio, flumioxazina, tiadiazina, oxadiazón, sulfentrazona, pentoxazona, piraclonil, pirazolinato, pirazoxifeno, benzofenap, mesotriona, isoxaflutol, isoxaclortol, amitrol, aclonifen, diflufenican, benzobiciclon, diclofop-metilo, fluazifop-butilo, aloxidim sodio, cletodim, setoxidim, tralkoxdim, tepraloxidim, bensulfuron-metilo, pirazosulfuron-etilo, rimsulfuron, imazosulfuron, prosulfuron, fulmetsulam, diclosulam,

metosulfam, imazapir, imazaquin, piritiobac-sódico, bispiribac-sódico, piriminobac-metilo, flucarbazona, propoxicarbazona, glifosato, una sal de glifosato de amonio, glufosinato, trifluralina, pendimetalina, benfluralina, prodiamina, profam, ditiopir, alaclor, metolaclor, petoxamida, acetoclor, propaclor, dimetenamida, difenamida, napropamida, mefenacet, fentrazamida, molinato, dimepiperato, cicloato, esprocarb, tiobencarb, tiocarbazil, bensulida, dalapon, asulam, DNOC, dinoseb, flupoxam, triaziflam, quinclorac, cinmetilina, dazomet, dimron, etobenzanida, oxaziclomefona, piributicarb, y similares. Un experto en la técnica reconocerá que esta no es una lista exhaustiva y puede utilizarse cualquier herbicida aceptable para la agronomía y la horticultura.

[0060] En algunos ejemplos, una composición de control biológico de la presente invención comprende blastosporas de un hongo entomopatógeno y uno o más reguladores de crecimiento de las plantas incluyen las gibberelinas (por ejemplo, gibberelina A3, gibberelina A4, y gibberelina A7), IAA, NAA, y similares. Un experto en la técnica reconocerá que esta no es una lista exhaustiva y puede utilizarse cualquier regulador del crecimiento de plantas aceptable para la agronomía y la horticultura.

[0061] En algunos ejemplos, una composición de control biológico de la presente invención comprende blastosporas de un hongo entomopatógeno y uno o más insecticidas químicos. Un experto en la técnica es capaz de escoger uno o más insecticidas químicos según sea apropiado para el control de una o más especies de plagas de insectos. Tales insecticidas químicos pueden incluir los siguientes: Inhibidores de la acetilcolinesterasa (carbamatos, organofosfatos), bloqueadores de canales de cloro dependientes de GABA (organoclorados ciclodieno, fenilpirazolas), moduladores de canales de sodio (piretroides, piretrinas), moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina (neonicotinoides, nicotina, sulfoxaflor, buetnolides), moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (espinosinas), moduladores alostéricos del canal de cloro dependiente de glutamato, imitadores de la hormona juvenil (análogos hormonales, fenoxicarb, piriproxifen), inhibidores no específicos (multisitio) (haluros de alquilo, cloropicrina, fluoruro de sulfurilo, boratos, tártaro hemético, generadores de isotiocianato de metilo), moduladores de órganos cordotonales (pimetrozina, flonicamid), inhibidores del crecimiento de ácaros (clofentezina, diflovidazin, hexitiazox, etoxazol), inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial (diafentiurón, acaricidas orgánicos de estaño, propargita, tetradifon), activadores de canales de cloro (avermectina, milbemicina), disruptores

del gradiente de protones / desacoplantes de la fosforilación oxidativa (clorfenapir, DNOC, sulfluramida), bloqueadores de canales del receptor nicotínico de acetilcolina (análogos de nereistoxina), inhibidores de la biosíntesis de quitina (benzoilureas, buprofezin), disruptores de la muda (criomazina), agonistas del receptor de ecdisona (diacilhidrazinas), agonistas del receptor de octopamina (amitraz), inhibidores del transporte de electrones (hidrametilnon, acequinocil, fluacripirim, acaricidas METI, rotenona, fosfina, cianidas, derivados de β-cetonitrilo, carboxanilidas), bloqueadores de canales de sodio dependientes de voltaje (indoxacarb, metaflumizona), inhibidores de la acetil CoA carboxilasa (derivados de ácido tetrónico y tetrámico), moduladores del receptor de rianodina (diamidas), y compuestos de modos de acción desconocidos (azadiractina, benzoximato, bifenazato, bromopropilato, chinometionato, criolita, dicofol, piridalilo, pirifluquinazón, azufre, azufre calcáreo). Un experto en la técnica reconocerá que esta es una lista no limitante de insecticidas potenciales, y puede utilizarse cualquier pesticida aceptable para la agronomía y la horticultura.

[0062] Aún en otras modalidades, una composición de control biológico de la presente invención comprende blastosporas de un hongo entomopatógeno y uno o más fungicidas, por ejemplo: mancozeb, triciclazol, carbendazim, hexaconazol, metalaxil, benomilo, difenoconazol, propiconazol, kitazin, tebuconazol, oxicloruro de cobre, hidróxido de cobre, tridemorfo, propineb, safin, esporrina, blastina, bio-vitrioll y similares. Típicamente, un fungicida usado tendrá poca o no tendrá actividad contra las blastosporas fúngicas de la composición. Un experto en la técnica reconocerá que esta no es una lista exhaustiva y puede utilizarse cualquier regulador del crecimiento de plantas aceptable para la agronomía y la horticultura.

[0063] Las formulaciones de la composición de control biológico para el uso como un agente para el control de insectos pueden prepararse a partir de blastosporas que se han recolectado del medio de cultivo tal como se describió anteriormente. Como cuestión práctica, se prevé que tales formulaciones puedan prepararse directamente a partir del cultivo, obviando de esta manera la necesidad de algunos pasos de purificación. Aunque los cultivos líquidos pueden usarse directamente, en la modalidad preferida el agua se elimina de los cultivos hasta la sequedad parcial o considerable como se describió anteriormente, y el cultivo seco se rompe o granula en pequeñas partículas adecuadas para la aplicación mediante aplicadores convencionales de gránulos, mediante el uso de técnicas convencionales en la técnica. El secado puede realizarse a

través de secado al aire (tal como mediante la mezcla de las blastosporas recolectadas con un agente desecante tal como tierra de diatomeas) o secado por pulverización.

[0064] Para facilitar la aplicación y posterior proliferación de hongos, las blastosporas recolectadas pueden formularse alternativamente en un portador o vehículo adecuado, aceptable para la agronomía, nutricional o inerte para la aplicación como polvos humectables, polvos, gránulos, cebos, soluciones, concentrados emulsionables, emulsiones, concentrados en suspensión y pulverizadores (aerosoles). Por ejemplo, para aplicaciones líquidas, las composiciones de control biológico pueden formularse como una suspensión o emulsión. En tales modalidades, los portadores preferidos incluyen pero no se limitan a agua, amortiguadores, o aceites vegetales o de plantas. En una modalidad alternativa, preferida particularmente adecuada para aplicaciones granulares sólidas, las composiciones de control biológico pueden formularse con portadores o diluentes sólidos inertes tales como tierra de diatomeas, talco, arcilla, vermiculita, $CaCO_3$, mazorcas de maíz, geles de alginato, matrices de almidón o polímeros sintéticos, o pueden incorporarse en micropartículas o microcápsulas convencionales de liberación controlada. El experto reconocerá que los hongos pueden formularse, además, en conjunto con aditivos convencionales tales como agentes pegajosos o adherentes, agentes emulsionantes, surfactantes, espumas, humectantes, o agentes de humectación, antioxidantes, protectores UV, aditivos nutritivos, fertilizantes, insecticidas, o incluso con fungicidas que exhiben baja toxicidad para los hongos sujeto. Para la aplicación en la corteza o la copa de los árboles y plantas, las composiciones de control biológico pueden formularse, además, con un adyuvante higroscópico o hidrofílico.

