

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS* (WIZE) BROUM & SMITH

Aidanet Carr Pérez, Orestes Elósegui y Noris Bel Padrón

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

RESUMEN

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown & Smith es un hongo entomopatógeno Deuteromiceto utilizado para el control de plagas que afectan a cultivos de gran importancia económica. Entre ellas se encuentran *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Lyriomisa trifolii* Burgues, las termitas y *Thrips palmi* Karni. Este último se detectó en nuestro país en 1996, afectando grandemente los cultivos de papa, frijol, calabaza y pepino, entre otros. Debido a que *Paecilomyces fumosoroseus* tiene grandes perspectivas en el control biológico, se realizaron aislamientos en diversas áreas y se desarrollaron diferentes estudios, tales como morfológicos y fisiológicos. Se caracterizaron los aislados Pz-5 y LBPf-4, el primero obtenido del Parque Zoológico Nacional, zona donde nunca se han realizado aplicaciones de hongos entomopatógenos. El segundo aislado se obtuvo a partir de *Bemisia tabaci* en un área de papa en el municipio de Güines. En ambos aislados se utilizó el método de dilución decimal seriada. Los mejores valores de concentración se lograron sobre los medios Czapek-Dox y Sabouraud Maltosa Agar (SMA), y en estos el mejor desarrollo del crecimiento micelial se obtuvo en el medio SMA. El rango de temperatura favorable para el crecimiento y la germinación de los aislados se enmarca entre 25-28°C, con un óptimo a 25°C. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los cultivos se encontraban bajo el régimen de oscuridad. El pH óptimo de crecimiento fue 6,5. De las enzimas evaluadas, las de mayor actividad fueron proteasa y quitinasa. Ambos aislados utilizan el nitrógeno tanto en forma inorgánica como orgánica. Fue mayor el crecimiento del micelio en los tratamientos donde se utilizó glucosa y lactosa, y la concentración de conidios fue mejor cuando se utilizó almidón y melaza.

Palabras clave: *Paecilomyces fumosoroseus*, control biológico, hongo entomopatógeno

ABSTRACT

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown & Smith is an entomogenous Deuteromycetes fungus used for the control of pests attacking crops of great economic importance. Among them we can find *Bemisia tabaci* (whitefly), *Lyriomisa trifolii* Burges, the termites and the *Thrips palmi* Karni, the latter being detected in our country in 1996, in potato, bean, squash and cucumber, among others. Because *Paecilomyces fumosoroseus* has a big potential for the biological control, isolations were carried out in several areas, and different studies were developed about them, such as morphological and physiological studies. The isolates Pz-5 and LBPf-4 were characterized, the first one obtained from the National Zoo Park, an area where applications of entomogenous fungi had never been carried out, and the second isolate was obtained from *Bemisia tabaci*, in a potato field in the municipality of Güines. The best concentration values were achieved on the culture media Czapek-Dox and Sabouraud's Maltose Agar (SMA) and the best development of the mycelial growth was obtained in the SMA medium. The range of favorable temperature for the growth and the germination of both isolates was from 25°C to 28°C, with an optimal value of 25°C. The best results were obtained when the cultures were under total darkness. The best pH of growth was 6.5. We evaluated four enzymes, the best activities were found for protease and chitinase. Both isolates used the nitrogen in both inorganic and organic forms. The growth was greater in the treatments where both glucose and lactose were used and the conidial concentration was better when it was used starch and sugar cane molasses.

Key words: biological control, entomogenous fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*

INTRODUCCIÓN

El control biológico es un método de protección de las plantas que se basa en el uso de parásitos, depredadores y microorganismos para el control de plagas, enfermedades y malezas. Algunos autores lo describen como un método silencioso, ecológicamente compatible y seguro, además de ser diverso, efectivo y tener la posibilidad de formar epizootias en el suelo [Fernández-Larrea, 1995]. Con este objeto la atención se ha desviado hacia los hongos entomopatógenos, específicamente a los que por vía natural infectan a su hospedante.

