

MEDIOS DE CULTIVO PARA LA REPRODUCCIÓN MASIVA DE *ASCHERSONIA ALEYRODIS* WEBBER

Alexis A. Hernández Mansilla¹ y Carmen Rosón Álvarez²

¹ Centro Provincial de Meteorología. Grupo Científico. Marcial Gómez 401, esq. a Estrada, Ciego de Ávila, Cuba, c.e.: ahmansilla@yahoo.es y agro@meteoro.fica.inf.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central Extremo Oeste, Ciego de Ávila, Cuba.

RESUMEN

Con el objetivo de seleccionar un medio de cultivo que garantice la reproducción masiva de *Aschersonia aleyrodis* Webber para su posterior empleo como bioplaguicida, se realizó un trabajo investigativo en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Ciego de Ávila. Se estudiaron varios medios líquidos compuestos por harina de maíz-cabecilla de arroz (HM-CA), desechos de harina de maíz (DHM), maicena (M), cabecilla de arroz-levadura (CA-L), melaza-levadura torula (MZ-L), harina de maíz (HM), cebada-levadura (C-L), caldo de papa (CP) y caldo de boniato (CB), y como medios sólidos se consideraron cabecilla de arroz-residuos de soya (CA-RS), harina de maíz-residuos de soya (HM-RS), trigo remojado (TR), cabecilla de arroz (A), trigo molido (TM) y harina de maíz (B). Las diferentes variantes fueron depositadas en frascos donde se esterilizaron y se inocularon con suspensión a concentración de 10^8 con/mL, pasadas 24 h de reposo para su posterior incubación. En los medios líquidos se evaluó el crecimiento superficial, y en ambos el tiempo de inicio de crecimiento, pureza, concentración de esporas, viabilidad y virulencia sobre *B. tabaci*. Como resultado se obtuvo que los líquidos (HM-CA) y (CA-L) presentaron los mejores crecimientos, pero con concentraciones bajas entre 10^4 y 10^5 , y viabilidad de 60,2 y 73,7%, respectivamente, y con baja virulencia, además de menor pureza que los sólidos, de los cuales (A) inició el crecimiento a los tres días de inoculado, alcanzó una concentración de 10^8 esp/mL, con viabilidad y virulencia entre 90 y 97%, que lo catalogan como el mejor.

Palabras clave: *Aschersonia aleyrodis*, medios de cultivo, reproducción masiva

ABSTRACT

In order to select a culture media that guarantees massive reproduction of *Aschersonia aleyrodis* Webber for its later employment as biopesticide, a research work was realized in Plant Health Laboratory of Ciego de Ávila province. Several liquid media composed by maize flour-milled rice (HM-CA), maize flour waste (DHM), fine maize powder (M), milled rice-yeast (CA-L), cane juice sirup-torula yeast (MZ-L), maize flour (HM), barley-yeast (C), potato broth (CP) and sweet potato broth (CB) were assessed, and as solid media were considered milled rice-soy bean residues (CA-RS), maize flour-soy bean residues (HM-RS), dipped wheat (TR), milled rice (A), ground wheat (TM) and maize flour (B). Different culture media deposited in flasks, were sterilized and then were inoculated with a suspension of 10^8 conidia/mL of concentration, after being 24 hours in rest for their later incubation. In liquids media was evaluated superficial growth, and in both liquids and solids were evaluated initial time to beginning growth, purity, spores concentration, viability and virulence on *B. tabaci*. Result obtained showed that liquids (HM-CA) and (CA-L) had the best growths, but with low concentrations between 10^4 and 10^5 , viability of 60.2 and 73.7% respectively, and with low virulence besides minor purity than the solids; about these last ones (A) initiated the growth three days from inoculation and reached a concentration of 10^8 spores/mL, with viability and virulence between 90 and 97%, so it is catalogued like the best

Key words: *Aschersonia aleyrodis*, massive reproduction, culture media

INTRODUCCIÓN

Los esfuerzos por alcanzar una agricultura sostenible en la que se presupone la utilización óptima de diversos métodos técnicamente efectivos, económicamente viables y compatibles con el ambiente, son aspectos de primer orden en el país. La lucha biológica tiene una participación preponderante dentro de esta línea de trabajo, fundamentalmente en la producción de bioplaguicidas por métodos artesanales e industriales

estables [Fernández-Larrea, 1997, 2000], para ejercer una óptima y sana protección fitosanitarias de los cultivos.