[0065] La cantidad absoluta de las blastosporas y su concentración en la composición final puede seleccionarse para proporcionar una reducción eficaz en la población del insecto objetivo en comparación con un control sin tratar. La cantidad real no es crítica y es una función de consideraciones prácticas tales como las propiedades del vehículo o portador, la densidad de la población de insectos objetivo, y el método y sitio de aplicación, y puede determinarse fácilmente mediante pruebas de rutina. Como las blastosporas de esta invención sirven para producir y suministrar una alta concentración de las células fúngicas vegetativas infecciosas para controlar los insectos objetivo mediante infección y muerte, para los propósitos de formulación y aplicación, una “cantidad eficaz” se define como cualquier cantidad de blastosporas suficientes para producir posteriormente suficientes células en el hábitat objetivo para infectar y destruir los

insectos objetivo en relación con un control sin tratar. A modo de ejemplo y sin que se limite a este, se prevé que las formulaciones adecuadas contengan, típicamente, aproximadamente 1×10^{6} blastosporas o más por gramo de biomasa recuperada del cultivo líquido (basado en el peso seco de la biomasa), preferentemente al menos 1.5×10^{7} blastosporas por gramo de biomasa. Para la aplicación a cultivos en fila típicos, sin que se limite a esto, se prevé que las tasas de aplicación adecuadas sean al menos 1×10^{7} blastosporas por hectárea. En otras modalidades, la tasa de aplicación puede ser al menos al menos 1×10^{6}, 5×10^{6}, 1×10^{7}, 5×10^{7}, 1×10^{8}, 5×10^{8},1×10^{9}, 5×10^{9}, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}, 5×10^{11}, 1×10^{12}, 5×10^{12}, 1×10^{13}, 5×10^{13}, 1×10^{14}, 5×10^{14}, 1×10^{15}, 5×10^{15}, 1×10^{16}, 5×10^{16}, blastosporas o más por hectárea.

[0066] En uso, las composiciones de control biológico de esta invención pueden aplicarse al sitio o cerca de los insectos objetivo o sobre la superficie de las plantas a proteger, p. ej., sobre la corteza de los árboles, o como un revestimiento de semillas, mediante el uso de técnicas convencionales. En una modalidad preferida, las blastosporas se aplican al suelo, o a mezclas de envases sin suelo tales como las que se usan en invernaderos, en una forma granular y a superficies de plantas sobre la tierra en una suspensión pulverizable. En dependencia de la plaga de insectos objetivo, las blastosporas pueden aplicarse en campos agrícolas, huertos, invernaderos, jardines o céspedes, o cerca de plantas ornamentales, árboles o estructuras comerciales o residenciales. Las composiciones de control biológico pueden aplicarse al suelo, a mezclas de envases sin suelo, a superficies de plantas, o una combinación de estos.

[0067] Ya descrita la invención en general, los ejemplos a continuación ilustran la generación y eficacia de la invención. Ni los ejemplos, ni la descripción general anterior deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

[0068] Preparación de hongos e inóculos

[0069] Se analizaron en este estudio cinco aislados de *B. bassiana* y cinco aislados de *I. fumosorosea*. La mayoría de los aislados fúngicos se originaron en Brasil con los detalles dados en la **Tabla 1**. Los aislados ARSEF 3581 de *I. fumosorosea* y GHA (ARSEF 6444) de *B. bassiana,* actualmente designados como el ingrediente activo del bioinsecticida comercial conocido como Mycotrol® (Laverlam, Butte, MT, Estados Unidos), sirvieron como estándares de los Estados Unidos para los estudios de cultivo líquido. Los aislados fúngicos brasileños se identificaron anteriormente mediante el uso de una técnica molecular basada en la secuenciación

de genes de dominio. Los cultivos de reserva de estos hongos se cultivaron en agar de dextrosa de papa ([PDA] Difco®, Detroit, MI, Estados Unidos) en placas Petri durante 2–3 semanas a 22 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12:12 h (L:D) hasta la esporulación, se contaron en tampones de agar de 1 mm^2 y se almacenaron en glicerol al 10 % en crioviales estériles a –80 °C. Para producir el inóculo de conidios, se usaron cultivos de reserva congelados para inocular placas de PDA que se incubaron durante 2–3 semanas hasta que los cultivos esporularon en las placas.

Tabla 1. ***Aislados de B. bassiana*** **e** ***I. fumosorosea***

Hongo	Código del aislado	Huésped/Fuente
B. bassiana	ESALQ-PL63	*Atta* sp
	ESALQ447	*Solenopsis invicta*
	ESALQ1432	*Diaphorina citri*
	CG1229	*Rupela albinella*
	GHA (ARSEF6444)	*Diabrotica undecimpunctata*
I. fumosorosea	ESALQ1296	*Bemisia tabaci*
	ESAL11364	*Myzus persicae*
	ESALQ1409	*B. tabaci*
	CG1228	*R. albinella*
	ARSEF3581	*B. tabaci*

[0070] Medios y condiciones de cultivo

[0071] Los medios líquidos usados para los precultivos y la producción de blastosporas contenían las siguientes sales basales por litro: KH_2PO_4, 2.0 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 37 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 16 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 14 mg; tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tióctico, 500 mg cada uno; ácido fólico, biotina, vitamina B12, 50 mg cada uno. Todas las sustancias químicas usadas se obtuvieron de Sigma® (St. Louis, MO, Estados Unidos) a menos que se especifique lo contrario. El medio de sales basales para precultivo se complementó con glucosa (Fisher Scientific®) a 80 g/L (40 % de carbono) y caseína hidrolizada por ácido (derivada de leche de bovino, Hy-case™ MSF, Kerry Bioscience, Nueva York, NY, Estados Unidos) a 25 g/L (8.5 % de N y 53 % de C), lo que produjo un medio con una relación carbono a nitrógeno (C:N) de 23:1. El medio para precultivos tenía un pH inicial de 5.8 y el pH no se ajustó durante el crecimiento del cultivo. Las soluciones de reserva de glucosa (20 % p/v) se autoclavearon por separado y se añadieron antes de la inoculación. La esterilización de los cultivos líquidos y de las soluciones de reserva de glucosa se realizó a 123°C durante 20 min. Todos los medios se

prepararon con agua destilada desionizada (ddH_2O). Los inóculos de conidios para precultivos se cosecharon mediante el raspado de las placas con 10 ml de solución acuosa estéril de monooleato de polioxietilensorbitano al 0.04 % (Tween® 80, Sigma®). Los precultivos se inocularon con suspensiones de conidios para suministrar una concentración final de 5×10^5 conidios por ml para *I. fumosorosea* y 1×10^6 conidios por ml para *B. bassiana* en el medio de cultivo líquido. Los precultivos de cien ml de todos los hongos se cultivaron en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml (Bellco Glass, Vineland, NJ, Estados Unidos) durante 3 días a 28 °C y 350 rpm mediante el uso de un agitador rotatorio de incubadora (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Las concentraciones de conidios y blastosporas se midieron por microscopía mediante el uso de un hemocitómetro (aumento de 400×) con un microscopio óptico con lente óptico DIC (BH2, Olympus America, Center Valley, PA, Estados Unidos).

[0072] Diseño experimental para estudios de fermentación líquida

[0073] Para analizar los componentes nutricionales óptimos para una experimentación adicional, se analizaron varias fuentes de nitrógeno para su capacidad de inducir la producción de blastosporas y la tolerancia a la desecación. Las fuentes de nitrógeno analizadas fueron caseína hidrolizada por ácido al 3 %, harina de semilla de algodón, soya, levadura autolisada, licor de maíz, ácido L-glutámico y nitrato de amonio [NH_4NO_3] al 1 %. Todos los medios de cultivo contenían 12 % de glucosa. Cincuenta ml de los cultivos se cultivaron en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml a 28 °C y 350 rpm durante 3 días. Las blastosporas se separaron del caldo de cultivo con tierra de diatomeas (7.5 % p/v) y después se secaron al aire a < 4 % de humedad. La tolerancia a la desecación de las blastosporas se evaluó mediante la medición de la germinación por las blastosporas secadas al aire rehidratadas en caldo de dextrosa de papa e incubadas durante 7 horas a 28 °C y 300 rpm.