Dentro de este grupo se encuentra incluido el hongo deuteromiceto *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, el cual ha sido observado sobre lepidópteros: larvas de *Spodoptera littoralis*, familia Noctuidae [Fargues *et al.*, 1980], *Spodoptera frugiperda* [Lezama-Gutierrez *et al.*, 1994], *Lyriomiza trifolii* Burgues [Bordat *et al.*, 1988; Riba *et al.*, 1989]. Sobre coleópteros se informa su efecto ovicida contra *Diabrotica speciosa* [Tigano-Milani *et al.*, 1995b]. En *Otiorrhyncus sulcatus* fue informado por Marchal (1987); sobre dípteros: *Musca domestica* [Bordat

et al., 1988]; en homópteros: *Bemisia tabaci* (Gennadius) [Osborne *et al.*, 1992; Inglis *et al.*, 1999] e isópteros: especies de termitas [Ochiel, 1995 y Kenneth, 1997].

En 1997 aparece por primera vez en Cuba el *Thrips palmi* Karny afectando grandemente a diferentes cultivos de gran importancia económica, además de las altas poblaciones de *Bemisia tabaci* en diferentes hortalizas.

El aislamiento de este hongo entomopatógeno se puede lograr a partir de muestras de suelo o de individuos enfermos, los cuales se llevan al laboratorio para observar la presencia de esporas [Zimmerman, 1986; Sosa-Gómez *et al.*, 1998]. Como objetivos de este trabajo nos propusimos la caracterización tanto morfológica como fisiológica de dos aislados del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislamientos se realizaron en el Parque Zoológico Nacional de Cuba, en el cual nunca se había realizado aplicaciones de biopreparados. El otro fue aislado de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en un área de papa del municipio de Güines, provincia de La Habana en la campaña 1997-1998. Los muestreos se realizaron con el método de Zimmermann (1986), tomando cinco puntos al azar en cada zona evaluada. Los aislamientos se obtuvieron a partir del método de dilución decimal seriada (cultivo monospórico) utilizado por Hall (1980), tanto para los aislados de suelo como para el de insectos. Se trabajó con el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las placas fueron incubadas a 25°C de tres a cuatro días hasta que comenzaron a crecer colonias aisladas, de las cuales tomamos una asada y fue transferida a tubo con medio PDA, el cual contenía 0,5 g/L de cloranfenicol.

Para la caracterización morfológica se realizó la observación al microscopio óptico, con contraste de fase y aumento de 400X. Se determinó el largo y ancho de los conidios para los aislamientos (Pz-5 y LBPf-4), los cuales reunían las características similares a lo planteado por Brady (1979) para el hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus*, determinándole el ancho y largo de fialides y conidios, así como el ancho del eje del conidióforo. Se realizaron preparaciones microscópicas utilizando el método descrito por Harrigan y Mac Cance (1968). Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 48 y 72 horas de incubación, midiendo 50 estructuras para cada caso.

Para la caracterización fisiológica los medios de cultivos utilizados fueron los usados por Samson (1974) PDA, SMA; Domsh (1980) Czapek-Dox; Lecuona (1996) medio completo, y Figueroa *et al.* (2000) SDA. Se prepararon diluciones de 10^6 - 10^7 conidios/mL a partir de los aislados Pz-5 y LBPf-4. Se realizaron conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) de forma directa a las 48 horas. Los medios que se utilizaron fueron SMA y Czapek-

Dox. Se observó la forma de la colonia, características miceliales, color y cambio de color en su reverso.

Se estudió el efecto del crecimiento micelial a diferentes temperaturas (10°, 20°, 25°, 28°, 30°, 35° y 40°C), con el empleo como sustrato Czapek-Dox y SMA. El porcentaje de germinación conidial se evaluó utilizando la norma cubana 72-02/1993. Se contó con los conidios germinados y los no germinados en cinco campos.