La eficiencia del hongo *Aschersonia aleyrodis* Webber como entomopatógeno natural, presente en el agroecosistema citrícola del país hace pensar en la perspectiva de su utilización como bioplaguicida para reducir las poblaciones de insectos plaga que resulten sensi-

bles a él, y que afectan cultivos en los que este microorganismo no se establece, por cuanto resultaría de gran interés contar con una tecnología de producción.

En el establecimiento de un proceso masivo de producción de entomopatógenos deben tenerse en cuenta algunos premisas que repercuten directamente en el proceso productivo, como medios de cultivos idóneos, capaces de brindar al microorganismo los nutrientes necesarios para su desarrollo, que de hecho, una buena selección favorece la capacidad de un rápido crecimiento y una buena esporulación como requisitos fundamentales; la forma de sustrato que se emplee como soporte, sea sólida o líquida, puede o no favorecer el crecimiento e incidir además en la capacidad esporulativa, los medios sólidos tienen una mayor facilidad de manipulación a nivel de laboratorio y evitan mayores riesgos de contaminación; y el empleo de subproductos agrícolas, que resulta un factor económico decisivo, pues la factibilidad de obtención es un elemento que ha de tenerse en cuenta para el establecimiento de una producción de este tipo.

Es por ello que para la elaboración de una tecnología para la reproducción artificial se requiere de un amplio nivel de conocimiento sobre la biología del microorganismo, y dentro de ello disponer de un medio de cultivo que permita su reproducción con calidad, elemento que constituye el objetivo fundamental de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Ciego de Ávila, para lo cual se emplearon cepas de *Aschersonia aleyrodis* Webber, aisladas de conidiomas presentes en hojas de naranjo Valencia (*Citrus sisnensis* L.) procedentes de la Empresa de Cítricos Ceballos, en Ciego de Ávila.

En la evaluación de los medios de cultivo se tuvieron en cuenta diferentes parámetros como crecimiento, esporulación, pureza, viabilidad y virulencia con *Bemisia tabaci* como insecto tipo.

Medios líquidos estáticos

Se elaboraron ocho medios de cultivo líquidos como harina de maíz-cabecilla de arroz-azúcar refino (HM-CA), desecho de harina de maíz-azúcar (DHM), maicena-levadura torula-azúcar (M), cabecilla de arroz-levadura torula-azúcar (CA-L), melaza-levadura torula-harina de maíz (MZ-L), cebada-levadura torula-azúcar (C-L), papa molida-azúcar (CP) y boniato molido-azúcar (CB).

Su confección se realizó mediante combinaciones de elementos nutricionales recomendados para *Beauveria bassiana* [López, 1985], *Hirsutella thompsonii* [Cabrera y Domínguez, 1987] y *Verticillium lecanii* [Luján *et al.*, 1990]. Se tuvieron además en cuenta las posibilidades económicas y la solvencia del material residual disponible para una futura producción.