[0074] Se usó un diseño experimental factorial para investigar el impacto de la fuente de nitrógeno sobre diferentes aislados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* cultivados en cultivos líquidos sumergidos. *Los cultivos de Isaria* y *Beauveria* se cultivaron en un volumen de 100 ml en frascos Erlenmeyer de 250 ml y se incubaron a 28 °C y 350 rpm en una incubadora con agitador rotatorio. El medio de producción de blastosporas contenía el medio de sales basales descrito anteriormente complementado con glucosa (100 g/L) y ya sea caseína hidrolizada por ácido o harina de semilla de algodón (9.4 % de N y 40 % de C; Pharmamedia®, Traders Protein, Memphis, TN, Estados Unidos) a una concentración de 25 g/L. El medio tenía un pH inicial de

5.5 y una relación C:N de 21:1. Los inóculos de blastosporas se obtuvieron de precultivos de 3 días (fase exponencial) que proporcionan una concentración final del inóculo de 5×10^6 blastosporas/ml. Los frascos se agitaron a mano frecuentemente durante el proceso de fermentación para minimizar el crecimiento micelial y la esporulación en las paredes del frasco. En todos los experimentos, el pH no se controló durante el crecimiento del cultivo.

[0075] Durante el muestreo y la dilución del caldo de cultivo, las suspensiones de blastosporas se agitaron constantemente para asegurar la homogeneidad. Se usó el peso seco como una medida de la acumulación de biomasa. Se recolectaron muestras duplicadas de 1 ml del caldo de cultivo de los frascos, la biomasa se separó del medio agotado mediante filtración al vacío (modelo 1225, Millipore®) en discos de filtro de fibra de vidrio de 2.4 cm previamente pesados (G6, Fisher Scientific®, Pittsburgh, PA, Estados Unidos), y después se secó a 80 °C durante 24 h hasta un peso constante antes de la medición. Al final del proceso de fermentación, se midió la glucosa restante (g/L) mediante el uso de un glucómetro (GlucCell®, CESCO, Atlanta, GA, Estados Unidos) como medio para determinar la utilización de glucosa por los hongos. Además, se registró el pH final de todos los caldos de cultivo. Todos los experimentos de cultivo en frasco de agitación se realizaron en duplicados y los experimentos se repitieron al menos tres veces en fechas diferentes.

[0076] También se buscó determinar los efectos de otras condiciones de cultivo en la producción, la tolerancia a la desecación, el almacenamiento, y la capacidad entomopatógena de las blastosporas. Entre los parámetros analizados se encuentran la presión osmótica y el aumento de la aeración. Para analizar los efectos de la presión osmótica variable, los cultivos se cultivaron en un medio de sales basales con 2,5 % de harina de semilla de algodón a 28 ºC, 350 rpm y 50 ml en frascos de Erlenmeyer deflectados de 250 ml. Se analizaron las concentraciones de glucosa de 20 g/L a 200 g/L, cuando la glucosa (10 %) se corrigió con 2 %, 4 % o 6 % de polietilenglicol (PEG 200) y las sales no tóxicas NaCl y KCl, ambas a 0.25 mol/L (14.32 g/L y 18.64 g/L, respectivamente).

[0077] Para analizar los efectos de cantidades variables de aeración, se analizó la producción de cultivo líquido de blastosporas por varios aislados de *B. bassiana* cultivados en un medio de sales basales complementado con 2.5 % de harina de semilla de algodón (A) o caseína hidrolizada por ácido (B) y 10 % de glucosa. Cincuenta y 100 ml de cultivos se cultivaron en frascos de Erlenmeyer reflectados de 250 ml, en una incubadora con agitador a 28 °C y ya sea

175 rpm o 350 rpm. Los volúmenes de cultivo se alteraron para aumentar (50 ml) o disminuir (100 ml) la aeración. Las suspensiones de blastosporas de tres días se mezclaron con tierra de diatomeas, se filtraron para eliminar los medios agotados, y se secaron al aire a < 4 % de humedad. La viabilidad de las blastosporas se midió mediante la evaluación de la germinación después de rehidratar e incubar las blastosporas secadas al aire en caldo de dextrosa de papa durante 7 horas a 28 °C y 300 rpm en una incubadora con agitador.

[0078] Estudios de recolecta, secado y almacenamiento

[0079] Después de cultivar *B. bassiana* e *I. fumosorosea* durante 3 días, todo el cultivo se mezcló con 7.5 % (p/v) de tierra de diatomeas [DE (HYFLO®, Celite Corp., Lompoc, CA, Estados Unidos)]. Las mezclas de blastosporas con DE se filtraron al vacío mediante el uso de un embudo Buchner con discos de papel de filtro de 12.5 cm (Whatman #1, Maidstone, Inglaterra). La torta de filtración resultante de cada frasco replicado se desmenuzó, se colocó en una placa Petri de 10 cm, y se secó al aire durante la noche a ~22 °C en una cámara de secado al aire con un flujo de entrada lateral de aire (RH ~ 50–60 %) durante 16–20 h a menos de 4 % de humedad. Las preparaciones de blastosporas secas se rompieron mediante pulsación en un mezclador (Mini Prep® Plus, Cuisinart, East Windsor, NJ, Estados Unidos), se empaquetaron al vacío (Multivac Inc., Kansas City, MO, Estados Unidos) en bolsas de polietileno de nailon (15.3 × 21.8 cm), y se almacenaron a 4°C. El contenido de humedad (en base húmeda [w.b.]) y la actividad del agua (a_w) de estas formulaciones se midieron antes del almacenamiento con un analizador de humedad (Mark II, Denver Instruments, Arvada, CO, Estados Unidos) y un analizador de actividad del agua (AquaLab 4TEV, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, Estados Unidos), respectivamente, y se consideraron como covariables potenciales.

[0080] Se obtuvieron al menos 4 empaques de cada aislado fúngico a partir de diferentes lotes de fermentación y se controlaron en el tiempo para evaluar la sobrevivencia de las blastosporas secadas al aire. La viabilidad de todas las preparaciones de blastosporas secadas al aire se determinó inmediatamente después del secado y durante el almacenamiento mediante el uso de un ensayo de germinación descrito anteriormente. Brevemente, el ensayo de germinación se realizó mediante la adición de ~25 mg de la preparación de blastosporas secadas al aire a 25 ml de caldo de dextrosa de papa [PD (Difco®)] en un frasco de Erlenmeyer reflectado de 125 ml. Después de 6 h de incubación para *I. fumosorosea* y 7 h de incubación para *B. bassiana* a 28 °C y 300 rpm en una incubadora con agitador rotatorio, se determinó el porcentaje de viabilidad de

forma microscópica mediante el estudio de 200 blastosporas diferenciadas por frasco replicado para la formación del tubo germinal. La germinación no se evaluó en los grupos sino más bien donde las blastosporas se diferenciaron y se consideraron germinadas cuando la longitud del tubo de germinación fue al menos la mitad del diámetro de las blastosporas. Los estudios de estabilidad se realizaron en las muestras almacenadas bajo condiciones refrigeradas (4 °C) y se controló la viabilidad de las blastosporas mensualmente durante un periodo de 13 meses mediante el uso del protocolo de germinación descrito anteriormente.

[0081] Para determinar la relación entre a_w y el contenido de humedad, se establecieron las isotermas de sorción para *B. bassiana* e *I. fumosorosea* formuladas con 7.5 % de DE (p/v). Las diferentes soluciones de sales saturadas se prepararon para crear diferentes humedades relativas de equilibrio (ERH) mediante el uso de las siguientes sales: hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de litio (LiCl), cloruro de magnesio (MgCl2.6H2O), carbonato de potasio (K_2CO_3), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), y sulfato de potasio (K_2SO_4) que correspondían a valores de aw de 0.082, 0.113, 0.328, 0.432, 0.753, 0.843, y 0.973, respectivamente. Todas las sales se adquirieron de Sigma®. Para lograr un ERH muy bajo, se usó Drierite® (sulfato de calcio anhidro, 8 mesh, W.A. Hammond Drierite Company, Xenia, OH, Estados Unidos) como un agente desecante estándar y proporcionó 0.0221 de a_w. Las soluciones salinas se añadieron al fondo de los desecadores al vacío (206 mm de altura × 149 mm de diámetro interior) (Bel-Art Products®, Wayne, NJ, Estados Unidos), y las muestras se incubaron a 25 °C durante siete días antes de las lecturas.