Se determinó el pH óptimo, con el uso del método propuesto por Harrigan y Mac Cance (1968). Se utilizó el medio líquido papa-dextrosa. Los valores de pH ensayados fueron 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0.

La influencia de diferentes regímenes de luz en el crecimiento micelial se evaluó con diferentes condiciones de luz: luz continua, alterna (16 horas luz-8 de oscuridad placas envueltas en papel de aluminio) y oscuridad continua o total. Se envolvieron las placas en papel de aluminio.

La quitina se obtuvo a través del método de Stanier *et al.* (1966) [citado por López, 1995]. Se determinó por el halo de hidrólisis producido de los siete a los catorce días. La determinación de la proteasa se realizó utilizando el método de Riba (1985), así como el medio de cultivo. Fue evaluado a los cinco días de cultivo, observando el halo de hidrólisis producido por la utilización de la proteína en el medio de cultivo. La producción de la enzima lipasa se detecta por la opacidad alrededor de la colonia. Se empleó el medio compuesto por Tween 80 más sales minerales de Harrigan *et al.* (1968). Para determinar la degradación del almidón se utilizó el reactivo de Lugol, añadido al medio a los siete días de incubación. Se evaluó por el halo de hidrólisis producido [Szabó, 1974].

La determinación de nitrógeno orgánico e inorgánico se realizó mediante el método de Stainer *et al.* (1966) [citado por López, 1995]. Para el nitrógeno orgánico se evaluó por el crecimiento del hongo en agua de peptona al 1%, y el inorgánico en un medio compuesto por diferentes sales. La evaluación se realizó a los 14 días.

Se evaluó el crecimiento utilizando como fuente de carbono los siguientes azúcares: glucosa, arabinosa, lactosa, sacarosa, fructuosa, galactosa y maltosa, todos al 1%, según Shirling y Gottlieb (1966) [citado por López, 1995]. Se incubaron de siete a catorce días para la determinación de su utilización, y la medida del diámetro de la colonia. La concentración de conidios se determinó en cada medio colocando dos discos de 7mm de cada placa en dos tubos de ensayos con 10 mL de agua destilada estéril y una gota de Tween 80. Se agitó fuertemente y se realizó el conteo en la cámara de Newbauer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se muestran los aislamientos obtenidos de los aislados identificados como *Paecilomyces*

fumosoroseus (Wize) Brown & Smith. En las placas de Petri que fueron utilizadas para el método de dilución decimal seriada, observamos a partir del cuarto día de incubación colonias aisladas donde fueron identificadas con presencia de coremios definidos y polvorientos, con hifas vegetativas hialinas y conidioforos erectos. Se recuperó

un gran número de esporas individuales de manera confiable, y por la buena ubicación de la espota se desarrolló el tubo germinativo y sus ramificaciones, pudiendo distinguir todos sus detalles correspondientes y asegurándonos de que la colonia se originó a partir de una sola célula, por lo que resultó exitoso el aislamiento.

Tabla 1. Aislados obtenidos en diversas zonas ecológicas

Aislamientos	Lugar	Clasificación
Pz-5	Parque Zoológico	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) Brown & Smith
LBPf-4	Güines (mosca blanca)	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) Brown & Smith

Los conidios de los aislados Pz-5 y LBPf-4 poseen una forma de cilíndrica a fusiforme, forman cadenas y tienen extremos redondeados. Las hifas vegetativas presentan paredes lisas, los conidioforos son erectos y tienden a formar sinemas con verticilos ramificados en grupos de 4-6 fialides. Los valores medios del tamaño de las esporas, hifas y micelio simple de Pz-5 y LBPf-4 se muestran en la *Tabla 2*, los que se encuentran dentro del rango establecido para la descripción de esta especie realizada por Brady

(1979) y Marchal (1987), aunque existen diferencias significativas entre los valores medios del tamaño de las esporas tanto en el ancho como en el largo, no siendo así en el ancho de las hifas; pero sí existen diferencias entre el largo de los dos, al igual que en el ancho del conidioforo. Estos autores plantean que el tamaño de los conidios oscila entre 1-2 μm de ancho y 3-4 μm de largo aproximadamente, con hifas de 1-1,5 μm de ancho y 3,5-4,4 μm de largo, y los conidioforos de 1,5-3 μm de ancho.