En la elaboración de cada variante se adicionó agua destilada para su cocción. Finalmente se distribuyó en 20 frascos de 500 mL de capacidad, a razón de 80 mL/frasco de caldo. Se taparon con tapones de algodón-gasa y retapa de papel de aluminio para su esterilización a 1,5 atm de presión y temperatura de 120°C durante 40 min. Se inocularon e incubaron después de transcurrir en reposo 24 h. La inoculación se realizó mediante una jeringuilla automática con 5 mL de suspensión de conidios de *A. aleyrodis* a concentración de 10^8 con/mL. En la preparación del inóculo se emplearon cuatro tubos de cepas bien esporuladas de primer pase, a las que se les desprendieron los conidios y se depositaron en erlenmeyers de cristal, que contenían 100 mL de agua destilada estéril más dos gotas de Tween 80 a 1%. Los frascos se colocaron de forma inclinada y permanecieron estáticos durante 21 días en cuarto climatizado a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura con alternancia de períodos de luz-oscuridad de 12-12 h.

El crecimiento superficial de las colonias se midió transcurridos los 10 primeros días, en los que se observó el desarrollo de las colonias y su expansión en el medio, para lo cual la superficie del medio se dividió en partes porcentuales y así poder estimar el crecimiento del hongo. Para esta operación se establecieron los siguientes parámetros:

Descripción
No crecimiento
Hasta 25% de la superficie cubierta
Hasta 50% de la superficie cubierta
Hasta 75% de la superficie cubierta
Total de la superficie cubierta

La evaluación de la pureza, concentración de esporas, viabilidad y virulencia se ejecutó de acuerdo con la Norma Cubana 72-02 (1993).

Medios sólidos

Los medios sólidos cabecilla de arroz-residuos de soya (CA-RS), harina de maíz-residuos de soya (HM-RS), trigo remojado (TR), cabecilla de arroz (A), trigo molido (TM), harina de maíz (B) se seleccionaron de acuer-

do con las recomendaciones para la reproducción de *Verticillium lecanii* (Limm.) [Luján *et al.*, 1990] y *Beauveria bassiana* (Bals) [López, 1985]. Algunos de ellos fueron combinados con diferentes componentes para enriquecerlos con elementos proteicos que posibilitaran el desarrollo del hongo.

Estos medios se distribuyeron en 20 frascos de cristal de 250 mL de capacidad, a razón de 30 g/frasco, se les añadió 10 mL de solución de carbonato de calcio a 1% como medio de estabilización del pH y para favorecer la esporulación de los hongos [López, 1985; Luján *et al.*, 1990]. Posteriormente se esterilizaron durante 30 min en autoclave a 1,5 atm de presión y temperatura de 120°C [Norma Cubana 72-05, 1993; Norma Cubana 72 03, 1993]. Transcurridas las 24 h de su elaboración y reposo se inocularon con jeringuilla automática, y en cada frasco se depositaron 10 mL de la suspensión de conidios, a partir de cuatro tubos bien esporulados de primer pase, los que se desprendieron con ayuda de un asa de siembra y se depositaron en 100 mL de agua destilada estéril, con dos gotas de Tween 80. Los frascos se agitaron de forma manual para lograr homogeneidad en el sustrato, y se incubaron durante 21 días en cuarto climatizado a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y alternancia de luz-oscuridad por tiempos de 12-12 h.

En el caso de los medios sólidos no se evaluó el crecimiento superficial producto de la homogeneidad creada al inocular el sustrato sólido, aspecto que no hace posible un crecimiento superficial del microorganismo por llegar a cubrir las partículas del soporte. Pureza, esporulación, viabilidad y virulencia se evaluaron de acuerdo con la Norma Cubana 72-02 (1993). Las especificidades y ajustes experimentales fueron similares a los descritos anteriormente para los medios líquidos.

Los datos de crecimiento superficial de los medios líquidos y la viabilidad y virulencia obtenidos en ambos tipos de medios se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza simple, con su correspondiente prueba de Duncan a 95 %, para determinar los niveles de significación de las variables analizadas. Los valores porcentuales de los parámetros evaluados se transformaron mediante $\arcsen \sqrt{x}$. Finalmente los datos de pureza y esporulación resultantes se organizaron mediante una tabla comparativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de pureza se expresan en la *Tabla 1*. En ella aparecen el número de frascos con crecimiento puro de *A. aleyrodís* y el de frascos contaminados al finalizar el proceso para ambos tipos de medios.