[0082] Insectos

[0083] La colonia del biotipo B de *B. tabaci* se obtuvo originalmente de Apopka, FL, Estados Unidos, en 2013 y se cultivó en col silvestre ‘Bravo’ (*Brassica oleracea* L.; Harris Seeds, Rochester, NY, Estados Unidos) y frijol de lago azul (*Phaseolus vulgaris* L. [Kelly Seed Co., Peoria, IL, Estados Unidos]) con plantas confinadas en cajas de marco de PVC de 0.6 m^3 revestidas con una tela tamiz fina (material de gasa de dracon blanquecino, BioQuip Products Inc., Rancho Dominguez, CA, Estados Unidos) bajo condiciones de invernadero (intervalo de temperatura: 24–30 °C). Todas las plantas se cultivaron es un medio de envase de suelo preparado con 77.5 L de mezcla de crecimiento Redi Earth® pasteurizada (Sun Gro Horticulture Canada Ltd., Vancouver, Canadá) corregido con 60 g de micromax granular y 400 g de osmocote

14-14-14. Se usaron las semillas sin tratar y las plantas se cultivaron libres de pesticidas químicos.

[0084] Virulencia de esporas fúngicas contra la mosca blanca

[0085] Para comparar la virulencia entre las blastosporas y los conidios aéreos de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, se realizaron los bioensayos de insectos contra las ninfas del biotipo B de *B. tabaci* del segundo instar emergidas recientemente, como se describió en estudios recientes. Los bioensayos de laboratorio se llevaron a cabo con *B. bassiana* (ESALQ1432) e *I. fumosorosea* (CG1228). Las blastosporas se produjeron en un medio de cultivo líquido, como se describió anteriormente, que contenía 10 % de glucosa y 2.5 % de harina de semilla de algodón, y se recolectaron después de 3 días de incubación a 28 °C y 350 rpm. Las preparaciones de blastosporas (intervalo de tamaño de 3–11 µm) se formularon con 7.5 % de DE y se secaron al aire a < 4 % de humedad, mientras que los conidios aéreos (intervalo de tamaño de 1.8–5.0 µm) se cultivaron en placas de PDA durante 10–14 días a 22 °C y fotoperiodo de 12:12 (L:D) h antes del uso en los bioensayos. Las suspensiones originales de ambas esporas se prepararon con una solución de Tween 80 a 0.01 % y se filtraron una vez a través de una capa doble estéril de estopilla. Las concentraciones deseadas se ajustaron a través de diluciones seriadas mediante el uso de Tween 80 (0.01 %) a 1×10^5, 5×10^5, 2.5×10^6, 1.25×10^7, y 6.25×10^7 esporas/ml, lo que se corresponde a su vez a tasas de deposición (dosis) de 1.26×10^2, 6.82×10^2, 3.7×10^3, 2.0×10^4, y 1.09×10^5 esporas/cm^{-2}, respectivamente. Los controles consistían en ninfas pulverizadas con una solución de Tween 80 al 0.01 %. La viabilidad de las blastosporas usadas en todos los bioensayos fue >75 % después de 6 h (para *I. fumosorosea*) y 7 h (para *B. bassiana*) de incubación en caldo PD, mientras que los conidios aéreos retuvieron >90 % de viabilidad después de 17 h de incubación en PDA a 25 °C.

[0086] Las hojas individuales de frijol se colocaron en placas Petri de poliestireno (Falcon®, 100 × 15 mm) cubiertas con 20 ml de agar agua (2 %, p/v), denominadas en lo sucesivo como ‘placas ventiladas’. Cada hoja de frijol, infestada con 50–70 ninfas tempranas del segundo instar, se pulverizó con una torre de micropulverización ajustada a 10 PSI y 3 segundos. Hubo cinco replicados por concentración fúngica y todas las concentraciones se evaluaron al mismo tiempo. Todo el experimento se repitió al menos dos veces en diferentes fechas mediante el uso de diferentes lotes fúngicos y cohortes de insectos. Después del tratamiento, las placas ventiladas se invirtieron de manera que el lado abaxial de la hoja se enfrentó con el lado adaxial que se

encuentra en contacto con el agar y después se incubaron en una cámara de crecimiento a 27 ± 1 °C, 70 % (48–78 %) de RH y fotoperiodo de 14:10 (L:D) h durante seis días antes de evaluar la mortalidad. Solo las ninfas que mostraron signos de infección o síntomas de enfermedad fúngica (es decir, micosis) se puntuaron como individuos muertos seis días después de la aplicación para estimar la concentración letal media (LC_{50}), expresada como esporas cm^{-2}. Para comparar la velocidad de muerte entre las blastosporas y los conidios aéreos, se usó el mismo protocolo anteriormente mencionado, pero a una concentración de 1.25×10^7 esporas/ml (es decir, 2.7×10^4 esporas/cm^{-2}), y se registró la mortalidad cada 24 h después del tratamiento durante seis días.

[0087] Se decidió comparar la velocidad de muerte y la dosis letal de blastosporas producidas en medios con baja y alta presión osmótica para determinar cualquier efecto. Las blastosporas de *B. bassiana* (ESALQ1432) se produjeron en medios líquidos con 2.5 % de harina de semilla de algodón y glucosa al 4 %, 10 %, o 14 %. Las blastosporas se aislaron como se describió anteriormente después de tres días de crecimiento. Las blastosporas se separaron de los caldos de cultivo con tierra de diatomeas y se secaron al aire. La exposición de ninfas de la mosca blanca (biotipo B de *B. tabaci*) es como se describió anteriormente.

[0088] Análisis Estadístico

[0089] Todos los experimentos se llevaron a cabo con un diseño completamente aleatorio y se repitieron dos a tres veces para asegurar la reproducibilidad. Se usaron modelos lineales generalizados (GLMM) para ajustar los datos en los recuentos de blastosporas con una distribución de Poisson y la acumulación de biomasa con la distribución de Gauss (normal) a partir de los estudios de fermentación mediante el uso de SAS macro PROC GLIMMIX. El aislado fúngico, la fuente de nitrógeno, y el día de fermentación (tiempo) se implementaron como factores fijos, mientras que los frascos de agitación (es decir, medición repetida en el tiempo) y las repeticiones experimentales se declararon como efectos aleatorios en estos modelos. Los datos de proporción de la viabilidad de blastosporas a partir de los ensayos de tolerancia a la desecación se ajustaron a un GLMM con distribución binomial para errores, en los que se incluyó la repetición experimental en el término aleatorio, mientras que el aislado fúngico y la fuente de nitrógeno comprendían los factores fijos. Las estadísticas de los efectos fijos y sus términos de interacción también se determinaron mediante la prueba F de Wald tipo III. Se realizaron comparaciones múltiples post-hoc en pares utilizando la prueba de Tukey a $P \leq 0.05$ para efectos fijos y sus términos de interacción, una vez que se detectó la significación. Los datos