Tabla 2. Media de esporas, hifas y micelio simple de los aislados LBPf-4 y Pz-5

Cepa	Esporas (μ)		Hifas (μm)		Conidioforo (μm)
	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
LBPf-4	1,38 a	3,88 a	1,5 a	3,5 a	1,9-2,5 b
Pz-5	1,40 a	4,01 b	1,5 a	4,2 b	1,5-2 a

En la *Fig. 1* se observa que los mejores valores de concentración de conidios para la dilución de 10^7 oscilaron entre $6,2-7,4 \times 10^7$ conidios/mL, siendo los medios SMA y Czapek-Dox los de mejores resultados, tanto para Pz-5 como LBPf-4. Se encontraron diferencias significativas entre los demás medios utilizados. Para la dilución de 10^6 los valores de concentración se encontraban entre $7,76-8,22 \times 10^6$ conidios/mL. Resultaron los mejores me-

dios los mismos que para la dilución de 10^7 , existiendo diferencias significativas entre SDA, PDA y el medio completo. Los resultados menos significativos fueron para el medio completo en las dos diluciones estudiadas, coincidiendo con Brady (1979) y Domsch (1980) con respecto a los medios seleccionados para este hongo, aunque Samson (1974) plantea que el mejor resultado es en agar malta, seguido por el medio PDA.

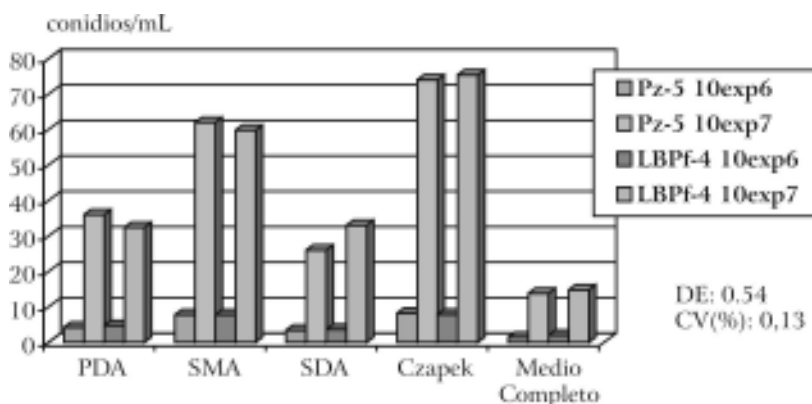


Figura 1. Crecimiento de Pz-5 y LBPf-4 en medios diferentes a dos concentraciones.

Se observó crecimiento del micelio a partir de las 96 horas de incubación. Las colonias se presentan de forma regular produciendo coremios bien definidos: polvorientos en el primer aislamiento, no así en el segundo y tercer pase, tanto para Pz-5 como LBPf-4.

La influencia de los medios Czapek-Dox y SMA en el crecimiento de la colonia de Pz-5 y LBPf-4 son buenos para el objetivo propuesto con los dos aislados, aunque existen diferencias significativas entre ellos.

Los resultados reflejan que no en todos los tratamientos hay crecimiento micelial. A temperaturas de 20 y

35°C este decrece. El mínimo crecimiento fue a 10 y a 40°C. El óptimo de temperatura para el crecimiento micelial de Pz-5 y LBPf-4 fue de 25°C. Existieron diferencias significativas entre las temperaturas estudiadas, no así para los medios (Tabla 3).