Tabla 1. Comportamiento de la pureza en soportes líquidos y sólidos

Parámetro	Medios sólidos	Medios líquidos
Crecimientos puros	37	27
Contaminados	3	13
Sin crecimiento	20	20
Total de frascos	60	60

El número de frascos con crecimientos puros en las variantes sólidas fue superior a las variantes líquidas. Esto se asocia a la facilidad de manipulación de los sustratos en la elaboración de los medios, al tener un menor riesgo de contaminación en el proceso de laboratorio. Al respecto se plantea que los medios líquidos son muy propensos al desarrollo de contaminantes en las horas de reposo, antes de ser inoculados, así como en el momento de realizar la inoculación, además de recomendar para la producción de biopreparados soportes sólidos para todas las líneas de entomopatógenos [Fernández-Larrea, 2000].

El comportamiento del crecimiento superficial de *A. aleyrodís* en los medios líquidos aparece en la *Fig. 1*. En ella se aprecia que el hongo fue capaz de crecer en los medios probados, aunque se encontraron diferencias en el desarrollo de las colonias en cada uno de ellos. Los medios HM-CA con 87% y CA-L con 100%, a partir de harina de maíz y cabecilla de arroz respectivamente, mostraron los más altos porcentajes de crecimiento superficial, a diferencia de D-HM con 42%, y C-L con un área inferior a 70%, los cuales señalan que el crecimiento en estos dos últimos fue pobre, por lo que les resta posibilidades de empleo si se quisiera establecer una tecnología de reproducción masiva.

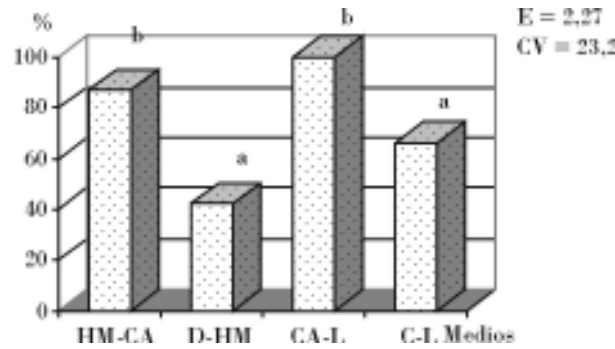


Figura 1. Crecimiento de *A. aleyrodis* en medios líquidos.

La variante CA-L presentó un crecimiento inicial rápido. A los siete días alcanzó 100% del área posible de crecimiento, acompañado de un cambio en la coloración del micelio de blanco a naranja, lo que determina el desarrollo del proceso esporulativo y, por consiguiente, la presencia de los conidios indicativos de que este medio satisface las necesidades nutricionales del hongo y permite su desarrollo fisiológico. Los frascos inoculados sobre el medio HM-CA, de igual forma que el anterior, presentó un buen crecimiento ante el resto de los medios. Estadísticamente los soportes HM-CA y CA-L no difirieron de forma significativa entre ellos, pero sí de los restantes medios (Fig. 1). Por tanto pueden ser empleados en la reproducción de este hongo,

salvo las desventajas de los posibles riesgos de contaminación.

En la Fig. 2 se muestra el número de días para iniciar el crecimiento a partir de la inoculación y la máxima esporulación en los medios sólidos. Los soportes CA-RS y A iniciaron el crecimiento pasados tres días de la inoculación; HM-RS y TM se atrasaron dos días más. Los medios CA-RS, A y TM alcanzaron la máxima esporulación antes de los 28 días posteriores a la inoculación. No se observó crecimiento en los medios líquidos M-L, CP y CB, al igual que en los sólidos TR, TM y B, los que no satisfacen los requerimientos nutricionales exigidos por este entomopatógeno para indicar que no deben utilizarse con esta finalidad.