de la evolución en el tiempo de la sobrevivencia de las blastosporas (% de germinación) a almacenamiento a 4°C se ajustaron a un modelo no lineal logístico, de 4 parámetros para estimar las vidas medias ($t_{1/2}$) de las blastosporas secadas al aire producidas con diferentes fuentes de nitrógeno. El modelo tuvo la siguiente notación: $S = S0 + (\alpha/(1 + (t/t0)\beta))$, donde S es la sobrevivencia de las blastosporas (% de germinación), t es el tiempo de almacenamiento (en meses) y α, β (pendiente), S0 y t0 son las constantes de mejor ajuste estimadas mediante el análisis interactivo realizado en SAS macro PROC NLIN. Para probar la hipótesis de que la fuente de nitrógeno podría afectar la estabilidad de almacenamiento de las blastosporas secadas al aire a lo largo del tiempo de incubación, se empleó la prueba de reducción de la suma de los cuadrados para comparar sus regresiones lineales. La relación entre aw y el contenido de humedad de las blastosporas formuladas con DE secadas al aire se explicó mediante el ajuste de los resultados experimentales al modelo GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) para extraer las curvas isotermas de la sorción de humedad. También se analizó si la a_w o el contenido de humedad podrían tener cualquier relación con los datos de viabilidad de las blastosporas basado en la correlación de Spearman (PROC CORR). La fórmula de Abbott se aplicó para corregir el porcentaje de mortalidad antes de estimar las relaciones de la mortalidad en respuesta a dosis entre las diferentes esporas fúngicas y las ninfas del segundo instar a través de un modelo logístico (PROC PROBIT). Se escogió el modelo logístico ya que proporcionó el mejor ajuste debido a su menor desviación. La concentración letal media (LC_{50}) con sus correspondientes límites de confianza (CL 95 %), y la pendiente se calcularon consecutivamente para cada tipo de espora. La virulencia de los tipos de esporas se comparó a través de una prueba de relación en pares a $\alpha = 5$ % aplicada a LC_{50}. Las diferencias en la velocidad de muerte (tiempo letal medio, LT_{50}) entre las blastosporas y los conidios aéreos se analizaron mediante el uso del modelo logístico anterior para trazar las funciones de supervivencia acumuladas mediante el tratamiento con comparaciones en pares sobre la prueba de t-Student a $P \leq 0.05$. Todos los análisis se realizaron en el Sistema de Análisis Estadístico v.9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

[0090] Resultados experimentales

[0091] Rendimiento de las blastosporas y acumulación de biomasa

[0092] Los aislados fúngicos respondieron significativamente diferentes en términos de crecimiento filamentoso cuando se cultivan en medios líquidos complementados con diferentes fuentes de nitrógeno (**Figura 1** – resultados mostrados para dos aislados de *B. bassiana*). En

general, los resultados demuestran que los aislados de *B. bassiana* crecen de forma similar a levaduras con mejoras en el rendimiento de las blastosporas cuando la fuente de nitrógeno es harina de semilla de algodón, harina de soya, levadura autolisada o caseína hidrolizada por ácido (AHC). Además, la mayoría de las fuentes de nitrógeno resultan en un adecuado nivel de tolerancia a la desecación. Resultados similares se obtuvieron para *I. fumosorosea* (datos no mostrados). Dos de estas fuentes de nitrógeno (AHC y harina de semilla de algodón) se escogieron como las fuentes de nitrógeno para experimentos adicionales.

[0093] Los cultivos líquidos complementados con AHC o harina de semilla de algodón a 25 g/L se cultivaron como se describió anteriormente y se analizaron los parámetros de crecimiento. Basado en las observaciones diarias, hubo un aumento significativo en el rendimiento de las blastosporas así como también en la acumulación de biomasa desde el día 2 hasta el día 3 de crecimiento para todos los aislados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, independientemente de la fuente de nitrógeno (**Tablas 2, 3 –** las letras en minúscula se refieren a la comparación entre los aislados fúngicos y las fuentes de nitrógeno en cada día de fermentación (en columnas), mientras que las letras en mayúscula se refieren a las comparaciones entre el día de fermentación (en filas) para cada aislado.).

Tabla 2. Productividad del cultivo líquido de *cepas de* B. bassiana

cepa de B. bassiana	Fuente de nitrógeno	Biomasa (mg/ml)		Rendimiento (× 10^8 blastosporas/ml)	
		Día 2	Día 3	Día 2	Día 3
CG1229	AHC	11.7±0.6 b, B†	15.3±0.2 e, A	3.4±1.3 c, B	5.5±1.4 b, A
	Harina de semilla de algodón	25.1±0.5 a, A	26.0±0.7 bc, A	8.8±1.8 ab, A	9.11±1.2 ab, A
ESALQ1432	AHC	12.9±1.7 b, B	20.5±0.7 d, A	4.4±0.3 bc, B	7.9±0.8 ab, A
	Harina de semilla de algodón	28.5±1.9 a, B	32.8±0.3 a, A	8.3±0.5 ab, B	12.4±1.0 a, A
ESALQ447	AHC	12.9±0.9 b, B	16.4±0.5 e, A	2.4±0.2 c, B	6.8±0.8 ab, A
	Harina de semilla de algodón	26.1±1.6 a, A	24.2±0.9 c, A	5.1±0.4 abc, B	7.8±0.5 ab, A
ESALQ-PL63	AHC	14.3±0.9 b, A	15.5±0.3 e, A	0.34±0.06 d, B	0.95±0.1 c, A
	Harina de semilla de algodón	25.9±0.9 a, A	24.0±0.6 c, A	0.30±0.02 d, B	1.2±0.1 c, A
GHA	AHC	10.5±0.4 b, B	16.2±0.5 e, A	2.7±0.5 c, B	4.9±0.5 b, A
	Harina de semilla de algodón	25.9±0.7 a, A	28.0±1.8 b, A	10.0±0.6 a, A	11.6±0.6 a, A

Tabla 3. Productividad del cultivo líquido de *cepas de* I. fumosorosea

cepa de I. fumosorosea	Fuente de nitrógeno	Biomasa (mg ml^{-1})		Rendimiento (× 10^8 blastosporas ml^{-1})	
		Día 2	Día 3	Día 2	Día 3
CG1228	AHC	22.1±1.5 a, B	33.3±2.8 a, A	14.4±1.7 ab, B	26.0±0.9 ab, A
	Harina de semilla de algodón	31.8±1.5 a, B	40.9±1.1 a, A	15.4±1.5 a, B	27.9±2.2 a, A
ESALQ 1296	AHC	21.7±0.5 a, B	34.6±2.0 a, A	9.6±1.1 abc, B	16.6±0.7 bc, A
	Harina de semilla de algodón	30.6±1.5 a, B	40.6±2.2 a, A	10.0±0.9 abc, A	13.0±1.1 c, A
ESALQ 1364	AHC	20.5±1.2 a, B	32.2±2.5 a, A	9.6±0.5 abc, B	15.3±1.7 c, A
	Harina de semilla de algodón	29.1±0.7 a, B	36.9±0.5 a, A	6.7±0.6 b, A	6.9±0.9 d, A
ESALQ 1409	AHC	20.4±1.4 a, B	33.2±2.6 a, A	8.7±0.6 abc, B	13.8±1.9 c, A
	Harina de semilla de algodón	31.6±0.8 a, B	38.7±1.8 a, A	9.4±0.3 abc, B	15.3±1.5 c, A
ARSEF 3581	AHC	23.7±1.0 a, B	33.9±2.1 , A	11.2±2.4 abc, A	14.3±1.4 c, A
	Harina de semilla de algodón	31.2±1.5 a, B	37.6±1.4 , A	8.9±1.9 bc, A	10.4±1.5 cd, A

[0094] Los aislados de *B. bassiana* exhibieron diferentes tasas de crecimiento medidas como la concentración de blastosporas en el tiempo, como el término de interacción entre los aislados y el día de fermentación fue significativo ($F_{4,105} = 5.97$, $P = 0.0002$), mientras que la producción de blastosporas aumentó a la misma tasa para los aislados de *I. fumosorosea* en el tiempo ($F_{4,62} = 2.28$, $P = 0.0708$). Los recuentos de blastosporas usualmente alcanzaron mayores números el día 3 de crecimiento para *B. bassiana* ($F_{1,105} = 71.89$, $P = 0.0001$) e *I. fumosorosea* ($F_{1,62} = 53.29$, $P < 0.0001$), aunque algunos aislados no produjeron significativamente más blastosporas el día 3 en comparación con el día 2. La interacción del aislado fúngico y la fuente de nitrógeno tuvo un fuerte impacto en los rendimientos de las blastosporas para *I. fumosorosea* ($F_{4,62} = 5.53$, $P = 0.0007$), pero solo un efecto espurio para *B bassiana* ($F_{4,105} = 2.42$, $P = 0.0531$). El efecto de la fuente de nitrógeno por sí mismo fue más pronunciado sobre la producción de blastosporas para