Los resultados corroboran lo expresado por Osborne *et al.* (1992), quienes plantearon que la temperatura para un crecimiento óptimo de la colonia de *P. fumosoroseus* es de 23- 25°C. Mietkiewski *et al.* (1993) estudiaron a *P. fumosoroseus* y manifestaron que es esta una especie de hongo dominante detectado en suelos con temperatura de 25°C.

Tabla 3. Crecimiento de Pz-5 y LBPf-4 a diferentes temperaturas en los medios Malta y Czapek a los 14 días de incubación

	Medios/Temp. °C	10	20	25	28	30	35	40
Pz-5	Czapek	5,0	23,4	48	46,4	34,2	21,6	0
	Malta	4,8	27,6	50	47,2	42,8	20,6	0
LBPf-4	Czapek	5	28,4	47,2	46,4	39,6	20,4	0
	Malta	3,8	30	48	47	44,4	24	0

Según Hall *et al.* (1982, 1995) y Marshall (1995), la temperatura óptima de crecimiento de *P. fumosoroseus* es de 28°C, mientras que de la esporulación es a 24°C. La temperatura óptima varía grandemente no sólo entre especies de hongos, sino también entre aislados de la misma especie, aunque pueden resultar diferentes para el crecimiento micelial y las conidiaciones [Thomas *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1998].

Los resultados sobre la producción de enzimas de los aislados Pz-5 y LBPf-4 revelan que los dos son capaces de producir las enzimas estudiadas. Se evidencia que el comportamiento en los cuatro sustratos estudiados es igual entre los aislados Pz-5 y LBPf-4, donde sólo las supera en la actividad proteolítica, siguiendo la actividad quitinolítica. Es mucho menor la intensidad de la actividad para la amilasa y luego la lipasa (Fig. 2).

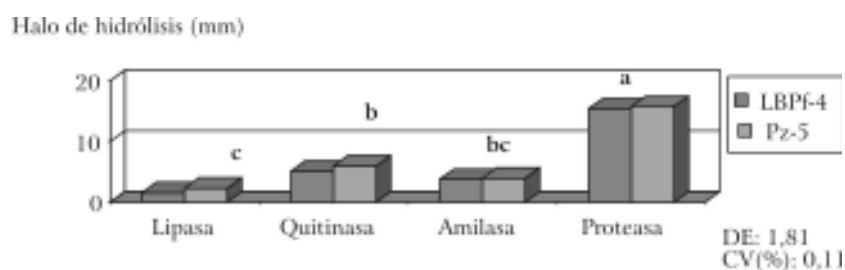


Figura 2. Halo de hidrólisis en la producción de diferentes enzimas de LBPf-4 y de Pz-5.

Fargues *et al.* (1980) expresan que desde que el hongo se pone en contacto con su hospedante y se encuentra como primer obstáculo la quitina presente en la cutícula, hasta que invade la hemolinfa, este es capaz de producir toxinas letales. Las enzimas como la quitinasa, lipasa, proteasa y amilasa, juegan un papel muy importante en todo este mecanismo de acción de los entomopatógenos.

De este complejo campo enzimático se puede afirmar que la secreción de enzimas durante los primeros estados del desarrollo de un hongo no siempre es condición suficiente para asegurar la penetración al tegumento. Estas características enzimáticas no sólo dan la idea

de las capacidades patogénicas, sino también indican que se pueden utilizar para su reproducción, sustratos ricos en lípidos, proteínas y almidón [López, 1995].

Los resultados indican que tanto el aislado LBPf-4 como el Pz-5 utilizan el nitrógeno, ya sea en forma inorgánica (NH_4) o en forma orgánica (peptona), sin que existan diferencias significativas en la fuente orgánica, aunque sí en la inorgánica, que se observa mayor esporulación en Pz-5 que en LBPf-4. También existen diferencias significativas entre ellas en cuanto a su crecimiento en estas fuentes.