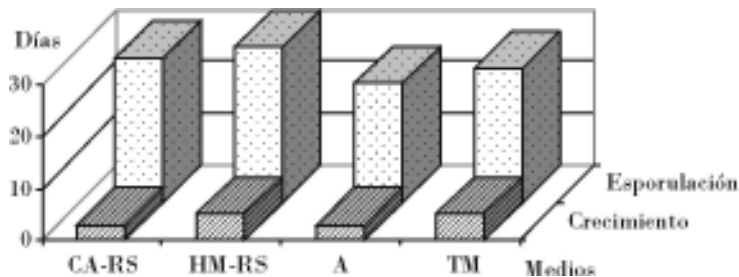


Figura 2. Comportamiento del período de inicio de crecimiento y máxima esporulación de *A. aleyrodis* en soportes sólidos.

La concentración de esporas en los diferentes medios inoculados con *A. aleyrodis* se reflejan en la Tabla 2. Los medios sólidos lograron mayor esporulación en aquellos de mayor crecimiento como CA-RS; HM-RS, A y TM. Los valores registrados superaron la concentración de 10^6 . Se destaca A con los valores más altos en un rango entre $1,9 \times 10^8$ a $4,1 \times 10^8$, óptimos para ser utilizados en la fase reproductiva. El soporte a base de TM solo alcanzó índi-

ces de concentración entre $1,1 \times 10^6$ y $2,3 \times 10^6$, que no permiten la utilización de este sustrato en producciones masivas por no superar 10^8 , según Norma Cubana 72-02 (1993). De forma similar CA-RS y HM-RS con $1,5 \times 10^7$ tampoco deben ser considerados. No obstante para la producción de este hongo el empleo de medios a base de granos de cereales pueden llegar a producir concentraciones entre 1 a 2×10^9 esporas [Fransen, 1987a].

Los sustratos líquidos presentaron en general valores de concentración de esporas muy inferiores a lo establecido nacionalmente para la reproducción de hongos entomopatógenos, con un rango entre 10^4 y 10^5 . La comparación entre ambas formas de sustratos muestra la superioridad de los sólidos en la concentración de esporas por mililitro, parámetro importante en los registros de calidad biológica para estas producciones.

En referencia a los medios de cultivo empleados y la concentración de esporas que se alcanza, existen trabajos realizados en 1920 por Berger sobre PSA (agar-papa-sacarosa) en los que se alcanzaron concentraciones de 8×10^6 esp/mL [Fransen, 1987a]. Según Berlanga

y Hernández (2002), Gottwald (1978) con medio GGP llegó a obtener $5,88 \times 10^{10}$, así como Graza (1977) en Saboraud glucosa a 2% más extracto de levadura. Este último autor obtuvo concentraciones de 10^4 a 28°C pasados 42 días, mediante modificación de la técnica de Samson, con 30 g de arroz y 20 cc de extracto de levadura más tetraciclina con 40 cc de agua. Todos estos medios, a pesar de sus diferencias con los empleados en este trabajo, demuestran la factibilidad de llegar a establecer producciones masivas de este hongo y la superioridad de los sustratos con cabecilla de arroz y otros cereales que corroboran planteamientos de Fransen (1987a).

Tabla 2. Comportamiento de la concentración de esporas de *A. aleyrodís* según medio de cultivo y estado físico

Soportes sólidos		Soportes líquidos	
Medios	Rango de concentración (esp/mL)	Medios	Rango de concentración (esp/mL)
Cabecilla de arroz + residuos de soya (CA-RS)	$1,5 \times 10^7$ $1,9 \times 10^8$	Harina de maíz + cabecilla de arroz + azúcar (HM-CA)	$1,6 \times 10^4$ $2,0 \times 10^5$
Harina de maíz + residuos de soya (HM-RS)	$1,1 \times 10^6$ $1,5 \times 10^7$	Desecho de harina de maíz + azúcar (DHM)	$1,1 \times 10^4$ $2,7 \times 10^5$
Trigo remojado (TR)	—	Maicena + azúcar + levadura torula (M)	—
Cabecilla de arroz (A)	$1,9 \times 10^8$ $4,1 \times 10^8$	Cabecilla de arroz + levadura torula + azúcar (CA-L)	$1,4 \times 10^4$ $3,6 \times 10^5$
Trigo molido (TM)	$1,1 \times 10^6$ $2,3 \times 10^6$	Melaza + levadura + harina de maíz (MZ-L)	—
Harina de maíz (B)	—	Cebada + azúcar + levadura torula (C-L)	$1,0 \times 10^4$ $3,4 \times 10^5$
		Papa molida + azúcar (CP)	—
		Boniato molido + azúcar (CB)	—