B. bassiana ($F_{1,105} = 16.97$, $P < 0.0001$), cuyos aislados alcanzaron mayores concentraciones cuando crecieron con harina de semilla de algodón, excepto para el aislado ESALQ-PL63 que no fue sensible. El resultado opuesto se observó para los aislados ESALQ1364 y ARSERF3581 de *I. fumosorosea* que rindieron mayores recuentos de blastosporas cuando se cultivaron con caseína hidrolizada por ácido en vez de harina de semilla de algodón ($F_{1,62} = 13.61$, $P = 0.0005$), aunque los otros aislados no respondieron de manera diferente a las fuentes de nitrógeno. Las comparaciones entre los aislados de *Isaria* revelaron que CG1228 alcanzó la mayor concentración de blastosporas ($2.6–2.8 \times 10^9$ blastosporas/ml) el día 3, independientemente de la fuente de nitrógeno ($F_{4,62} = 37.04$, $P < 0.0001$). Bajo las mismas condiciones de fermentación, los mejores aislados que producen blastosporas de *B. bassiana* fueron CG1229, GHA y ESALQ1432 crecidos en medios líquidos con harina de semilla de algodón en vez de caseína hidrolizada por ácido los que alcanzaron rendimientos de $0.9–1.2 \times 10^9$ blastosporas/ml en 3 días de crecimiento ($F_{4,105} = 21.2$, $P < 0.0001$). Es interesante notar que todos los aislados de *I. fumosorosea* fueron capaces de producir más de 1×10^9 blastosporas/ml al día 3, mientras que solo 2/5 de los aislados de *B. bassiana* alcanzaron esta alta concentración de esporas. Además, los aislados de *I. fumosorosea* demostraron un crecimiento filamentoso más rápido en comparación con los aislados de *B. bassiana*. Entre todos los aislados fúngicos analizados, ESALQ-PL63 mostró el crecimiento similar a levadura más pobre por el crecimiento más hifal, lo que resultó en un caldo de cultivo espeso, viscoso.

[0095] Con respecto a la acumulación de biomasa, los datos se examinaron por separado para cada fuente de nitrógeno, ya que los medios corregidos con harina de semilla de algodón contenían anteriormente una mayor cantidad de sólidos (15.54 ± 0.08 mg/ml) en comparación con caseína hidrolizada por ácido (0.07 ± 0.01 mg/ml), lo que hace difícil las comparaciones. Independientemente de la fuente de nitrógeno, la biomasa seca no varió entre los aislados de *I. fumosorosea* ($F_{4,62} = 1.81$, $P = 0.1383$), aunque la mayoría de estos aislados aumentó la biomasa en el tiempo ($F_{1,62} = 20.43$, $P < 0.0001$) (**Tablas 2, 3**). Cuando se cultivaron aislados de *B. bassiana* en medios complementados con caseína hidrolizada por ácido, el peso seco de los cultivos aumentó considerablemente en el tiempo en relación con la harina de semilla de algodón ($F_{4,105} = 7.77$, $P < 0.0001$). Tanto *B. bassiana* e *I. fumosorosea* acumularon más pesos secos al día 3 ($F_{1,105} = 43.77$, $P < 0.0001$; $F_{1,62} = 583.36$, $P < 0.0001$, respectivamente). Aparte de la fuente de nitrógeno, ESALQ1432 de *B. bassiana* mostró la mayor biomasa entre todos los

aislados ($F_{4,105} = 15.04$, $P < 0.0001$). Finalmente, el pH final de los cultivos de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* después de la fermentación tuvo un aumento de acidez y fueron muy similares con un intervalo de pH desde 3.8–4.8 y 3.6–4.9, respectivamente. La producción de blastosporas y la tolerancia a la desecación aumentó con el aumento de la concentración de la fuente de nitrógeno, posiblemente nivelándose a mayores niveles (**Figura 2**).

[0096] Tolerancia a la desecación

[0097] El secado de las blastosporas de 3 días a < 4 % de contenido de humedad ($a_w < 0.3$) reveló un efecto de interacción significativo entre la fuente de nitrógeno y el aislado fúngico en la viabilidad de las blastosporas para *I. fumosorosea* ($F_{4,29} = 4.90$, $P = 0.0038$) y *B. bassiana* ($F_{4,56} = 5.26$, $P = 0.0011$). La tolerancia a la desecación se evaluó mediante la medición de la germinación por las blastosporas secadas al aire rehidratadas en caldo de dextrosa de papa (PD) e incubadas durante 7 horas y 6 horas a 28oC y 300 rpm para *B. bassiana* e *I. fumosorosea* respectivamente. Cuando se examinó la viabilidad dentro de *B. bassiana*, las blastosporas de los aislados ESALQ1432 y ESALQ447 fueron más tolerantes a la desecación con mayor viabilidad de las esporas (71–79 %) cuando se produjeron con harina de semilla de algodón que con caseína hidrolizada por ácido ($F_{1,56} = 14.06$, $P = 0.0004$) (**Tabla 4 –** las letras no correspondientes indican diferencias significativas con letras pequeñas lo que se refiere a la comparación entre los aislados dentro de cada fuente de nitrógeno (columnas), mientras que las letras mayúsculas se refieren a las comparaciones entre las fuentes de nitrógeno (filas) para cada aislado).

Tabla 4. Tolerancia a la desecación en blastosporas de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*

Aislados fúngicos	Tolerancia a la desecación (% de sobrevivencia de las blastosporas) *	
	Caseína hidrolizada por ácido	Harina de semilla de algodón
Beauveria bassiana		
CG1229	80.8±2.1 a, A	78.2±2.3 c, A
ESALQ1432	73.0±2.8 b, B	79.2±2.4 bc, A
ESALQ447	73.9±2.7 b, B	84.0±2.0 ab, A
ESALQ-PL63	85.3±2.0 a, A	86.5±1.9 a, A
GHA	70.9±3.0 b, A	75.5±2.8 c, A
Isaria fumosorosea		
CG1228	80.3±2.5 a, A	74.1±2.9 ab, B
ESALQ1296	77.3±2.7 a, A	68.6±3.1 b, B
ESALQ1364	74.1±2.9 ab, A	65.3±3.3 b, B
ESALQ1409	62.3±3.4 b, B	70.6±3.1 ab, A

ARSEF3581	82.4±2.4 a, A	79.1±2.6 a, A

[0098] Por el contrario, los aislados de *I. fumosorosea* mostraron mejor tolerancia a la desecación con mayor viabilidad de esporas cuando se cultivaron en medios que contenían caseína hidrolizada por ácido en vez de harina de semilla de algodón ($F_{1,29} = 8.37$, $P = 0.0072$), excepto para los aislados ESALQ1409 y ARSEF3581. La sobrevivencia de las blastosporas después del secado al aire varió entre los aislados de *B. bassiana* ($F_{4,56} = 16.5$, $P < 0.0001$) e *I. fumosorosea* ($F_{4,29} = 12.96$, $P < 0.0001$). El análisis en *B. bassiana* indicó que ambas fuentes de nitrógeno apoyaron las mayores tasas iniciales de viabilidad (70–86 %) después del secado al aire, mientras que los aislados de *I. fumosorosea* alcanzaron una sobrevivencia inicial de 62–82 % de blastosporas.

[0099] Después del secado al aire, las isotermas de sorción de humedad se determinaron a 25 °C para describir la relación entre aw de la biomasa fúngica (blastosporas + micelio) formuladas con 7.5 % de DE y contenido de humedad (%, base en peso seco). Los datos experimentales se explicaron significativamente mediante el modelo GAB (*B. bassiana*: $R2 = 0.99$, $F_{3,28} = 3666.55$, $P < 0.0001$; *I. fumosorosea*: $R2 = 1.00$, $F_{3,21} = 2738.01$, $P < 0.0001$) asumiendo una curva de forma sigmoidal (**Figura 3**). Las actividades del agua (a_w) de las blastosporas secadas al aire de los aislados de *B. bassiana* se encontraron en el intervalo de 0.251–0.364 con los contenidos de humedad correspondientes de 1.38–2.70 %, mientras que para los aislados de *I. fumosorosea* aw varió de 0.270–0.323 que correspondía a un contenido de agua de 1.76–2.63 %. Ni la actividad de agua o el contenido de humedad se correlacionó con las tasas iniciales de sobrevivencia de las blastosporas después del secado para cada una de las especies fúngicas (correlación de Spearman: $-0.02 \leq r \leq 0.30$, $0.06 \leq P \leq 0.86$). Las blastosporas de *B. bassiana* crecidas bajo las condiciones descritas en la presente sobrevivieron al secado por pulverización (mezclado con polvo de leche desnatada (SMP) o SMP + 2.5 % de ácido ascórbico) y al secado al aire (mezclado con tierra de diatomeas). Estos resultados se informan en la **Tabla 5**, no hubo diferencia significativa independientemente de la formulación o el proceso de secado. La tolerancia a la desecación se midió como el por ciento de blastosporas germinadas tras la rehidratación en caldo PD después de 7 horas de incubación a 28 °C y 300 rpm.