En la Fig. 3 podemos observar que los dos manifiestan un mejor crecimiento y esporulación en el medio compuesto

por peptona al 1%; sin embargo, el comportamiento en el medio donde la fuente de nitrógeno es un compuesto inorgánico fue menor.

Se coincide con los resultados de Jenkins *et al.* (1988), los cuales plantean la importancia de considerar la fuente de

nitrógeno y su proporción como elemento clave en la obtención de un biopreparado efectivo. Específicamente para *M. anisopliae* se han realizado estudios de patogenicidad sobre insectos, y se conoce que el microorganismo crece bien sobre diferentes sustratos, aun sin nitrógeno orgánico como inorgánico citado por Luján (1988).

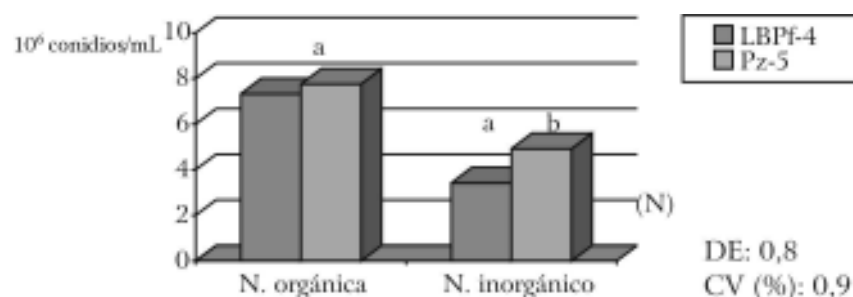


Figura 3. Utilización de nitrógeno orgánico e inorgánico por los aislados LBPf-4 y Pz-5.

Todas las fuentes de carbono utilizadas estimularon el desarrollo de las colonias en comparación con el testigo, aunque las que mejores resultados obtuvieron fueron la glucosa y la lactosa, seguidos en este orden por el almidón, la fructuosa, la arabinosa, la sacarosa y la

melaza. Los menores niveles de crecimiento se observaron al usar la maltosa y la galactosa. No existen diferencias significativas entre Pz-5 y LBPf-4 al comprobar el crecimiento micelial ante diferentes fuentes de carbono (Fig. 4).

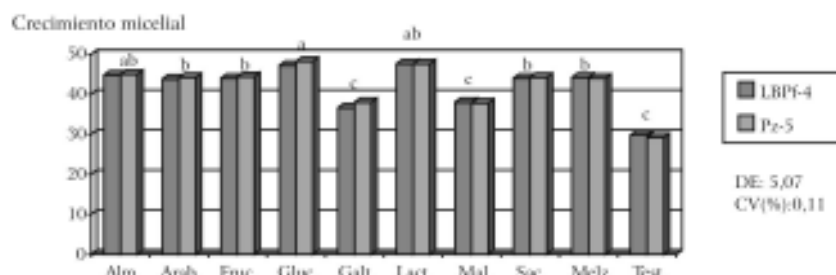


Figura 4. Influencia de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento micelial de Pz-5 y LBPf-4.

El hongo se puede reproducir en algunos medios de cultivo, aunque existen sustratos sólidos que pueden serle también nutritivos [Jenkins *et al.*, 1994]. Una de las ventajas ofrecidas por el uso de los sustratos no nutritivos es la oportunidad de escoger y adicionar los nutrientes al sustrato para la esporulación óptima del aislado obtenido. El sustrato que comúnmente se selecciona para la producción de conidios de *P. fumosoroseus* ha sido el arroz descascarado [Ibrahim *et al.*, 1993; Milner *et al.*, 1993].

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos nuevos aislados que se identificaron como *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, siendo nombrados Pz-5 y LBPf-4.