La viabilidad de esporas es un parámetro muy importante dentro del registro de calidad de los biopreparados. Los resultados en medios líquidos se muestran en la Fig. 3.

El medio líquido con mayor germinación de las esporas de *A. aleyrodís* correspondió a CA-L con índice medio de 73,7%, seguido de HM-CA con 60,2%. El medio de menor porcentaje (42%) fue el de (DHM). Los resultados estadísticos corroboran que el medio CA-L fue el mejor, que difirió significativamente del medio con desechos de harina de maíz (DHM), no así de los restan-

tes, los que a su vez no difirieron de este último, que presentó los valores más bajos de viabilidad.

No obstante, los porcentajes de esporas viables en medio líquido fueron bajos para todos los casos de acuerdo con los parámetros de calidad establecidos en la Norma Cubana 72-02 (1983). La capacidad de germinación de las esporas es un factor de suma importancia para desencadenar el proceso infeccioso contra las plagas existentes en el campo. Por tanto, estos resultados justifican la no utilización de tales sustratos en estado líquido por reflejar bajos índices en este parámetro.

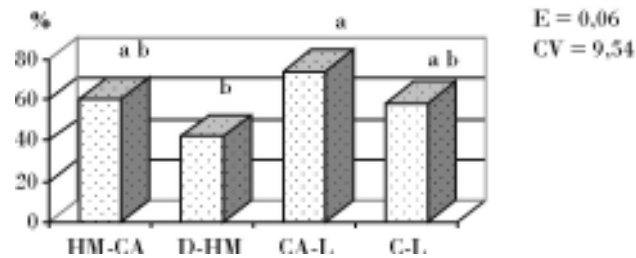


Figura 3. Comportamiento de la viabilidad de las esporas de *A. aleydoris* en medios líquidos

Los porcentajes de esporas viables en los medios sólidos se muestran en la Fig. 4. La germinación en medio A mostró diferencias significativas con respecto a TM, no así ante las restantes variantes como CA-RS y HM-RS, a pesar de que entre ellas y la variante TM no existen diferencias significativas. Los valores porcentuales de viabilidad más

altos correspondieron a los obtenidos en el medio A con 90%. El resto de los medios CA-RS (89%), HM-RS (88%), TM (69%) lograron germinación por debajo de 90%, valores que según parámetros de calidad no aprueban su empleo para fines productivos de entomopatógenos [Norma Cubana 72-02, 1983] (Fig. 4).

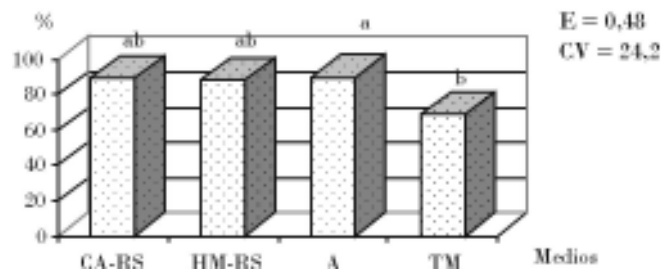


Figura 4. Comportamiento de la viabilidad de las esporas de *A. aleydoris* en medios sólidos.