Tabla 5. Secado al aire y secado por pulverización de blastosporas de *B. bassiana*

Método de deshidratación	Formulación	Humedad (%)	Actividad del agua	Tolerancia a la desecación (% de

				germinación) [b]
Secado por pulverización	20 % de SMP	4.48 (2.85–5.79)	0.195 (0.077–0.2827)	83.1 ± 1.2
	17.5 % de SMP + 2.5 % de ácido ascórbico	4.47 (3.84–5.75)	0.253 (0.184–0.324)	82.6 ± 0.7
Secado al aire	Tierra de diatomeas	0.84 (0.56–1.31)	0.246 (0.2142–0.2876)	80.9 ± 1.0

[00100] Almacenamiento

[00101] La estabilidad en almacenamiento a largo plazo de las blastosporas secadas al aire bajo condiciones refrigeradas varió con el aislado fúngico y la fuente de nitrógeno (**Figuras 4, 5**). El modelo logístico con los cuatro parámetros bien ajustados a ($R2 = 0.74–0.99$, $P < 0.01$) los datos experimentales sobre la sobrevivencia de las blastosporas en todo el tiempo de almacenamiento para todos los aislados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* producidos con cualquier fuente de nitrógeno. De conformidad con la prueba de reducción de la suma de los cuadrados usada para comparar las regresiones no lineales de las curvas de sobrevivencia de las blastosporas, se encontró que la fuente de nitrógeno no influyó en la sobrevivencia de las blastosporas secadas al aire de *B. bassiana* durante el periodo de 13 meses de almacenamiento en frío, excepto los aislados CG1229 y GHA que sobrevivieron considerablemente más tiempo cuando se produjeron con harina de semilla de algodón y caseína hidrolizada por ácido, respectivamente (**Figura 4**). Particular a *I. fumosorosea*, las blastosporas de los aislados ARSEF3581, ESALQ1296, y ESALQ1364 retuvieron mayor viabilidad por un periodo de tiempo más largo cuando crecen en harina de semilla de algodón, mientras que la viabilidad a largo plazo de los otros aislados no fue influenciada por la fuente de nitrógeno (**Figura 5**). En general, las curvas de sobrevivencia de las blastosporas de *I. fumosorosea* representan un patrón de decaimiento más rápido en comparación con *B. bassiana*, independientemente de la fuente de nitrógeno. Los estimados de las vidas media de las blastosporas secadas al aire de *B. bassiana* almacenadas a 4 °C exhibieron un tiempo mínimo de 14.1 meses para el crecimiento GHA en harina de semilla de algodón, mientras que la mayoría de los aislados retuvieron una vida media mayor de 14 meses (Tabla 5). Por el contrario, las blastosporas de *I. fumosorosea* secadas al aire mostraron la vida media más corta (9.2 meses) con ESALQ1296 crecida en caseína hidrolizada por ácido. La vida media más larga alcanzada por *I. fumosorosea* (13.1 meses) fue ARSEF3581 crecida en harina de semilla de

algodón. En la mayoría de los casos, la harina de semilla de algodón apoyó las mayores vidas media para aislados de *I. fumosorosea*.

[00102] Se analizó, además, una variedad de empaques y opciones de almacenamiento para las composiciones insecticidas de la presente invención, específicamente el análisis de las condiciones de almacenamiento que favorecieron el almacenamiento a largo plazo a "temperatura ambiente alta" (28 °C). Para los resultados mostrados en la **Tabla 6**, se calculó la vida media como ln(2)/b. Todo el empaquetamiento al vacío fue a una presión de 999 mbar, lo que proporcionó un oxígeno atmosférico ≤0.021 % en bolsas de aluminio (mylar). El gel de sílice (SG) se usó como un absorbedor de humedad. ZM-1 y ZPT-50 se usaron como depuradores de oxígeno por separado. RP-3A es una combinación de depurador de oxígeno y depurador de humedad.

Tabla 6: Efectos del almacenamiento a alta temperatura ambiente con empaquetamiento variable.

Método de secado	**Formulación**	**Empaquetamiento**	**Almacenamiento temperatura (°C)**	**½ (semanas)**
Secado por pulverización	SMP	Sellado al vacío	28	2.0
			4	>36
Secado al aire	DE	Sellado al vacío	28	13.3
			4	>36
Secado por pulverización	SMP	Control	28	2.3
		RP-3A	28	31.5
		SG	28	2.4
	SMP + ASA	Control	28	2.4
		RP-3A	28	59.2
		ZM-1	28	2.0
		ZPT-50	28	1.6
		SG	28	3.0
Secado por pulverización	SMP	Control	28	2.0
		ZM-1 + SG	28	5.0
		ZPT-50 + SG	28	3.2
		ZM-1	28	3.5
		ZPT-50	28	1.8
		SG	28	2.4
Secado al aire	DE	Control	28	3.0

	RP-3A	28	>36
	ZM-1	28	3.2
	ZPT-50	28	1.3
	SG	28	16.1

[00103] Para investigar, además, las diferencias vistas entre los métodos de almacenamiento, se analizaron los diferentes depuradores de oxígeno y humedad.

[00104] El efecto de los depuradores de oxígeno y humedad en la estabilidad de almacenamiento de las blastosporas de *Beauveria bassiana* secadas al aire almacenadas a 28 °C se midió con cada una de las anteriores combinaciones de empaquetamiento. Los resultados se muestran en la **Figura 6** (RP-3A = "O_2+absorbedor de humedad"; ZM-1 = "O_2 absorbedor tipo A"; ZPT-50 = "O_2 absorbedor tipo A"; Gel de sílice = "Absorbedor de humedad") La sobrevivencia se informó como el porcentaje de las esporas viables que quedan en comparación con las muestras de blastosporas recién secadas. La germinación se midió como la elongación del tubo germinal después de 7 hrs de incubación en caldo de dextrosa de papa, 28 C, y 300 rpm de agitación. Los resultados de un análisis similar para las blastosporas de *B. bassiana* secadas por pulverización con SMP (con o sin ácido ascórbico (ASA) mostraron que la adición de ASA a la formulación aumenta la sobrevivencia de las formulaciones secadas por pulverización (**Figura 7**).

[00105] Presión osmótica

[00106] Los resultados mostraron que el aumento de la presión osmótica resultó en un aumento del rendimiento de las blastosporas que no fue simple debido al aumento de la disponibilidad de glucosa en las células similares a levaduras (**Figura 8**, **Tabla 7 -** Media (± SE) seguido por diferentes letras son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). Para los osmolitos enumerados en la Tabla 7, las concentraciones enumeradas son equivalentes a 200, 14.32 y 18.64 g/L de glucosa, NaCl y KCl, respectivamente. Los medios que contienen las correcciones de NaCl y KCl contenían 100 g de glucosa (0.56 M) como una fuente de carbono.). Las letras en minúscula se refieren a las comparaciones dentro de la cepa para cada día de muestra (columnas), mientras que las letras mayúsculas se refieren a las comparaciones en todo el día de fermentación dentro de la cepa (filas)). Las blastosporas de la invención producidas bajo alta presión osmótica (> 0.5 MPa) exhibieron una morfología esférica que es más pequeña y diferente a las blastosporas oblongas producidas en medios de crecimiento típicos (**Figura 9**).

Esta forma esférica de las blastosporas se asocia con una mayor infectividad de las plagas objetivo y representa una forma única de blastosporas que no se ha informado anteriormente (ver más adelante).