- Se determinó un crecimiento óptimo a 25°C, y a esta misma temperatura se obtuvo el mayor porcentaje de germinación con 96,4 % tanto para Pz-5 como LBPf-4. El pH del medio de cultivo tuvo un óptimo de 6,5.
- Se demostró que los mejores valores de crecimientos miceliales y esporulación para Pz-5 y LBPf-4 se obtienen cuando las placas son incubadas con el régimen de oscuridad continua.
- Los aislados Pz-5 y LBPf-4 son capaces de producir las enzimas estudiadas, así como utilizan el nitrógeno, tanto en forma orgánica como inorgánica, y todas las fuentes de carbono probadas estimulan el crecimiento del micelio.

REFERENCIAS

- Bordat, D.; P. Robert; M. Renand: «Susceptibility of *Liriomyza trifolii* (Burgues) and *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera:Agromyidae) to Eleven Strains of Entomopathogenic Fungi», *Agron Trop.* 43 (1):68-73, 1988.
- Brady, B.: «Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria». No 614, 1979
- Domsch, K. H.; W. Gams; T. H. Anderson: *Compendium of Soil Fungi*, Academic Press, 1980.
- Fargues, J.; D. Rodríguez: «Sensibilité des larvas de *Spodoptera littoralis* (Lep:Noctuidae) aux hiphomycetes entomophogenes, *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumosoroseus*. Entomophytourus fungi», *J. invertebr. Pathol.* 11:70-81, 1980.
- Fernández-Larrea, O.: «Microorganismos y antagonistas. Posibilidades de producción», *Boletín Técnico*, INISAV, 1995.
- Figueroa, L. M.; A. Varela; D. Corredor: «Evaluation of Isolates of the Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with Relation to Their Physiology and Effectiveness in the Control of *Frankliniella occidentalis*». Program and abstracts, XXXIII Meeting, August 13-18, 2000, University of Guanajuato, México, p. 40.
- Hall, R. A.: «Control of Whitefly, *Trialeurodes v* and Cotton Aphid *Aphis gossypii* in Glashouse by Two Isolates on the Fungus *Verticillium lecanii*», *Annals of Applied Biology*, 101, 1-11, 1982.
- Hall, R. A.; D Perkin; B. Ali: «Fungal Control of Whitefly, *Thrips palmi* and Sugarcane Froghopper in Trinidad Tobago». VI International Colloguium on Interthrate Pathology and Microbial Control, 1995.
- Harrigan, W. P.; H. R. Mac Cance: *Métodos de laboratorio en microbiología*, Ed. Academia León, España, 1968.
- Ibrahim, Y. B; W. Low: «Potential of Mass-Production and Field Efficacy of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Against *Plutella xylostella*», *International Journal of Pest Management* 39, 288-292, 1993.
- Inglis, P. W; M. S. Tigano; M. C. Valadares: «Transformation of the Entomopathogenic Fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus*» (Deuteromycotina:Hyphomycetes) to Benomyl Resistance, 1999.
- Jenkins, N. E.; C. J. Lomer: «A Novel System for the Mass Production of Aerial Conidia of *Metarhizium flavoviridae*». International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animal and Plants. *West Palaearctic Regional Section Bulletin*. 17(3), 181-184, 1994.
- Jenkins, N. E.; G. Heviefio; J. Langewald; A. Cherry; C. Lomer: «Development of Mass Production Technology for Aerial Conidia for Use As Mycospesitcides», *Biocontrol News and Information* 19 (1):21-31, 1998.
- Kenneth, J. C.: «Biological Control Strategies for Suppression of Termites», *J. Agric. Entomol.* 14(3):281-289, Jul., 1997.
- Lecuona, R.; G. Riba: «Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos», *Boletín de Divulgación Técnica* 37, 4-30, 1991.
- Lecuona, R.: «Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas», Buenos Aires, febr., 1996.