El comportamiento de la virulencia sobre ninfas de *B. tabaci* de los biopreparados líquidos de *A. aleyrodís* aparece en la Fig. 5. En ella se observa una patogenicidad baja de forma general. Solo la variante CA-L logró una virulencia de 60%. El resto de las variantes mostraron valores medios inferiores: HM-CA (55,5%), DH-M (48,8%) y CL (32,1%). Estos índices no son satisfactorios

y muestran una relación directa con los resultados de viabilidad. Según sea la cantidad de esporas viables, así será la capacidad de germinación al hacer contacto con el insecto y poder llegar a infectarlo. Para pruebas *in vitro* la mortalidad alcanzada es muy baja, y de ser aplicado en condiciones de campo no lograría disminuir los niveles de la plaga, por lo que no sería efectiva su aplicación.

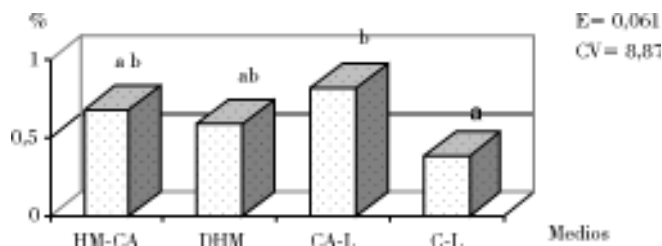


Figura 5. Comportamiento de la virulencia de *A. aleyrodís* sobre *B. tabaci*.

Resultados similares fueron planteados por Fernández-Larrea (2000) en las producciones de biopreparados líquidos, los que no satisfacen los requerimientos para el crecimiento, producción y viabilidad de conidios de los hongos entomopatógenos. En estos momentos la producción de biopreparados fúngicos se apoya sobre soportes sólidos por lograrse en ellos superior calidad y más fácil manipulación y recobrado de la producción.

Los porcentajes de virulencia logrados por biopreparados sólidos de *A. aleyrodis* se muestran en la Fig. 6. Los máximos valores de patogenicidad se lograron en el medio A con valores comprendidos entre 97%. Los medios CA-RS, HM-RS y TM lograron solo una mortalidad de 80, 69 y 61% de las ninfas de *B. tabaci* respectivamente. Solo los porcentajes de virulencia correspondientes al medio cabecilla de arroz (A) cumplen con lo establecido en la NC 72-02 (1993).

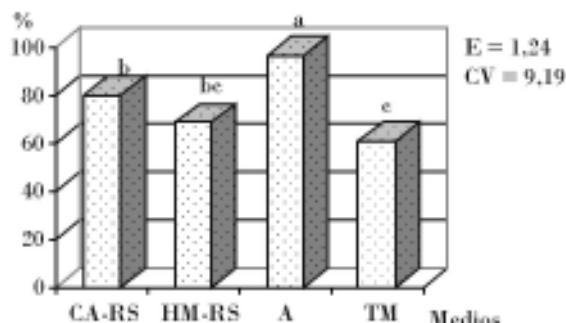


Figura 6. Comportamiento de la virulencia de *A. aleyrodis* sobre *B. tabaci* en medios sólidos.

Similares resultados tuvo Fransen (1987b) al realizar tratamientos con *A. aleyrodis* para disminuir las poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* en condiciones de invernaderos, en las que alcanzó una mortalidad de 95%. También Meekes *et al.* (1994), en ensayos de laboratorio al tratar moscas blancas, lograron una virulencia superior a 90%.

Los resultados estadísticos corroboran que el medio cabecilla de arroz (A) fue el mejor al diferir significativamente de los medios cabecilla de arroz + residuos de soya (CA-RS), harina de maíz + residuos de soya (HM-RS) y trigo molido (TM). Los medios CA-RS y HM-RS no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero sí ante TM, que no difiere de HM-RS. La virulencia y la viabilidad de las esporas son parámetros muy importantes para los biopreparados, ya que confirman la cantidad de esporas capaces de germinar en el momento de la aplicación y generar el proceso infeccioso del hongo sobre el insecto, como fases iniciales para llegar a provocar la epizootia.