Tabla 7. Aumento de la producción de blastosporas inducido por el aumento de la presión osmótica

cepa de B. bassiana	Osmolito (mol/L)	Presión osmótica (MPa)	Concentración de blastosporas ($\times 10^8$ ml^{-1})		Tolerancia a la desecación (% de germinación)
			Día 2	Día 3	
ESALQ1432	Glucosa (1.1)	2.7	17.3 ± 1.2 aB	29.0 ± 1.1 aA	66.2 ± 2.1
	NaCl (0.25)	2.5	12.1 ± 0.8 bB	33.1 ± 1.4 aA	76.1 ± 2.8
	KCl (0.25)	2.5	11.1 ± 1.2 bB	29.6 ± 1.8 aA	70.7 ± 2.0
GHA	Glucosa (1.1)	2.7	15.6 ± 1.2 aB	29.4 ± 2.0 aA	58.6 ± 2.2
	NaCl (0.25)	2.5	12.7 ± 0.5 aB	24.1 ± 1.7 aA	57.4 ± 1.1
	KCl (0.25)	2.5	15.1 ± 0.9 aB	26.1 ± 1.9 abA	54.2 ± 1.4

[00107] Alta aeración

[00108] Aunque los estudios anteriores han indicado que mayores tasas de aeración obtenidas mediante el uso de frascos deflectados y mayor agitación proporcionaron más oxígeno a los cultivos líquidos y mejoraron los rendimientos de blastosporas de *I. fumosorosea*, ha habido una contraindicación de que no hay aumento en la producción de esporas de *B. bassiana* por encima de 200 rpm (Pham y otros, Mycobiology 2009).

[00109] Los resultados iniciales sugieren que es el volumen del cultivo lo importante. Cuando se comparan 50 ml de cultivos con 100 ml de cultivos (medio de sales basales, 2.5 % de harina de semilla de algodón, 10 % de glucosa en frascos Erlenmeyer deflectados de 250 ml, 28 °C y 350 rpm), se nota que los niveles de oxígeno disuelto fueron mayores en el menor volumen (**Figura 10**). También se analizó la velocidad de agitación variable, lo que reveló que a mayores velocidades aumenta la producción de blastosporas en los cultivos de 50 y 100 ml (**Tabla 8** -para cada cepa y cada día de muestra, valores medios seguido por diferentes letras son

significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).). La producción de altos rendimientos de blastosporas de *B. bassiana* mediante el uso de fermentación en tanques profundos apoya la necesidad de niveles de oxígeno disuelto (datos no mostrados).

Tabla 8. Efectos de mayor aeración en el rendimiento de blastosporas

Cepa de Beauveria bassiana	Velocidad de agitación (RPM)	Volumen del medio (ml)	Producción de blastosporas (blastosporas $L^{-1} \times 10^{11}$)	
			Día 2	Día 3
ESALQ1432	350	100	7.6±1.0 b †	9.9±1.1 a
		50	11.0±0.6 a	14.0±1.5 b
	175	100	3.3±0.1 c	3.3±0.3 c
		50	4.9±0.2 c	5.7±0.5 c

[00110] Los resultados demuestran que los cultivos de *B. bassiana*, así como también de *I. fumosorosea* (datos no mostrados), crecidos bajo condiciones altamente aireadas (nivel de oxígeno disuelto por encima de cero para la mayoría de la fermentación) con concentraciones apropiadas de una fuente de nitrógeno (> 15 g/L), fuente de carbono (≥ 60 g/L), y presión osmótica mayor que 0.5 MPa alcanzaron una rápida producción de altos números de blastosporas (**Figura 11**). Las blastosporas producidas bajo estas condiciones proporcionan una producción y un proceso de estabilización viables para las blastosporas de *Beauveria* mediante el uso de componentes de medios económicos. Los intentos anteriores de producir blastosporas de *Beauveria* mediante el uso de procesos de fermentación de cultivos líquidos requirieron mayores tiempos de fermentación (6–8 días) para maximizar los rendimientos y producir células que tienen pobre sobrevivencia después de la desecación y almacenamiento.

[00111] Eficacia contra la mosca blanca

[00112] Para comparar la virulencia entre las blastosporas y los conidios aéreos, se bioevaluaron las ninfas del biotipo B de *B. tabaci* del segundo instar. Las pruebas de virulencia revelaron que las blastosporas de *B. bassiana* requirieron una concentración de esporas cuatro veces menor para destruir el 50 % de las ninfas que los conidios aéreos (**Tabla 9**). Un total de diez (10) replicaciones, cada una que contiene más de cincuenta (50) ninfas de mosca blanca se analizaron por concentración fúngica. La concentración letal media suministrada (LC_{50}) se expresa en propágulos/cm^2 y se estima mediante el modelo logístico. La mortalidad acumulada se registró hasta el día 6 después de la aplicación. La mortalidad control promedió 3.7 ± 1.3 %. La potencia relativa es la medida de la eficacia relativa de blastosporas a conidios aéreos dentro de cada

especie fúngica: (LC_{50} conidios / LC_{50} blastosporas). Las comparaciones se realizaron dentro de cada especie fúngica y si el límite de confianza para la relación LC no contiene 1, se concluye de esta manera que los valores de LC son significativamente diferentes. χ^2 y los valores *P* representan la probabilidad de pendiente ≠ 0, en vez de ajustarse al modelo logístico.

Tabla 9. *Las blastosporas de B. bassiana* son más eficaces que los conidios para el control de la mosca blanca

Tipo de espora	n[a]	LC_{50} (propágulos/cm^2)[b]	(95 % CL)[c]		RP_{50}[d]	(95 % CL)		χ^2 (*valor*-P)[e]
			Menor	Mayor		Menor	Mayor	
Blastosporas	3113	485	353	643	4.6	3.25	6.50	109.35 (< 0.0001)
Conidios	3059	2230	1362	3393	-	-	-	72.22 (< 0.0001)

[00113] Consistente con las observaciones anteriores para *B. bassiana*, el tiempo letal medio (LT_{50}, tiempo necesario para destruir el 50 % de las ninfas) para conidios aéreos fue significativamente más largo (t = 9.88, P < 0.0001) que el calculado para blastosporas, lo que resulta en un aumento significativo de la velocidad de destrucción (> 37 % más rápido) por las blastosporas (**Tabla 10**). Se analizaron diez insectos por tratamiento ($2.0x10^4$ esporas/cm^2) y los insectos control se pulverizaron con solución de Tween 80 al 0.01 %. La mortalidad promedió 11.5±1.6 % después de 6 días. Las blastosporas de *I. fumosorosea* requirieron 70 % menos esporas para provocar el 50 % de mortalidad así como también más rápida la mortalidad de las ninfas (t = 2.52, P = 0.0215) cuando se compara con los conidios. La mayoría de los cadáveres de ninfas infectadas por ambos tipos de propágulos apoyaron la proliferación de hongos que posteriormente esporularon.

Tabla 10. *Las blastosporas de B. bassiana* (ESALQ1423) destruyen las moscas blancas más rápido que los conidios

Hongo	Tipo de propágulos	n[a]	Tiempo de sobrevivencia medio (días)[b]	95 % CL (días)	
				Menor	Mayor
B. bassiana	Blastosporas	512	2.45 ± 0.05 b	2.34	2.55
	Conidios	561	3.35 ± 0.07 a	3.21	3.49

[00114] Para examinar si las blastosporas crecidas bajo alta presión osmótica muestran buena eficacia contra las ninfas de la mosca blancas, se produjeron las blastosporas de *B. bassiana*

(ESALQ1432) en un medio líquido con cantidad fija (2.5 %) de harina de semilla de algodón y glucosa a 4 %, 10 %, y 14 % de glucosa después de 3 días de crecimiento. Las blastosporas se separaron del caldo de cultivo con tierra de diatomeas y se secaron al aire, o se encapsularon en una matriz de leche desnatada (SMP) y se secaron por pulverización. Los resultados mostrados en la **Figura 12** indican que las células más pequeñas, redondeadas producidas bajo alta presión osmótica (10 % y 14 % de glucosa) mostraron aumentos en la infectividad y destruyeron a los insectos más rápidamente.