- Lezama-Gutiérrez, R.; R. Alatorre-Rosas; F. Sánchez-García: «Evaluación de cepas de *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)», *Vedalia, Revista Internacional de Control Biológico*, México 1(1):19-22, jun., 1994.
- López, M. C.: «*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson: «Caracterización, reproducción y obtención de un biopreparado como efecto nematocida». Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, 1995.
- López, M. C; O. Fernández-Larrea; N. Gómez: «*Metarhizium anisopliae*: nueva vía de obtención», INISAV, 1996.
- Luján, M.: «Importancia del hongo *Metarhizium anisopliae* como insecticida microbiológico en el control de plagas nocivas», *Boletín de Reseñas. Protección de Plantas* 27-28, 1988, pp. 5-26.
- Marchal, M.: «Contribution a l'étude de la biologie de *Otiiorhynchus sulcatus*. F (Col:Cucurionidae) invertaire, incidence et perspectives d'utilisation des Champignons entomopathogenes. Suivie d'une mise au poit monographique sur le genre *Otiiorhynchus*», Paris 56, 1987.
- Marshall, W. J.: *IPM of Thrips palmi in vegetables*, Plenum Press, Nueva York, 1995.
- Mietkiewski, R.; C. Tkaczuk; T. Badowska-Czubik: «Entomogenous Fungi Isolated from Strawberry Plantation Soil Infested by *Otiiorhynchus ovalus* L.», *Plant Protection* 22 (1-2):39-46, 1993.
- Milner, R. J.; D. J. Rogers; C. M. McRae; R. J. Huppatz; H. Brier: «Preliminary for Control of Peanut Scarabs», *Pest Control Unsustainable Agriculture*, CSIRO, Melbourne, Australia, 1993, pp. 253-255.
- Norma Cubana: «Método de ensayo. Biopreparado de entomopatógenos», *Bioteconología Agrícola* 72-02, may., 1993.
- Ochiel, G. R. S.: «Biology and Bio-control Potencial of *Cordycepsioideus bisporus* Stifler and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith on the Higher Termites *Macrotermes subhyalinus* Rambur in Kenya», KVL, Copenhagen, Dinamarca, 1995.
- Osborne, L. S.; Z. Landa: «Biological Control of Whiteflies with Entomopathogenic Fungi», *Florida-Entomologist*. 75(1):156-171, 1992.
- Riba, G.: «Contribution á l'étude génétique de quelques Hyphomycetes entomopathogènes». Tesis pour obtenir le grade de Docteur d'état. 65-67, 19 mars, 1985.
- Riba, G; C. Silvy: «Combattre les ravageurs des culture, enjeux et perspective», INRA, 1989.
- Samson, R. A.: «*Paecilomyces* and Some Allied Hyphomycetes», Institute of the Royal Netherlands, Academy of Letters, Jun., 1974.
- Sosa-Gómez, D. R.; M. S. Tigano-Milano; O. N. Arantes: «Caracterização de entomopatógenos», *Controle microbiano de insectos*, cap. 22, Piracicaba, FEALD, USP,1075-1095, 1998.
- Suzuki, K.: «Laboratory Trial of Biological Control Agents Against Subterranean Termites», *Internat. Res. Group. Wood Preserv. Doc.* No. IRG/WP/1475:1-11, 1991.
- Szabó, L. M.: *Microbial Communities in Forest Rendsina-Ecosystem*, Academia Klado. Budapest, 1974, pp. 275-325.
- Tigano-Milani, M. S.; R. J. Honeycutt; L. A. Lacey; R. Assis; M. McClelland; B. W. S. Sobral: «Genetic Variability of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates Revealed by Molecular Markers», *J. Invertebr. Pathol.*, May, 1995. 65 (3):274-282.
- Thomas, M. B.; N. E. Jenkins: «Effects of Temperature on Growth of *Metarhizium flavoviridae* and Virulence to the Variegated Grasshopper *Zonocerus variegates*», *Mycological Research* 101, 1469-174, 1997.
- Zimmermann, G. «The "Galleria Bait Method" for Detection of Entomopathogenic Fungi in Soil», *Z. Anew. Entomol.* 102, 213-215, 1996.