CONCLUSIONES

- Los medios sólidos en comparación con los líquidos presentan una mayor pureza y factibilidad de utilización para la reproducción de *A. aleyrodis*.

- El soporte sólido de cabecilla de arroz resultó el mejor ante el resto de los medios probados por alcanzar 100% de pureza, 90% de esporas viables, concentraciones de 10^8 con/mL y una patogenicidad de 97% sobre *B. tabaci*.
- En los ensayos realizados se destacan fundamentalmente los medios constituidos a base de cereales tanto en forma líquida como sólida. De ellos los segundos brindan la posibilidad de emplearse para la reproducción de *A. Aleyrodis* en condiciones de laboratorio.
- Los resultados de este trabajo sirven de antecedente básico para la confección de aspectos tecnológicos que permitan la reproducción masiva de este hongo entomopatógeno.

REFERENCIAS

- Berlanga P., Angélica María; V. Hernández Velásquez: «*Aschersonia aleyrodis* Webber en el control microbial de mosca blanca de los cítricos *Dialeurodes* spp.». Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, DGSV-SAGAR, Estación FFCC, Tecmán, Colima, México, 2002. <http://www.procesosvirtuales.com/documentos/archivos/DT-BT01-001.pdf>. 2002.
- Cabrera, R. I.; Delmis Domínguez: «Metodología para la reproducción de *Hirsutella thompsonii* en cultivo mixto», Instituto Nacional de Cítricos, La Habana, 1987.
- Fernández-Larrea, Orietta: «Actualidad y perspectivas en la producción e investigación de bioplaguicidas. Situación en Cuba», V Encuentro Nacional Científico-Técnico de Bioplaguicidas, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 22- 23 de octubre de 1997, pp. 9-15.

- Fernández-Larrea, Orietta: «La reproducción de los hongos entomopatógenos y antagonistas. Experiencia cubana», Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 2000 (inédito).
- Fransen, J. J.: «*Aschersonia aleyrodis* as a Microbial Control Agent of Greenhouse Whitefly», Doctorate Thesis, Agricultural University of Wageningen, Holanda, 1987a.
- : «Control of Greenhouse Whitefly, *Trioletodes vaporarior*, by the Fungus *Aschersonia aleyrodis*. Integrated Control in Glass House», Budapest, Bulletin *SROP* (France) Apr. 10(2):57-61, 1987b.
- Gottwald, A. C.: «Biotécnica de aislamientos y reproducción masiva a nivel de laboratorio de esporas del hongo *Aschersonia aleyrodis* nativo de México», Memorias VI Reunión Nacional de Control Biológico, Culiacán, 1978, pp. 22-29.
- López, Miriam: «Metodología de reproducción y aplicación de *Beauveria bassiana*, Departamento de Lucha Biológica, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, MINAGRI, La Habana, 1985.
- Luján, Mercedes; Esperanza Sánchez; Tania Vásquez; Teresa Cabrera: «Metodología de propagación bifásica o líquida de estática del hongo *Verticillium lecanii* (Limm.)», INISAV-CNSV, La Habana, 1990.
- Meekes, E. T.; J. J. Fransen; J. C. Van Lenteren: «The Use of Entomopathogenic Fungi for the Control of Whiteflies», Mededelingen Faculteit Landbouwkundige, *Toegepaste biologische Wetenschappen Universiteit* (2)111-115, 1994.
- Norma Cubana 72-02: «Métodos de ensayos. Biotecnología agrícola. Biopreparados entomopatógenos. Biotecnología agrícola», INISAV, MINAGRI, La Habana, 1993.
- Norma Cubana 72-03: «Biopreparado del entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola», INISAV, MINAGRI, La Habana, 1993.
- Norma Cubana 72-05: «Biopreparado del entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola», INISAV, MINAGRI, La Habana, 1993.